



# **Cambios bioquímicos generados en la vitelogénesis y desarrollo embrionario de arañas**

**Tesis Doctoral**

Lic. Sofía Micaela Romero

**Directores**

Dr. Fernando Garcia

Dra. Mónica Cunningham



Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
Universidad Nacional de La Plata  
2021



*El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Naturales, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas-UNLP, bajo la dirección del Dr. Fernando Garcia y la Dra. Mónica Cunningham*



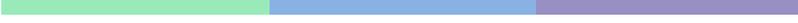


### **Dedicado a...**

Mis padres, Mónica y Jorge, por su amor, compañía y por todo el sacrificio y esfuerzo que hicieron para darnos siempre lo mejor. Gracias por esta familia pincharrata, por sus valores, su apoyo y su contención inigualable. Por enseñarme a que debo dar lo mejor de mí, que todo se gana con esfuerzo y dedicación, y que tarde o temprano... todo llega. ¡Son mi gran orgullo!

A mi hermano Sebastián, por su incondicionalidad más allá de cualquier distancia, por brindarme largas charlas, momentos inolvidables y por su optimismo a prueba de cualquier adversidad. Gracias por no juzgarme sino aconsejarme, por ser paciente conmigo y por tu cariño ilimitado. Sos mi gran ejemplo de dedicación, esfuerzo y voluntad, algo que dejaste bien reflejado al darle forma, color y vida a esta tesis. Bro, te adoro, te respeto y te admiro profundamente.

*"Y cuando el libro de mi vida se cierre,  
mi familia será el capítulo más bello"*





En memoria de...

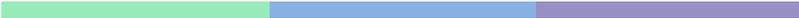
*Sara Catalina Ben*

Mi abuela, mi nona, mi Sarita...

Por su esfuerzo, sacrificio, fortaleza y su inmenso cariño. Por su fuente inagotable de anécdotas que vivirán siempre conmigo.

Te extraño, te recuerdo y te sonrío...

Gracias por tanto amor nona.



## **Mi agradecimiento...**

A la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme llevar a cabo y financiar el presente trabajo de tesis doctoral.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, por ser mi segundo hogar durante tantos años y por brindarme la educación pública y gratuita que me permitió crecer personal y profesionalmente durante mi formación de grado y de posgrado.

A la docencia y a la extensión universitaria, que me apasionan, me desafían y me llenan de satisfacciones, como también a todas las cátedras y proyectos que me dieron un espacio, confiaron en mi y me permitieron desarrollarme como docente.

A mi grupo de trabajo... A mis directores, Dr. Fernando Garcia y la Dra. Mónica Cunningham por abrirme las puertas, por su apoyo incondicionales, por su paciencia y su gran optimismo. Por cada minuto que me brindaron de su valioso tiempo, por enseñarme todo lo que sé, por sus innumerables consejos y su compañía en los momentos más duros. Gracias por no dejarme bajar los brazos, por enseñarme que cada paso es importante y que con esfuerzo y constancia toda meta se alcanza. A la Dra. Aldana Laino por la generosidad de brindarme su tiempo, de transmitirme todos sus conocimientos y por impulsarme a mejorar cada día un poco más. Por prestarme su oído y brindarme unas palabras y su apoyo en los momentos más difíciles, y por regalarme un sin fin de carcajadas y anécdotas. Al Lic. Gabriel Molina, por brindarme las charlas más interesantes que un almuerzo podría tener, por compartir sus conocimientos y ser parte de este trayecto. A todos ustedes, gracias por estos años de aprendizaje, de contención y por soportar mi locura y desparpajo... este trabajo de tesis no podría haber sido posible sin ustedes.

Al INIBIOLP, que me dio el lugar y me acompañó durante toda la tesis... A Romina y Marianela por su ayuda con los Western Blot, su generosidad y su cariño. A Juan y Sergio, por su paciencia de oro y por brindarme su valioso tiempo cada vez que lo necesité, especialmente con el cromatógrafo. A Graciela, por sus consejos y su ayuda para el análisis de las muestras de ácidos grasos. A Juan Manuel, por cuidar los animales para obtener los anticuerpos. A Mario, por su paciencia y su trabajo con los diseños de los gráficos de cada uno de los trabajos publicados. Al laboratorio 11 y al 8 bis por ser tan generosos al compartirme su espacio y su tiempo siempre que lo necesité, y por brindarme unos buenos mates en los días largos de espectrofotómetro y de revelado. A Romi, Marli y Lu por su amistad, por escucharme, apoyarme, aconsejarme y acompañarme en las largas jornadas interminables de mesada, y estar ahí conmigo cada vez que lo necesité, dentro y fuera del instituto... A todo el personal del INIBIOLP les agradezco por las charlas entre pasillo, los mates y almuerzos compartidos, los consejos y el apoyo que recibí a lo

largo de todos estos años.

A todo el laboratorio de arcnología del CEPAVE, por brindarme su tiempo, prestarme sus instalaciones y su material para obtener varias de las imágenes de la tesis.

A la Dra. Florencia Arrighetti, por el aporte histológico y por su generosidad al brindarme su tiempo y compartir conmigo todos los detalles que fueron necesarios para esta tesis.

A la Dra. Marie Tralalon, por transmitirme todos sus conocimientos acerca de las arañas, por brindarme momentos inolvidables, por su gran generosidad y su inmenso cariño.

A los jurados de la tesis, el Dr. Ramírez, el Dr. Rodríguez y el Dr. Ronderos por todos sus comentarios y observaciones que permitieron mejorar la tesis, aportando cada uno a partir de su área de conocimiento todo lo necesario para enriquecerla.

A Sebi, por su cariño, su apoyo, su compañía y su incondicionalidad a lo largo de todos estos años. Por ser una fuente inagotable de chistes que sacan sonrisas, por prestarme siempre su oído y dejarme un sin fin de frases y consejos de oro, por ser un gran sostén y un empuje en los momentos más duros y dolorosos. Por sus llamados de atención tan necesarios, por sus abrazos de refugio, por los llantos y las risas de locos, por miles de momentos compartidos y por todo lo aprendido. Sebi, gracias por estar siempre a mi lado más allá de cualquier distancia y por creer en mi, incluso cuando a veces ni siquiera yo lo hago.

A Mechi, por ser mi gran confidente y una amiga incondicional. Por escucharme, por apoyarme siempre, por entenderme mejor que nadie y por ser mi hermana del alma. Por estar en cada paso, sosteniéndome en las malas y festejando conmigo en las buenas. ¡Amiga sos de oro!

A mi amado "Plantófilos y cols.", "Círculo Rojo" o "Feriado Lovers" por su apoyo, su amistad y contención. Gracias por sacarme una sonrisa y darme un hombro en los momentos más difíciles, por ser un gran sostén, un refugio y una fuente inagotable de cariño para esta persona.

A mis "Laguneros" por tantos años de experiencia, anécdotas inolvidables y viajes compartidos y en especial a mi querida Andre... lagunera con una fortaleza y dedicación admirable, quien confió siempre en nosotros y nos brindó su cariño. Andre gracias por abrirme las puertas, por tu buena onda y por impulsar siempre a tus laguneros, y aunque hoy no estés más con nosotros tu dedicación, empuje y cariño nos va acompañar siempre.

A Juan, Eugin y Rita, por enseñarme que la amistad no entiende de edades ni de estilos de vida, por estar siempre presentes, alegrándonos de los éxitos y riéndonos para curar las penas.

A Pablo, mi ahijado, mi hermano del corazón y mi gran compinche por su compañía, por entendernos como solo nosotros nos entendemos y por compartir momentos únicos que siempre los llevaré conmigo.

A mi Bambi, Bambino o Bambam, por los 17 años de macanas, amor y risas que le ha regalado a esta familia.

A mi familia y amigos de la familia, Nuevejulienses, Platenses y Nicoleños, y a mis amigos que estuvieron ahí siempre, ofreciéndome todo su apoyo, impulsándome para lograr mis objetivos, sosteniéndome en las malas y festejando conmigo los pequeños y grandes logros. A todos ellos les pido perdón por no haber podido estar siempre y les agradezco por brindarme tanto amor y cariño y por nunca haberme dejado más allá de las distancias, de mis horarios extraños y mis ánimos cambiantes.

A todas las incertidumbres y miedos que me acecharon, a todas las piedras que hubo en el camino, y también a las que vendrán, por enseñarme que las derrotas no me definen... solo me define el valor con el que me vuelvo a levantar.

*A todos... ¡gracias!*

Los resultados presentados en este trabajo de tesis, han sido parcialmente publicados en:



Romero, S., Laino, A., Arrighetti, F., Cunningham, M., Garcia, C. F. (2018).

**First study on lipid dynamics during the female reproductive cycle of *Polybetes pythagoricus* (Araneae: Sparassidae).** Canadian Journal of Zoology, 96(8), 847-858. DOI: 10.1139/cjz-2017-0222



Romero, S., Laino, A., Arrighetti, F., García, C. F., Cunningham, M. (2019).

**Vitellogenesis in spiders: first analysis of protein changes in different reproductive stages of *Polybetes pythagoricus*.** Journal of Comparative Physiology B, 189(3-4), 335-350. DOI: 10.1007/s00360-019-01217-9

Romero, S., Laino A., Molina G.; Cunningham, M., García, C. F. (2021).

**Embryonic and post-embryonic development of the spider *Polybetes pythagoricus* (Sparassidae): A biochemical point of view.** Enviado para publicar.



**El presente trabajo de tesis fue diseñado por el  
Diseñador en Comunicación Visual Sebastián Romero.**

*Sebastián Romero*

[www.sebastianromero.tv](http://www.sebastianromero.tv)



# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	5

## **I** **Introducción**

<b>I.1 Consideraciones generales de artrópodos</b> .....	8
<b>I.2 Generalidades de arácnidos</b> .....	8
<b>I.3 Las arañas</b> .....	10
I.3.A Consideraciones morfológicas generales .....	11
I.3.B Sistema digestivo .....	12
I.3.C Sistema circulatorio .....	13
I.3.D Sistema reproductor .....	14
I.3.D.a Generalidades de los órganos sexuales externos	
I.3.D.b Generalidades de los órganos sexuales internos	
I.3.E Generalidades del desarrollo de arañas .....	16
I.3.E.a Construcción de ootecas y cuidado maternal	
I.3.E.b Generalidades del desarrollo embrionario y postembrionario	
<b>I.4 Generalidades de <i>Polybetes pythagoricus</i></b> .....	18
I.4.A Generalidades de la especie .....	18
I.4.B Distribución de la especie .....	19
I.4.C Generalidades del desarrollo de la especie .....	19
<b>I.5 Vitelogénesis en artrópodos</b> .....	22
I.5.A Generalidades de la vitelogénesis en insectos .....	23
I.5.B Generalidades de la vitelogénesis en crustáceos .....	24
I.5.C Generalidades de la vitelogénesis en quelicerados .....	25
<b>I.6 Lipoproteínas en artrópodos</b> .....	26
I.6.A Lipoproteínas no ligadas al sexo .....	26
I.6.B Lipoproteínas circulantes ligadas al sexo: Vitelogeninas .....	28
I.6.C Lipovitelininas .....	30
I.6.D Lipoproteínas y lipovitelininas de <i>Polybetes pythagoricus</i> .....	32
<b>I.7 Hemocianina</b> .....	33
I.7.A Estructura de la hemocianina en artrópodos .....	35
I.7.B Vinculación de la hemocianina con la vitelogénesis y sus funciones secundarias .....	36

<b>II</b>	<b>Objetivos generales</b> .....	39
<b>III</b>	<b>Materiales y métodos</b>	
<b>III.1</b>	<b>Obtención y mantenimiento de ejemplares de <i>Polybetes pythagoricus</i></b> .....	40
	III.1.A Sitio de muestreo y obtención de ejemplares jóvenes y adultos .....	40
	III.1.B Captura de los ejemplares y su mantenimiento en el laboratorio .....	40
<b>III.2</b>	<b>Análisis de adultos de <i>Polybetes pythagoricus</i></b> .....	41
	III.2.A Obtención de medidas generales de machos y hembras adultos .....	41
	III.2.B Extracción de hemolinfa y disección de los órganos .....	42
	III.2.C Homogeneización y centrifugación de los tejidos de adultos .....	42
	III.2.D Cálculo del índice gonadosomático e índice hepatosomático .....	43
	III.2.E Análisis histológico de los ovarios .....	43
	III.2.E.a Fijación de las muestras	
	III.2.E.b Inclusión en resina	
	III.2.E.c Cortes de las muestras y preparación de los portaobjetos	
	III.2.E.d Tinción con hematoxilina - eosina y obtención de las medidas	
<b>III.3</b>	<b>Análisis del desarrollo de <i>Polybetes pythagoricus</i></b> .....	46
	III.3.A Obtención de las ootecas y su mantenimiento en el laboratorio .....	46
	III.3.B Determinación de los grupos experimentales .....	46
	III.3.C Medidas generales .....	47
	III.3.C.a Medidas de la ooteca	
	III.3.C.b Peso húmedo y peso seco de los individuos	
	III.3.C.c Cálculo de la velocidad de desplazamiento de los juveniles	
	III.3.C.d Homogeneización y centrifugación de las muestras	
<b>III.4</b>	<b>Aislamiento de lipoproteínas hemolinfáticas y lipovitelinas de <i>Polybetes pythagoricus</i></b> .....	49
	III.4.A Ultracentrifugación en gradiente de densidad y fraccionamiento .....	49
	III.4.B Medidas efectuadas en las fracciones obtenidas de la ultracentrifugación .....	50
<b>III.5</b>	<b>Análisis de los lípidos</b> .....	51
	III.5.A Obtención de lípidos totales .....	51
	III.5.B Cuantificación de lípidos totales por gravimetría .....	52
	III.5.C Microdeterminación de lípidos .....	53
	III.5.C.a Confección de las curvas de calibración	
	III.5.C.b Desarrollo de la cromatografía	
	III.5.C.c Cuantificación	
	III.5.D Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido (GLC) .....	55
	III.5.D.a Saponificación de los lípidos y derivatización de ácidos grasos	
	III.5.D.b Identificación de los ácidos grasos	
<b>III.6</b>	<b>Análisis de las proteínas</b> .....	56
	III.6.A Cuantificación de proteínas totales .....	56

III.6.B Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) .....	57
III.6.C Revelado de las proteínas y determinación de los pesos moleculares .....	58
III.6.D Obtención de anticuerpos policlonales anti-LV y anti-Hc en ratas .....	58
III.6.E Western Blot .....	59
III.6.E.a Transferencia electroforética ("Electroblotting")	
III.6.E.b Electroquimioluminiscencia	
III.6.F Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) .....	61
III.6.G Obtención de las secuencias N-terminal .....	62
<b>III.7 Determinación del contenido de glucógeno</b> .....	63
<b>III.8 Análisis estadístico</b> .....	64

## **IV Análisis de la vitelogénesis en *Polybetes pythagoricus***

<b>IV.1 Introducción</b> .....	65
<b>IV.2 Aspectos generales</b> .....	67
IV.2.A Resultados .....	68
IV.2.A.a Mediciones generales	
IV.2.A.b Índice gonadosomático e índice hepatosomático	
IV.2.A.c Análisis histológico del ovario	
IV.2.B Discusión .....	72
<b>IV.3 Caracterización lipídica</b> .....	74
IV.3.A Resultados .....	74
IV.3.A.a Concentración de lípidos totales	
IV.3.A.b Composición lipídica	
IV.3.A.c Análisis de ácidos grasos	
IV.3.B Discusión .....	85
<b>IV.4 Caracterización proteica</b> .....	90
IV.4.A Resultados .....	90
IV.4.A.a Concentración de proteínas solubles	
IV.4.A.b Caracterización proteica	
IV.4.A.c Secuencias extremo N-terminal	
IV.4.A.d Cuantificación de hemocianina	
IV.4.B Discusión .....	98
<b>IV.5 Conclusiones generales</b> .....	104

## **V Análisis bioquímico del desarrollo de *Polybetes pythagoricus***

<b>V.1 Introducción</b> .....	105
<b>V.2 Aspectos generales</b> .....	107
V.2.A Resultados .....	107
V.2.A.a Etapas del desarrollo de <i>Polybetes pythagoricus</i>	
V.2.A.b Viabilidad de los individuos	
V.2.A.c Número de individuos y mediciones generales	

V.2.B	Discusión .....	111
<b>V.3</b>	<b>Caracterización lipídica</b> .....	112
V.3.A	Resultados .....	113
	V.3.A.a Concentración de lípidos totales	
	V.3.A.b Composición lipídica	
	V.3.A.c Análisis de los ácidos grasos	
V.3.B	Discusión .....	119
<b>V.4</b>	<b>Caracterización proteica y concentración de carbohidratos</b> .....	123
V.4.A	Resultados .....	124
	V.4.A.a Concentración de proteínas solubles y caracterización proteica	
	V.4.A.b Cuantificación de lipovitelina y hemocianina	
	V.4.A.c Cuantificación de glucógeno	
V.4.B	Discusión .....	129
<b>V.5</b>	<b>Conclusiones generales</b> .....	132
<b>VI</b>	<b>Conclusiones y consideraciones finales</b> .....	133
	<b>Bibliografía</b> .....	136

# Abreviaturas

**AGL:** ácidos grasos libres

**COL:** colesterol

**Cu:** cobre

**DAG:** diacilgliceroles

**DE:** desvío estándar

**DI:** divertículos intestinales

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**EE:** esteroides esterificados

**ELISA:** ensayo inmunoabsorbente  
ligado a enzimas

**EMAG:** ésteres metílicos de ácidos  
grasos

**FID:** detector de ionización de llama

**G:** gónadas

**GLC:** cromatografía gas-líquido

**H:** homogenato de huevos

**Hc:** hemocianina

**HC:** hidrocarburos

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HL:** hemolinfa

**IgG:** inmunoglobulina G

**IGS:** índice gonadosomático

**IHS:** índice hepatosomático

**kDa:** kilodalton

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**Lp:** lipoforina

**LV:** lipovitulina

**MAG:** monoacilgliceroles

**MUFA:** ácidos grasos monoinsaturados

**Mus:** músculo

**Ov:** ovario

**PAGE:** electroforesis en gel de  
poliacrilamida

**PBS:** buffer fosfato salino

**PC:** fosfatidilcolina

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PostV:** postvitelogenicas

**PreV:** previtelogenicas

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados

**PVDF:** polivinilidenofluoruro

**SDS:** dodecilsulfato de sodio

**SFA:** ácidos grasos saturados

**SM:** esfingomielina

**Std:** estandar de peso molecular

**TAG:** triacilgliceroles

**TEMED:** tetrametiletildiamina

**Test:** testículos

**TLC-FID:** cromatografía en capa fina  
acoplada a un detector de ionización  
de llama

**V:** vitelogenicas tardías

**Vg:** vitelogenina

**VHDL:** lipoproteína de muy alta  
densidad

**Vn:** vitelina

**Vt:** vitelogenicas tempranas

# Resumen

En los animales ovíparos, la vitelogénesis representa el proceso mediante el cual las hembras acumulan en los oocitos todos los recursos necesarios que finalmente serán transferidos a los huevos. Este proceso en el que intervienen diferentes tipos de biomoléculas garantiza que todos los recursos acumulados permitan el desarrollo adecuado de la descendencia. A pesar de la importancia de este proceso que fue ampliamente estudiado en distintos grupos de artrópodos, el conocimiento sobre el mismo es verdaderamente escaso para un grupo tan diverso e importante como son las arañas.

Una característica destacable de las arañas es que sus huevos nunca quedan expuestos directamente al ambiente, siendo protegidos por un cocón de seda que las mismas madres construyen. Debido a la presencia de esta estructura, dentro de este cocón de seda también transcurren el desarrollo de estadios postembrionarios. De esta manera, todos los recursos acumulados durante la vitelogénesis serán necesarios para suplir no solo los requerimientos energéticos del desarrollo embrionario, sino también los de los estadios postembrionarios y las actividades de emergencia, dispersión, y otras actividades postemergentes hasta que los juveniles puedan alimentarse.

A partir de lo expuesto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue analizar el proceso de vitelogénesis en la especie *Polybetes pythagoricus* determinando cuali y cuantitativamente los recursos principales que las hembras almacenan y destinan a los huevos y analizando las variaciones de las principales biomoléculas en los órganos implicados en la formación del vitelo. Asimismo, con el propósito de vincular el proceso de vitelogénesis con el proceso de desarrollo, se analizó el consumo de los distintos recursos durante el desarrollo embrionario, postembrionario y estadios postemergentes de *P. pythagoricus*.

En primer lugar, se determinó a partir de un análisis morfológico, morfométrico e histológico los distintos estadios de la vitelogénesis analizados. Las hembras se clasificaron en cuatro estadios: previtelogénicas, vitelogénicas

tempranas, vitelogénicas tardías y, luego de la puesta, postvitelogénicas. A partir de este análisis se observó un aumento del peso corporal de las hembras y de los ovarios. A partir de estas medidas, se calculó el índice gonadosomático que resultó ser un buen parámetro para determinar el estado reproductivo de las hembras. Por otra parte, se observó un aumento en el diámetro de los oocitos y la acumulación y aumento de tamaño de los gránulos de vitelo.

Posteriormente, aplicando técnicas cromatográficas, se realizó la caracterización de los lípidos y ácidos grasos de los principales órganos y/o tejidos de las hembras de los diferentes estadios analizados. Se analizó la variación de estos componentes durante la vitelogénesis observándose una acumulación considerable de lípidos en los ovarios. Dentro de estos componentes, se destacó la acumulación de fosfatidiletanolamina y, en menor medida, de fosfatidilcolina y triacilgliceroles, como también se observó un aumento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Además, se pudo observar que los huevos presentaban el mismo perfil lipídico que los ovarios, siendo a su vez comparable con el contenido de lípidos previamente reportado para las lipovitelinas de esta especie. Luego de la puesta, se observó una disminución en el contenido total de lípidos en todos los órganos y/o tejidos analizados de las hembras postvitelogénicas, alcanzando valores comparables a los de las hembras previtelogénicas y machos. Durante este período, se observó una disminución particular en el contenido de los triacilgliceroles en los divertículos intestinales de las hembras, lípidos que fueron previamente destacados como componentes mayoritarios de este órgano.

Mediante la aplicación de técnicas colorimétricas y electroforéticas, se cuantificó el contenido de proteínas y se determinó su variación durante la vitelogénesis. A partir de este análisis se pudo observar la acumulación progresiva de varias proteínas. Mediante la aplicación de inmunoensayos se demostró la presencia de ciertas proteínas que compartían identidad inmunológica con las lipovitelinas y la hemocianina, la cual se acumuló progresivamente en los ovarios. Mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal se pudo comprobar la presencia de hemocianina en los huevos, la cual se distinguió como componente de una de las lipovitelinas. A partir de los resultados obtenidos con la metodología aplicada, se pudo determinar que los componentes proteicos de las lipovitelinas de *P. pythagoricus* presentan polipéptidos que provendrían principalmente del ovario y, en menor medida, del aporte de los divertículos intestinales y de la hemolinfa (hemocianina).

Aplicando las mismas técnicas previamente mencionadas, se determinó el consumo de los diferentes recursos durante el desarrollo embrionario, postembrionario y en estadios emergentes de *P. pythagoricus*. Para esto se determinó cuali y cuantitativamente la variación de los lípidos y ácidos grasos

en los diferentes estadios, los cuales se compararon con estadios juveniles de desarrollo avanzado y con adultos. A partir de este análisis, se determinó que los fosfolípidos son el principal recurso lipídico consumido durante el desarrollo postembrionario, mientras que los triacilgliceroles se consumen luego de que los juveniles emergen de la ooteca y se dispersan. A su vez, durante estos períodos de consumo se observó un aumento en la concentración de ácidos grasos libres. También se analizó y cuantificó el contenido de glucógeno, el cual representó menos del 1% de las reservas y se consumió de manera gradual a partir del período postembrionario. También se determinó y cuantificó el contenido de las reservas proteicas de las lipovitelinas que se consumieron de manera gradual y diferencial durante el desarrollo, agotándose luego de la dispersión. Por último, se cuantificó el contenido de hemocianina el cual aumentó a partir de estadios postembrionarios avanzados.

Finalmente, los resultados obtenidos en el marco de esta tesis han brindado una nueva fuente de información que amplía el conocimiento acerca de *P. pythagoricus*, un modelo de araña en el que se han analizado por más de 20 años diferentes aspectos bioquímicos y fisiológicos. De esta manera, a través de distintos abordajes metodológicos, esta tesis ha permitido reconocer los diferentes recursos que las hembras destinan a la producción de huevos y el consumo de los mismos durante el desarrollo. Este aporte permite vincular por primera vez para un modelo de araña dos procesos biológicos esenciales, como son la vitelogénesis y el desarrollo para este grupo de artrópodos.

# Abstract

In oviparous animals, vitellogenesis represents the process through which the females accumulate in the oocytes all the necessary resources that will eventually transfer to the eggs. This process in which different types of biomolecules are involved ensures the adequate development and survival of offspring by using the resources accumulated. The vitellogenesis has been widely studied in several arthropods, although current knowledge about spiders' vitellogenesis is scarce despite its importance and their diversity.

A remarkable feature of spiders is that eggs are never directly exposed to the environment since they are protected by a silk cocoon that the mother builds. Because of this, some postembryonic stages develop inside this silk cocoon so that all resources accumulated during vitellogenesis will be necessary both to supply the energetic requirements of embryonic development and the energy demand of the postembryonic stages like the emergence, dispersal, and other post-emergence activities until spiderlings can feed.

To improve the knowledge about this process, the general objective of this thesis was to analyze the process of vitellogenesis in *Polybetes pythagoricus*, determining qualitatively and quantitatively the main resources that females store and provide to eggs. Furthermore, the variations of the main biomolecules in the organs involved in the yolk formation were analyzed. Likewise, to link the vitellogenesis process with the development one, the consumption of the different resources along the embryonic, postembryonic, and post-emergence stages of *P. pythagoricus* development was analyzed.

First of all, the different stages of the vitellogenesis process were determined from the morphological, morphometric, and histological analysis. Females were classified into four stages: previtellogenic, early-vitellogenic, late vitellogenic, and after egg-laying, the postvitellogenic one. The results showed an increase in the total mass of the females and the ovaries. Through these measurements, the gonadosomatic index was calculated, which turned out to be a good parameter

to determine the reproductive state of the females. On the other hand, it was observed an increase in both the diameter of oocytes and the storage and size of the yolk granules.

Afterward, the characterization of lipids and fatty acids in the main organs and/or tissues of the different females' analyzed stages were carried out applying chromatographic techniques. The variation of these components along the different stages of the vitellogenesis was analyzed, and as a result, an increase and accumulation of lipids in the ovaries was observed. Among these components, a great accumulation of phosphatidylethanolamine and, to a lesser extent, of phosphatidylcholine and triacylglycerols was observed, as well as an increase in the content of polyunsaturated fatty acids. At the same time, the same lipid profile was observed in the eggs, which was comparable with the lipid content previously reported for the lipovitellins of this species. A decrease in the total content of lipids in all the analyzed organs and/or tissues of the postvitellogenic females was observed after laying, whose values reached comparable to those of the previtellogenic females and the males. During this period, there was a particular decrease in the content of triacylglycerols in the midgut diverticula of the postvitellogenic females, kind of lipids that were previously reported as major components of this organ.

The content of proteins was quantified and variation during vitellogenesis was determined by applying colorimetric and electrophoretic techniques. From this analysis, it was possible to determine the progressive accumulation of several proteins. Through immunoassay techniques, the presence of certain proteins that shared immunological identity with lipovitellins and hemocyanin was demonstrated, and the latter was accumulated progressively in the ovaries. The analysis of the N-terminal amino acid sequence proved the presence of hemocyanin in eggs which was identified as a component of one of the lipovitellins. From the results obtained, it could be determined that the different subunits of *P. pythagoricus* lipovitellins present polypeptides that would mainly originate from the ovary and, to a lesser extent, from the midgut diverticula and the hemolymph (hemocyanin).

Applying the same techniques previously mentioned, the consumption of the different resources along the embryonic, postembryonic, and emerging stages of *P. pythagoricus* development was determined. For this purpose, the change in lipids and fatty acids composition in the different stages was qualitatively and quantitatively determined, and the values were compared with those of the juveniles in advanced development and adults. This analysis determined that phospholipids are the main lipid resource consumed during postembryonic development, while triacylglycerols are consumed after the spiderlings emerge from the ootheca

and disperse. Furthermore, an increase in the concentration of free fatty acids was observed during these periods of consumption. Glycogen content was also analyzed and quantified, which represented less than 1% of the reserves and it was gradually consumed during the postembryonic period. On the other hand, the content of the protein reserves of lipovitellins was determined and quantified, which was consumed gradually and differentially along the development process and depleted after dispersion. Finally, hemocyanin content was quantified and increased from the advanced postembryonic stages.

In conclusion, the results obtained in this thesis have provided a new source of information that broadens the knowledge about *P. pythagoricus*, spider model whose different biochemical and physiological aspects have been analyzed for more than 20 years. Through different methodological approaches, this thesis has determined the different resources that females allocate to the production of eggs and their consumption during development. This contribution established a link between the two essential biological processes of vitellogenesis and development for the first time in a spider model.

# I Introducción

- I.1 Consideraciones generales de artrópodos
- I.2 Generalidades de arácnidos
- I.3 Las arañas
- I.4 Generalidades de *Polybetes pythagoricus*
- I.5 Vitelogénesis en artrópodos
- I.6 Lipoproteínas en artrópodos
- I.7 Hemocianina

## I.1 Consideraciones generales de artrópodos

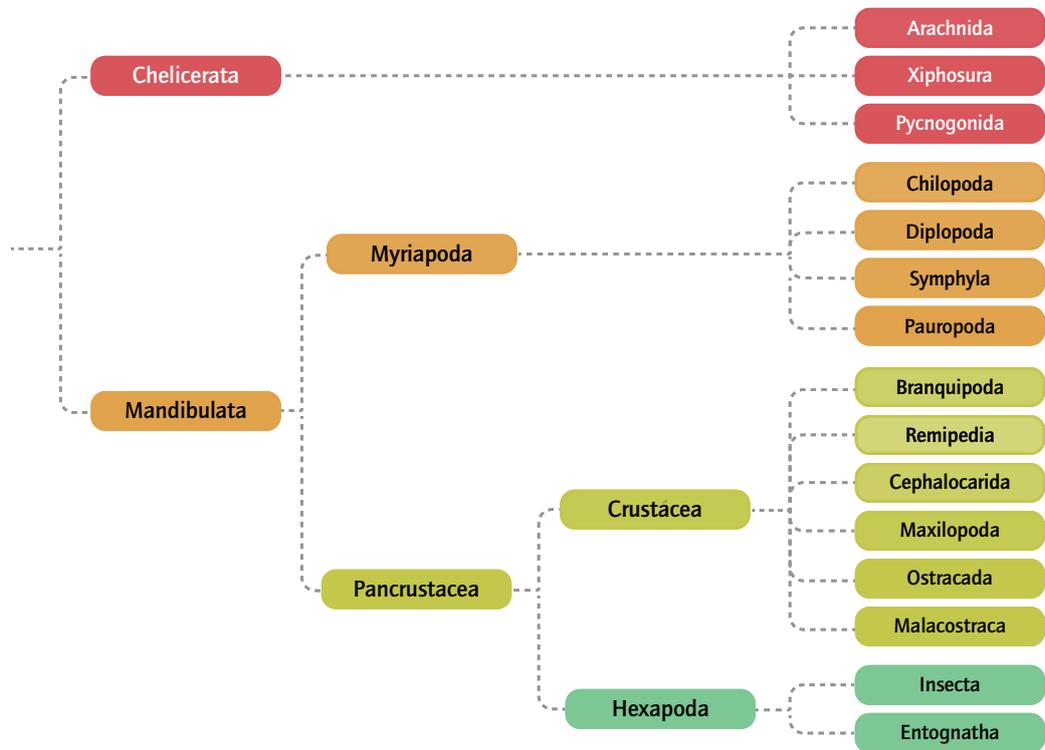
Los artrópodos representan el Filo de animales más numeroso y ubicuo con más de 1.000.000 de especies descritas, abarcando una gran diversidad de taxones desde el Cámbrico hasta la actualidad. Las características distintivas de este grupo son la presencia de un cuerpo segmentado, una cutícula esclerotizada que forma parte del exoesqueleto, el cual se renueva en un fenómeno conocido como ecdisis, y la presencia de apéndices articulados (Budd & Telford 2009).

En la búsqueda de una reconstrucción consensuada de las relaciones de los artrópodos, se han presentado múltiples sistemas de clasificación tradicionalmente complejos e intrincados. Los sistemas más recientes se han generado basándose en datos moleculares, morfológicos y en el registro fósil (Budd & Telford 2009; Legg *et al.* 2013; Edgecombe & Legg 2014). Dentro del Filo se reconocen cuatro grupos principales y, debido a la gran cantidad de sistemas de clasificación y con el fin de facilitar el análisis y las comparaciones presentadas en esta tesis, se utilizará la clasificación de Telford y colaboradores (2008) (Figura I.1).

## I.2 Generalidades de arácnidos

La Clase Arácnida, conocida comúnmente como "arácnidos", está compuesta por 11 órdenes y presenta más de 90.000 especies (Coddington & Colwell 2001; Chapman 2009) (Figura I.2). Estos artrópodos han logrado una gran diversidad adaptativa, encontrándose distribuidos en todos los hábitats terrestres existentes, siendo de vida libre o parásitos; depredadores, herbívoros fitófagos, omnívoros e incluso necrófagos; pueden ser terrestres epigeos e hipogeos y en algunos casos acuáticos, siendo también habitantes comunes de cuevas y grutas y fundamentalmente de hábitos nocturnos (Francke 2014; Armas *et al.* 2017). Debido a la gran

**Figura 1.1**  
Esquema de clasificación basado en el análisis filogenético de Telford y colaboradores (2008).



disponibilidad de refugios y alimentos, algunas especies de este grupo pueden hallarse también en centros urbanos (Cordeiro et al. 2015).

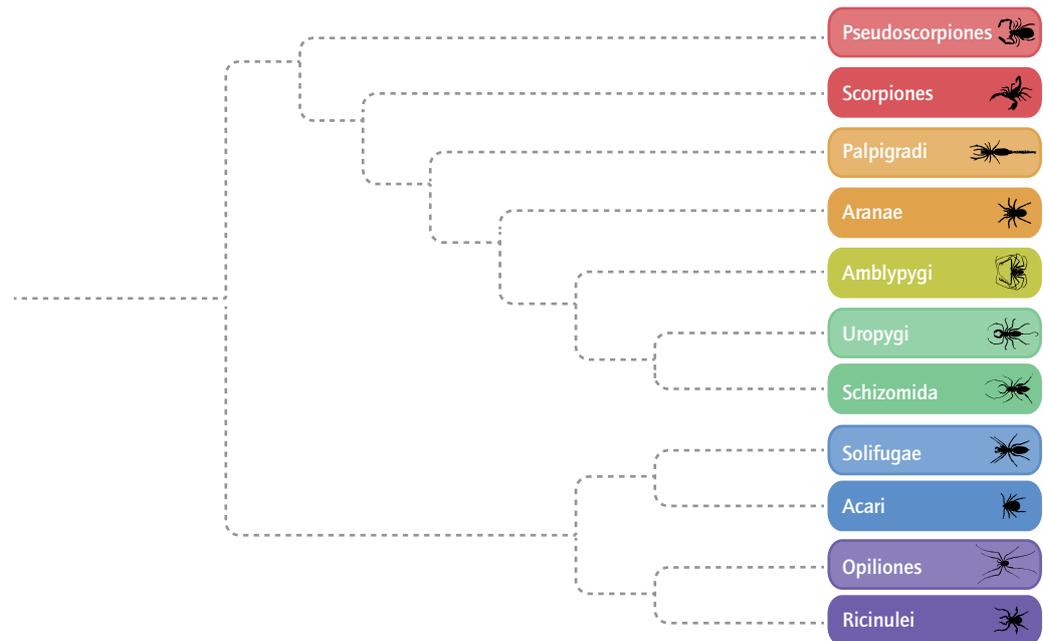
El cuerpo de los arácnidos se encuentra dividido en dos regiones: el prosoma (anterior) y el opistosoma (posterior). El prosoma presenta seis pares de apéndices, un par de quelíceros (función principalmente alimenticia), un par de pedipalpos (funciones variables entre los grupos) y cuatro pares de patas locomotoras, y en la parte dorsal presenta un escudo prosomal o caparazón donde se ubican los ojos. En cambio, el opistosoma es la región donde se ubican principalmente las estructuras relacionadas con las funciones de circulación, respiración, digestión interna y reproducción. Los arácnidos presentan un sistema circulatorio abierto, con un corazón dorsal que bombea la hemolinfa (HL) que circula por el cuerpo. Otra característica distintiva de estos organismos es que realizan una digestión parcial del alimento, vertiendo enzimas sobre sus presas e ingiriendo sustancias líquidas o semilíquidas.

Usualmente los miembros de este grupo no tienen una buena reputación y son percibidos como animales agresivos, peligrosos y letales. Se han reportado casos de emponzoñamiento provocados especialmente por algunas especies de arañas y escorpiones (González et al. 1998; Vetter & Isbister 2008; Von Reumont et al. 2014; Stuber & Nentwi 2016; Hauke & Herzog 2017), y la transmisión de ciertas enfermedades por algunas especies de ácaros (Dautel & Kahl 1999; Marcondes & Dantas-Torres 2017). Sin embargo, el interés por estos organismos ha aumenta-

do en los últimos años debido a su destacable rol en el control biológico de las poblaciones de otros artrópodos y por las posibles aplicaciones biotecnológicas de algunos componentes del veneno (Senff-Ribeiro et al. 2008; Sabatier & Waard 2013; Cordeiro et al. 2015; Saba et al. 2020).

**Figura 1.2**

Esquema de las relaciones filogenéticas de los arácnidos, basado en el análisis de Lozano-Fernandez y colaboradores (2019).



### I.3 Las arañas

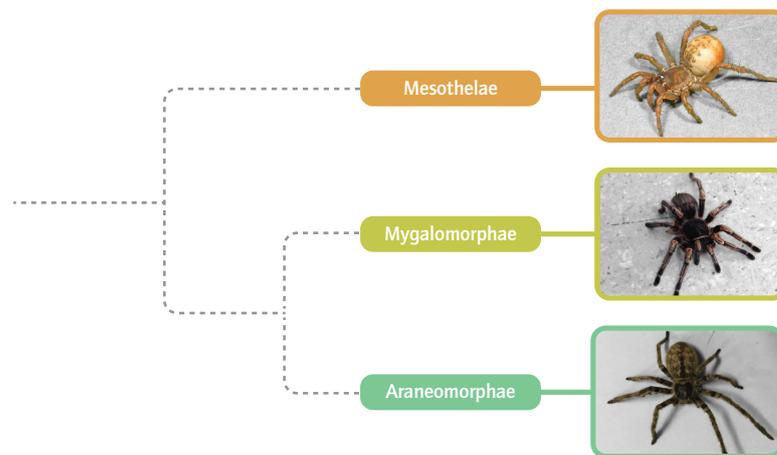
Con más de 49.000 especies descritas (World Spider Catalog 2021), las arañas representan uno de los órdenes de animales más importantes y megadiversos siendo solo superado por cinco órdenes de insectos (Grismado et al. 2014). Las arañas se dividen en dos Subordenes: el Mesothelae y el Opisthothelae. El Suborden Mesothelae presenta rastros de segmentación en el opistosoma, corresponde a menos del 1% de las especies de arañas descritas y con una única familia con representantes actuales. En cambio, el Suborden Opisthothelae, donde los no se observan rastros de segmentación en el opistosoma, se divide en dos Infraórdenes: el Mygalomorphae que corresponde aproximadamente al 7% de las arañas descritas, y el Araneomorphae que comprende más del 90% de las especies (Coddington 2005) (Figura 1.3). Las arañas se hallan en diversos tipos de hábitats a excepción del aire y el mar abierto, encontrándose incluso *Argyroneta aquatica* (Araneae: Cybaeidae), una especie adaptada a vivir permanentemente bajo el agua (Foelix 2011). La mayoría viven alejadas del hombre, solo algunas habitan zonas aledañas o entran a

las casas en búsqueda de alimento.

En las arañas el prosoma y el opistosoma se encuentran conectados a partir de un pedicelo que permite independizar el movimiento del prosoma con respecto al opistosoma, lo que les brinda una mayor flexibilidad necesaria para hacer uso de la seda producida. Aunque ciertos insectos pueden producir seda en ciertos momentos del ciclo de vida, las arañas producen distintos tipos de seda a partir de glándulas especializadas para cumplir múltiples funciones entre las que se destacan la captura e inmovilización de presas, la señalización, la construcción de nidos, refugios y de los sacos de huevos (ootecas), la dispersión y también su empleo durante el apareamiento (Foelix 2011).

**Figura 1.3**

Esquema de las relaciones entre los Subordenes e Infraordenes de las arañas.



En general, el miedo hacia estos arácnidos es un fenómeno muy recurrente en la sociedad, llegando en casos extremos a producir una de las fobias específicas más comunes conocida como “aracnofobia” (Granado *et al.* 2007). Esta imagen desafortunada sobre estos organismos está relacionada con el hecho de que ciertas especies de arañas pueden ser perjudiciales para la salud debido al efecto nocivo que genera su veneno (González *et al.* 1998; Vetter & Isbister 2008; Pezzi *et al.* 2016). Sin embargo, gracias a su capacidad depredadora generalista (Nyffeler *et al.* 1994; Nyffeler & Sterling 1994), las arañas han acaparado la atención del hombre debido al rol que cumplen en el control biológico de las plagas en diferentes agroecosistemas (Riechert & Lockley 1984; Tarabaev & Sheykin 1990; Armendano & González 2010; Saba *et al.* 2020) y por las propiedades mecánicas y biofísicas de la seda, las cuales se han analizado durante casi dos décadas (Schacht & Scheibel 2011; Tokareva *et al.* 2014; Zafar & Al-Samadani 2014).

### 1.3.A Consideraciones morfológicas generales

Dentro de la gran diversidad morfológica que exhibe este grupo, se encuen-

tran arañas con cuerpos de menos de 1 mm de largo, como los machos de *Patu digua* (Araneae: Symphytognathidae) (Forster & Platnick 1977), hasta individuos de 80-90 mm de largo como en el caso de algunas especies de migalomorfas (Foelix 2011). Dentro de los distintos caracteres que definen a este Orden se pueden destacar: la presencia de apéndices abdominales conectados a glándulas sericígenas (hilanderas), un par de quelíceros asociados a glándulas de veneno, la ausencia del músculo depresor trocánter-fémur y pedipalpos modificados en los machos como órganos de transferencia de esperma (Coddington et al. 2004; Grismado et al. 2014).

Los quelíceros biarticulados son el primer par de apéndices del prosoma los cuales cumplen las funciones de sostén de las presas y de defensa, como también pueden ser utilizados para cavar madrigueras, transportar la ooteca, o para entrelazarse durante el apareamiento. Según el tipo de orientación de los quelíceros, se puede dividir a los individuos en ortognatos o labidognatos (Grismado et al. 2014). Respecto a los pedipalpos, en las hembras la estructura es similar a la de las patas mientras que en los machos este apéndice se encuentra modificado. Los cuatro pares de patas locomotoras contienen siete segmentos con musculatura esquelética estriada, distinguiéndose el primer par de patas por su importante capacidad sensorial (Foelix 2011).

En la parte anterior de la región ventral del opistosoma se puede observar el surco epigástrico donde se ubica la desembocadura del aparato reproductor y, lateralmente al surco, se encuentran los dos espiráculos pulmonares. En la región ventral posterior se ubican las hilanderas dispuestas de a pares encontrándose seis en la gran mayoría de las especies (tres pares), una reducción a 4 o 2 hilanderas algunas familias y solo ocho en las Mesothelae (Grismado et al. 2014). En conexión con estas hilanderas se encuentran diferentes tipos de glándulas que secretan distintos tipos de seda específicas para diversos fines (Foelix 2011).

### 1.3.B Sistema digestivo

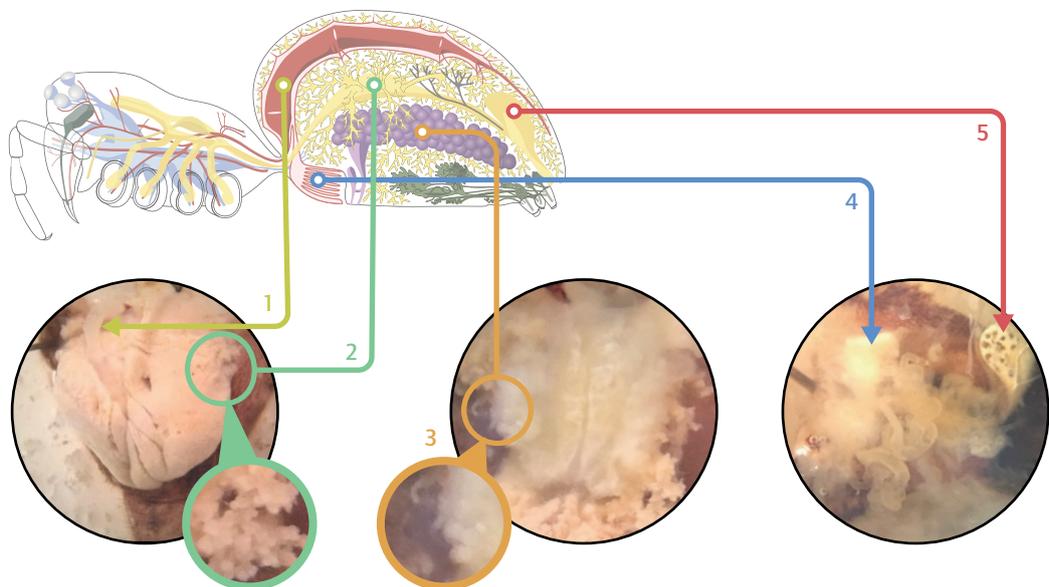
La comida que fue predigerida, es succionada a través de la boca por la acción de los músculos de la faringe y el estómago, estructuras cubiertas por una delgada cutícula que forman parte del estomodeo. El estómago se conecta a la parte dorsal superior por varios músculos que al contraerse permiten la succión del alimento.

Conectado al estómago se encuentra la parte proximal del intestino medio que se sitúa en el prosoma, mientras que sus porciones media y posterior se encuentran en el opistosoma. En la porción media se extienden grandes ramificaciones laterales que se denominan divertículos intestinales (DI), los cuales pueden ocupar la mayor parte del opistosoma rodeando las glándulas y los órganos reproductivos (Figura 1.4). El intestino medio carece de un revestimiento cuticular

siendo el único sitio adecuado para la absorción de nutrientes. En este epitelio se ubican las células secretoras, que producen las enzimas digestivas, y las células absorptivas que absorben los nutrientes y los vierten a la HL. La presencia de los DI tan desarrollados explica en parte por qué las arañas pueden sobrevivir durante mucho tiempo sin comer. Laino y colaboradores demostraron que los DI de arácnidos son el principal centro metabólico involucrado en la captación y liberación de lípidos, como también el principal sitio de almacenamiento lipídico (Laino et al. 2009, 2011). Este órgano se compone principalmente de triacilgliceroles (74%) y de fosfolípidos (16%), con un patrón dominado por ácidos grasos insaturados (Laino et al. 2009).

**Figura 1.4**

Anatomía interna de una araña. (1) Corazón, (2) Divertículos intestinales, (3) Ovarios, (4) Pulmón en libro, (5) Saco estercoral. La imagen utilizada se encuentra bajo la licencia Creative Commons Atribución 3.0 Unported, la cual fue modificada para su uso.



En el extremo posterior del intestino medio de las arañas se encuentran los túbulos de Malpighi encargados de la excreción. Estas estructuras desembocan en el extremo posterior del intestino medio a la altura del saco estercoral (Figura 1.4), excretando guanina, adenina, hipoxantina y ácido úrico. Finalmente, el tracto digestivo termina en el proctodeo, donde los excrementos almacenados en el saco estercoral son eliminados periódicamente por el ano (Foelix 2011).

### 1.3.C Sistema circulatorio

Las arañas exhiben un sistema circulatorio abierto compuesto por un sistema vascular hemolinfático y un complejo de senos y lagunas. El sistema vascular se compone de un corazón tubular, que se ubica dorsalmente en la parte anterior del opistosoma dentro de un seno pericárdico (Figura 1.4), y de arterias que se ramifican extendiéndose a través de todo el cuerpo, alcanzando inclusive los segmentos más

distales de las patas (Wirkner & Huckstorf 2013).

La HL que baña directamente a los órganos/tejidos se acumula en lagunas en el lado ventral del cuerpo, pasa por los órganos respiratorios y, enriquecida con oxígeno, regresa a través de los senos pulmo-pericárdicos hacia el corazón (Foelix 2011, Wirkner & Huckstorf 2013). De esta manera, manteniendo un curso a lo largo de caminos específicos, las arañas tienen un sistema arterial “cerrado” sin capilares y un sistema de senos abierto donde se produce el intercambio de gases (Paul *et al.* 1994; Foelix 2011).

La HL representa aproximadamente un 20% del peso corporal de la araña, siendo necesario un cierto volumen de HL que permita aumentar la presión en las patas para poder estirarlas durante la locomoción (Speck & Barth 1982; Foelix 2011). Asimismo, la HL se encarga del transporte de oxígeno, nutrientes y hormonas (Jalal *et al.* 2010) y posee una gran variedad de células denominadas hemocitos las cuales desempeñan diferentes tipos de funciones. Tanto los llamados plasmotocitos o células hialinas como también los granulocitos se vinculan con la respuesta inmune del organismo, mientras que los prohemocitos actúan como células madre, los cianocitos cumplen funciones relacionadas con la respiración y la respuesta inmune y los leberidiocitos participan en la regulación del contenido de agua en el cuerpo durante el proceso de muda (Foelix 2011; Kuhn-Nentwig *et al.* 2014; Soares *et al.* 2015). Por otra parte, la HL se encarga del transporte de hemocianina (Hc), el pigmento respiratorio encargado del transporte y almacenamiento de oxígeno en arañas.

A su vez, en este tejido predominan como osmolitos los iones sodio y cloruro los cuales constituyen un 35-41% de los osmolitos de la HL de ciertos lícósidos (Punzo 1982), mientras que en algunas arañas migalomorfas pueden representar cerca del 90% de los osmolitos (Punzo 1989). Por otra parte, presentan concentraciones relativamente bajas de potasio, calcio, magnesio, sulfatos y fosfato inorgánico. Dependiendo de la especie, los aminoácidos representan entre el 0,9-4% de los osmolitos de la HL, siendo la prolina el más abundante (Punzo 1982, 1989; Schartau & Leidescher 1983).

### **1.3.D Sistema reproductor**

Las arañas son organismos dioicos donde, exceptuando casos particulares, las hembras suelen ser más grandes que los machos. Los machos suelen ser más ágiles y, en comparación con las hembras, generalmente requieren de un número menor de mudas para alcanzar la madurez. En líneas generales, los machos poseen una vida bastante corta e incluso algunos mueren poco después de la cópula, mientras que las hembras suelen vivir mucho más debido a que se encargan de la puesta de los huevos.

Como previamente se mencionó, una de las principales características que distingue a las arañas del resto de los arácnidos es la modificación de los tarsos de los pedipalpos de los machos. Como los machos carecen de órganos copuladores primarios, sus tarsos se engrosan notablemente formando órganos de transferencia de esperma que los distingue fácilmente de las hembras (Eberhard & Huber 2010). A su vez, para que se produzca el apareamiento, las arañas han desarrollado un comportamiento especial de cortejo que es específico para cada especie.

### **I.3.D.a Generalidades de los órganos sexuales externos**

En las Haplogynae, uno de los dos grupos en los que tradicionalmente se han dividido las arañas araneomorfas, los machos presentan pedipalpos ligeramente modificados con tarsos con una extensión en forma de bulbo piriforme. En el caso de las hembras de este grupo, los órganos copuladores se consideran bastante simples ya que no presentan una placa esclerosada externa o epigino y los receptáculos seminales se conectan directamente con el útero externo de manera que el conducto copulador es al mismo tiempo un conducto de fertilización (Eberhard & Huber 2010).

En cambio, las arañas Entelegynae presentan una correlación entre el palpo altamente diferenciado del macho y el epigino complejo de la hembra. Los machos tienen un tipo de palpo complejo debido a que la pared del órgano consta de estructuras esclerotizadas (escleritos) y áreas blandas que se activa por fuerzas hidráulicas (Austad 1984; Foelix 2011). Por su parte, las hembras presentan órganos copuladores complejos con un verdadero epigino. Las hembras presentan una abertura genital primaria (gonoporo) que se oculta en el surco epigástrico y, a su vez, el epigino presenta varios pliegues cuticulares que constituyen los conductos de conexión (conductos de los espermatozoides) y las espermatecas (Austad 1984; Uhl 2000; Eberhard & Huber 2010). Los conductos de cópula conectan y culminan en las espermatecas, de las cuales surgen los denominados conductos de fertilización que se conectan finalmente con el útero externo. Durante el apareamiento, el émbolo del macho se inserta a través de la abertura genital externa en el conducto de conexión de cópula. Por otra parte, las hembras de este grupo producen un tipo especial de seda que utilizan exclusivamente para la construcción de las ootecas y que no se encuentra en haploginas (Grismado *et al.* 2014).

### **I.3.D.b Generalidades de los órganos sexuales internos**

Los testículos y los ovarios (Ovs) se encuentran como estructuras pares dentro del opistosoma. Los testículos son tubos rectos o contorneados que se fusionan en un conducto común que conduce a través del gonoporo al surco epigástrico. La espermiogénesis tiene lugar en el epitelio de los tubos testiculares, comienza semanas antes de la madurez y continúa durante el resto de la vida del

macho (Michalik & Uhl 2005). Los espermatozoides permanecen empaquetados e inmóviles tanto en los palpos masculinos como cuando se transfieren a los receptáculos de las hembras. Al momento de la fertilización, se disuelve la capa protectora de proteínas que los empaqueta permitiendo que los espermatozoides sean móviles (Brown 1985).

Los Ovs son un par de estructuras alargadas situadas en la parte ventral del opistosoma. Los oocitos sobresalen hacia la cavidad del cuerpo, cubriendo una gran extensión del órgano (Figura 1.4), y están conectados al epitelio ovárico mediante un pedicelo. Cada Ov presenta un oviducto que conecta con el útero. El útero termina en la abertura genital no esclerotizada que se conecta con los órganos sexuales externos (Morishita *et al.* 2003). La fertilización tiene lugar justo antes de que se depositen los huevos, de manera que los espermatozoides se liberan cuando los óvulos atraviesan el útero externo (Foelix 2011).

### **1.3.E Generalidades del desarrollo de arañas**

#### **1.3.E.a Construcción de ootecas y cuidado maternal**

Unas pocas semanas después de la cópula, la hembra está lista para comenzar a poner sus huevos. Durante la oviposición, que puede durar unos minutos, los huevos fertilizados son liberados uno por uno a través de la abertura genital. Los huevos nunca están expuestos directamente al ambiente, sino que se encuentran protegidos por un cocón de seda construido por las madres (Foelix 2011). La presencia del cocón de seda mantendría un nivel de humedad favorable y proporcionaría aislamiento térmico a los huevos en desarrollo (Hieber 1985).

Acompañando a la diversidad del grupo, tanto la forma como el tamaño y el color de las ootecas varía notablemente entre las diversas especies de arañas. En el caso más simple, como se observa en la familia Pholcidae, sólo unos pocos hilos de seda envuelven a los huevos, mientras que en otros casos la ooteca presenta un gran grosor y consta de una placa basal y una cubierta que encierran y protegen a los huevos (Humphreys 1983; Foelix 2011). Las ootecas pueden presentar diversas formas: de disco, esférica (Costa & Capocasale 1985), piriforme (González *et al.* 1997) o hasta forma de campana como ocurre en *Agroeca brunnea* (Clubionidae). Se encuentran diversos colores de ootecas desde blancas, amarillentas, grisáceas, verdes hasta marronadas (Galiano 1971; González 1981; Costa & Capocasale 1985; Foelix 2011; Ruhland *et al.* 2016). Por otra parte, los diámetros de los huevos varían desde 0,2-1,5 mm (Anderson 1990; Hieber 1992) y pueden encontrarse ootecas que contienen de 1500-2500 huevos hasta ootecas con muy pocos huevos (Humphreys 1983; Anderson 1990; Foelix 2011), como ocurre con algunas especies de la familia Ochyroceratidae donde se ha reportado la presencia de ootecas de 5

huevos (Pérez-González *et al.* 2016).

Las hembras de algunas especies muestran cierto grado de protección de sus ootecas. En algunos casos las madres depositan pigmentos sobre las mismas, los cuales servirían para protegerlas de microorganismos externos o para camuflarlas (Craig & Catherine 2003; Ruhland *et al.* 2016). Algunas hembras permanecen cerca de la ooteca hasta que emergen las crías, mientras que otras pueden acarrear la ooteca e incluso cuidar las crías en sus primeros estadios (Grismado *et al.* 2014); como el caso de los licósidos que unen las ootecas a las hilanderas y las hembras las transportan consigo hasta que las crías eclosionan (Costa & Capocasale 1985; Ruhland *et al.* 2016). Solo en algunos casos extremos se produce la matrifagia, comportamiento mediante el cual las crías devoran directamente a las madres (Grismado *et al.* 2014; Kim *et al.* 2000).

### **I.3.E.b Generalidades del desarrollo embrionario y postembrionario**

En líneas generales podemos dividir la ontogenia de las arañas en tres períodos: embrionario, postembrionario (denominado previamente “larvario”) y emergente (denominado previamente “ninfal”) (Vachon 1957). El desarrollo embrionario abarca desde el momento en que se da la fecundación del óvulo hasta que se establece la forma típica del cuerpo de la araña. Una vez que eclosionan, todas las etapas hasta el adulto están separadas por un proceso de muda. En líneas generales, en el período postembrionario los juveniles no pueden alimentarse por sí mismos y, como carecen de ciertas características morfológicas, se los denomina “estadios incompletos” (Foelix 2011). De esta manera, la emergencia no se da hasta que todos los sistemas de órganos están presentes y las arañas se vuelven autosuficientes.

Los huevos de las arañas presentan dos capas, una interna conocida como membrana vitelina y una externa denominada corion. En el transcurso de las primeras horas, el cigoto sufre una serie de divisiones mitóticas. Alrededor de las 100 h se forma un nódulo primitivo o cúmulo el cual representa el centro organizador para la formación del eje dorsoventral del embrión (Holm 1952; Foelix 2011; Akiyama-Oda & Oda 2003, 2006). El posterior disco germinal que se forma, se estira en una amplia banda germinal y consta de un lóbulo cefálico (desprende el segmento de los quelíceros), cinco somitos (segmentos de los pedipalpos y las patas) y un lóbulo caudal (forma el primer segmento abdominal). Posteriormente, los primordios de las extremidades se vuelven visibles como ligeras elevaciones en los segmentos prosomales y los segmentos abdominales se agregan sucesivamente en el extremo caudal. Solo en etapas tardías del desarrollo de los embriones labidognatos (cerca del día 10) comienza el proceso de inversión cuando la banda germinal ha alcanzado su longitud máxima y los lóbulos cefálico y caudal casi se

tocan. Este proceso comienza con la aparición de un surco longitudinal en la línea media que separa en dos la banda germinal, de manera que las áreas marginales del embrión se extienden lateralmente hasta que se encuentran en la línea media dorsal. Cuando finaliza el proceso de inversión se distingue la forma típica del cuerpo de la araña (Foelix 2011).

La eclosión o la apertura de las membranas del huevo marca la transición de la vida embrionaria a la postembrionaria. Usualmente las arañas mudan varias veces dentro del cocón dando lugar a etapas inmóviles (una a tres) hasta que se produce una muda donde se desprende completamente los remanentes de cutícula embrionaria. Se observan cambios en los órganos sensoriales entre los estadios inmóviles y los móviles (Wurdak & Ramousse 1984), siendo en los estadios móviles donde los individuos adquieren la forma de arañas en miniatura y presentan todos los tipos de pelos sensoriales, los ojos más desarrollados, patas con las garras típicas, hileras con estructuras funcionales asociadas a las glándulas de seda y un aparato bucal diferenciado.

Los estadios tempranos mudan con mayor frecuencia, mientras que en las etapas posteriores los intervalos entre mudas dependen de las condiciones nutricionales y del tamaño corporal final. Si bien en general las crías mudan independientemente unas de otras, en ciertos casos se produce una sincronización en la muda que podría darse a través de una comunicación química o por señales de vibración producidas por los individuos que mudan que estimularía al resto (Fowler & Gobbi 1988; Leafloor *et al.* 1996; Kim 2001).

## **I.4 Generalidades de *Polybetes pythagoricus***

### **I.4.A Generalidades de la especie**

Descrita por Holmberg (1875), *Polybetes pythagoricus* es una araña perteneciente a la Familia Sparassidae conocida comúnmente como “arañón del monte” o “araña cangrejo”. Esta especie de hábitos nocturnos se encuentra con frecuencia debajo de la corteza de los árboles, principalmente de los eucaliptos (*Eucalyptus* sp.) (Figura I.5), pero puede hallarse en los aleros de las casas, galpones, e incluso en las viviendas en días de tormenta. Aunque tienden a escapar y retirarse ante la presencia del hombre, son arañas que pueden atacar con facilidad si se sienten amenazadas.

Esta especie se caracteriza por presentar un cuerpo aplanado, de color castaño o grisáceo con patas lateralizadas con rayas o anillos del mismo color (Figura I.5). El prosoma presenta una mancha negra y su opistosoma de color marrón pre-

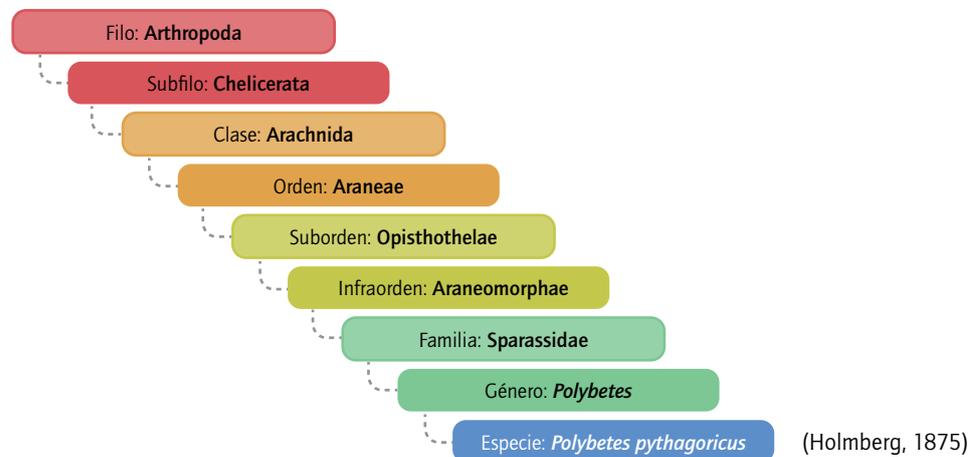
senta una mancha lineal oscura con una vellosidad densa y clara (Gersschman & Schiapelli 1965). Son individuos errantes y muy veloces, salvo las hembras cuando cuidan a sus crías.

**Figura 1.5**

Ejemplares de hembras de *P. pythagoricus* debajo de la corteza (izquierda) y al pie de un árbol de eucalipto (derecha).



#### Sistemática de la especie



#### I.4.B Distribución de la especie

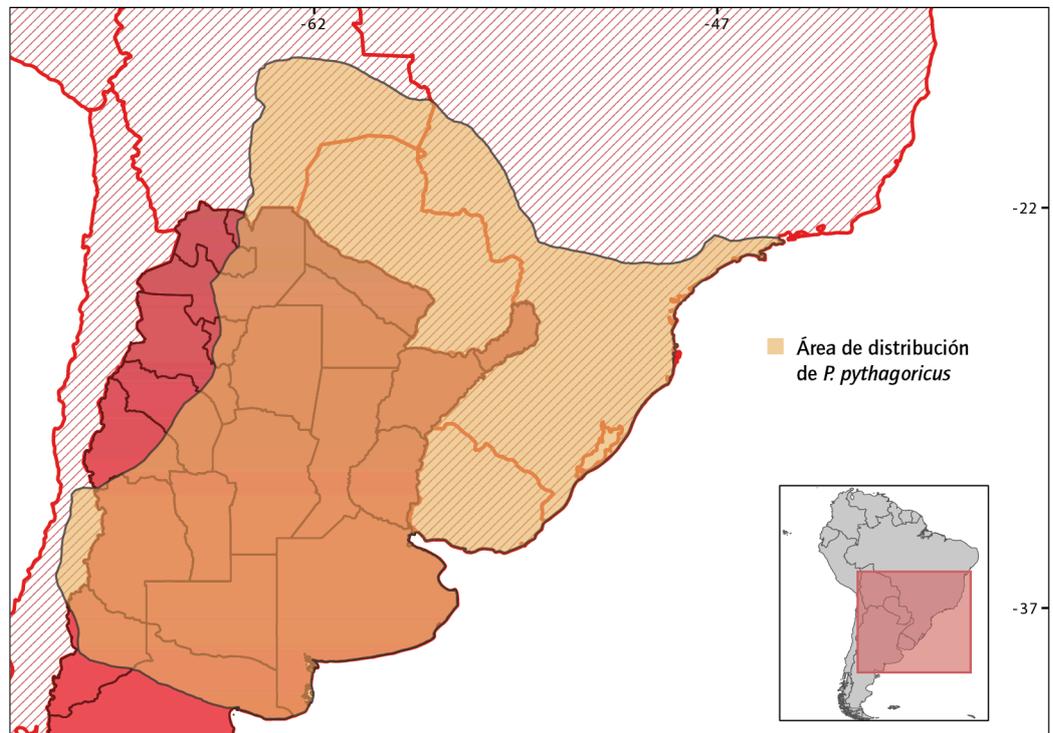
*P. pythagoricus*, se distribuye en América del Sur, encontrándose en Chile, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y en el norte-centro de nuestro país llegando a la provincia de Río Negro (GBIF: Global Biodiversity Information Facility) (Figura 1.6).

#### I.4.C Generalidades del desarrollo de la especie

Las hembras de *P. pythagoricus* construyen ootecas de color blanco níveo con

**Figura I.6**

Área de distribución de *P. pythagoricus*. Datos de ocurrencia obtenidos de GBIF (Global Biodiversity Information Facility).



forma de disco de 21–30 mm de diámetro (Figura I.7a). Presentan un techo plano y un piso convexo que se unen en la circunferencia del disco que forma un reborde a partir del cual numerosos hilos fijan la ooteca a la pared, quedando suspendida en el aire. La hembra se mantiene cerca y al cuidado de la ooteca, atacando al enemigo que se aproxime a ella (Galiano 1971).

Galiano (1971) describió que las hembras de *P. pythagoricus* colocan por ooteca entre 60–250 huevos de color verde intenso y con diámetros promedios de 1,93–2,19 mm. Los datos publicados sobre el desarrollo postembrionario determina que estas arañas presentan cuatro estadios que transcurren dentro de la ooteca.

- **Primer estadio:** cubierto por una cutícula embrionaria, una tenue membrana que formará la primera exuvia la cual se rompe entre 2–12 h después de que se produce la eclosión.
- **Segundo estadio:** no es un estadio libre ya que permanece parcialmente envuelto por remanentes de cutícula (Figura I.7b). Al producirse la segunda exuvia, se desprende junto con la primera y la envoltura del huevo.
- **Tercer estadio:** es un estadio libre pero inmóvil que dura entre 6–9 días (Figura I.7c). Presenta el cuerpo doblado en ángulo recto con las patas extendidas hacia los costados sin poder apoyarlas. Se observa la segmentación de los apéndices, sin verdaderas uñas tarsales. Faltan los pelos de cubierta y no presentan pigmentación, ni pelos, ni fúsculas en las hileras (pelo modificado por donde se secreta la seda). A lo largo de los

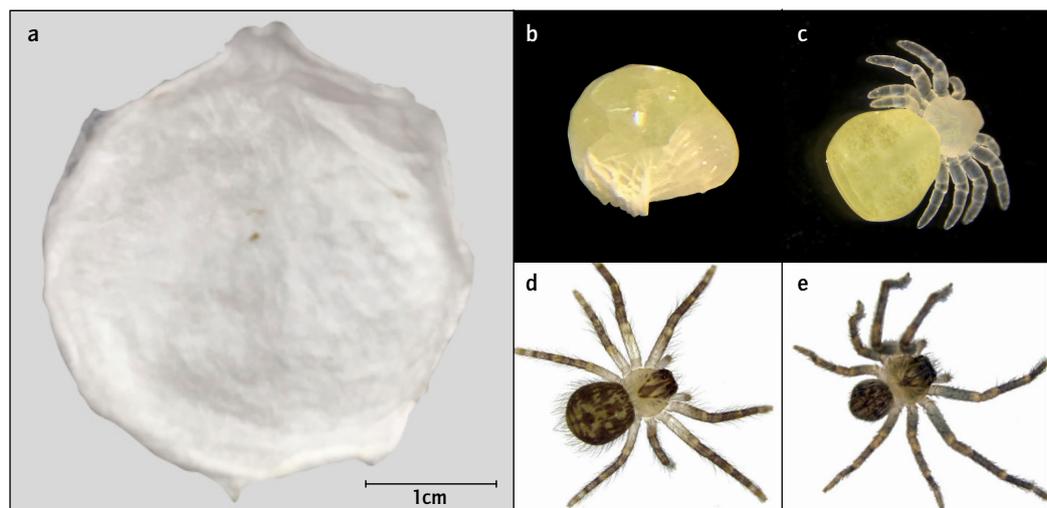
días, el pigmento se va depositando en la cutícula.

- **Cuarto estadio:** al producirse la tercera muda, los individuos se encuentran en el mismo plano, con las patas apoyadas en el sustrato, libres y móviles (Figura I.7d). Los ojos presentan depósito de pigmento. Las hileras presentan pelos y fúsculas y son capaces de elaborar seda. Este estadio también presenta quelíceros con la uña corta y curva y los tarsos de las patas con las dos uñas. Los pelos son escasos en el prosoma y más abundantes en el opistosoma. Durante este estadio, la pigmentación se intensifica llegando a enmascarar el color verde inicial.

Cuando las arañas han alcanzado este punto de desarrollo, las madres abren la ooteca por uno de los costados de la unión del piso con el techo. Las arañas se dispersan sobre la ooteca moviéndose ágilmente, pero manteniendo aún una vida gregaria. Sin embargo, ante alguna perturbación externa, las arañas ingresan nuevamente a la ooteca. Aunque haya presas en abundancia las arañas no cazan, por lo cual siguen viviendo de sus reservas durante este estadio.

**Figura I.7**

Imágenes de la ooteca y de estadios del desarrollo de *P. pythagoricus* (a) Ooteca, (b) Segundo estadio (parcialmente envuelto por remanentes de cutícula), (c) Tercer estadio (libre inmóvil), (d) Cuarto estadio (libre móvil), (e) Juvenial en etapa de dispersión.



En el quinto estadio (denominado “ninfal”) la organogénesis se completa, los individuos presentan muchos pelos en la cubierta y muy variados, y la pigmentación es más intensa y extendida. Las patas son más largas y las arañas son mucho más ágiles que el estadio anterior (Figura I.7e). En este punto las arañas abandonan las ootecas y son capaces de cazar, pero mantienen cierto grado de agrupación. *P. pythagoricus* alcanza el estado adulto luego de un número de entre 13-16 mudas (Scioscia 1984; Galiano 1979). Como en todas las arañas araneomorfas, en esta especie no se producen mudas durante la vida adulta (Galiano 1979), llegando a la madurez cuando se evidencia la aparición de órganos copuladores. La cópula y el apareamiento, junto con otros datos relevantes acerca del ciclo de vida de *P. pythagoricus*, fueron previamente descriptos por Galiano (1979).

## I.5 Vitelogénesis en artrópodos

Los organismos ovíparos son especies que se caracterizan por producir y depositar huevos. Para maximizar el éxito reproductivo, las hembras acumulan en los oocitos todos los recursos necesarios para que la descendencia se desarrolle de manera adecuada. Dentro de los diferentes fenómenos asociados a la reproducción, la vitelogénesis representa el proceso estacionario más importante mediante el cual las hembras acumulan varias proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales serán en última instancia transferidos a los huevos (Valle 1993; Tsukimura 2001; Shechter *et al.* 2005; Wilder *et al.* 2010; Fruttero *et al.* 2011). Este proceso es un paso crucial en la reproducción y ha sido ampliamente estudiado en insectos, crustáceos y ácaros, analizándose a partir de tres perspectivas: morfológica, bioquímica y fisiológica.

Dentro de los estudios morfológicos, se han analizado los cambios que afrontan las hembras durante la oogénesis los cuales han brindado, a partir de medidas morfométricas y técnicas histológicas, varios sistemas de clasificación de las distintas etapas del proceso de vitelogénesis (Charniaux-Cotton 1985; Raikhel & Dhadialla 1992; Trabalon *et al.* 1992; Melo *et al.* 2000; Morishita *et al.* 2003; Ferré *et al.* 2012; Xu *et al.* 2014; Smija & Devi 2015). En cuanto a los aspectos bioquímicos se ha analizado la composición del Ov como también de los órganos/tejidos vinculados al proceso (Beenackers *et al.* 1985; Pourié & Trabalon 2003; Arrese & Soulages 2010; Xu *et al.* 2014). En estrecha asociación con los aspectos fisiológicos, se ha analizado la dinámica de este proceso determinando los sitios de síntesis de los diferentes recursos, su transporte y acumulación durante la vitelogénesis y, en ciertos casos, brindando información sobre los mecanismos del control endócrino del proceso (Melo *et al.* 2000; Yepiz-Plascencia *et al.* 2000; Telfer & Woodruff 2002; Pourié & Trabalon 2003; Arrese & Soulages 2010; Xu *et al.* 2014).

Las diversas etapas de la vitelogénesis se dividen y determinan, entre otros aspectos, por la acumulación progresiva del vitelo en los oocitos que es el principal recurso de los huevos (Raikhel & Dhadialla 1992; Foelix 2011; Melo *et al.* 2000). Si bien su composición varía entre los distintos grupos, esta sustancia de reserva está compuesta principalmente por proteínas, siendo las vitelinas (Vns) una proporción sustancial de las proteínas solubles de los huevos (Tsukimura 2001), como también por gotas lipídicas (Lee & Walker 1995; Jedrzejowska & Kubrakiewicz 2010; Fruttero *et al.* 2017) y lipoproteínas de alta densidad denominadas lipovitelinas (LVs) (Wallace *et al.* 1967; Laino *et al.* 2013; Trabalon *et al.* 2018). Según el sitio de síntesis de estos recursos que se acumulan en el Ov, el origen de estos componentes puede ser autosintético (endógeno) cuando se da en el tejido ovárico, o heterosintético cuando se producen en tejidos extraováricos (exógenos) tales como el cuerpo gordo en insectos (Sappington & Raikhel 1998; Swevers *et al.* 2005), el hepatopáncreas

en crustáceos (Wilder *et al.* 2010), o los DI y/o intestino medio de arácnidos (Chinzei *et al.* 1983; Bednarek *et al.* 2019).

### I.5.A Generalidades de la vitelogénesis en insectos

En los insectos, la vitelogénesis muchas veces implica la remodelación citológica del cuerpo graso y de los Ovs, los órganos responsables de la síntesis y captación de las proteínas precursoras de las lipoproteínas del vitelo conocidas como vitelogeninas (Vgs) (Valle 1993). Durante la vitelogénesis, el crecimiento del oocito en el folículo ovárico se da en gran medida por la endocitosis de proteínas las cuales pueden derivar de las Vgs sintetizadas en el cuerpo graso (origen exógeno) y/o de células epiteliales foliculares que rodean a los oocitos (origen endógeno) (Hagedorn & Kunkel 1979; Raikhel & Dhadialla 1992; Izumi *et al.* 1994; Melo *et al.* 2000). En algunas especies de insectos los oocitos también internalizan otros tipos de precursores distintos a las Vgs entre los que se incluyen: la lipoforina (Lp) (Telfer & Pan 1988; Machado *et al.* 1996), arilforina, microvitelogenina (Kawooya *et al.* 1986; Telfer & Pan 1988; Swevers *et al.* 2005) y otras proteínas específicas del folículo (Sato & Yamashita 1991). La mayoría de las Vns de insectos presentan pesos moleculares altos de 385–470 kDa y, a su vez, están compuestas por polipéptidos o subunidades que difieren según las especies (Kunkel & Pan 1976; Chino *et al.* 1977; Harnish & White 1982).

En cuanto a la composición lipídica de los oocitos, los lípidos comprenden entre un 30–40 % del peso seco de los mismos (Briegel 1990; Troy *et al.* 1975) siendo también la principal fuente de energía para los embriones en desarrollo (Beenackers *et al.* 1985; van Handel 1993). Durante la maduración ovárica el contenido de lípidos en los oocitos aumenta, siendo en general los diacilgliceroles los principales lípidos que se movilizan vía hemolinfática en los insectos. Si bien se ha descrito que en los oocitos se pueden sintetizar ácidos grasos *de novo*, esta contribución no representa más del 1% del contenido de lípidos del huevo (Arrese & Soulages 2010). La gran mayoría de los lípidos acumulados en los oocitos se origina en el cuerpo graso y son transportados al Ov por las Lps, de manera que la acumulación de lípidos en los Ovs esta estrechamente relacionada con la disminución en el contenido de lípidos del cuerpo graso (Ziegler & Ibrahim 2001; Ziegler & van Antwerpen 2006).

Si bien el contenido de lípidos de las Vgs es mucho menor que el de las Lps, la gran cantidad de Vg que captan los oocitos determinaría que su contribución al contenido de lípidos podría ser significativo durante el desarrollo de los oocitos (Arrese & Soulages 2010). Los lípidos provistos por las Vgs podrían utilizarse no solo para su almacenamiento sino también como componente de membrana o como fuente de energía durante el desarrollo de los oocitos (Hagedorn & Kunkel

1979). En general, la composición de fosfolípidos en el oocito no cambia profundamente después de la incorporación de Vg, siendo la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina los principales fosfolípidos en varias especies (Beenackers *et al.* 1985).

### **I.5.B Generalidades de la vitelogénesis en crustáceos**

En términos generales, el proceso de vitelogénesis en los crustáceos puede subdividirse acorde a dos etapas principales: una etapa previtelogénica y una vitelogénica (Charniaux-Cotton 1985; Kulkarni *et al.* 1991; Abdu *et al.* 2000; Tsukimura 2001). La etapa previtelogénica representa un período en donde los oocitos primarios comienzan a incrementar su tamaño, aumentan el contenido de ribosomas y se observa un gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso (Charniaux-Cotton 1985; Meusy & Payen 1988). La etapa vitelogénica se subdivide en general en una vitelogénesis primaria y una secundaria (Smija & Devi 2015). Durante la vitelogénesis primaria, también denominada fase endógena, se ha observado síntesis activa de proteínas y de Vg en los oocitos (Charniaux-Cotton 1985). En cambio, durante la vitelogénesis secundaria, también conocida como fase exógena, se produce la captación de Vg que fue sintetizada en el hepatopáncreas, observándose un aumento considerable del diámetro de los oocitos (Wilder *et al.* 2010; El-Sherif *et al.* 2012; Smija & Devi 2015). A su vez, los oocitos en este período se encuentran rodeados por células foliculares, las cuales podrían participar en la captación de Vg y hasta eventualmente sintetizarla (Okumura *et al.* 2004; Mollemberg *et al.* 2017; Ferré *et al.* 2012). Además de aumentar el tamaño, a medida que transcurre la vitelogénesis los oocitos se pigmentan adquiriendo una coloración que varía entre una tonalidad verdosa, anaranjada o morada según la especie (Abdu *et al.* 2000; Tsukimura 2001; El-Sherif *et al.* 2012; Arcos-Ortega *et al.* 2019).

El hepatopáncreas representa el principal centro de almacenamiento de reservas orgánicas e inorgánicas (Barker & Gibson 1979) y se ha demostrado que los lípidos almacenados en este órgano se transportan al Ov durante la vitelogénesis. Como la cantidad de proteínas y lípidos acumulados en los Ovs son mayores que las cantidades almacenadas en el hepatopáncreas, los nutrientes requeridos para el desarrollo de los oocitos dependen principalmente de la ingesta de alimentos (Pillay & Nair 1973; Kyomo 1988; Yamaguchi 2001; Xu *et al.* 2014). En el transcurso de la vitelogénesis se ha observado un aumento en el contenido de lípidos y proteínas en los Ovs de algunas especies de decápodos (Spaziani & Hinsch 1997; Xu *et al.* 2014), junto con una disminución significativa en el contenido de carbohidratos durante de la maduración de los oocitos (Rodríguez-González *et al.* 2006). Este fenómeno indica que los carbohidratos podrían ser una fuente importante de energía durante las primeras etapas del desarrollo ovárico, pero no lo serían durante el desarrollo embrionario (Oliveira *et al.* 2011; Xu *et al.* 2014).

### I.5.C Generalidades de la vitelogénesis en quelicerados

En Xiphosura la oogénesis fue descrita en *Limulus polyphemus* por Munson (1898) quien describió la presencia de células germinales blancas y oocitos de mayor tamaño. Las células germinales presentan un núcleo y nucléolo fácilmente reconocibles similar a los oocitos previtelogénicos y a medida transcurre la vitelogénesis los oocitos de mayor tamaño se pigmentan progresivamente adquiriendo un color rosado conforme el vitelo se acumula. El desarrollo de los oocitos se dividió en dos etapas, observándose en la segunda la formación de gránulos de vitelo (Gardiner 1927).

A partir de los diversos análisis histológicos que se han realizado en distintas especies de arañas, se han clasificado los oocitos en distintos estadios acorde a los cambios estructurales observados (André & Rouiller 1957; Choi & Moon 2003; Morishita *et al.* 2003; Ouriel 2016), determinándose las fases de previtelogénesis, vitelogénesis temprana y vitelogénesis tardía (André 1958; Osaki, 1971, 1972; Seitz 1971) y, describiéndose en algunos casos una fase postvitelogénica (Trabalon *et al.* 1992; Pourié & Trabalon 2003; Ouriel 2016). En cuanto a la acumulación de vitelo, se ha descrito la presencia de los “cuerpos vitelinos”, constituidos por una capa laminar y un núcleo central, en especies de las familias Lycosidae y Thomisidae (Sotelo & Trujillo-Cenóz 1957), como también los cuerpos de Balbiani que comprenden cisternas de retículo endoplásmico, mitocondrias y otros orgánulos y contienen gotas de lípidos (Jedrzejska & Kubrakiewicz 2010). A medida transcurre la vitelogénesis, los oocitos se rodean de una membrana basal y una banda de origen proteico, y aumentan considerablemente su tamaño producto de la acumulación progresiva del vitelo y de gotas lipídicas (Trabalon *et al.* 1992; Choi & Moon 2003; Morishita *et al.* 2003; Ouriel 2016). En *Loxocles intermedia* (Araneae: Sicariidae), los oocitos maduros experimentan un cambio morfológico al presionarse entre las células del pedicelo delimitando una abertura a través de la cual los oocitos alcanzar la luz del ovario. En esta instancia el oocito de gran tamaño se encuentra protegido mecánicamente por una membrana vitelina, la cual podría dar lugar a la capa externa de los huevos (Morishita *et al.* 2003).

En los ácaros, el Ov consiste en una pared epitelial formada por pequeñas células y los oocitos en diferentes etapas de desarrollo se encuentran unidos a la pared ovárica mediante un pedicelo que deriva de las células epiteliales (Till 1961; de Oliveira *et al.* 2007). Se cree que este pedicelo puede sintetizar y proporcionar ciertos precursores del vitelo durante la vitelogénesis (Denardi *et al.* 2004; de Oliveira *et al.* 2007). Si bien el origen de las Vns de los ácaros es principalmente exógeno, se ha observado en algunos casos que el tejido ovárico actúa como un segundo sitio de síntesis. Las Vns pueden llegar a representar hasta aproximadamente un 80% de la proteína total del huevo en algunas especies de garrapatas, con pesos

moleculares que varían entre 200–480 kDa y formadas por seis u ocho subunidades según la especie (Chinzei *et al.* 1983; Shanbaky *et al.* 1990).

## 1.6 Lipoproteínas en artrópodos

La mayor parte de los lípidos que se acumulan en los oocitos son sintetizados en tejidos extraováricos, de manera que los lípidos deben ser transportados desde los sitios de absorción, almacenamiento y síntesis hacia el Ov. Debido a su carácter hidrofóbico, los lípidos se transportan a partir de complejos macromoleculares denominados lipoproteínas (Canavoso *et al.* 2001; van Antwerpen *et al.* 2005). Todas las lipoproteínas muestran una estructura básica que consiste en agregados esféricos o discoidales conformados por un núcleo o core hidrofóbico, compuesto por lípidos hidrofóbicos, y una capa superficial compuesta por fosfolípidos anfipáticos, colesterol y proteínas (denominadas apoproteínas) (Yepiz-Plascencia *et al.* 2000; Fruttero *et al.* 2017). Las diferentes lipoproteínas se pueden separar en diferentes clases acorde a su densidad de hidratación y, por consiguiente, acorde a la composición relativa de lípidos y proteínas que contengan. En líneas generales, en los artrópodos se pueden encontrar las siguientes lipoproteínas dependiendo de los filos:

- **Lipoproteína de baja densidad (LDL):** densidad entre 1,006–1,06 g/ml.
- **Lipoproteína de alta densidad (HDL):** densidad entre 1,06–1,21 g/ml.
- **Lipoproteína de muy alta densidad (VHDL):** densidad mayor a 1,21 g/ml.

A su vez, las lipoproteínas pueden clasificarse en lipoproteínas no ligadas al sexo, presentes tanto en hembras como en machos, como también lipoproteínas específicas de hembras, las cuales cumplen un rol fundamental en la formación del vitelo. En la siguiente sección se abordarán generalidades acerca de las lipoproteínas presentes en artrópodos, haciendo especial énfasis en las lipoproteínas vinculadas al proceso de vitelogénesis (las Vgs) y en las lipoproteínas componentes de los huevos.

### 1.6.A Lipoproteínas no ligadas al sexo

Las lipoproteínas median el transporte de los lípidos en el entorno hidrofílico de los fluidos fisiológicos, como es el caso de la HL para los artrópodos. En insectos, la mayor parte de los lípidos en la HL se encuentran asociados a una partícula lipoproteica a la cual Chino y colaboradores (1981) denominaron “lipoforina”. Estas lipoproteínas presentan apolipoproteínas denominadas apolipoforinas, con pesos moleculares de aproximadamente 600 kDa. Los componentes proteicos de estas partículas en insectos comprenden tres tipos de apolipoforinas: apolipofor-

rina I (apoLp-I), apolipoproteína II (apoLp-II) y apolipoproteína III (apoLp-III) con pesos moleculares de 250 kDa, 80 kDa y 18 kDa (Wojda et al. 2020). Las apoLp-I y apoLp-II son apolipoproteínas no intercambiables, que dan lugar a partículas lipoproteicas de alta densidad (HDLp, densidad de 1,15 g/ml) mientras que la apoLp-III se une transitoriamente a la HDLp, formando partículas de lipoproteína de baja densidad (LDLp, densidad de 1,03 g/ml) que facilita la unión y el transporte de lípidos (Canavoso et al. 2001; Weers & Ryan 2006).

Los lípidos pueden comprender hasta el 50% de la masa de las lipoproteínas, y a pesar de que la composición lipídica es dinámica y varía según las especies, tanto los fosfolípidos (principalmente fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina) como los diacilglicerolés son los principales componentes de esta lipoproteína. Exceptuando algunos casos específicos, las lipoproteínas tienen en general un alto contenido de fosfatidiletanolamina (Soulages & Wells 1994). Si bien la principal clase de lípidos transportados por las lipoproteínas son los diacilglicerolés, también pueden transportar esterolés, ácidos grasos, hidrocarburos, carotenoides y monoacilglicerolés (van der Horst et al. 2009). Una característica distintiva del funcionamiento de la Lp es el administrar diferentes clases de lípidos a tejidos específicos, transfiriendo los diacilglicerolés al cuerpo gordo y al tejido ovárico, los hidrocarburos a la cutícula y los carotenoides a la glándula de seda, como en el caso del gusano de la seda (Canavoso et al. 2001).

Si bien en los crustáceos las concentraciones de proteínas son altas en la HL (30-100 mg/ml), también contiene concentraciones significativas de lipoproteínas para mediar el transporte de los lípidos en el entorno acuoso polar de la HL (Hoeger & Schenk 2020). En camarones, se han encontrado dos tipos de lipoproteínas de alta densidad, una HDL y una VHDL (Teshima & Kanazawa 1980; Puppione et al. 1986; Lee & Puppione 1988; Yepiz-Plascencia et al. 2000). Las diferentes HDLs presentan una densidad aproximada de 1,364-1,139 g/ml, donde los fosfolípidos representan entre el 40-87%, encontrándose en menor medida triacilglicerolés, diacilglicerolés, monoacilglicerolés, ácidos grasos libres, esterolés e hidrocarburos. El componente proteico representa entre un 26-32% del peso de esta partícula lipoproteica. En cambio, la VHDL presenta un contenido mayor de proteínas cercano al 81%, mientras que los fosfolípidos representan un 14% de la lipoproteína (Teshima & Kanazawa 1980).

Dentro de la Clase Arácnida, se identificaron y caracterizaron las lipoproteínas de tres especies de arañas: del Suborden Mygalomorphae se caracterizaron en *Aphonopelma californicum* (= *Eurypelma californicum*) (Araneae: Theraphosidae), y del Suborden Araneomorphae, se caracterizaron las lipoproteínas de *Latrodectus mirabilis* (Araneae: Theridiidae) y de *P. pythagoricus*, modelo de estudio de este trabajo de tesis razón por la cual las lipoproteínas de esta especie serán tratadas en

detalle en una sección particular. Haunerland y Bowers (1989) reportaron la presencia de dos lipoproteínas en *A. californicum*, una HDL con una densidad de 1,07-1,14 g/ml y una VHDL con una densidad de 1,28 g/ml. Cunningham y colaboradores identificaron en *L. mirabilis* dos HDL, la HDL1 con una densidad de 1,13 g/ml y una HDL2 la cual presenta una densidad de 1,19-1,2 g/ml y Hc como componente apolipoproteico (Cunningham et al. 2000).

Dependiendo de la especie, las HDLs presentan entre un 20-40% de lípidos mientras que las VHDL contienen entre un 8-16%. Dependiendo de la lipoproteína, los fosfolípidos representan entre un 32-60% de la partícula lipoproteína. En cuanto a los lípidos energéticos, *A. californicum* presenta un contenido alto de diacilgliceroles (39%), mientras que las araneomorfas presentan triacilgliceroles (16-24%). En cuanto al contenido de ácidos grasos libres, la VHDL de *A. californicum* presenta un 34%, y dependiendo de la especie, las HDL contienen entre un 17-33% (Cunningham et al. 1994; Haunerland & Bowers 1989; Cunningham et al. 2000). En todas las lipoproteínas analizadas, el contenido total de proteínas fue mayor al 60%.

Recientemente, Kluck y colaboradores (2018) han caracterizado en ácaros una nueva lipoproteína de alta densidad (1,18 g/ml) en *Rhipicephalus microplus* (= *Boophilus microplus*) (Ixodida: Ixodidae). Esta lipoproteína posee un peso molecular nativo de 420 kDa y está compuesto por una subunidad de 122 kDa. Además, presenta una composición lipídica diferente al resto de las lipoproteínas de artrópodos, presentando un 40% de colesterol, 27% de fosfolípidos, 20% de triacilgliceroles y 15% de hidrocarburos. Por otra parte, esta lipoproteína no solo une ácidos grasos de la HL, sino que también une y transporta colesterol libre.

### **1.6.B Lipoproteínas circulantes ligadas al sexo: Vitelogeninas**

Las Vgs son lipoproteínas específicas de las hembras y precursoras de las lipovitelininas (LVs) que se acumulan en el Ov y que se encuentran en los huevos y pueden compartir cierta similitud o ser idénticas (Lee 1991). El término "vitelogenina" derivó originalmente del término "vitelogénesis", el cual se determinó y utilizó por primera vez para un modelo de insecto (Pan et al. 1969). En un inicio, las Vgs era el nombre genérico que se le daba a un grupo de glicolipoproteínas que se sintetizan en tejidos extraováricos y que eran precursoras de las proteínas del vitelo (vitelininas) que se acumulaban en el Ov, las cuales comprenden entre el 60-90% de las proteínas solubles del vitelo (Wyatt & Pan 1978; Hagedorn & Kunkel 1979; Chen et al. 1997). Las Vgs pueden ser modificadas en relación a las necesidades de los diferentes organismos, y se encargan del transporte de carbohidratos, fosfato, sulfatos (unidos covalentemente), lípidos, hormonas, carotenos, vitaminas y metales (Lagueux et al. 1981; Kunkel & Nordin 1985; Byrne et al. 1989; Dhadialla & Raikhel 1990; Niimi et al. 1993; Chen et al. 1997). De esta manera, las Vgs en algunas espe-

cies de miriápodos, crustáceos e insectos representan un complejo de lipoproteínas necesarias para la formación del vitelo (Meusy 1980; Lee 1991).

En líneas generales, la mayoría de los insectos presentan Vgs con subunidades que van desde los 50–200 kDa y de 50–60 kDa (Brennan *et al.* 1982; Valle 1993; Chen *et al.* 1997). Algunos casos particulares son los observados en los himenópteros donde no se produce el clivaje de las Vgs (Wheeler & Kawooya 1990; Kageyama *et al.* 1994; Chen *et al.* 1997) y, dentro de los dípteros, el caso particular de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) donde Bownes (1982) propuso denominar a las Vgs de esta especie como “proteínas del vitelo” (“yolk protein”) debido a diferencias en los sitios de síntesis, procesamiento y tamaño. Se ha descrito la presencia de “microvitelogeninas” de 21–31 kDa en algunas especies de lepidópteros y en *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) se identificaron proteínas hemolinfáticas de 30 kDa que también se encontraban presentes en grandes cantidades en el Ov (Valle 1993; Liu *et al.* 2015).

En crustáceos, se ha observado que las puestas de huevos viables son posibles siempre que haya una acumulación previa de Vg en los oocitos (van Herp 1993), existiendo una correlación positiva entre el desarrollo de los oocitos y los niveles de Vg en la HL. Las Vgs en condiciones nativas presentan pesos moleculares que van desde los 263 kDa a 800 kDa (Chang *et al.* 1993; Lee *et al.* 1997; Okumura *et al.* 2004). En los decápodos, la Vg está compuesta por al menos tres subunidades, cuyos pesos moleculares son aproximadamente 200, 100 y 90 kDa (Wilder *et al.* 2010). La síntesis de Vg varía según los distintos grupos: en los isópodos y anfípodos la esta síntesis ocurriría en el cuerpo graso (Souty & Picaud 1981; Meusy *et al.* 1983; Okuno *et al.* 2000), mientras que en los decápodos se da en el hepatopáncreas, en los Ovs o en ambos sitios (Tsukimura 2001; Tsang *et al.* 2003; Yang *et al.* 2005; Wilder *et al.* 2010) y, en algunas especies, la síntesis de Vg se da en las células foliulares del Ov (Kulkarni *et al.* 1991; Lee & Walker 1995).

Durante la vitelogénesis, en los ácaros las Vgs son sintetizadas en el cuerpo graso, se liberan a la HL y luego se transportan e incorporan a los oocitos para formar el vitelo (Chinzei *et al.* 1983; Rosell & Coons 1992; James & Oliver 1996). Si bien en la gran mayoría de los ácaros las Vgs son sintetizadas en tejidos extraováricos, como el cuerpo graso y/o en el intestino (Chinzei *et al.* 1983; James & Oliver 1997; Horigane *et al.* 2010), ciertas especies pueden presentar simultáneamente una síntesis ovárica (Shanbaky *et al.* 1990; Rosell & Coons. 1992). Se han caracterizado y vinculado múltiples Vgs y Vns en el Orden Ixodida, las cuales son hemo-glicolipoproteínas fosforiladas que poseen un grupo hemo debido a los hábitos hematófagos de las especies de este orden, y con pesos moleculares de más de 200 kDa (Chinzei *et al.* 1983; Shanbaky *et al.* 1990).

En el Orden Araneae, la información en cuanto a la síntesis e identificación de

Vgs es verdaderamente escasa y reciente. El primer reporte acerca de una potencial Vg fue descrito por Pourié y Trabalon (2003), quienes reportaron un polipéptido de 47 kDa presente en los Ovs y la HL de hembras de *Eratigena atrica* (syn. *Tegenaria atrica*) (Araneae: Agelenidae), la cual podía pertenecer al complejo Vg-Vn. En 2018, Guo y colaboradores a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (qRT-PCR) determinaron la expresión de tres Vgs, PpVg1, PpVg2 y PpVg3, en hembras adultas de *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae) (Guo et al. 2018). Recientemente, Bednarek y colaboradores (2019) determinaron la presencia de dos genes que codifican Vgs (PtVg4 y PtVg6), junto con la identificación de tres subunidades de una de las Vg (250, 47 y 30 kDa) en el intestino medio, Ovs y HL de *Parasteatoda tepidariorum* (Araneae: Theridiidae).

### 1.6.C Lipovitelinas

Una vez que las Vgs son absorbidas por el oocito, se denominan Vns o LVs. Sin embargo, las proteínas del vitelo en los insectos se han llamado, de manera bastante confusa, Vg como también LV dificultando el análisis comparativo. En los insectos, las LVs pueden comprender entre un 80-90% de las proteínas solubles del huevo, las cuales se almacenan principalmente en gránulos de vitelo. En ciertos casos, como en el gusano de seda (*B. mori*), la LV contribuye solo al 40% de las proteínas del vitelo, mientras que otras proteínas específicas del huevo representan aproximadamente el 20% de las proteínas solubles. Otras proteínas o lipoproteínas no asociadas a las LVs también pueden contribuir al vitelo, como ocurre en *Samia cynthia* (= *Phylosamia cynthia*) (Lepidoptera: Saturniidae) donde se ha observado la presencia de lipoforina en los huevos (Beenackers et al. 1985).

A partir de las distintas investigaciones, se han caracterizado distintas LVs en crustáceos revelando varias similitudes. En general, las LVs de crustáceos son complejos de caroteno-lipoglicoproteína de peso molecular alto, las cuales representan la principal reserva de huevo y poseen un rol crucial en la nutrición de los embriones y la supervivencia de las larvas (Lubzens et al. 1997; Garcia et al. 2008). Asimismo, todas las LVs contienen aproximadamente entre un 27-40% de lípidos, un porcentaje bajo de carbohidratos y no contienen fósforo unido a proteínas. En la mayoría de los casos, los fosfolípidos representan el principal componente lipídico, mientras que los triacilgliceroles y el colesterol solo se encuentran en pequeñas cantidades. Se ha observado que en general las LVs de los decápodos presentan un peso molecular de 330-370 kDa. En el cangrejo *C. sapidus*, la LV es una HDL globular con una densidad de hidratación de 1,16 g/ml la cual presenta un color naranja (Lee & Walker 1995). Esta lipoproteína del huevo está compuesta por un 48% de lípidos, un 50% de proteínas y solo un 2% de carbohidratos (Lee 1991). El fosfolípido principal es la fosfatidilcolina, presentando también triacilgliceroles y

colesterol en menor proporción. Su fracción proteica presenta dos apoproteínas, el péptido A de 107 kDa y el péptido B de 78 kDa. En los oocitos maduros de esta especie, las LVs representan el 95% las proteínas solubles y el 35% de las proteínas totales (Lee & Walker 1995). Garcia y colaboradores (2004) determinaron y caracterizaron una única LV de 440 kDa en los huevos de *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae). Esta LV esta compuesta por dos subunidades de 94 y 112 kDa, y presenta un 30% de lípidos (Garcia et al. 2004). En esta especie, la tasa de consumo de LV es lenta en etapas temprana del desarrollo siendo mayor su consumo en etapas embrionarias tardías (Garcia et al. 2008).

Empleando anticuerpos anti-LV, Lubzens y colaboradores (1997) determinaron en *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae) que tanto la Vg como la LV estaban compuestas por tres apolipoproteínas de 20, 120 y 80 kDa. Sin embargo, la composición lipídica entre ambas era diferente ya que la LV, en contraste con la Vg, transportaba cantidades considerables de triacilgliceroles (22%) y solo pequeñas cantidades de diacilgliceroles. En *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae), Chang y colaboradores (1994) determinaron que la LV presentaba más subunidades que la Vg (Chang et al. 1993) sugiriendo que la Vg era incorporada dentro de los oocitos y las subunidades largas eran clivadas para producir las subunidades más pequeñas de la LV (Chang et al. 1994).

En las arañas, se han identificado y caracterizado las LVs de *Schizocosa malitiosa* (Araneae: Lycosidae) (Laino et al. 2013) y de *P. pythagoricus* (Laino et al. 2011b), como así también se ha determinado la presencia y se ha cuantificado el contenido de LV en *Pardosa saltans* (Araneae: Lycosidae) (Trabalon et al. 2018). En la araña lobo *S. malitiosa* se identificaron y caracterizaron dos LVs las cuales se nombraron como SmLVI y SmLV2. La SmLVI es una lipoproteína HDL, con un peso molecular de 559 kDa la cual presenta tres apolipoproteínas de 116, 87 y 42 kDa, respectivamente. Esta LV presenta 67% de proteínas, 28% de lípidos y 3,6% de carbohidratos. En cambio, la SmLV2 es una VHDL con un 81% de proteínas, un 9% de lípidos y un 8,8% de carbohidratos. Los principales ácidos grasos presentes en ambas LVs fueron el 18:2 n-6; 18:1 n-9 y 16:0 (Laino et al. 2013). En *P. saltans*, otro miembro de la familia Lycosidae, las LVs contienen cuatro apolipoproteínas de 116, 87, 70 and 42 kDa, las cuales representan un 35-45% de las proteínas totales. A pesar de que no se caracterizó la composición de las LVs, los huevos contenían como lípidos principales los triacilgliceroles, fosfolípidos, ácidos grasos libres y esteroides (Trabalon et al. 2018). También se han identificado y caracterizado las LVs de *P. pythagoricus*, las cuales serán tratadas de manera particular en la siguiente sección por ser las LVs del modelo de estudio de esta tesis.

### I.6.D Lipoproteínas y lipovitelinas de *Polybetes pythagoricus*

En *P. pythagoricus* se han caracterizado tres lipoproteínas no ligadas al sexo, dos de las cuales presentan Hc como apolipoproteína (Cunningham et al. 1994; Cunningham & Pollero 1996; Cunningham et al. 2007).

La HDL1 es una lipoproteína similar en tamaño y composición a la lipoforina de insectos. Esta partícula lipoproteica posee una densidad de 1,13 g/ml, no contiene Hc como apolipoproteína y se compone de un 28% de lípidos y un 72% de proteínas. Esta lipoproteína contiene un 60% de fosfolípidos, un 17% de ácidos grasos libres y, a diferencia de la lipoforina que transporta principalmente diacilglicérols, esta lipoproteína transporta un 16% triacilglicérols. A su vez, esta partícula lipoproteica se compone de dos subunidades de 250 y 80 kDa respectivamente (Cunningham et al. 1994).

Dentro de las partículas lipoproteicas no ligadas al sexo que contienen Hc que le aporta una coloración gris/azul se encuentra una VHDL y la HDL2 las cuales transportan cerca del 70% de los lípidos circulantes totales, siendo la VHDL la que se encuentra en mayor concentración (Cunningham & Pollero 1996). La VHDL presenta una coloración azul, una densidad de 1,21-1,24 g/ml y esta compuesta por un 97% de proteínas y solo un 3% de lípidos. El pequeño porcentaje de lípidos esta representado principalmente por triacilglicérols y fosfolípidos, de los cuales un 40% de los lípidos de la partícula corresponde a la fosfatidilcolina. Además, a parte de la subunidad de 67 kDa correspondiente al monómero de Hc, esta partícula lipoproteica se compone minoritariamente de otras dos apoproteínas de 105 y 121 kDa denominadas como "proteínas no respiratorias" (Cunningham & Pollero 1996). La HDL2 presenta una coloración mas bien grisácea, con una densidad de hidratación de 1,20-1,28 g/ml y con un contenido bajo de lípidos (3,5%) los cuales están representados principalmente por triacilglicérols y fosfolípidos con un 22% de fosfatidilcolina. En cuanto a su composición apoproteica es igual que la de la VHDL (Cunningham & Pollero 1996).

*P. pythagoricus* presenta dos tipos de LVs. La LVI es una HDL que posee una densidad de 1,16 g/ml mientras que la LV2 es una VHDL que posee una densidad de 1,23 g/ml. Ambas constituyen el 51,5% del total de las proteínas presentes en el huevo. La LVI contiene un 49,3% de lípidos, 1,4% de carbohidratos y 49,3% de proteínas, y representa el 27,05% de las proteínas totales del huevo. A su vez, esta lipoproteína presenta un gran contenido de fosfolípidos (57,1%), con un 25% de fosfatidiletanolamina y un 23% fosfatidilcolina, y también presenta un 26% de esteroides esterificados. Por su parte, la LV2 contiene un 9,7% de lípidos, representados por un 25% de fosfatidiletanolamina, un 24% fosfatidilcolina y un 24% de esteroides esterificados; y contiene un 0,7% de carbohidratos y 89,6% de proteínas, las cuales representan el 23% de las proteínas del huevo (Laino et al. 2011b).

## I.7. Hemocianina

Al igual que el resto de los pigmentos respiratorios, las Hcs son metaloproteínas que se encuentran presentes en la HL responsables principalmente del transporte y el almacenamiento de oxígeno en varios moluscos y artrópodos (Markl 2013; Coates & Decker 2017). A diferencia del resto de los pigmentos respiratorios que contienen hierro, como la hemoglobina, la hemeritina y la clorocruorina, la Hc se caracteriza por presentar en el sitio activo dos átomos de cobre (Cu) encargados de unir reversiblemente el oxígeno molecular (van Holde *et al.* 2001; Coates & Decker 2017). Por otra parte, a diferencia de la hemoglobina y la hemeritina, las Hc de son proteínas extracelulares multiméricas de gran tamaño que circulan libremente por la HL, alcanzando concentraciones que varían según las especies desde  $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$  a más de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  y representando hasta un 95% de las proteínas de la HL (van Bruggen 1980; van Holde & Miller 1995; van Holde *et al.* 2001; Coates & Decker 2017). A su vez, estas cuproproteínas también presentan oligosacáridos unidos covalentemente al polipéptido, presentando un contenido de 2-9% p/p en moluscos y 0,1-4,9% p/p en artrópodos (Stoeva *et al.* 1995; Kato *et al.* 2017).

Si bien las Hc entre ambos Filos no son homólogas, presentando diferentes estructuras y secuencias, los sitios activos de estas enormes glucoproteínas multiméricas son similares tanto en la coordinación del Cu a través de los ligandos de histidina como también en la forma en que une el oxígeno (Magnus *et al.* 1994; Cuff *et al.* 1998; van Holde *et al.* 2001; Burmester 2002). El estado de oxidación de los átomos de Cu varía dependiendo si se encuentran en la forma oxi o en la forma desoxi-Hc. En el estado de desoxi-Hc, el par de átomos de Cu se encuentran como  $\text{Cu}^+$ . En este estado de oxidación los átomos de Cu se unen al oxígeno mediante una adición oxidativa en la cual una molécula de oxígeno se reduce a ion peróxido ( $\text{O}_2^{-2}$ ), mientras que los dos átomos de  $\text{Cu}^+$  son oxidados a  $\text{Cu}^{+2}$  (Rosas Zavala *et al.* 1996; van Holde *et al.* 2001). Este cambio en el estado de oxidación del Cu explica el color desarrollado tras la oxigenación, de manera que la Hc cambia de incolora al color azul distintivo que le ha dado el nombre a esta molécula (cian = azul) (Coates & Nairn 2014; Cunningham *et al.* 2020). Por otra parte, se ha observado *in vitro* que los cambios de pH, la concentración de cationes divalentes y la fuerza iónica disocian de forma reversible las moléculas de Hc de moluscos y artrópodos (van Bruggen 1980). A un pH alcalino, las moléculas se disocian en subunidades funcionales, las cuales pueden volverse a ensamblar en su estructura cuaternaria original a pH casi neutro y en presencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , los cuales podrían desempeñar funciones reguladoras estabilizando las conformaciones nativas de las Hcs (van Holde & Miller 1995; Markl 2013).

A partir del descubrimiento de la Hc descrito por primera en el molus-

co *Octopus vulgaris* (Octopoda: Octopodidae) por Fredericq (1878), se han realizado múltiples investigaciones acerca de los distintos tipos y estructuras de Hcs presentes. En moluscos, se encuentran presentes en las clases gasterópoda, poli-placófora, cefalópoda y algunos bivalvos (van Bruggen 1980). Sin embargo, ciertos grupos de moluscos presentan múltiples moléculas transportadoras de oxígeno (Terwilliger & Terwilliger 1985), algunos poli-placóforos y gasterópodos pueden presentar también mioglobinas en el músculo radular o Hb tisular que les brinda una coloración rojiza a varios tejidos (Eernisse et al. 1988; Terwilliger 1998). Se cree que esta yuxtaposición de pigmentos respiratorios permitiría que la Hb facilite la transferencia de oxígeno desde la Hc a los tejidos en condiciones hipóxicas. En el caso de los artrópodos, la presencia de Hc ha sido ampliamente descrita y reconocida en crustáceos, merostomados, arácnidos y algunos miriápodos (quilópodos y diplópodos), pero en los últimos 15 años también se ha identificado su presencia en algunos miembros de Hexapoda y en Onychophora, el taxón hermano de los Euarthropoda (Burmester 2002; Kusche et al. 2002; Hagner-Holler et al. 2004; Pick et al. 2009).

Debido a que las Hcs de artrópodos y moluscos parecen haber evolucionado independientemente a partir de proteínas diferentes a comienzo del Cámbrico, sus orígenes se consideran como eventos separados (van Holde et al. 2001). Se ha observado que la homología de secuencia entre las Hcs de artrópodos y moluscos es baja, aproximadamente de un 10% (Salvato & Beltramini 1990), difiriendo no solo en su organización estructural nativa sino también en el tamaño de las subunidades y en el contenido de Cu (0,17% en artrópodos y 0,25% en moluscos) (van Bruggen 1980; Markl & Decker 1992; van Holde & Miller 1995; Grossmann et al. 2000; van Holde et al. 2001; Burmester 2002; Markl 2013). Estas diferencias han llevado a proponer que ambas Hcs pertenecen a dos tipos de superfamilias de proteínas distintas (Markl 2013). En los moluscos, la Hc comparte similitudes de secuencia con las tirosinasas que se encuentran en muchas bacterias, hongos, plantas y en otros animales, lo que sugiere que estas tirosinasas y Hc de moluscos representan una superfamilia de proteínas ancestrales de unión al oxígeno similares a las tirosinasas (Burmester 2002). A pesar de que las Hcs de los artrópodos también están relacionadas con tirosinasas a base de Cu, se cree que estas Hcs emergieron de una enzima fenoloxidasa específica de artrópodos, siendo a su vez notable las diferencias entre las subunidades de Hc de los subfilos Chelicerata, Myriapoda y Crustacea (Burmester 2002). De esta manera, las diferentes Hcs de los filos habrían surgido de una convergencia evolutiva a partir de ancestros enzimáticos de tipo tirosinasa / fenoloxidasa. Por otra parte, en contradicción a la visión canónica de que las Hcs se consideraban restringidas a los artrópodos y moluscos, reportes actuales han demostrado la presencia de genes de Hc en una gama mucho más amplia de animales,

entre los que se encuentran los anélidos (Aguilera et al. 2013; Martín-Durán et al. 2013; Costa-Paiva et al. 2018).

### I.7.A Estructura de la hemocianina en artrópodos

Las Hcs de los artrópodos son miembros de una superfamilia de proteínas que comprende las fenoloxidasas de artrópodos (tirosinasas), pseudohemocianinas de crustáceos (criptocianinas) y hexamerinas de insectos (Burmester 2001). El peso molecular nativo de la Hc de este grupo puede variar entre 0,5–3,5 MDa (van Holde & Miller 1982), a diferencia de la Hc de los moluscos organizada en decámeros que presenta pesos moleculares de entre 3,3–13,5 MDa (Fernandez-Moran et al. 1966; van Holde et al. 2001; Markl 2013; Kato et al. 2017). La Hc de los artrópodos está formada por subunidades similares o idénticas denominadas monómeros (Waxman 1975; Markl & Decker 1992; Cunningham & Pollero 1996). Cada una de estas subunidades de 68–85 kDa cuenta con un único sitio de unión a una molécula de oxígeno, donde se encuentran un par de iones  $\text{Cu}^+$  coordinados por seis residuos de histidina de la cadena polipeptídica. Estos monómeros se ordenan formando hexámeros cúbicos ( $1 \times 6$ ) o múltiplo de hexámeros ( $n \times 6$ ) dependiendo de la especie (Markl & Decker 1992; Terwilliger 1998).

En los crustáceos, la Hc puede llegar a representar entre 25–90% de las proteínas de la HL dependiendo del estado fisiológico del animal (Depledge & Bjerregaard 1989; Hoeger & Schenk 2020). Dentro de este grupo, se describió en *Panulirus interruptus* (Decapoda: Palinuridae) una de las moléculas de Hc más pequeñas (540 kDa) con el par de átomos de Cu unidos por tres residuos de histidina (van Holde & Miller 1982; van Schaick et al. 1982).

Los quelicerados presentan monómeros con pesos moleculares de aproximadamente 70–85 kDa y sus Hcs se organizan en hexámeros o múltiplo de hexámeros cuyo nivel de agregación nativo es característico de cada grupo. Cada subunidad adquiere una posición diferente, generando estructuras macromoleculares grandes con subunidades que se agregan y/o polimerizan dando lugar a moléculas con múltiples sitios de unión al oxígeno que disminuyen la presión osmótica en la HL (van Holde et al. 2001). En el cangrejo cacerola *Limulus polyphemus* (Xiphosura: Limulidae) se presenta la concentración de Hc más alta observada en artrópodos con  $140 \text{ mg mL}^{-1}$  (Coates et al. 2012; Coates & Decker 2017). Tanto *L. polyphemus* como *Tachyplus tridentatus* (Xiphosura: Limulidae) presentan una estructura de Hc con 8-hexámeros (Kempter et al. 1985). La mayoría de los arácnidos presenta 7 tipos de subunidades primarias, que se combinan para formar una estructura cuaternaria tetrahexamérica ( $4 \times 6$ ). En el caso de los escorpiones, la estructura nativa de la Hc está compuesta por 8 cadenas polipeptídicas diferentes de aproximadamente unos 68–75 kDa, las cuales se disponen en cuatro hexámeros cúbicos ( $4 \times 6$ )

(Lamyali *et al.* 1980; Abid Ali *et al.* 2007; Cong *et al.* 2009). En el Orden Araneae, en general la estructura nativa de la Hc también está organizada en 4-hexámeros, sin embargo, dentro de algunos linajes de arañas el número de hexámeros puede variar según la especie (Markl *et al.* 1976; van Bruggen 1980; Markl 1986; Markl & Decker 1992; Voit *et al.* 2000; Averdam *et al.* 2003). En el Infraorden Mygalomorphae la Hc representa entre un 80-82% de las proteínas de la HL y todas las especies analizadas contienen Hc con estructuras de 4-hexámeros (4x6) (Markl *et al.* 1976; Voit *et al.* 2000), describiéndose 7 subunidades diferentes en *Aphonopelma hentzi* (Araneae: Theraphosidae) (Nentwig *et al.* 2012). En cambio, en algunas especies del Infraorden Araneomorphae se han observado otras estructuras como en el caso de *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae) donde se produce una mezcla con una relación de 1:2 entre la Hc monohexámerica (1x6) y dihexámerica (2x6), las cuales representan el 75% de las proteínas de la HL (Markl *et al.* 1976; Ballweber *et al.* 2002). Esta estructura de 2x6 se ha observado en varias familias como Agelenidae, Salticidae, Thomisidae, Clubionidae y Lycosidae (Markl 1986).

En Myriapoda las proteínas respiratorias se han considerado innecesarias durante mucho tiempo, sin embargo, se ha evidenciado la presencia de Hc asociada al transporte de oxígeno (Mangum *et al.* 1985; Jaenicke *et al.* 1999; Scherbaum *et al.* 2018). La primera evidencia de la presencia de Hc en Myriapoda se encontró en el ciempiés *Scutigera longicornis* (Scutigeraomorpha: Scutigerae) (Rajulu 1969). Luego se determinó en diferentes especies, Hcs con estructuras 6x6 y 3x6 o con mezcla de ellas (Markl *et al.* 2009; Damsgaard *et al.* 2013). No obstante, la ausencia de Hc en algunos Diplopodos y Chilopodos sugiere que la pérdida independiente de Hc en estos taxones (Pick *et al.* 2014).

En cuanto a la biosíntesis de la Hc en artrópodos, los reportes son escasos y muy variados entre los distintos Subfilos. En los crustáceos se cree que la biosíntesis de Hc en adultos ocurre en el hepatopáncreas (Senkbeil & Wriston 1981; Hennecke *et al.* 1990; Gellissen *et al.* 1991). Dentro de los quelicerados, el sitio de síntesis de Hc en *Limulus* y en las arañas serían unas células especiales llamadas cianocitos (Fahrenbach 1970; van Holde & Miller 1982; Kempter 1983), mientras que en escorpiones se cree que podría ser la endocutícula (Alliel *et al.* 1983).

### **1.7.B Vinculación de la hemocianina con la vitelogénesis y sus funciones secundarias**

Si bien son escasos los reportes que han vinculado la Hc al proceso de vitelogénesis, se ha identificado la presencia de Hc en el tejido ovárico de algunos crustáceos (Durliat 1984; Charniaux-Cotton 1985; Wache *et al.* 1988; Terwilliger 1991; Terwilliger & Dumler 2001; Rao *et al.* 2007; Ward *et al.* 2010). En algunos decápodos se ha descrito que la Hc está presente en los oocitos durante todas las

etapas del desarrollo ovárico, pero aumenta notablemente en la etapa vitelogénica a partir de la endocitosis de la Hc hemolinfática por parte del oocito (Durliat 1984; Charniaux-Cotton 1985; Terwilliger 1991; Terwilliger & Dumler 2001). A su vez, Terwilliger (1991) determinó que la Hc del embrión presentaba subunidades distintas a la Hc hallada en los oocitos y en la HL de los adultos, lo que sugería una síntesis de Hc por parte de los embriones. Durante el desarrollo, se producen cambios complejos en la expresión de las subunidades de Hc que culminan en el patrón de Hc observado en adultos (Terwilliger & Dumler 2001). Por otra parte, durante la vitelogénesis del camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) se ha observado que se produce un aumento en la concentración de Hc hemolinfática, al igual que un incremento en el contenido de Cu en el hepatopáncreas, HL y Ov. En ese trabajo, los autores proponen que el Cu sería un importante elemento para el desarrollo del Ov (Rao et al. 2007). Se ha reportado la presencia de una Hc específica de hembras de *Scylla olivacea* (Decapoda: Portunidae) la cual solo se encontraba en la HL de hembras adultas con Ovs maduros. Sin embargo, esta Hc particular no se hallaba en la HL de los juveniles de cualquier sexo ni en los machos adultos de esta especie (Chen et al. 2007). En cuanto a los quelicerados, solo se ha observado la presencia de cuatro hexámeros de Hc en el Ov de la araña *A. hentzi*, la cual sería similar o idéntica a la Hc hemolinfática de las hembras (Kempter 1986).

Como previamente se mencionó la Hc posee como función principal el transporte y almacenamiento de oxígeno, sin embargo, esta proteína presenta varias funciones secundarias relevantes. Una de estas funciones es la de unir y transportar moléculas hidrofóbicas, como se ha observado en algunas especies de moluscos, crustáceos y arácnidos, en donde la Hc puede actuar como apoproteína asociada a lípidos formando parte de las lipoproteínas hemolinfáticas (Heras & Pollero 1990, 1992; Cunningham & Pollero 1996; Hall et al. 1995; Cunningham et al. 2000; Laino et al. 2009, 2011a). Cunningham y colaboradores (1999) observaron *in vitro* la capacidad de la Hc de *P. pythagoricus* de unir una cantidad de lípidos significativamente mayor que la observada *in vivo*, sugiriendo una posible adaptación para el transporte de diferentes cantidades de lípidos en respuesta a variaciones fisiológicas o ambientales. Asimismo, en *A. hentzi* se observó que la Hc era capaz de unir ecdisona aunque con baja afinidad (Jaenicke 1999).

La Hc también puede presentar actividad fenoloxidasa. Estas proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza catalizan las reacciones enzimáticas iniciales activando el sistema pro-fenoloxidasa que resulta en la producción de melanina (Cerenius et al. 2010). En los invertebrados, la fenoloxidasa desempeña funciones vitales en las reacciones inmunitarias, el cierre de heridas y los procesos de esclerotización en los artrópodos (Sritunyaluksana & Söderhäll 2000). A partir de la activación por proteólisis o por desdoblamiento parcial de la estructura con

tratamientos con sales o detergentes (SDS), la Hc es activada modificando su sitio activo y permitiendo la interacción con sustratos fenólicos (Decker & Rimke 1998; Decker & Tuzcek 2000; Decker *et al.* 2001; Jaenicke & Decker 2008). Particularmente en los arácnidos, la actividad fenoloxidasa derivada de la Hc se ha estudiado solo en las arañas *A. hentzi* y *P. pythagoricus*, como también en el escorpión *Pandinus imperator* (Scorpiones: Scorpionidae) (Decker & Rimke 1998; Baird *et al.* 2007; Laino *et al.* 2015; Schenk *et al.* 2015).

La Hc también puede participar en la inmunidad innata a partir de la producción de péptidos antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos, un papel fundamental para aquellos organismos que carecen de un sistema inmunológico adaptativo. Estos péptidos, que en su mayoría tienen pesos moleculares por debajo de 25-30 kDa (Bulet *et al.* 2004), se han podido aislar de los hemocitos o a partir de una hidrólisis parcial del extremo C-terminal de la Hc (Schnapp *et al.* 1996; Destoumieux *et al.* 1997; Iwanaga & Kawabata 1998; Khoo *et al.* 1999; Lee *et al.* 2003). Por otra parte, ciertos trabajos han revelado que péptidos derivados de la Hc presentaban propiedades antivirales (Zhang *et al.* 2004; Dolashka-Angelova *et al.* 2009; Coates & Nairn 2014) como así también propiedades antifúngicas (Riciluca *et al.* 2012). Asimismo, muchas de las proteínas que componen los coágulos en las arañas están relacionadas con el sistema inmunológico innato, siendo la Hc el componente principal, lo que sugiere que esta proteína también juega un papel en la formación del coágulo (Sanggaard *et al.* 2016). Se ha detectado la presencia de fragmentos de Hc como componente de la cutícula en algunos artrópodos (Paul *et al.* 1994; Coates & Nairn 2014; Adachi *et al.* 2005).

Asimismo, se observó que la Hc tiene función de aglutinación y hemolítica (Zhang *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008, Yan *et al.*, 2011). Al incubar la Hc frente a diferentes bacterias patógenas se observó la agregación de las células debido a la interacción entre la Hc y la membrana plasmática de la célula diana, como también, las subunidades y oligómeros de Hc indujeron la ruptura de eritrocitos a través de la formación de poros permeables.

## II Objetivos generales

Durante más de 20 años, *P. pythagoricus* ha sido un gran modelo de araña para el análisis de ciertos aspectos bioquímicos y fisiológicos, brindando una fuente importante de información sobre los conocimientos bioquímicos básicos tanto a nivel estructural como funcional del organismo. De esta especie se han caracterizado las lipoproteínas, se ha estudiado el transporte de lípidos y se ha analizado el metabolismo de varios órganos, como así también se han realizado estudios ecotoxicológicos.

Con la finalidad de analizar y avanzar en nuevos aspectos bioquímicos y fisiológicos de esta especie, los objetivos generales de este trabajo de tesis son:

- Analizar las variaciones bioquímicas de los órganos vinculados al proceso de formación del vitelo.
- Determinar cuali y cuantitativamente los recursos principales que las hembras almacenan y destinan a los huevos.
- Analizar el consumo de los distintos recursos durante el desarrollo embrionario, postembrionario y luego de la emergencia.

Tanto las hipótesis como los objetivos específicos planteados para el análisis bioquímico de la vitelogénesis como para el desarrollo de *P. pythagoricus* se encontrarán enunciados en la introducción de los respectivos capítulos (Capítulo IV: Análisis del proceso de vitelogénesis en *Polybetes pythagoricus* y Capítulo V: Análisis del desarrollo de *Polybetes pythagoricus*).

# III Materiales y métodos

**III.1** Obtención y mantenimiento de ejemplares de *Polybetes pythagoricus*

**III.2** Análisis de adultos de *Polybetes pythagoricus*

**III.3** Análisis del desarrollo de *Polybetes pythagoricus*

**III.4** Aislamiento de lipoproteínas hemolinfáticas y lipovitelinas de *Polybetes pythagoricus*

**III.5** Análisis de lípidos

**III.6** Análisis de las proteínas

**III.7** Determinación del contenido de glucógeno

**III.8** Análisis estadístico

## III.1 Obtención y mantenimiento de ejemplares de *Polybetes pythagoricus*

### III.1.A Sitio de muestreo y obtención de ejemplares juveniles y adultos.

Los ejemplares adultos y juveniles de *P. pythagoricus* utilizados para el presente trabajo de tesis se hallaron y capturaron en los montes de eucaliptos (*Eucalyptus* sp.) (permiso de captura de la provincia de Buenos Aires No. 117/16) presentes en el Parque Martín Rodríguez (S: 34° 52' 56", O: 57° 56' 07") (Figuras III.1) ubicado en la ciudad de Ensenada (Partido de Ensenada, Provincia de Buenos Aires), en el parque Pereyra Iraola (S: 34° 50' 39", O: 58° 10' 55") perteneciente al partido de Berazategui, y en otras zonas aledañas a la ciudad de La Plata donde se pueden encontrar también estos árboles.

### III.1.B Captura de los ejemplares y su mantenimiento en el laboratorio

Los ejemplares utilizados para los estudios fueron capturados y colocados individualmente en frascos de plástico cilíndricos de 10 cm de diámetro y 5 cm de altura (Figura III.2). Para esto, los frascos se apoyaban sobre el tronco para rodear al animal, de manera que pudieran ingresar al mismo sin provocarles daño. Se utilizaron aproximadamente 120 arañas obteniéndose de estos muestreos ejemplares adultos, machos ( $1,42 \pm 0,37$  g) y hembras ( $1,93 \pm 0,59$  g), como también ejemplares juveniles de desarrollo avanzado ( $1,2 \pm 0,4$  g).

Las arañas fueron trasladadas al laboratorio y mantenidas a  $20 \pm 1$  °C con un fotoperíodo de 14:10 (L:O)h hasta el momento de su utilización. Las arañas que requerían mantenerse durante un largo período en el laboratorio fueron alimentadas con cucarachas runner (*Shelfordella tartara*) o cucarachas dubia (*Blaptica dubia*) vivas adquiridas comercialmente.

**Figuras III.1**

Imagen satelital de la zona del principal sitio de muestreo, el Parque Martín Rodríguez (resaltado con borde rojo).

**Figura III.2**

Ejemplares hembras de *P. pythagoricus* capturados en el Parque Martín Rodríguez, Partido de Ensenada, Provincia de Buenos Aires.



## III.2 Análisis de adultos de *Polybetes pythagoricus*

### III.2.A Obtención de medidas generales de machos y hembras adultos

Para poder trabajar con los ejemplares, las arañas fueron previamente anestesiadas con frío a 4 °C durante 15-20 min dependiendo del tamaño del individuo y luego fueron sacrificados con frío a -20 °C. Luego, los individuos fueron pesados en una balanza de precisión 0,01 g para obtener los valores de peso corporal de los

machos y de las hembras. Obtenidos estos valores, se procedió a medir el tamaño del prosoma y del opistosoma. Para esto, se midió el ancho y el largo de ambas regiones con un calibre digital de acero inoxidable Miyoshi (0–150 mm).

### III.2.B Extracción de hemolinfa y disección de los órganos

La extracción de HL fue realizada bajo el método utilizado por Cunningham y colaboradores (1994). Para esto se realizaron cortes en las patas a nivel del fémur y el resto del cuerpo de la araña se colocó en un embudo de vidrio que desembocaba en un tubo eppendorf de 1,5 ml. A su vez, todo este sistema se colocó en un tubo para centrífuga Falcon™ de 50 ml para ser centrifugado a baja velocidad durante 15 min en una centrífuga International Model UV. De esta manera, la HL fluyó por el embudo y se acumuló en el eppendorf. Obtenida la HL, se midió el volumen final de la misma para cada uno de los individuos. La mitad del volumen de HL se destinó para la extracción y análisis de lípidos de la muestra y el resto fue fraccionado en alícuotas de 20  $\mu$ l y guardado a -70 °C hasta el momento de ser utilizado.

El tejido del músculo fue extraído de las patas que fueron cortadas. Para esto se extrajo el tejido con una pinza y fue colocado en un tubo eppendorf de 1,5 ml para luego ser pesada. Extraída la HL y el músculo, se procedió a la disección de resto del cuerpo de los individuos. Inicialmente se separó la región del prosoma y del opistosoma a través de una incisión a nivel del pedicelo. Separado el opistosoma, se realizó un corte longitudinal en el tegumento de esta región a nivel de la línea media dorsal. Luego de la separación del tegumento, se removió el corazón tubular dorsal quedando expuestos los DI. Los DI fueron extraídos con una pinza de disección fina, colocados en un tubo eppendorf de 1,5 ml y pesados. Al extraer los DI, quedan expuestos los órganos reproductores internos (Ovs y testículos) ubicados en la parte ventral anterior. Las gónadas fueron extraídas y colocadas en tubos eppendorf y pesadas. Todos los órganos y/o tejidos extraídos fueron pesados en una balanza analítica Mettler-Toledo (New Classic modelo MS-204S) con una precisión de 0,0001 g.

Obtenido estos valores, la mitad de cada muestra fue separada y pesada en tubos de ensayos para el análisis de componentes lipídicos. El resto de la muestra fue colocado en 1 ml de buffer fosfato potasio 50 mM (pH 7,4) con la adición de un coctel inhibidor de proteasas 1:1000 (v/v) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) para ser posteriormente homogeneizado.

### III.2.C Homogeneización y centrifugación de los tejidos de adultos

Las muestras de las gónadas, músculo y DI que se obtuvieron a partir de las

disecciones de los adultos fueron homogeneizadas con un homogeneizador Potter-Elvehjem en 1 ml de buffer fosfato potasio 50 mM (pH 7,4) con el coctel de inhibidor de proteasas 1:1000 (v/v) en el que se habían conservado. Posteriormente, las muestras homogeneizadas fueron centrifugadas a 10.500 g a 4 °C durante 20 min. De esta centrifugación se descartó el pellet y se midió el volumen de sobrenadante. El sobrenadante obtenido se fraccionó en alícuotas de 100  $\mu$ l las cuales fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de ser utilizadas.

### III.2.D Cálculo del índice gonadosomático e índice hepatosomático

En las hembras, el índice gonadosomático (IGS) es un indicador macroscópico de actividad gonadal el cual refleja los cambios en el peso de las gónadas respecto a la fase de madurez ovárica, midiendo la madurez sexual de las hembras a partir del desarrollo del Ov (Rodríguez-González *et al.* 2006; Ferré 2012; Garcia & Heras 2012; Xu *et al.* 2014). Para calcular este índice se realizó la relación porcentual del peso fresco del Ov respecto al peso corporal del individuo, el cual se expresa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso del Ov (g)} * 100}{\text{Peso corporal del individuo (g)}}$$

Inicialmente, para calcular la variación del peso de los principales órganos de reserva durante la madurez ovárica, en peces y en crustáceos se ha utilizado el índice hepatosomático (IHS) (Xu *et al.* 2014). Considerando que en arañas los DI son el principal órgano de reserva, este índice se calculó a partir de la relación porcentual del peso fresco de los DI respecto al peso corporal del individuo, expresándose de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IHS} = \frac{\text{Peso de los DI (g)} * 100}{\text{Peso corporal del individuo (g)}}$$

### III.2.E Análisis histológico de los ovarios

Obtenidas las mediciones generales, se procedió a realizar el análisis histológico de los Ovs de hembras seleccionadas acorde a sus valores métricos generales. Este análisis fue llevado a cabo en el Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (MACN) y fue desarrollado por la Dra. Florencia Arrighetti. Los tejidos fijados fueron posteriormente incluidos en resina y analizados con la

tinción clásica de hematoxilina-eosina. Para llevar a cabo este procedimiento se realizaron los pasos de fijación de las muestras por inmersión, deshidratación, infiltración con el medio de inclusión, polimerización en el medio de inclusión y, por último, el corte y la tinción de las muestras.

### III.2.E.a Fijación de las muestras

De los Ovs extraídos de las ocho hembras analizadas se fijaron pequeñas porciones en una solución de Bouin. Los materiales empleados para la preparación de esta solución de fijación fueron:

- Agua destilada
- Formol puro al 40%
- Ácido acético glacial 1,5 M
- Ácido pícrico (cantidad necesaria para saturar la solución)

Para preparar un litro de esta solución se parte de una relación agua:formol:ácido acético de 70:25:5 (v/v). Para ello, se mezcla el agua destilada con el formol al 40% y se agrega el ácido pícrico hasta saturar la solución. Por último, se agrega el ácido acético glacial 1,5 M en el momento que la solución de fijación va a ser utilizada. Los tejidos a fijar fueron sumergidos en la solución fijadora entre 4 a 8 h dependiendo el tamaño del tejido. Luego, las muestras fueron lavadas dos veces con etanol 70° y conservadas en esta misma solución de alcohol hasta el momento de ser utilizadas.

### III.2.E.b Inclusión en resina

Para realizar la inclusión de la muestra en resina los tejidos a analizar debieron ser previamente deshidratados. La eliminación del contenido de agua en los tejidos se llevó a cabo en diluciones seriadas crecientes de etanol. Los tejidos conservados en etanol 70° fueron deshidratados durante una noche en etanol 80°. Pasado ese tiempo, se descartó la dilución de etanol 80° y los tejidos se mantuvieron durante 2 h en etanol 96°.

Luego de la deshidratación, los tejidos fueron incluidos en resina Leica (Kit Leica HistoResin®, Heidelberg, Alemania). Para esto, los tejidos se mantuvieron durante 2 h en una solución de infiltración formada por 50 ml de resina básica y 0,5 g del activador (peróxido), los cuales se mezclaron y se agitaron hasta que se disolvió completamente el activador en la resina básica. Posteriormente, se preparó una solución final para generar los tacos de resina que fueron posteriormente cortados. Esta solución final se obtuvo a partir de una mezcla de 15 ml de solución de infiltración con 1 ml del catalizador. El tejido infiltrado se extrajo y se ubicó en un molde para formar el taco. Por molde se colocó 0,4 ml de la solución final y el tejido se dejó a temperatura ambiente en esta solución hasta que el taco endureció.

### III.2.E.c Cortes de las muestras y preparación de los portaobjetos

Los fragmentos de Ovs incluidos en resina Leica se cortaron en secciones de  $4\ \mu\text{m}$  con un micrótopo de rotación con cuchillas de carburo de tungsteno (Leica RM 2155, Alemania). Los cortes fueron colocados en los portaobjetos y llevados a estufa ( $40\text{--}50\ \text{°C}$ ) o a una placa caliente y se dejaron durante un mínimo de 6–8 h para permitir la adhesión de los tejidos al portaobjetos.

### III.2.E.d Tinción con hematoxilina – eosina y obtención de las medidas

Una vez adherido al portaobjeto se procedió a realizar la tinción del corte con hematoxilina y eosina. Para llevar a cabo este proceso, inicialmente se hidratan los cortes adheridos a los portaobjetos durante 10 min con agua destilada. Una vez hidratado, el primer paso es la tinción con hematoxilina.

Para la tinción de las muestras se utilizó la hematoxilina de Carazzi (hemalumbre). Los materiales empleados para la preparación de la hematoxilina de Carazzi fueron:

- Hematoxilina: 0,5 g
- Sulfato doble de aluminio y potasio (“alumbre de potasio”): 25 g
- Iodato de potasio: 0,1 g
- Etanol  $100^\circ$ : 1 ml
- Glicerina: 100 ml
- Agua destilada: 400 ml

Para la preparación del colorante, se disolvió el alumbre de potasio en el agua destilada tibia al cual se le agregó luego la hematoxilina previamente disuelta en 1 ml de etanol  $100^\circ$ . Por último, se agregó el iodato de potasio y la glicerina. Para que los tejidos se colorearan, se mantuvieron durante 18–20 min con esta solución de hematoxilina. Luego de la tinción, los preparados fueron virados con agua corriente.

Previo a la tinción con eosina, se limpiaron las muestras con agua destilada. Los materiales empleados para la preparación de la eosina alcohólica fueron:

- Eosina: 0,25 g
- Etanol  $70^\circ$ : 100 ml

Una vez que la eosina se solubilizó en el alcohol, se dejó la muestra coloreando con la eosina alcohólica durante 15 min. Finalmente, se deshidrataron los cortes a partir de lavados con diluciones alcohólicas ascendente con etanol  $70^\circ$ , etanol  $90^\circ$  y, finalmente, etanol  $96^\circ$ . Una vez deshidratado, se dejó secar el corte a temperatura ambiente y se montó con Bálsamo de Canadá sintético.

Los cortes de los Ovs se observaron bajo microscopía óptica (AXIOPLAN 2 Zeiss®), y los diámetros de los oocitos se midieron considerando solo aquellos oo-

citados donde el núcleo y nucléolo era visible. Las mediciones se realizaron utilizando el programa de análisis de imágenes AxioVision Rel. 4.6.3 (Zeiss®) midiendo dos diámetros tomados en ángulos rectos, siendo uno de estos el diámetro máximo. A partir de los promedios de estas medidas se obtuvieron los diámetros presentados en la sección del análisis histológico del capítulo IV.

### III.3 Análisis del desarrollo de *Polybetes pythagoricus*

#### III.3.A Obtención de las ootecas y su mantenimiento en el laboratorio

Se obtuvieron en el campo hembras grávidas de gran tamaño ( $3,14 \pm 0,9$  g) las cuales fueron trasladadas y mantenidas en el laboratorio hasta el momento de la puesta. Estas hembras fueron mantenidas en estufa a  $25 \pm 1$  °C,  $75 \pm 5\%$  de humedad relativa y un fotoperíodo de 14:10 (L:O)h. A diferencia de otras especies, el desarrollo de *P. pythagoricus* puede darse aún en ausencia de la madre de manera que, una vez que se producía la puesta, las hembras eran separadas de sus ootecas.

#### III.3.B Determinación de los grupos experimentales

Todas las ootecas analizadas ( $1,21 \pm 0,48$  g/ooteca) fueron mantenidas en estufa en las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa y fotoperíodo que las madres. Para el análisis del desarrollo de *P. pythagoricus* se utilizaron ocho grupos experimentales. Estos estadios experimentales fueron enumerados del 1 al 8, donde los primeros cinco son estadios intraooteca (se desarrollan dentro de la ooteca) y los últimos tres son estadios extraooteca (estadios emergentes) (Figura III.3). Los distintos estadios utilizados para este análisis se enumeraron para facilitar la interpretación de los resultados, sin que esto implique una relación con la enumeración de los estadios postembrionarios descritos por Galiano en 1971. Se detalla a continuación los ocho grupos experimentales y en el caso de los estadios postembrionarios se especifica, para facilitar la comparación, el número del estadio al que corresponde cada uno de los grupos experimentales dentro de la clasificación brindada por Galiano (1971):

##### Estadios intraooteca:

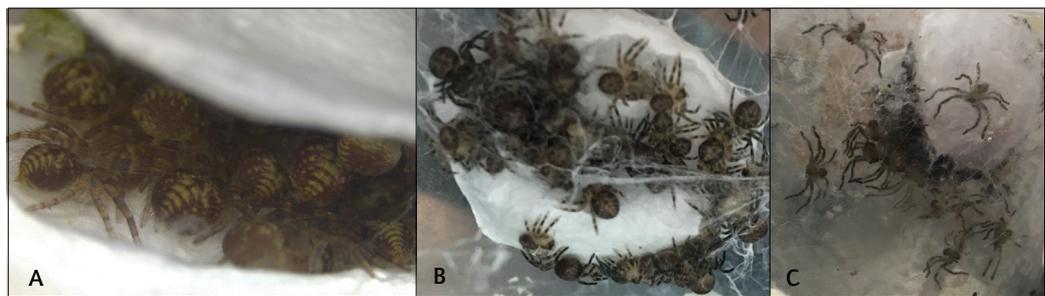
- **Estadio 1:** estadio de huevo (menos de 12 h luego de la puesta)
- **Estadio 2:** estadio embrionario de 5 días
- **Estadio 3:** estadio embrionario de 10 días
- **Estadio 4:** estadio postembrionario de 15 días (corresponde al estadio tres descrito por Galiano (1971) sin depósito de pigmento cuticular)

- **Estadio 5:** estadio postembrionario de 20 días (corresponde al estadio tres descrito por Galiano (1971) con depósito de pigmento cuticular)

#### Estadios extraooteca:

- **Estadio 6:** juveniles gregarios de  $25 \pm 1$  día (corresponde al estadio cuatro descrito por Galiano (1971) luego de la emergencia)
- **Estadio 7:** juveniles después de la primera muda postemergencia de  $35 \pm 1$  día (corresponde al estadio cinco descrito por Galiano (1971))
- **Estadio 8:** juveniles dispersos de  $42 \pm 1$  día (corresponde al estadio cinco descrito por Galiano (1971) una semana después de la primera muda postemergencia)

Con el fin de facilitar el análisis de los resultados obtenidos del estudio bioquímico del desarrollo de *P. pythagoricus*, los ocho grupos experimentales se describen con más detalle en el Capítulo V.



**Figura III.3** Estadios del desarrollo de *P. pythagoricus*. Estadios intraooteca: (A) Estadio 5 (postembrionario de 20 días). Estadios extraooteca: (B) Estadio 6 (juveniles gregarios) y (C) Estadio 7 (juveniles después de la primera muda postemergencia).

### III.3.C Medidas generales

#### III.3.C.a Medidas de la ooteca

Para cada estadio, se obtuvo el peso de la ooteca entera (g), del cocón de seda (g) y de los individuos (g) en su respectivo estadio del desarrollo (estadio I al 8). Para el análisis de los estadios intraooteca, luego de ser pesada la ooteca con los individuos, se procedió a la apertura de la misma a partir de la unión entre el techo y la base del cocón de seda y se cuantificó la cantidad de individuos que contenía cada ooteca y se separaron los individuos viables. Los huevos no viables son fácilmente reconocibles por su coloración más opaca, son más duros y, en estadios avanzados, pueden presentar una estructura arrugada producto de la desecación. En el caso de los estadios de juveniles, se determinaron como juveniles no viables aquellos juveniles que quedaron en etapas del desarrollo anteriores a la analizada y sin ningún tipo de movilidad. Para el análisis de los estadios extraooteca, las ara-

ñas fueron previamente anestesiadas con frío para separarlas del resto de la ooteca y de las mudas y poder así cuantificar el total de los individuos.

Una vez cuantificada la cantidad de individuos por ooteca, se separaron  $12 \pm 2$  individuos viables de cada ooteca para el análisis del peso húmedo y peso seco de cada estadio, mientras que el resto de los individuos viables fueron pesados, anestesiados con frío a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sacrificados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y congelados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del procesamiento de las muestras. Separados los individuos, se pesó el cocón de seda y se midió su diámetro ( $26 \pm 3\text{ mm}$ ), como también en aquellos casos que estaban presentes, se separaron las distintas mudas. El cocón de seda y las mudas fueron guardadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  junto a las muestras de los individuos viables.

### **III.3.C.b Peso húmedo y peso seco de los individuos.**

Los individuos separados previamente, fueron colocados en tubos Khan rotulados y pesados en la balanza analítica Mettler-Toledo para obtener los valores de peso húmedo de cada individuo. Obtenido los pesos húmedos, los individuos fueron anestesiados con frío a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente sacrificados con frío a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Pasado ese tiempo, los tubos con los individuos fueron colocados en una placa de calentamiento a  $70 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los individuos fueron pesados cada aproximadamente 3 h hasta que el valor del peso seco fuera constante.

### **III.3.C.c Cálculo de la velocidad de desplazamiento de los juveniles**

Con el fin de comparar la velocidad de los juveniles móviles emergentes, se estimó la velocidad de 15 individuos tanto del estadio 6 (juveniles gregarios) como del estadio 8 (juveniles dispersos). Para el cálculo de la velocidad, los individuos fueron colocados en cajas de Petri que presentaban un papel milimetrado en la base para poder medir las distancias de los movimientos.

Los videos se filmaron con cámara con sensor CMOS Sony Exmor RS de 12 MP y lente  $f/1.8$ , 28 mm (distancia focal) con autofocus y estabilización óptica de imagen,  $1920 \times 1080$  pixels (1080 p) de resolución a 240 cps (cuadros por segundo). Los videos se realizaron filmando en paralelo al plano longitudinal de las arañas. Para poder calcular la distancia recorrida por la araña, el movimiento se determinó acorde a las patas delanteras, desde que la despegaba del suelo hasta que la apoyaba. Para este análisis se consideraron solo los movimientos rectos, obteniéndose  $5 \pm 1$  medidas de velocidad por araña. Utilizando el programa Adobe After Effects, se pudieron agregar los cuadros por segundo (cps) midiendo así la cantidad de cuadros acorde a la distancia recorrida por el individuo, estimando el tiempo de ese movimiento. Los valores de velocidad fueron expresados en cm/s.

### **III.3.C.d Homogeneización y centrifugación de las muestras**

Para el análisis de la fracción acuosa de los distintos estadios del desarrollo,

Los individuos viables de cada estadio fueron homogeneizados en 1,5 ml de buffer fosfato potasio 50 mM (pH 7,4) con inhibidor de proteasas 1:1000 (v/v) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Una vez obtenido el homogenato, la mitad del volumen de la muestra de cada uno de los estadios se utilizó para el análisis de lípidos. El resto del volumen de cada muestra fue centrifugado a 10.500 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante se fraccionó en varias alícuotas las cuales fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de ser utilizadas.

Por otra parte, para complementar el análisis del desarrollo, se analizaron muestras de cuerpo entero de adultos y de juveniles de desarrollo avanzado obtenidos en el campo. Previamente a ser homogeneizados, los individuos fueron anestesiados con frío a 4 °C y posteriormente sacrificados con frío a -20 °C. El cuerpo completo de cada individuo fue homogeneizado en 3 ml de buffer fosfato potasio 50 mM (pH 7,4) con la adición de un coctel inhibidor de proteasas 1:1000 (v/v) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Una vez obtenido el homogenato, la mitad del volumen de la muestra de cada individuo se utilizó para el análisis de lípidos. El resto del volumen de cada muestra fue centrifugado en las mismas condiciones que los individuos de los distintos estadios del desarrollo y sus sobrenadantes fueron almacenados a -70 °C.

### **III.4 Aislamiento de lipoproteínas hemolinfáticas y lipovitelinas de *Polybetes pythagoricus***

#### **III.4.A Ultracentrifugación en gradiente de densidad y fraccionamiento**

El aislamiento de las lipoproteínas de la HL y las LVs se realizó mediante el proceso de ultracentrifugación en gradiente de densidad. Esta técnica permite que las partículas lipoproteicas se movilizan a lo largo del gradiente hasta un punto donde su densidad es idéntica a la de la solución del gradiente. Para evitar la sedimentación de las partículas lipoproteicas, la centrifugación se realiza sobre un “colchón” de material que posee una densidad superior a la de las lipoproteínas.

Para la obtención de las lipoproteínas VHDL y HDLI de la HL de *P. pythagoricus*, se extrajo la HL de cuatro arañas adultas utilizando el método de extracción previamente descrito. La HL obtenida se colocó en un tubo de centrífuga sobre un colchón de NaBr con una densidad 1,26 g/ml y con un volumen final de 4,3 ml.

Para el aislamiento de las LVs de *P. pythagoricus*, se utilizaron dos ootecas (1,25 ± 0,35 g/ootecas) que fueron separadas de las madres un día después de la puesta. Cada ooteca fue homogeneizada en 1 ml de buffer Tris-Cl 20 mM con la adición de un coctel inhibidor de proteasas 1:1000 (v/v) (Sigma Chemicals, St. Louis,

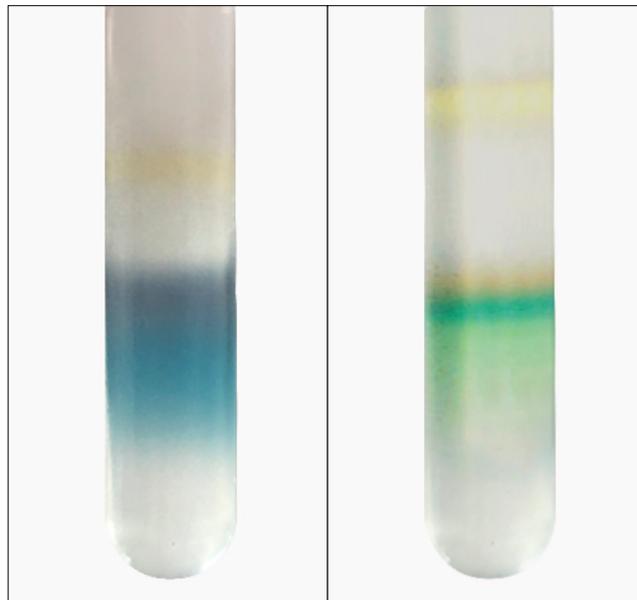
MO, USA). Los homogenatos obtenidos fueron centrifugados a 10.500 g durante 20 min y luego durante 60 min a 100.000 g para obtener la fracción citosólica. Dichas centrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga Beckman L8 70M con un rotor de ángulo fijo 70.1 Ti. La fracción citosólica fue utilizada para el aislamiento de las LVs de *P. pythagoricus*, para lo cual se colocó el sobrenadante obtenido en un tubo de centrifuga sobre un colchón de NaBr (densidad 1,28 g/ml) con un volumen final de 4,3 ml.

La separación de las lipoproteínas de ambas muestras se realizó en la ultracentrífuga Beckman L8M en un rotor de ángulo móvil SW60 Ti a 178.000 g y 10°C durante 22 h (Figura III.4). Junto a estas muestras, se centrifugó una solución blanco de NaCl de una densidad similar a la asumida para las muestras para corroborar la formación del gradiente y determinar las densidades relativas. Para la HL se utilizó una solución de NaCl con una densidad de 1,006 g/ml, mientras que en la centrifugación de las LVs se utilizó una solución de NaCl de 1,016 g/ml.

Una vez finalizada la centrifugación, se fraccionó el contenido de la muestra y de los blancos en alícuotas de 200  $\mu$ l desde el borde del tubo hasta el fondo del mismo.

#### Figura III.4

Gradientes de densidad obtenidos luego de la ultracentrifugación. Izquierda: Gradiente con las lipoproteínas de la hemolinfa (HL); Derecha: Gradiente con las lipovitelinas (LVs) de *P. pythagoricus*.



#### III.4.B Medidas efectuadas en las fracciones obtenidas de la ultracentrifugación

Para poder determinar las fracciones que contenían a las lipoproteínas, primero se midieron los índices de refracción de las fracciones correspondientes a los blancos. Utilizando un refractómetro Abbey (Bausch & Lomb), se calculó la

densidad de cada fracción interpolando los datos obtenidos con los tabulados por Lindgren (1975).

La presencia de color en las lipoproteínas hemolinfáticas y en las LVs de *P. pythagoricus* facilitó su identificación en el gradiente y en las fracciones de las alícuotas separadas. Para determinar fehacientemente la presencia de las lipoproteínas presentes en cada fracción del gradiente, se determinó a partir de la absorbanza de luz UV a 280 nm la presencia de proteínas en cada alícuota de las muestras en un espectrofotómetro Harvard Biochrom Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible. De esta manera, las fracciones que presentaban los máximos valores de absorción, y por lo tanto donde se encontraban las lipoproteínas, fueron reunidas para cada tipo de lipoproteína. Luego se determinó la concentración proteica de las alícuotas mediante el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Luego de cuantificar el contenido de proteínas de las alícuotas finales de LV1 y LV2 como también de la VHDL y HDL, las muestras se fraccionaron y se conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizadas.

## III.5 Análisis de lípidos

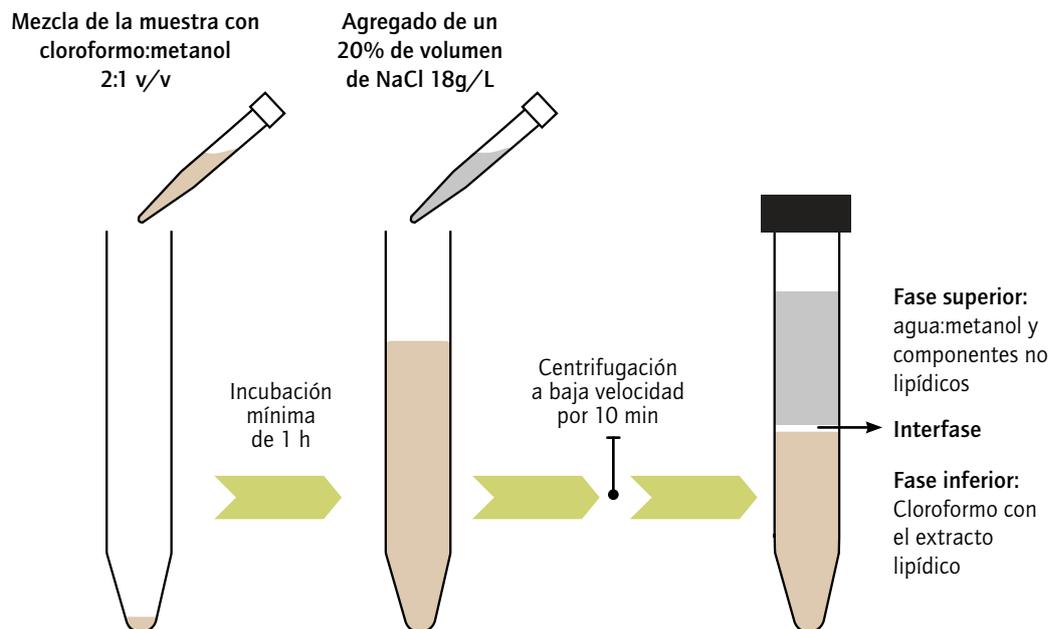
### III.5.A Obtención de lípidos totales

La obtención de lípidos totales de todas las muestras se realizó a partir de la aplicación del método de Folch y colaboradores (1957). Este método utiliza una mezcla de solventes de extracción formados por una relación cloroformo:metanol 2:1 (v/v), que permite separar los contaminantes no lipídicos de los componentes lipídicos de la muestra. De esta manera, se obtiene un sistema bifásico donde la fase superior (metanol-agua) contiene todas las sustancias no lipídicas y la fase inferior (cloroformo) contiene esencialmente todos los lípidos de la muestra (Figura III.5), obteniéndose extractos lipídicos puros a partir de un paso de extracción directa de muestras de tejidos.

Las muestras de gónadas, músculo, DI y HL extraídos de los adultos que se destinó al análisis de los componentes lipídicos fueron embebidos en 6 ml de la mezcla de solventes de extracción. A excepción de las muestras de HL, el resto de las muestras fueron homogeneizadas junto con la mezcla de solventes de extracción de lípidos en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Todos los tejidos homogeneizados como también la HL fueron agitados vigorosamente en un agitador vórtex con el sistema de solventes de extracción durante al menos 1 min y guardados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$  por un intervalo de tiempo mínimo de 1 h. En el caso de los homogenatos de las muestras de los distintos estadios del desarrollo y

**Figura III.5**

Esquema del procedimiento del método de Folch (Folch *et al.* 1957).



del cuerpo entero de los adultos y juveniles de desarrollo avanzado, al volumen de homogenato destinado para el análisis lipídico de cada muestra se le adicionaron 6 ml de la mezcla de solventes de extracción.

Luego, las muestras fueron filtradas mediante el uso de un papel de filtro y al tejido filtrado se lavó con un poco de solvente de extracción (aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ ) para evitar pérdida de extracto lipídico. A la muestra filtrada se le agregó un 20% de volumen de una solución de NaCl 18 g/L con respecto al volumen de la muestra. La mezcla se agitó y se centrifugó durante 10 min a baja velocidad para permitir la separación de las fases. La fase superior con los contaminantes no lipídicos se descartó y la fase inferior que contiene el extracto lipídico fue lavada dos veces más con la solución de NaCl 18 g/L. Una vez obtenido el extracto de lípidos totales, se evaporó el cloroformo con corriente de  $\text{N}_2$  y la muestra fue resuspendida en un pequeño volumen de cloroformo:metanol 2:1 (v/v), la cual se conservó  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$  para su posterior análisis.

### III.5.B Cuantificación de lípidos totales por gravimetría

La cuantificación por gravimetría es la estimación cuantitativa de un compuesto mediante la medición de su peso. Este método fue utilizado para determinar la cantidad de lípidos totales presentes en las muestras. Para esto, las muestras de lípidos totales se sometieron a una corriente de  $\text{N}_2$  para evaporar el solvente a seco. Una vez evaporado, se resuspendió la muestra en 1000  $\mu\text{l}$  de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v). De cada muestra resuspendida se tomaron 250  $\mu\text{l}$  que se colocaron en cápsulas de vidrio pequeñas, se evaporó el solvente de cada muestra a seco con corriente de  $\text{N}_2$  y luego se pesó el contenido en una balanza analítica

Mettler-Toledo. El valor obtenido fue posteriormente referido al volumen de la muestra total y los extractos lipídicos de cada muestra fueron resuspendidos en un pequeño volumen de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$ .

### III.5.C Microdeterminación de lípidos

Las distintas clases de lípidos se cuantificaron por cromatografía en capa fina acoplada a un detector de ionización de llama (TLC-FID), de acuerdo a la técnica de Ackman (1990) en un equipo latroscan TH-10 (Iatron Laboratories, Tokio), autoanalizador que combina la capacidad resolutive de la cromatografía en capa fina (TLC) con la sensibilidad de un detector de ionización de llama (FID). La separación de los extractos lipídicos se realizó sobre varillas Chromarod-SIII que consisten en columnas compactas de cuarzo revestidas de una capa adsorbente de  $75\ \mu\text{m}$  de espesor de pequeñas partículas de silica gel. Las varillas se colocan en un soporte de metal (rack) permitiendo el desarrollo cromatográfico de hasta 10 varillas al mismo tiempo (Figura III.6). En cada varilla se sembró un volumen total de  $1\ \mu\text{l}$  que contenía de  $1\text{--}15\ \mu\text{g}$  de lípidos. La siembra se realizó en un extremo de las varillas y la separación de los lípidos se realizó mediante el desarrollo cromatográfico de las muestras en diferentes sistemas de solventes. Mediante el uso de una unidad de adquisición de datos cromatográficos PEAK-ABC (CT-21, Chromatogram Acquisition Unit), los datos de las corridas fueron registrados y analizados utilizando el programa de Peak-ABC System.

**Figura III.6**

Varillas empleadas para el desarrollo de la TLC-FID. Izquierda: Cuba de desarrollo de la cromatografía. Derecha: Rack con las varillas Chromarod-SIII.



### III.5.C.a Confección de las curvas de calibración

Para este análisis cuantitativo se realizaron curvas de calibración para cada clase de lípido a analizar, utilizando MAG como estándar interno. Con los datos obtenidos se graficó el cociente de las áreas (área del lípido/área del estándar interno) versus la masa de cada lípido sembrado ( $\mu\text{g}$ ), lo que permitió el ajuste de una regresión lineal a la ecuación  $y = ax + b$  obteniéndose así los parámetros utilizados para cada lípido. Las curvas de calibración de las varillas presentaron coeficientes de correlación superiores a 0,95.

### III.5.C.b Desarrollo de la cromatografía

Para comenzar el desarrollo cromatográfico, las varillas se quemaron para asegurar la eliminación de impurezas. Luego se activaron en una estufa a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se sembró en cada varilla  $1\ \mu\text{l}$  del estándar de lípidos o de la muestra a analizar con el MAG incluido. Para estandarizar el contenido de humedad, las varillas sembradas se colocan en una cuba con solución de NaCl durante 5 min. Para el desarrollo de la cromatografía y separación de los diferentes componentes lipídicos se prepararon 3 sistemas de solventes:

- **Primer sistema:** formado por una mezcla de hexano:benceno 70:30 (v/v) que permite el desarrollo de lípidos de muy baja polaridad (por ejemplo, hidrocarburos y esteroides esterificados).
- **Segundo sistema:** formado por una mezcla de benceno:cloroformo:ácido fórmico 70:25:1 (v/v) que permite el desarrollo de lípidos neutros (por ejemplo, triacilgliceroides, ácidos grasos libres y esteroides).
- **Tercer sistema:** formado por una mezcla de cloroformo:metanol:agua 70:25:3 (v/v) que permite el desarrollo de los lípidos polares (por ejemplo, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina).

Luego se realizaron los siguientes pasos para el desarrollo de la cromatografía:

1. **Desarrollo en el primer sistema de solventes:** se saturó la cuba durante 15 min con el primer sistema y luego se colocaron las varillas, permitiendo su desarrollo durante aproximadamente 20 min. Luego se retiraron las varillas y se secaron en estufa durante 5 min y se quemaron en el FID (desde el tope hacia abajo) hasta los 4-5 cm del punto de siembra. Esta distancia se determina por la/s varilla/s que contienen los estándares de lípidos para establecer los  $R_f$  de esos lípidos.
2. **Desarrollo en el segundo sistema de solventes:** se saturó la cuba de desarrollo con este sistema y se colocaron las varillas. Se dejó desarrollar durante 30 min, se secó y se quemó hasta aproximadamente 2 cm del punto de siembra.

**3. Desarrollo en el tercer sistema de solventes:** se saturó la cuba de desarrollo con este sistema y se colocaron las varillas. Se dejó desarrollar durante 45 min, se secó y se quemó hasta el punto de siembra.

El equipo operó a una presión de  $H_2$  de  $1 \text{ Kg/cm}^2$ , un flujo de aire de  $2000 \text{ ml/min}$  y una velocidad de barrido de  $32 \text{ seg/varilla}$ .

### III.5.C.c Cuantificación

Las áreas de los lípidos se integraron con programa Peak-ABC System. Se obtuvieron los cocientes entre el área de cada lípido y el área del MAG para cada varilla. Utilizando los parámetros de la curva de calibración correspondiente, se obtuvo la masa de cada lípido en particular.

### III.5.D Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido (GLC)

La cromatografía gaseosa es una técnica cromatográfica en la cual la muestra se volatiliza y la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte que tiene como única función la de transportar el analito a través de la columna. La cromatografía gas-líquido (GLC) es uno de los métodos de cromatografía gaseosa más utilizado para la separación, identificación y cuantificación de ácidos grasos y sustancias relacionadas, cuando las mismas poseen una tensión de vapor apreciable a cualquier temperatura por debajo de la temperatura de descomposición.

Comúnmente a las temperaturas empleadas en las columnas de separación, los ácidos grasos de cadena corta se encuentran en forma gaseosa siendo esta condición necesaria para que la muestra se pueda analizar por GLC. Sin embargo, las muestras biológicas presentan en general ácidos grasos de mayor longitud de cadena y con distinto grado de insaturación, de manera que no se encuentran en la forma adecuada para su análisis a las temperaturas utilizadas. Por esta razón, los ácidos grasos deben ser derivatizados en sus ésteres metílicos para ser analizados por este método (Burchfield & Storrs 1975) debido a que son más volátiles, por la disminución de la polaridad al formarse el éster, y son más estables que sus respectivos ácidos grasos.

#### III.5.D.a Saponificación de los lípidos y derivatización de ácidos grasos

Los extractos lipídicos obtenidos se expusieron a una hidrólisis alcalina con una solución de KOH 10% p/v en etanol que rompe la unión éster entre los ácidos grasos y el resto de la molécula lipídica, liberando de esta manera los ácidos grasos de los lípidos que los contienen. De esta forma se obtuvieron las sales de ácidos grasos solubles en agua que eran componentes de los esteroides esterificados, acilglicéridos y fosfoglicéridos.

A partir de los ácidos grasos libres obtenidos por saponificación de las muestras, se preparan los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) utilizando  $\text{BF}_3$  al 10% en metanol de acuerdo a la metodología propuesta por Morrison y Smith (1964).

#### III.5.D.b Identificación de los ácidos grasos

Los EMAG fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama y sobre una columna capilar DB-23 (J y W Scientific) de 30 m de largo.

Las condiciones de uso fueron las siguientes:

- **Fase fija:** Megawax 250 (Supelco)
- **Gas portador:** He
- **Flujo de gas:** 0,7 ml/min
- **Temperatura de la cabeza de inyección:** 260 °C
- **Temperatura inicial del horno (T1):** 175 °C
- **Tiempo inicial a T1:** 3 min
- **Temperatura final del horno (T2):** 230 °C
- **Tiempo final de T2:** 19 min
- **Incremento de temperatura:** 3 °C/min

El método de identificación de los EMAG se basó en el tiempo de retención relativo característico de cada EMAG dependiente de la columna usada, de la fase móvil y la temperatura (Ackman 1963). Los picos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos conocidos (Supelco 37 Component FAME Mix).

### III.6 Análisis de las proteínas

#### III.6.A Cuantificación de proteínas totales

A partir de la valoración cuantitativa de proteínas mediante el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.* 1951), se cuantificaron las proteínas solubles obtenidas a partir de los sobrenadantes de las muestras. Este procedimiento consta de la formación del complejo Cu-proteína en un medio básico de color azul claro. Esto provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína exponiendo los residuos fenólicos que luego reducen el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. Este reactivo presenta una mezcla ácidos fosfomolibdúrico y fosfomolibdúrico de color amarillo que al reducirse da lugar a óxidos de color azul

intenso.

Para llevar a cabo la cuantificación, se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (1 mg/ml) de 3-70  $\mu\text{g}$  y la reacción colorimétrica de las muestras se midió a 750 nm en un espectrofotómetro Agilent 8453.

### III.6.B Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas con cargas a través de la migración en un campo eléctrico en un medio de soporte, las cuales se desplazan al electrodo de carga opuesta y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula. Dentro de los distintos tipos de soportes utilizados, los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y N,N'-metilen-(bis-acrilamida) (Figura III.7) que, dependiendo de la concentración, da lugar a un medio de soporte poroso de diferente grado de reticulación (diferente diámetro de poro). Uno de los métodos de electroforesis más utilizado para el análisis de proteínas es la electroforesis en condiciones disociantes. Esta técnica conocida como SDS-PAGE emplea geles de poliacrilamida (PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). El agregado de SDS en estos geles unifica la carga de todas las proteínas de manera que la movilidad relativa de las moléculas depende solo de la masa. De esta forma, la migración de las proteínas será a velocidades inversamente proporcionales a los logaritmos de sus pesos moleculares. Para que esto ocurra, es preciso romper los puentes disulfuro intra- e intercatenarios para lo cual se añade durante la preparación de la muestra un agente reductor, como el  $\beta$ -mercaptoetanol. De esta manera, los polipéptidos que se visualizan en los geles corresponden a las distintas subunidades de las proteínas.

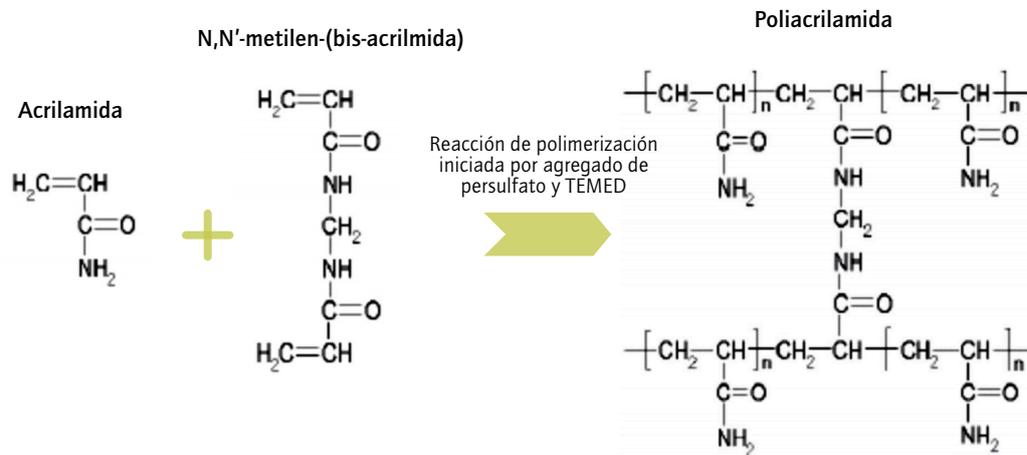
Para el análisis de las proteínas de las muestras se realizó una corrida electroforética discontinua según el método desarrollado por Laemmli (1970). Para esta electroforesis discontinua se prepararon dos geles, el gel superior concentrador de poliacrilamida al 4% p/v (con bajo grado de reticulación) y el gel separador con un gradiente de poro de 4-23% p/v. Por otra parte, para realizar la electroforesis en condiciones disociantes se agregó un 1% p/v de SDS a los geles y buffers utilizados, y para facilitar la desnaturalización de las proteínas, se agregó  $\beta$ -mercaptoetanol a las muestras y se calentaron en un baño a 100 °C durante 5 min.

Las soluciones empleadas en la preparación y desarrollo de las electroforesis fueron:

- Acrilamida 30% p/v - Bis-Acrilamida 0,8% p/v
- Buffer del gel concentrador (de siembra): Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)
- Buffer del gel de resolución: Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)

**Figura III.7**

Proceso de  
polimerización de los  
geles de poliacrilamida.



- Persulfato de amonio (inicia la polimerización)
- Tetrametilendiamina (TEMED) (catalizador de la polimerización)
- Buffer de desarrollo Tris-Glicina (0,025 M Tris y 0,192 M Gly, pH 8,3) con 4,5% v/v de SDS al 10%

### III.6.C Revelado de las proteínas y determinación de los pesos moleculares

Una vez desarrolladas las electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical Co) al 0,1% p/v disuelto en una mezcla de ácido acético:metanol:agua 10:40:50 (v/v) para fijar y teñir cada gel durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la decoloración del gel utilizando una solución de ácido acético:metanol:agua 10:40:50 (v/v), detectándose hasta un mínimo de 10  $\mu\text{g}$  de proteínas en geles de 1,5 mm.

Los pesos moleculares de las subunidades proteicas de interés se determinaron utilizando un estándar de proteínas de alto peso molecular (Cytiva, Formerly GE Healthcare Life Sciences, HMW Cod: 17-0615-01) y estándares coloreados (Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, Bio-Rad). Graficando los logaritmos decimales del peso molecular de las proteínas en función de sus valores de migración relativos al colorante trazador ( $R_f$ ) se obtuvo una recta de calibración que fue ajustada mediante análisis de regresión lineal. Las curvas de los geles presentaron coeficientes de correlación superiores a 0,95. En base a la curva ajustada, se calculó el peso molecular de las muestras.

### III.6.D Obtención de anticuerpos policlonales anti-LV y anti-Hc en ratas

Para los análisis inmunológicos se prepararon anticuerpos policlonales contra el monómero de Hc y contra la LV en ratas. A partir de la VHDL aislada de *P. pythagoricus*, la cual contiene Hc (Cunningham & Pollero 1996), se desarrollaron

geles SDS-PAGE 4-23% donde se sembró VHDL. Las subunidades correspondientes al monómero de 67 kDa de Hc, visualizadas mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250, se escindieron y procesaron con una solución decolorante con ácido acético:metanol:agua 5:20:75 (v/v). A continuación, las bandas homogeneizadas se lavaron 4 veces en una solución de buffer fosfato salino (PBS, "Phosphate-buffered saline") durante un período total de 24 h. Para generar los anticuerpos, se realizó una serie de inyecciones de los homogenatos de la subunidad en dos ratas hembras Wistar de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. **Primera inyección:** se realizó una inyección subcutánea que contenía 500  $\mu\text{l}$  de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) más 500  $\mu\text{l}$  de la muestra lavada con PBS.
2. **Segunda inyección:** tres semanas después se realizó una inyección de refuerzo que contenía 500  $\mu\text{l}$  de adyuvante incompleto junto con 500  $\mu\text{l}$  del antígeno (muestra lavada con PBS).
3. **Tercera inyección:** la inyección final se realizó después de otras 2 semanas e incluyó solo 1 ml del antígeno.

Una semana después de la última inyección, las ratas fueron anestesiadas con 180  $\mu\text{l}$  de Ketaminal y fueron desangradas mediante punción cardíaca. La sangre recogida se dejó coagular durante 30 min a temperatura ambiente y luego a 4 °C durante toda la noche para lograr la retracción del coágulo. Después de la centrifugación, el suero obtenido se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Después de una centrifugación a 10.000 g durante 10 min, se purificó la fracción de inmunoglobulina G (IgG) por precipitación con sulfato de amonio. El precipitado se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS) y se almacenó a -70 °C. La especificidad del antisuero se evaluó mediante inmunotransferencia contra diferentes proteínas y lipoproteínas de arácnidos.

Para obtener los anticuerpos policlonales contra LV, se utilizó como antígeno la LV purificada de *S. malitiosa* (SmLV) siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las LVs de *P. pythagoricus*. Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la obtención de los anticuerpos policlonales contra la Hc, a cada rata Wistar se le administraron las respectivas inyecciones subcutáneas con aproximadamente 1 mg de antígeno (SmLV). La especificidad de los anticuerpos policlonales contra las LVs se corroboró con las LVs de la especie y contra las subunidades de las LVs de la araña *P. saltans* (Trabalon et al. 2018; Laino et al. 2020).

### III.6.E Western Blot

Esta técnica de inmunotransferencia se utiliza para identificar antígenos específicos reconocidos por anticuerpos policlonales o monoclonales. Las muestras de proteínas se tratan con SDS y agentes reductores y luego se separan mediante

SDS-PAGE. Una vez que se desarrollan los geles por SDS-PAGE, los antígenos se transfieren electroforéticamente (electroblotting) a una membrana de nitrocelulosa o polivinilideno fluoruro (PVDF). Las proteínas transferidas se unen a la superficie de la membrana proporcionando acceso para la reacción con los reactivos de inmunodetección. Posteriormente, las membranas se bloquean con una proteína o un agente bloqueador de detergente que no es inmunodetectado. Las membranas se incuban con el anticuerpo primario, se lavan y se identifican los complejos de antígenos mediante una enzima peroxidasa acoplada al anticuerpo anti-IgG secundario. Finalmente, mediante el uso de  $H_2O_2$  y sustratos cromogénicos o luminiscentes, se visualiza la actividad y se detectan las proteínas antígeno específicas.

### III.6.E.a Transferencia electroforética (“Electroblotting”)

Las muestras a analizar fueron separadas por SDS-PAGE en un gradiente de poliacrilamida 4-23% junto con un estándar coloreado (Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, Bio-Rad) siguiendo el procedimiento previamente descrito para la electroforesis en condiciones disociantes. Al finalizar la electroforesis, los geles al igual que las membranas de nitrocelulosa, las esponjas y los papeles de filtro fueron embebidos durante 10 min en el buffer de transferencia frío formado por un buffer Tris-Glicina (39 mM Tris, 48 mM Gly, pH 9,2) con metanol al 20% v/v. Es necesario equilibrar el gel en el buffer de transferencia para evitar un cambio en el tamaño del mismo que provoque un patrón de transferencia indeseable. La transferencia de los geles fue realizada en una cuba de electroforesis con el gel en orientación vertical y completamente sumergido en buffer de transferencia frío entre los dos grandes paneles de electrodos. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 100 V en una Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Finalizada la transferencia, las membranas fueron separadas y bloqueadas durante una noche con una solución de leche en polvo descremada al 5% p/v en PBS-Tween. Finalizado el bloqueo, se incubó durante 2 h con el suero anti-Hc o anti-LV (anticuerpos primarios) diluidos 1:5000 y 1:3.000 respectivamente en una solución de leche en polvo descremada al 1% p/v en PBS-Tween. Posteriormente se realizaron 6 lavados con PBS-Tween de 5 min cada uno y se incubó durante 1,5 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata (generado en cabra) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (ABCAM Inc.) diluido 1:2000 en PBS-Tween con leche descremada al 1%. Concluida esta incubación, la membrana se lavó nuevamente con PBS-Tween y se reveló por electroquimioluminiscencia.

### III.6.E.b Electroquimioluminiscencia

Los antígenos se pueden identificar mediante la detección cromogénica o luminiscente del complejo formado entre el antígeno y los anticuerpos primarios y secundarios (con la enzima) unidos a la membrana. En la electroquimioluminis-

cencia la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario produce la oxidación de su sustrato, siendo utilizado en este caso el luminol (Sigma Chemical Co.). Inmediatamente después de la oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado el cual genera la emisión de luz. La luz emitida tiene una longitud de onda de 428 nm, y su emisión se puede prolongar durante 3 h.

Para revelar dos membranas con esta técnica se prepararon 10 ml de dos soluciones que contenían:

**Solución 1:**

- Solución 0,044 g/ml de luminol (Sigma Chemical Co.) en dimetil sulfoxido (DMSO): 100  $\mu$ l
- Solución 0,015 g/ml de ácido p-cumárico (Sigma Chemical Co.) en DMSO: 44  $\mu$ l
- Buffer Tris 1,5 M (pH 8,5): 666  $\mu$ l
- Agua bidestilada: 9,19 ml

**Solución 2**

- Buffer Tris 1,5 M (pH 8,5): 666  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 6,4  $\mu$ l
- Agua bidestilada: 9,33 ml

Los dos reactivos se mezclaron en un cuarto oscuro en una relación 1:1 (v/v) justo antes de ser utilizados. En presencia de luz roja, la membrana se hizo reaccionar durante 1 min con la mezcla de las dos soluciones. Luego, la membrana se secó y en total oscuridad se expuso aproximadamente unos 10 seg a una placa radiográfica Kodak X-Omat, XAR-5, 13 x 18 cm (Sigma Cematic Co.). Finalizada la exposición, se reveló la placa tratándola con una solución de revelador fotográfico comercial hasta que se comenzaron a visualizar las manchas, luego se la lavó con agua bidestilada y con una solución de reactivo fijador. Finalmente, la placa se lavó con agua bidestilada y se secó.

Para el análisis del desarrollo de *P. pythagoricus*, las señales de inmunorreactividad emitidas por las membranas se detectaron usando el sistema Chemidoc Imaging (Bio-Rad) y se analizaron con el software ImageJ (NIH).

### III.6.F Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El antígeno puede detectarse y cuantificarse mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). De acuerdo al ensayo de Engvall y Perlmann (1972), se cuantificó por ELISA el contenido de Hc y LV utilizando placas Nunc-Immuno™ MicroWell™ PolySorp®. Para esto se realizaron curvas estándares de LVI (0 a 1000 ng) y de VHDL (0 a 600 ng) de *P. pythagoricus* donde se cargó cada pocillo de las placas con 50  $\mu$ l de las lipoproteínas disueltas en buffer coating (35

mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.6). Una vez realizada la curva y colocadas las muestras a cuantificar disueltas en buffer coating en los pocillos, se incubaron las muestras a 37 °C en cámara húmeda durante 1,5 h. Pasado ese tiempo, se realizó un lavado con 300 µl PBS por pocillo. Luego se bloquearon incubando con 300 µl una solución de leche en polvo descremada al 3% p/v en PBS durante 2 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05% y se dejó incubando durante una noche a 4 °C con 50 µl del anticuerpo primario anti-LV (1:2000) o anti-Hc (1:1000) disuelto en una solución de leche en polvo descremada al 3% p/v en PBS-Tween 0,05%. Finalizada esta incubación, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,05% y se incubó durante 2 h a 37 °C en cámara húmeda con 50 µl el anticuerpo secundario (1:5000) disuelto en una solución de leche en polvo descremada al 3% p/v en PBS-Tween 0,05%. Finalmente, los pocillos con las muestras fueron lavados 4 veces con PBS-Tween 0,05% y se procedió al revelado. Para cada muestra analizada, se midieron por duplicado tres concentraciones distintas.

Para revelar se utilizó una solución de revelado que contenía:

- Ácido cítrico 0,1M: 10 ml
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M: 10ml
- ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-acido sulfónico): 6 mg
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2 µl

El volumen final de esta solución se ajustó acorde a la cantidad de pocillos a revelar. En cada pocillo se colocó 100 µl de solución de revelado y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µl de ácido oxálico 2% p/v por pocillo. A partir de un detector multimodo Beckman Coulter DTX 880 se midieron la absorbancia a 405 nm.

### III.6.G Obtención de las secuencias N-terminal

La determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de las proteínas de huevos fue realizada en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO, Universidad de Buenos Aires) mediante el uso de un secuenciador Shimadzu Modelo PPSQ 31A aplicando el método de secuenciación de degradación de Edman.

Para esto se realizó un gel SDS-PAGE (gradiente de poro 4-23%) donde se sembró el estándar coloreado (Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, Bio-Rad), una calle con 6 µg de albúmina y tres calles con 15 µg, 30 µg y 45 µg de la muestra de huevos de menos de 12 h de puestas. La membrana de PVDF se mantuvo durante 10 min en metanol y luego se realizó la transferencia del gel a esta membrana a 100 V durante 75 min siguiendo el mismo procedimiento que para las membranas de nitrocelulosa. Las subunidades fueron teñidas con Coomassie

Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Co) al 0,1% preparado en metanol al 50% y ácido acético al 1% durante 1 min y decoloradas dos veces con metanol al 50% durante 5 min y con varios lavados con agua bidestilada. La membrana se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego se envió para su análisis.

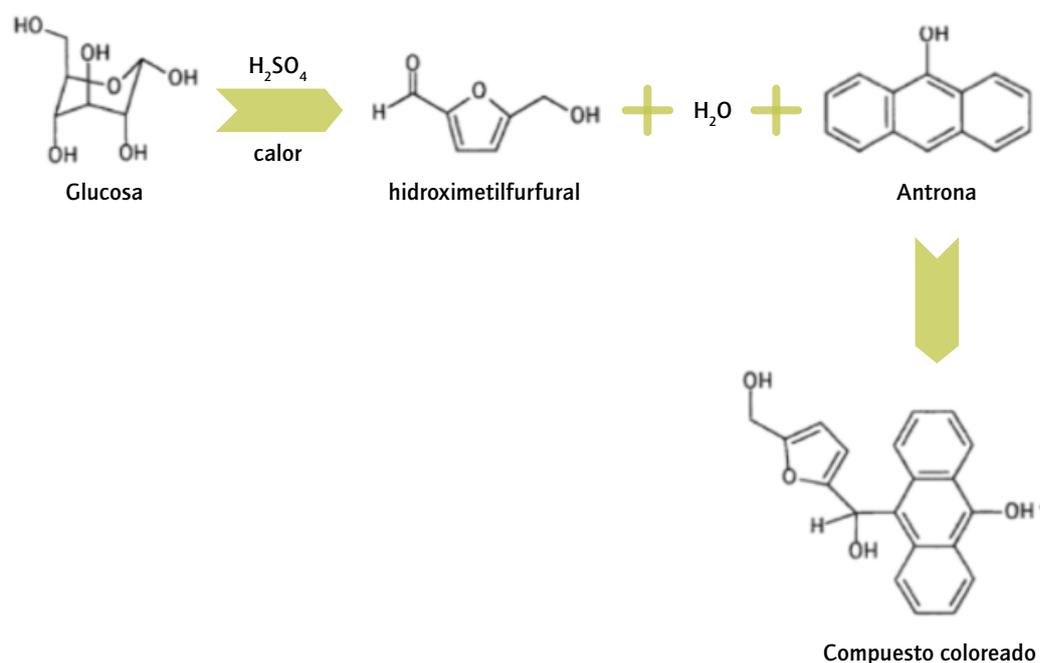
### III.7 Determinación del contenido de glucógeno

El contenido de glucógeno durante el desarrollo fue determinado por el método de antrona-sulfúrico de Van Handel (1985) con algunas modificaciones utilizando glucógeno como estándar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La reacción con antrona constituye la base de un método rápido para la determinación de hexosas y aldopentosas aisladas o que se encuentren formando parte de los polisacáridos.

Este método se basa en el hecho de que, en presencia del ácido sulfúrico concentrado, los carbohidratos son hidrolizados y deshidratados a furfurales o hidroxi-metil-furfurales (según se trate de pentosas o hexosas) los cuales condensan con compuestos aromáticos. Cuando se unen específicamente con la antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) se forma un complejo azul verdoso y la intensidad del color es cuantificada mediante medición de la absorbancia a 620 nm (Figura III.8). Este método también sirve para cuantificar oligosacáridos y polisacáridos debido a que el medio ácido favorece la hidrólisis previa del enlace glicosídico (Bolaños *et al.* 2003), de esta manera los polisacáridos por acción del ácido son hidrolizados a monosacáridos y posteriormente son deshidratados.

**Figura III.8**

Esquema simplificado del método antrona-sulfúrico para la cuantificación de glúcidos.



Para poder cuantificar el glucógeno, se precipitó el contenido de glucógeno de las muestras de desarrollo analizadas a partir de la fracción soluble obtenida. Para esto, las muestras fueron tratadas con una solución de KOH al 66% con una relación 1:1 (v/v) respecto al volumen de la muestra y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 20 min. Pasado este tiempo, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Luego se agregó una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  10% v/v y etanol 96° 0,25% v/v, respecto al volumen de muestra inicial. Se colocó en un baño con agua caliente durante 5 min y se centrifugó luego a velocidad media durante 10 min en una centrífuga International Model UV. De esta manera, se descartó el sobrenadante y los precipitados de glucógeno obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml de agua bidestilada.

Para cuantificar el contenido de glucógeno a partir del método de antrona, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se preparó una solución stock 66% v/v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  agregando el ácido sobre el agua bidestilada con agitación y enfriamiento externo.
2. Se disolvió en 100 ml de esta solución 1 g de tiourea y luego 0,05 g de antrona, calentando la mezcla a 80 °C.
3. Se preparó la curva estándar de glucógeno en el rango de 0,1–40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
4. En un tubo de vidrio con tapa, se agregó 2 ml del reactivo de antrona a 200  $\mu\text{l}$  de la solución de glucógeno de las muestras o del estándar de glucógeno y se agitó la mezcla.
5. Todos los tubos se colocaron en un baño de agua a temperatura ambiente para equilibrar la temperatura, y luego durante 15 min en un baño de agua a 100 °C.
6. Pasado este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad.
7. Finalmente, después de 20–30 min, se midió la absorbancia a 620 nm.

### III.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA de una vía) después de verificar la normalidad de los datos (test de Shapiro–Wilks) (Shapiro & Wilk 1965) y homogeneidad de las varianzas (test de Levene) (Levene 1960). Las diferencias significativas (con un  $p < 0,05$ ) se compararon mediante la prueba post hoc de Tukey. Los datos se analizaron utilizando los programas PAST V.4.03 y GraphPad InStat V.3.01. En el caso que fue necesario transformar los datos para cumplir con los supuestos del ANOVA, se aplicó la transformación angular arco seno para el caso de los datos expresados en porcentajes y la transformación logarítmica en el resto de los casos.

# IV Análisis de la vitelogénesis en *Polybetes pythagoricus*

## IV.1 Introducción

## IV.2 Aspectos generales

## IV.3 Caracterización lipídica

## IV.4 Caracterización proteica

## IV.5 Conclusiones generales

## IV.1 Introducción

La oviparidad es una estrategia reproductiva donde las hembras depositan los huevos de manera tal que los individuos completan su desarrollo expuesto al ambiente (Blackburn 1999). Debido a la necesidad de adaptarse a un desarrollo fuera del cuerpo de la madre, los huevos deben contener todos los recursos necesarios para el desarrollo adecuado del embrión cuyas variaciones pueden seguirse durante el proceso (García *et al.* 2008; Geister *et al.* 2008; Trabalón *et al.* 2018), aportando de esta manera una cantidad de energía determinada.

Durante la vitelogénesis, las hembras sintetizan y acumulan en sus oocitos todos los recursos necesarios para el desarrollo de los embriones. En los artrópodos, este proceso ha sido ampliamente estudiado durante décadas en insectos (Sappington & Raikhel 1998; Ziegler & van Antwerpen 2006; Aguirre *et al.* 2008; Ibanez *et al.* 2017) y en crustáceos (Muñoz *et al.* 1990; Vazquez Boucard *et al.* 2002; Shechter *et al.* 2005; Mollemborg *et al.* 2017), sin embargo, en la Clase Arácnida las contribuciones científicas son verdaderamente escasas. La mayoría de los estudios pertenecen al orden Acari debido a que algunos representantes de este orden son de importancia sanitaria y económica para el hombre (Shanbaky *et al.* 1990; Tellam *et al.* 2002; Silveira *et al.* 2006; Boldbaatar *et al.* 2010; Yang *et al.* 2015). En las arañas los aportes sobre este proceso son en su mayoría estudios ultraestructurales e histológicos del desarrollo ovárico donde se analizan los cambios que ocurren en los oocitos (André & Rouiller 1957; Sotelo & Trujillo-Cenóz 1957; Trabalón *et al.* 1992; Choi & Moon 2003; Morishita *et al.* 2003; Jedrzejowska & Kubrakiewicz 2010), surgiendo a partir de las variaciones observadas diferentes clasificaciones para las distintas etapas de la vitelogénesis (André 1958; Seitz 1971; Osaki 1972; Trabalón *et al.* 1992; Ouriel 2016).

Como previamente fue mencionado, los huevos de las arañas nunca se exponen directamente al ambiente, sino que se encuentran protegidos por un cócón

de seda que construyen las madres antes de la ovoposición (Foelix 2011). Debido a este suceso parte del desarrollo se ve influenciado por la presencia de este cócón ya que dentro de la ooteca transcurren los estadios del desarrollo postembrionario (estadios inmóviles) de manera que las reservas iniciales siguen siendo fundamentales luego de la eclosión. Durante la vitelogénesis, varias proteínas, carbohidratos y lípidos necesarios para el desarrollo embrionario se sintetizan y almacenan dentro de los oocitos (Wilder *et al.* 2010; Fruttero *et al.* 2011). En los animales ovíparos, los lípidos presentes en los oocitos forman parte de la estructura de las membranas y de las gotas lipídicas como también de la estructura de las lipoproteínas características del vitelo (Ziegler & van Antwerpen 2006). Las LVs en este grupo están compuestas principalmente por fosfolípidos y triacilgliceroles las cuales han sido caracterizadas en dos especies de arañas, *P. pythagoricus* (Laino *et al.* 2011b) y *S. malitiosa* (Laino *et al.* 2013), y se ha determinado solo su presencia durante el desarrollo de *P. saltans* (Trabalon *et al.* 2018). A pesar de la importancia de los lípidos, los escasos reportes sobre la vitelogénesis en este grupo tan diverso se han enfocado casi exclusivamente al análisis de los componentes proteicos (Pourié & Trabalon 2003; Guo *et al.* 2018; Bednarek *et al.* 2019).

En la mayoría de los artrópodos, los lípidos, proteínas y glúcidos, en forma libre o asociadas, que constituyen las LVs se producen mayoritariamente fuera de los Ovs. Estos compuestos son transportados por las proteínas precursoras del vitelo denominadas Vgs (Babin *et al.* 1999; Hayward *et al.* 2010). Estas Vgs pueden modificarse para formar las Vns o las LVs dentro del Ov (Raikhel & Dhadialla 1992; Bownes *et al.* 1993; Li & Zhang 2017), las cuales constituyen una proporción sustancial de las proteínas solubles de los huevos. Sin embargo, algunos reportes sugieren que la vitelogénesis podría darse a partir de un evento bifásico conformado por una fase de autosíntesis y otra de heterosíntesis (Rosell & Coons 1992; Subramoniam 2011), de manera que la síntesis de Vg puede darse tanto en tejidos extraováricos como también en el Ov, o en ambos sitios (Shanbaky *et al.* 1990; Rosell & Coons 1992; Yepiz-Plascencia *et al.* 2000; Tsukimura 2001; Tseng *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005). La información sobre las proteínas involucradas durante la vitelogénesis en arañas es verdaderamente escasa, con diferentes enfoques y no brinda información directa acerca del origen de las LVs (Pourié & Trabalon 2003; Guo *et al.* 2018; Bednarek *et al.* 2019).

Con el fin de generar nuevos aportes acerca del proceso de vitelogénesis en arañas, en este capítulo se presenta el análisis realizado en hembras de *P. pythagoricus* en diferentes estadios del proceso y los resultados obtenidos, como también el análisis realizado en ejemplares machos de la misma especie. Para una mejor interpretación y organización de los resultados obtenidos, este capítulo se encuentra dividido en tres secciones: "Aspectos generales", "Caracterización lipídica"

y “Caracterización proteica”.

Las **hipótesis** planteadas para el presente estudio de la vitelogénesis de *P. pythagoricus* fueron:

- Durante la vitelogénesis el índice hepatosomático disminuye mientras que el índice gonadosomático y el tamaño del ovario aumentan.
- Se produce un aumento en la cantidad de lípidos hemolinfáticos los cuales son posteriormente acumulados en el ovario durante la vitelogénesis.
- El ovario acumula principalmente triacilglicérols y fosfolípidos durante la vitelogénesis.
- En el transcurso de la vitelogénesis se produce un aumento en la concentración de proteínas en la hemolinfa y en el ovario.
- Los machos presentan concentraciones y composiciones de lípidos comparable a las hembras en estadios iniciales de la vitelogénesis.
- Algunas subunidades las lipovitelininas provienen de órganos extraováricos (síntesis exógena) mientras que otras son producidas por los ovarios (síntesis endógena).

Los **objetivos** específicos planteados para esta investigación fueron:

- Determinar la variación en el peso de los principales órganos de las hembras durante la vitelogénesis.
- Calcular el índice gonadosomático y el índice hepatosomático de las hembras.
- Determinar las distintas etapas del proceso de vitelogénesis de *P. pythagoricus*.
- Determinar de forma cuali y cuantitativa la composición lipídica de los principales órganos durante el proceso.
- Determinar y caracterizar los componentes proteicos de los principales órganos durante el proceso de vitelogénesis.
- Identificar las subunidades proteicas que estén presentes tanto en el ovario como en los huevos de *P. pythagoricus* y determinar los posibles sitios de síntesis mediante la utilización de anticuerpos policlonales.
- Obtener información en relación a las secuencias del extremo N-terminal de los polipeptidos más importantes durante la vitelogénesis.

## IV.2 Aspectos generales

En esta sección, se presentan los resultados que fueron utilizados para determinar el estado reproductivo de las hembras capturadas en el campo. Las hembras

fueron separadas de acuerdo a su estado reproductivo en hembras previtelogénicas (PreV), vitelogénicas tempranas (Vt), vitelogénicas tardías (V) y postvitelogénicas (PostV). Para separar los primeros tres estadios (PreV, Vt y V) se consideró el tamaño y el peso corporal de las hembras, como también el tamaño, el peso y el análisis histológico de los Ovs. En cambio, las hembras PostV se determinaron teniendo en cuenta el evento de oviposición producido en el laboratorio. Las madres fueron separadas de sus ootecas y sacrificadas  $4 \pm 1$  día luego de la puesta para ser analizadas. Para acompañar el análisis de las hembras, se realizaron algunas mediciones y caracterizaciones en machos.

## IV.2.A Resultados

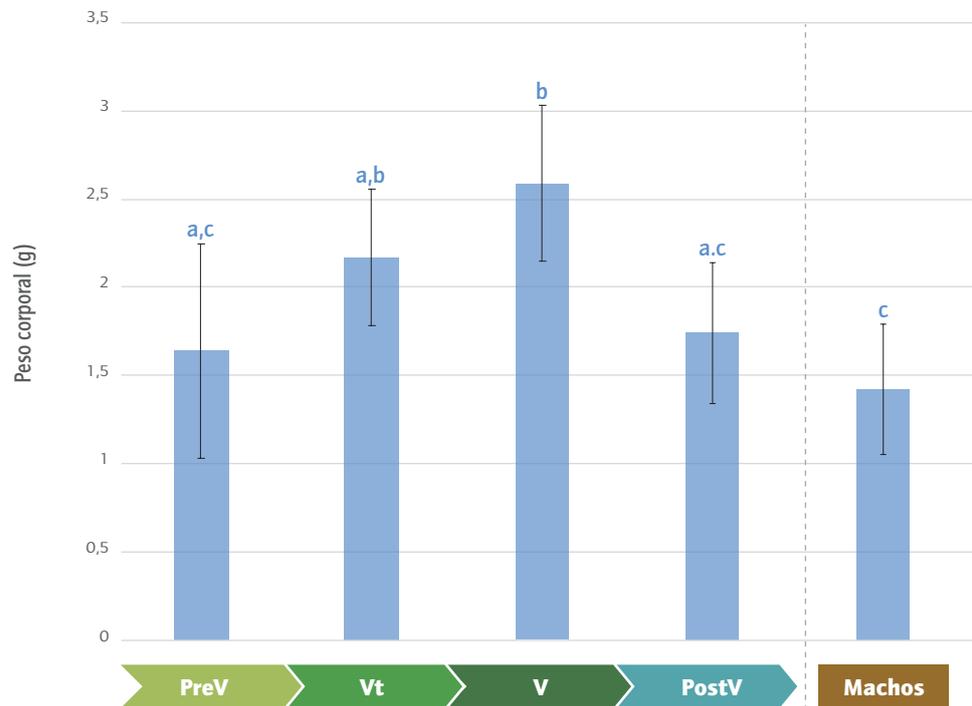
### IV.2.A.a Mediciones generales

En la Figura IV.1 se pueden observar los promedios de los pesos (g) de las hembras en distintos estadios vitelogénicos como también en machos. Las hembras PreV presentan pesos corporales de  $1,64 \pm 0,6$  g y opistosomas ovalados con medidas promedio de  $10,78 \pm 1,66$  mm de largo y  $8,83 \pm 1,42$  mm de ancho. Las Vt presentan medidas muy similares, con opistosomas de  $11,51 \pm 1,16$  mm de largo y  $9,45 \pm 1,5$  mm de ancho y con pesos ligeramente más elevados de  $2,17 \pm 0,4$  g. En las V el tamaño del opistosoma aumenta alcanzando promedios de  $16,3 \pm 0,73$  mm de largo y  $13,1 \pm 2,13$  mm de ancho, y presentan un peso corporal promedio de  $2,59 \pm 0,44$  g. Luego de la puesta, las PostV experimentan una disminución de su tamaño alcanzando valores comparables con las hembras PreV, con medidas de largo y ancho del opistosoma de  $10,2 \pm 1,2$  mm y  $7,8 \pm 0,8$  mm respectivamente, y su peso disminuye a  $1,74 \pm 0,4$  g.

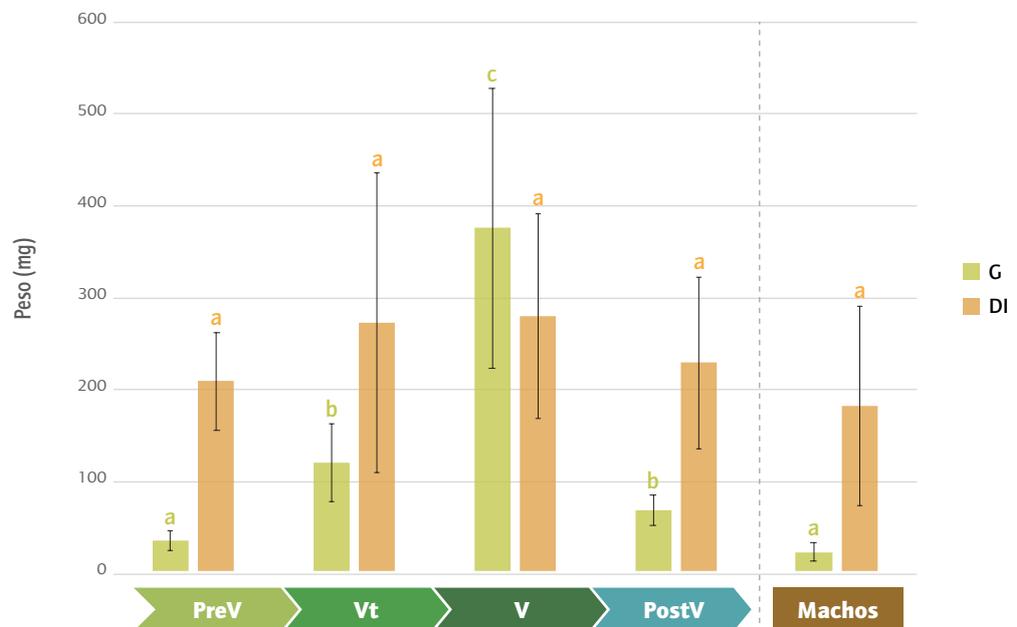
Los machos presentan tamaños de opistosoma pequeños con promedios de  $9,7 \pm 1,3$  mm de largo y  $7,2 \pm 0,5$  mm de ancho y pesos de  $1,42 \pm 0,37$  g comparables a los de las hembras PreV y las PostV.

El volumen de HL total por araña fue de  $143 \pm 78 \mu\text{l}$  en las hembras PreV, de  $230 \pm 80 \mu\text{l}$  en las Vt,  $420 \pm 56 \mu\text{l}$  en las hembras V y  $211 \pm 74 \mu\text{l}$  en las PostV, siendo significativamente mayor solo en las V con respecto al resto (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ).

En la Figura IV.2 se presentan los valores de los pesos (mg) de las gónadas y de los DI de los ejemplares adultos analizados. En las hembras el peso de los DI permanece relativamente constante con valores promedio de  $245 \pm 101$  mg durante todo el proceso de vitelogénesis. Por el contrario, el peso del Ov varía durante el proceso. En las PreV el Ov presenta un peso de  $33,3 \pm 10,95$  mg, aumentando de manera significativa en etapas posteriores. Inicialmente, el peso del Ov aumenta más de tres veces, alcanzando un valor promedio de  $118,33 \pm 42,4$  mg en las Vt.



**Figura IV.1** Peso corporal de las hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores se expresan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas.

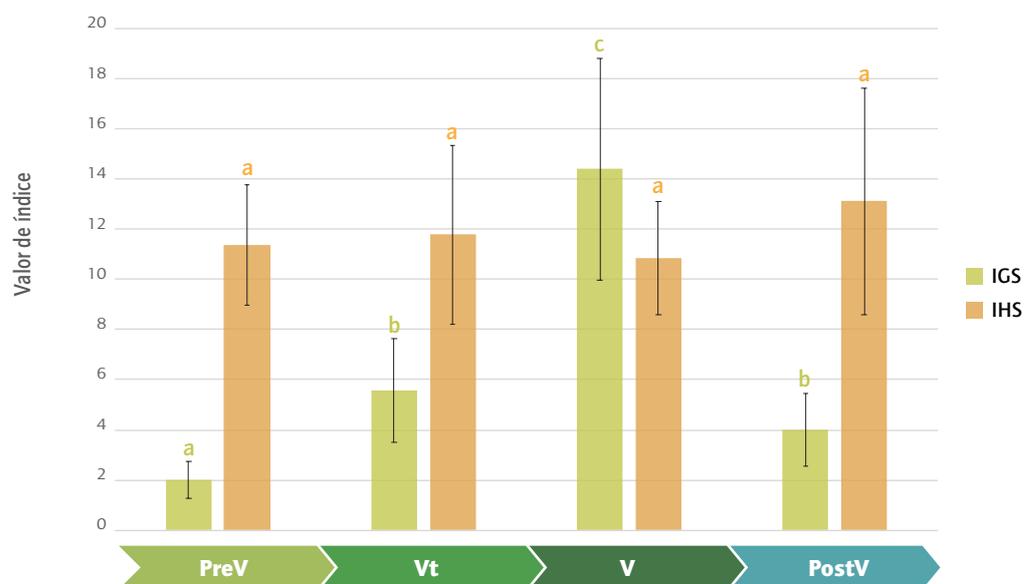


**Figura IV.2** Peso de los divertículos intestinales (DI) y las gónadas (G) de machos y hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los valores se expresan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas.

Este valor vuelve a aumentar tres veces más en las V con respecto a las Vt, observándose una gran masa ovárica con un promedio de  $372,86 \pm 152,6$  mg. En el caso de los machos, los valores de pesos de las gónadas y de los DI son comparables a los de las hembras PreV y presentan un volumen de HL promedio de  $103 \pm 50 \mu\text{l}$  por individuo.

#### IV.2.A.b Índice gonadosomático e índice hepatosomático

En la Figura IV.3 se presentan los valores del IGS e IHS calculados para las hembras en los cuatro estadios analizados. A partir de estos resultados, se puede observar que el IHS no experimenta cambios significativos durante el proceso. En cambio, el IGS aumenta 2,9 veces desde las PreV ( $2 \pm 0,74$ ) al las Vt ( $5,58 \pm 2,06$ ) y aumenta 1,4 veces más en las V alcanzando valores promedios de  $14,38 \pm 4,42$ . En las hembras PostV los valores del IGS descienden a  $4 \pm 1,45$ .



**Figura IV.3** Variaciones en el índice gonadosomático (IGS) y el índice hepatosomático (IHS) de las hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los valores se expresan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ),  $n=6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas.

#### IV.2.A.c Análisis histológico de ováριο

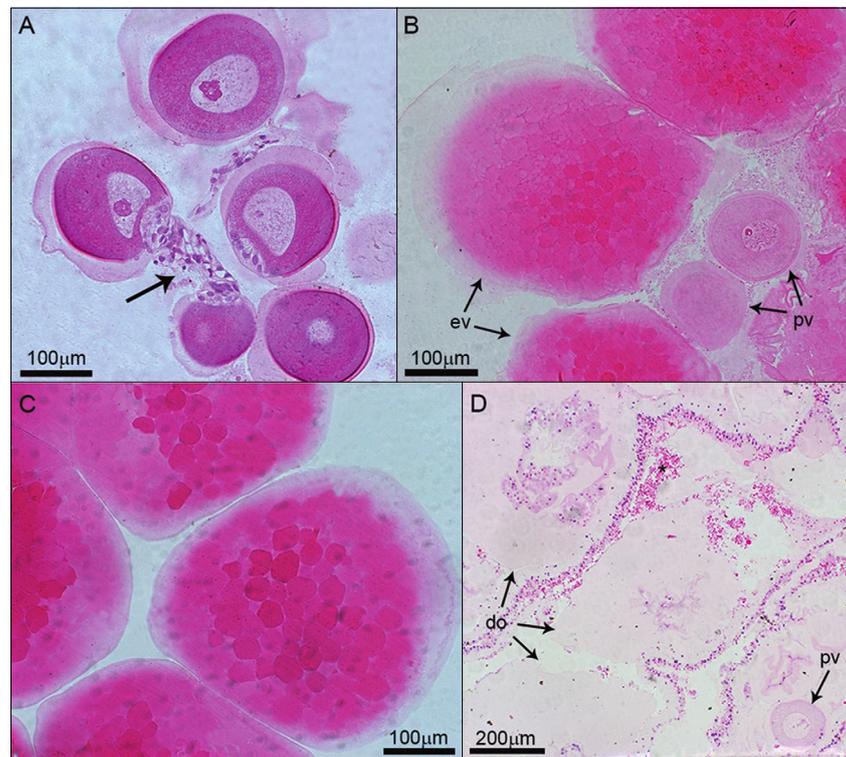
Los Ovs de *P. pythagoricus* se observan como un par de sacos alargados ubicados en la región ventral del opistosoma y rodeados por los DI. En las gónadas se pueden observar oocitos en diferentes estadios de maduración ovárica (Figura IV.4) distinguiéndose: oocitos previtelogénicos, vitelogénicos tempranos y vitelogénicos acorde a su estructura, como también oocitos en la fase de degeneración. Los oocitos previtelogénicos se conectan a la pared ovárica mediante un pedicelo

(Figura IV.4.A). Estos oocitos presentan un diámetro de entre  $90\ \mu\text{m}$  a  $183\ \mu\text{m}$  ( $115 \pm 39\ \mu\text{m}$ ), poseen un gran núcleo ovalado con un nucléolo prominente y con un citoplasma de tamaño similar al núcleo rodeado de una capa gelatinosa eosinófila. Durante la vitelogénesis, aumenta el contenido de vitelo y el tamaño de los oocitos. Los oocitos vitelogénicos tempranos presentan un diámetro promedio de  $627 \pm 86\ \mu\text{m}$  y muchos gránulos de vitelo pequeños (Figura IV.4.2B). Al final de la vitelogénesis, se observan oocitos vitelogénicos con un diámetro promedio de  $759 \pm 60\ \mu\text{m}$  y con gránulos de vitelo de mayor tamaño (Figura IV.4.2C). Se observaron diferencias significativas entre los diámetros de los tres grupos de oocitos descritos (ANOVA a una vía  $p < 0,001$ ).

#### Figura IV.4

Análisis histológico de los ovarios de las hembras: (A) hembras previtelogénicas; (B) hembras vitelogénicas tempranas; (C) hembras vitelogénicas tardías; (D) hembras postvitelogénicas.

En (A), la flecha marca el pedicelo; en (B) las flechas indican oocitos previtelogénicos (pv) y vitelogénicos tempranos (ev). (D), las flechas indican oocitos previtelogénicos (pv) y en degeneración (do). Tinción: hematoxilina-eosina.



Después de la oviposición, los oocitos restantes degeneran y su citoplasma se distiende, de manera que los gránulos de vitelo se desintegran y dispersan por todo el Ov (Fig. IV.4.2D). Sin embargo, durante esta etapa se pueden observar también algunos oocitos previtelogénicos.

A partir de este análisis, se pudo corroborar y correlacionar las agrupaciones macroscópicas realizadas a partir de las mediciones generales con los patrones histológicos observados. Inicialmente, las hembras PreV solo presentan oocitos previtelogénicos, mientras que las hembras Vt contienen tanto oocitos vitelogénicos tempranos como también algunos oocitos previtelogénicos. En cambio, las

hembras V presentan Ovs de gran tamaño con oocitos vitelogénicos. Luego de la oviposición, las hembras PostV entran en una etapa de regresión donde se observan oocitos atrésicos y también oocitos previtelogénicos.

## IV.2.B Discusión

A lo largo del tiempo, diversos estudios se han generado entorno a los diferentes aspectos reproductivos de las arañas. La gran mayoría de los estudios se han enfocado en la biología reproductiva de las mismas analizando el comportamiento de las arañas durante el cortejo, el proceso de selección sexual y la cópula (Galiano 1979; Robinson 1982; Costa & Pérez-Miles 2002; Huber 2015; Ferretti et al. 2012; Scott et al. 2018). Sin embargo, a pesar de ser un evento fundamental para la reproducción, el estudio de la vitelogénesis para un grupo tan diverso como es el Orden Araneae ha sido relegado durante mucho tiempo.

Los estudios histológicos como también los ultraestructurales han sido importantes para el avance en la comprensión de la vitelogénesis, brindando información valiosa sobre los cambios morfológicos que afrontan las gónadas durante este proceso. A partir de los diferentes análisis, se han realizado diversas clasificaciones según el criterio de cada autor. En el caso de las arañas, estos estudios han representado un gran aporte analizándose en diferentes especies tales como *Tegenaria parietina* (Araneae: Agelenidae) (André & Rouiller 1957), *Heptathela kimurai* (Araneae: Liphistiidae) (Osaki 1972), *C. salei* (Seitz 1971) y como también en especies de las familias Lycosidae, Clubionidae, Thomisidae y Sicaridae (Sotelo & Trujillo-Cenóz 1957; Morishita et al. 2003; Jedrzejowska & Kubrakiewicz 2010), brindando una gran fuente de información. A partir de estos análisis, se han clasificado diferentes estadios de oocitos acorde particularmente a los cambios observados en los diámetros y la aparición y/o acumulación progresiva de gránulos de vitelo (Sotelo & Trujillo-Cenóz 1957; Trabalon et al. 1992; Choi & Moon 2003; Morishita et al. 2003).

Los Ovs de *P. pythagoricus* presentan la anatomía estándar o general del grupo, ubicados en la cara ventral del abdomen entre el tracto digestivo y las glándulas de seda. Durante la vitelogénesis, los oocitos ocupan una gran parte del Ov observándose variaciones en su diámetro y estructura. A partir del análisis realizado, se pudo diferenciar en *P. pythagoricus* tres tipos particulares de oocitos acorde a su tamaño y a la presencia de gránulos de vitelo: (1) los previtelogénicos con diámetros menores a 200  $\mu\text{m}$  y sin la presencia de gránulos de vitelo; (2) vitelogénicos tempranos con diámetros de aproximadamente 600  $\mu\text{m}$  y con gránulos de vitelo de menor tamaño, y (3) los vitelogénicos con diámetros promedios de 750  $\mu\text{m}$  y con gránulos de vitelo de mayor tamaño. Tanto la ausencia de los gránulos de vitelo como una relación núcleo-citoplasma alta en los oocitos previtelogénicos coincide con lo observado por otros autores para las hembras PreV (Trabalon et al.

1992; Pourié & Trabalon 2003; Ouriel 2016). La presencia de los gránulos de vitelo y el aumento progresivo del tamaño de los oocitos, junto con las observaciones macroscópicas y las mediciones realizadas, permite determinar que las fases de la vitelogénesis en *P. pythagoricus* pueden quedar restringidas a las tres etapas previamente reportadas para otras especies: una previtelogénesis, una vitelogénesis temprana y una vitelogénesis tardía, siendo las hembras Vt un estadio de transición con oocitos en diferentes etapas de maduración (Fig. IV.4.2B).

Asimismo, en el presente trabajo se pudo aplicar para un modelo de arañas el IGS y el IHS, los cuales podrían considerarse análogos a los índices estándar ampliamente utilizados en crustáceos. Si bien originalmente IGS se utilizó en peces (Dadzie & Wangila 1980; Fatima *et al.* 2013), posteriormente se adaptó con éxito para el análisis reproductivo de moluscos (Di Cosmo *et al.* 2001; Iyapparaj *et al.* 2013), crustáceos (Vazquez Boucard *et al.* 2002; Garcia & Heras 2012) e insectos (Deb *et al.* 2013; Yuan *et al.* 2013). Aunque algunos autores actualmente prefieren medir el volumen ovárico, el IGS podría ser una alternativa para estimar la condición reproductiva de las hembras. Esta medida demostró ser una expresión matemática útil para el estudio del desarrollo del Ov y clasificación de los diferentes estadios de *P. pythagoricus*. Siempre que este análisis se acompañe con un análisis morfológico y morfométrico del individuo y del Ov, se puede proponer un sistema de clasificación para *P. pythagoricus* en el cual las hembras que presenten IGS menores a 3 pueden ser consideradas PreV mientras que las que presenten IGS mayores a 9 sean consideradas V, siendo las hembras Vt un estadio intermedio entre estos valores de IGS (3,5-9).

Considerando que los DI de arañas son equivalentes al hepatopancreas de crustáceos en cuanto a su función, se utilizó en este modelo el término IHS para permitir futuras comparaciones y relaciones con otras especies de arañas u otros artrópodos. En contraste con las variaciones en el IGS, la ausencia de diferencias significativas permite concluir que el IHS no sería una expresión matemática útil para el estudio del proceso de vitelogénesis en arañas. Se ha descrito previamente que la acumulación de vitelo se puede dar en dos etapas (Seitz 1957), produciéndose la segunda etapa de acumulación solo si hay suficiente alimento disponible (Foelix 2011). De esta manera, las hembras necesitarían alimentarse durante este proceso, lo que explicaría la ausencia de variaciones en el peso total del DI y en el IHS. En *Schizocosa ocreata* (Araneae: Lycosidae) se ha observado que la inanición compromete el desarrollo y mantenimiento de los folículos y de los oocitos, como también afecta el comportamiento durante la receptividad y el apareamiento o elección de pareja (Moskalik & Uetz 2016).

### IV.3 Caracterización lipídica

En esta sección se presenta los resultados obtenidos del análisis de los componentes lipídicos de las diferentes muestras estudiadas (DI, HL, gónadas y músculo) tanto de las hembras en los diferentes estadios de la vitelogénesis (PreV, Vt, V y PostV) como de los machos.

#### IV.3.A Resultados

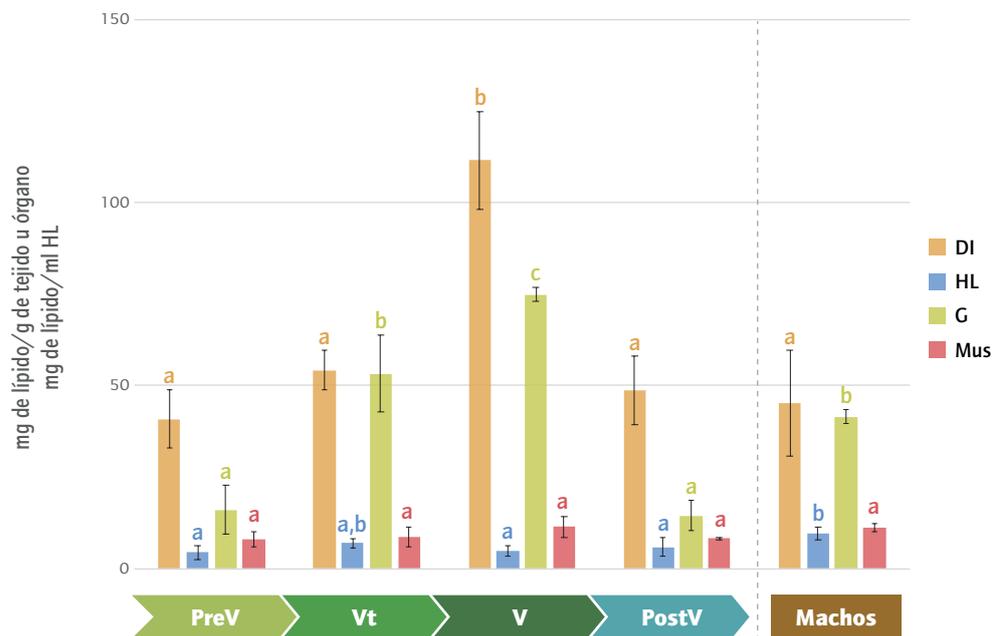
##### IV.3.A.a Concentración de lípidos totales

A partir de la cuantificación gravimétrica de los lípidos totales de los DI, gónadas, músculo y HL, se calculó la concentración de lípidos totales los cuales se expresaron como mg de lípido por g de peso húmedo (DI, gónada o músculo) y como mg de lípido por ml de HL.

En la Figura IV.5 se puede observar un aumento significativo en la concentración de lípidos de los DI durante la vitelogénesis, desde valores promedio de  $40,81 \pm 7,94$  mg de lípido/g de DI en las PreV hasta alcanzar valores de  $111,63 \pm 13,29$  mg de lípido/g de DI en las hembras V. Posteriormente, estos valores disminuyen a  $51,7 \pm 20,75$  mg de lípido/g de DI en las hembras PostV.

Asimismo, la concentración de lípidos en las gónadas aumenta progresivamente durante el proceso de vitelogénesis. Las hembras PreV presentan valores de  $16,03 \pm 6,63$  mg de lípido/g de Ov, valor promedio que aumenta 3,3 veces en las hembras Vt alcanzando una concentración de  $53,3 \pm 10,54$  mg de lípido/g de Ov. Finalmente, en las hembras V se observan los valores máximos de concentración con  $74,98 \pm 1,84$  mg de lípido/g de Ov, los cuales representan un aumento de 1,41 veces con respecto a las hembras Vt. Este aumento se da de manera progresiva, con un aumento inicial cercano a un 70% del contenido de lípidos desde las hembras PreV a las Vt, y posteriormente con un aumento cercano al 30% desde las hembras Vt a las V. Luego de la puesta, estos valores disminuyen en las hembras PostV a concentraciones comparables con los de las hembras PreV ( $14,42 \pm 4,04$  mg de lípido/g de Ov). Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la concentración de lípidos del músculo y de la HL, los cuales presentan valores promedio de  $8,76 \pm 2,21$  mg de lípido/g de músculo y de  $5,08 \pm 1,88$  mg de lípido/ml de HL entre los distintos estadios analizados.

En el caso de los machos las concentraciones son comparables a las observadas en las hembras PreV y Vt, con valores promedio de  $45,31 \pm 14,5$  mg de lípido/g de DI,  $41,41 \pm 1,9$  mg de lípido/g de testículo y  $11,17 \pm 1,14$  mg de lípido/g de músculo (Fig. IV.5), presentando una mayor concentración de lípidos solo en la HL ( $9,42 \pm 1,74$  mg de lípido/ml de HL).



**Figura IV.5** Concentración de lípidos presentes en divertículos intestinales (DI), gónadas (G), músculo (Mus) y hemolinfa (HL) de machos y hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas.

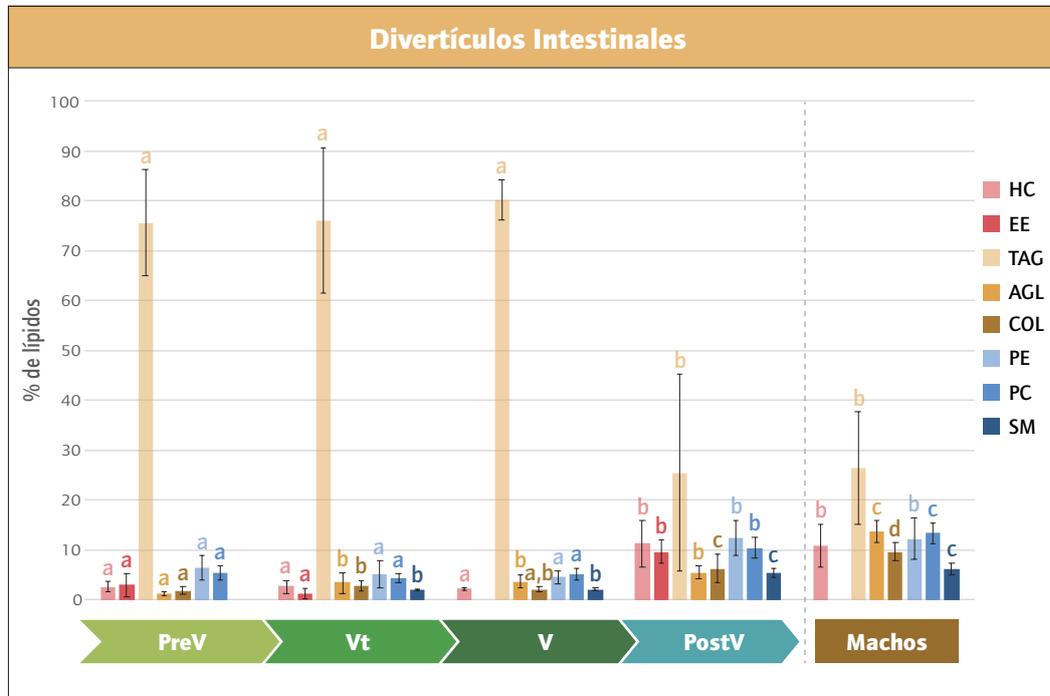
### IV.3.A.b Composición lipídica

En esta sección se presentan los resultados obtenidos a partir de la cuantificación por TLC-FID de las distintas clases de lípidos de las muestras analizadas de machos y hembras en distintos estadios de la vitelogénesis.

En la Figura IV.6 se presentan los resultados obtenidos del análisis de la composición lipídica de los DI. En esta figura se puede observar que los valores permanecen relativamente constantes desde las hembras PreV a las V. Se puede observar que un 77% de los lípidos de los DI corresponden a los triacilglicérols y un 11% a los fosfolípidos, entre los cuales predominan la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, mientras que el resto de los lípidos en general presentan valores inferiores al 3% (esteroles esterificados, ácidos grasos libres, colesterol e hidrocarburos). Sin embargo, en las hembras PostV estos valores porcentuales cambian significativamente. Si bien el contenido de lípidos totales es similar al de las hembras PreV, el porcentaje de triacilglicérols en los DI de las PostV disminuye a un  $25,5 \pm 19\%$  de lípidos totales, mientras que el porcentaje de los fosfolípidos aumentan llegando a valores cercanos a un 28% ( $12,4 \pm 3,5\%$  de fosfatidiletanolamina,  $10,43 \pm 2\%$  fosfatidilcolina y  $5,37 \pm 0,9\%$  de esfingomielina).

En los machos, los porcentajes fueron similares al de las hembras PostV, con un predominio de triacilglicérols con un  $26 \pm 11\%$  y aproximadamente un 31% de

fosfolípidos ( $12 \pm 4\%$  fosfatidiletanolamina,  $13 \pm 2\%$  fosfatidilcolina y  $6,2 \pm 1\%$  esfingomielina) pero con un  $13 \pm 2\%$  de ácidos grasos libres.

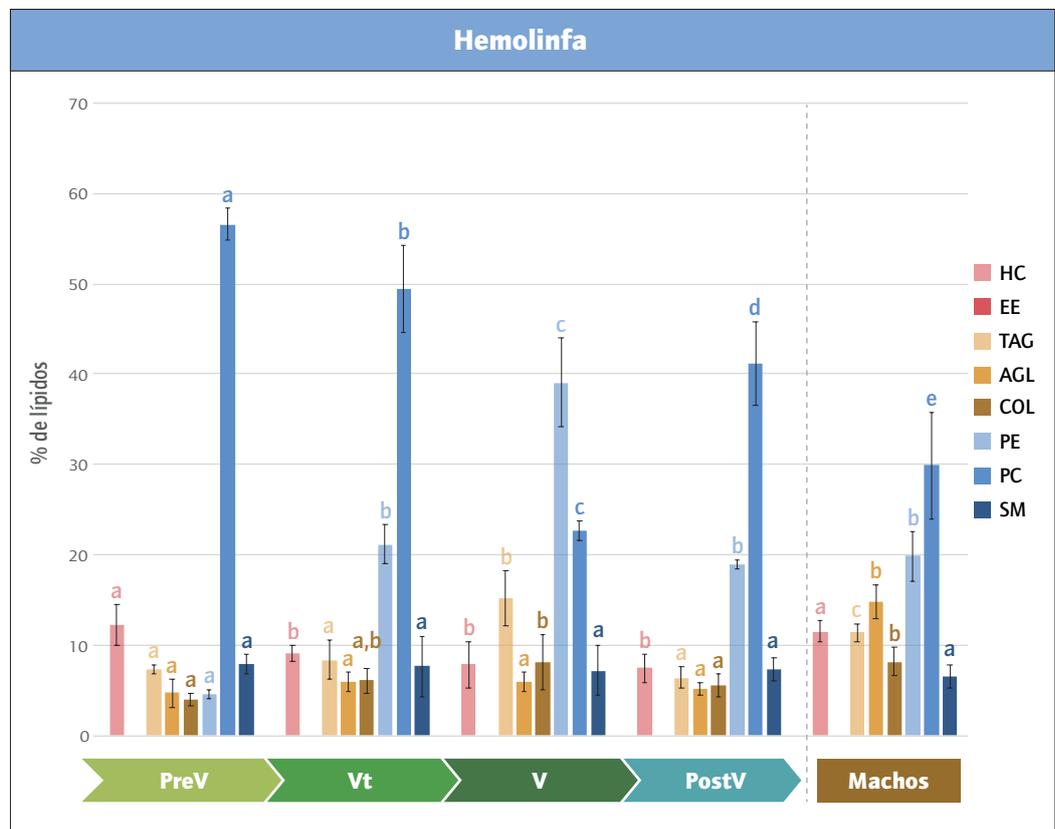


**Figura IV.6** Porcentaje de las distintas clases de lípidos (%) de los divertículos intestinales de machos y hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas. HC: hidrocarburos; EE: esteroides esterificados; TAG: triacilglicérolos; AGL: ácidos grasos libres; COL: colesterol; PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina.

En la Figura IV.7 se presentan los resultados obtenidos del análisis de la composición de lípidos de la HL tanto en hembras como en machos. En esta figura se puede observar que en un inicio la fosfatidilcolina predomina entre los lípidos totales con un  $56 \pm 2\%$  en las hembras PreV. En el transcurso de la vitelogénesis, se observa un aumento paulatino del contenido de fosfatidiletanolamina alcanzando un  $21 \pm 2\%$  en las Vt y un  $39 \pm 5\%$  en las V. Al mismo tiempo, se observa una disminución del contenido de fosfatidilcolina llegando a representar  $22 \pm 1\%$  de los lípidos totales en las hembras V. En este estadio también se observa un aumento del porcentaje de triacilglicérolos alcanzando un  $15 \pm 3\%$ , como también del contenido de colesterol representado un  $8 \pm 3\%$  de los lípidos totales. En las PostV estos valores se vuelven a invertir, siendo la fosfatidilcolina el lípido mayoritario con un  $41 \pm 4\%$  y disminuyendo los valores de fosfatidiletanolamina a menos del 20% de los lípidos totales.

En la hemolinfa de los machos, los fosfolípidos predominantes fueron la

fosfatidilcolina con un  $29 \pm 5\%$  y fosfatidiletanolamina con un  $19 \pm 3\%$ . Los machos también presentan un gran porcentaje de triacilgliceroles ( $11 \pm 0,9\%$ ), de ácidos grasos libres ( $15 \pm 2\%$ ) y de colesterol ( $8 \pm 1,5\%$ ).

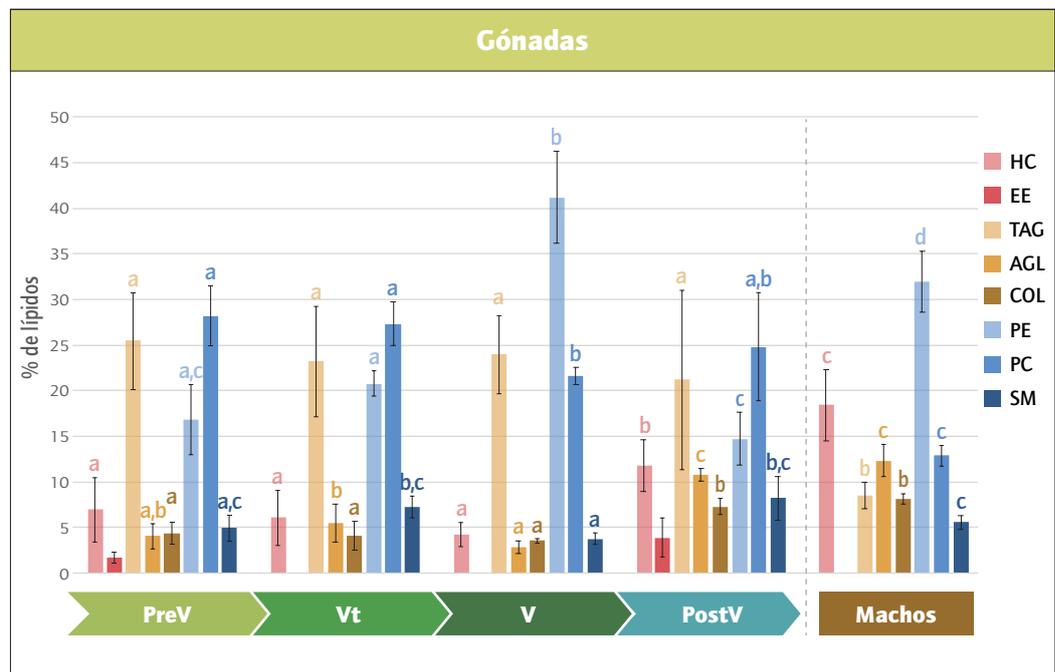


**Figura IV.7** Porcentaje de las distintas clases de lípidos (%) de la hemolinfa de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c, d y e) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )  $n=6$ . Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.6.

En la Figura IV.8 se presentan los resultados obtenidos del análisis de composición lipídica de las gónadas de las hembras en diferentes estadios y de los machos. En los Ovs de las hembras PreV hay un predominio de triacilgliceroles ( $25 \pm 5\%$ ) y de fosfatidilcolina ( $30 \pm 3\%$ ), mientras que la fosfatidiletanolamina representa un  $16 \pm 3\%$ . Durante la vitelogénesis se produce un aumento significativo en el contenido de fosfatidiletanolamina (representando hasta un 41% de los lípidos de las hembras V) junto con una disminución en el porcentaje de fosfatidilcolina ( $21 \pm 0,9\%$ ). Por otra parte, se observan variaciones en el contenido de los ácidos grasos libres que disminuyen desde un  $4 \pm 1\%$  en las PreV a un  $2,8 \pm 0,6\%$  en las V, y de la esfingomieline la cual disminuye desde un  $4,95 \pm 1,4\%$  en las PreV a un  $3,7 \pm 0,6\%$  en las V. En las hembras PostV, los valores de los lípidos mayoritarios vuelven a ser comparables con el perfil porcentual de las hembras PreV, pero con un porcentaje

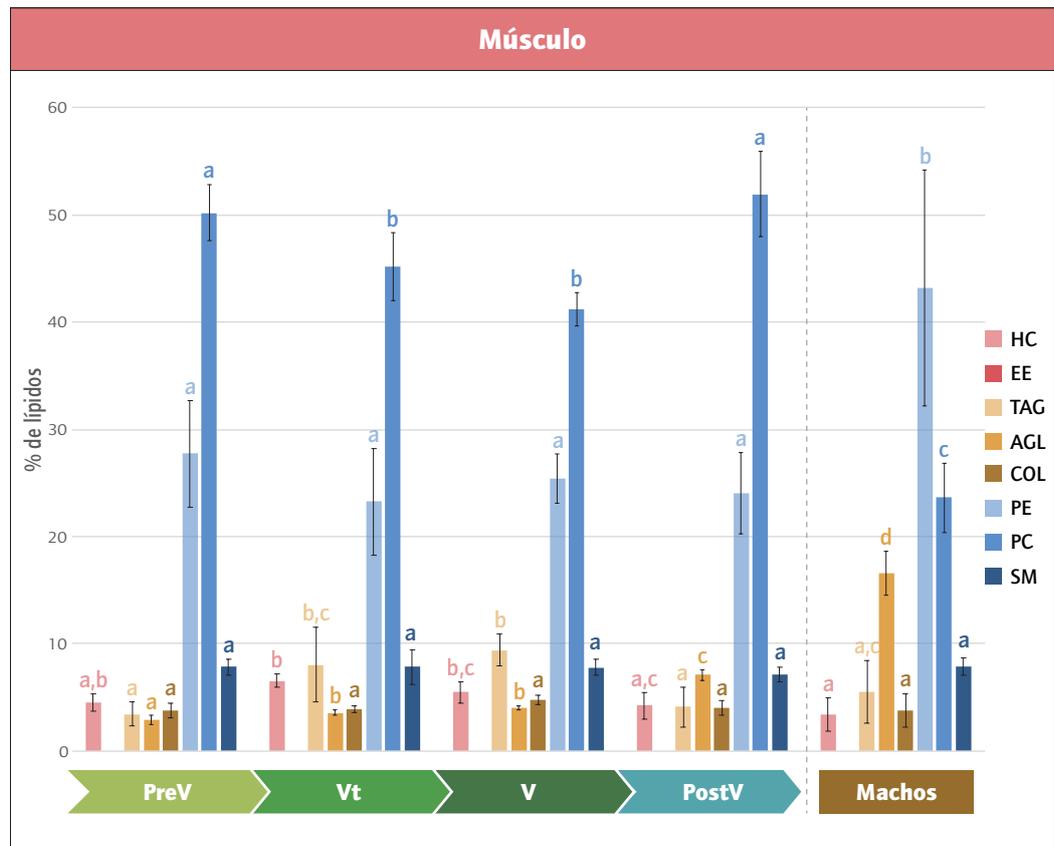
mayor de hidrocarburos ( $11,8 \pm 3\%$ ), ácidos grasos libres ( $10,7 \pm 0,7\%$ ) y colesterol ( $7 \pm 0,9\%$ ).

En los machos, los testículos presentan un  $32 \pm 3\%$  de fosfatidiletanolamina y  $18 \pm 4\%$  de hidrocarburos, mientras que la fosfatidilcolina no representa más de un  $13\%$ . A su vez, el porcentaje de triacilglicérols en los machos es significativamente menor representando un  $8,5 \pm 1,4\%$  de los lípidos totales. Al igual que las hembras PostV, presentan un porcentaje mayor de hidrocarburos ( $18 \pm 4\%$ ), ácidos grasos libres ( $12 \pm 1,8\%$ ) y colesterol ( $8 \pm 0,5\%$ ).



**Figura IV.8** Porcentaje de las distintas clases de lípidos (%) de las gónadas de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ),  $n=6$ . Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.6.

En la Figura IV.9 se presentan los resultados obtenidos del análisis de composición lipídica del músculo tanto de machos como de hembras en diferentes estadios. En las hembras PreV, los lípidos mayoritarios en el músculo son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina con el  $50 \pm 3\%$  y  $27,7 \pm 5\%$ , respectivamente, mientras que en las hembras V el valor de fosfatidilcolina disminuye a un  $41 \pm 2\%$  de los lípidos totales. En las hembras PreV los triacilglicérols representan cerca del  $3 \pm 1\%$  y los ácidos grasos libres representan el  $2,8 \pm 0,4\%$  los cuales aumentan en las hembras V ( $9 \pm 1,4\%$  de triacilglicérols y  $4 \pm 0,2\%$  de ácidos grasos libres). En las hembras PostV la fosfatidilcolina alcanza un valor de  $51,9 \pm 4\%$ , los triacilglicérols disminuyen a un  $4 \pm 1,8\%$  y los ácidos grasos libres aumentan a un  $7,1 \pm 0,5\%$ .



**Figura IV.9** Porcentaje de las distintas clases de lípidos (%) del músculo de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.6.

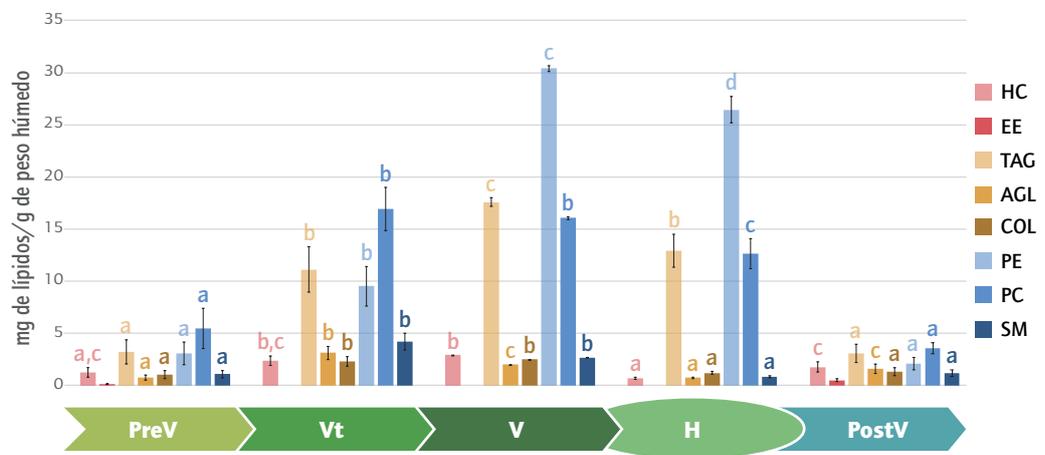
En los machos, la fosfatidiletanolamina es el fosfolípido mayoritario representando un  $43 \pm 10\%$  de los lípidos totales, mientras que la fosfatidilcolina representa el  $24 \pm 3\%$ . Por otra parte, los machos contienen un porcentaje de ácidos grasos libres mayor que las hembras, alcanzando un  $16,5\%$  de los lípidos totales.

Tanto en hembras como en machos, los diacilgliceroles se encuentran presentes en pequeñas cantidades o ausentes (datos no presentados).

En la Figura IV.10 se presenta la variación de la concentración de las distintas clases de lípidos en los Ovs de las hembras durante la vitelogénesis y en el homogenato de huevos. Los valores de estos resultados se expresan como mg de lípido por g de peso húmedo. Durante la vitelogénesis, se observa un aumento en la concentración de todos los lípidos, destacándose principalmente el aumento de la concentración de fosfatidiletanolamina. Se observa un incremento inicial de 3 veces el contenido desde las PreV ( $3,08 \pm 1,1$  mg de fosfatidiletanolamina/g de Ov) a las Vt ( $9,51 \pm 1,9$  mg de fosfatidiletanolamina/g de Ov), alcanzando posteriormente un máximo de  $30,41 \pm 0,29$  mg de fosfatidiletanolamina/g de Ov en las hembras V, lo que representa un segundo incremento de 3,2 veces con respecto a

Las Vt. Las concentraciones de fosfatidilcolina y esfingomielina aumentan desde las hembras PreV ( $5,46 \pm 1,95$  mg de fosfatidilcolina/g de Ov y  $1,07 \pm 0,38$  mg de esfingomielina/g de Ov) a las Vt, manteniéndose constante en las V ( $16,05 \pm 0,15$  mg de fosfatidilcolina/g de Ov y  $2,67 \pm 0,03$  mg de esfingomielina/g de Ov).

Por otra parte, se observa un aumento progresivo en la concentración de triacilglicerol durante el proceso comenzando en las hembras PreV con valores promedio de  $3,2 \pm 1,14$  mg de triacilglicerol/g de Ov y alcanzando una concentración de  $17,6 \pm 0,43$  mg de triacilglicerol/g de Ov en las V. Luego de la puesta, los valores de concentración de las hembras PostV pasan a ser comparables con los de las hembras PreV.



**Figura IV.10** Concentración de las distintas clases de lípidos de los ovarios de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y en huevos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas; H: homogenato de huevos (menos de 12 h de la puesta). HC: hidrocarburos; EE: esterolios esterificados; TAG: triacilglicerol; AGL: ácidos grasos libres; COL: colesterol; PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina.

Al igual que las hembras V, los huevos de *P. pythagoricus* contienen una gran concentración de fosfolípidos especialmente de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Los valores promedio de  $25,45 \pm 1,23$  mg de fosfatidiletanolamina/g de huevos y  $12,65 \pm 1,46$  mg de fosfatidilcolina/g de huevos, los cuales representan un 47% y un 22% respectivamente del contenido total de lípidos en este estadio, valor comparable al observado en las hembras V (aproximadamente 41% de fosfatidiletanolamina y 21% de fosfatidilcolina). Por otra parte, los triacilglicerol representan, al igual que en las hembras V, un 23% de los lípidos totales con un valor de concentración de  $12,92 \pm 1,55$  mg de triacilglicerol/g de huevos. Si bien la concentración de cada clase de lípido por gramo de huevo fue ligeramente menor al observado en las hembras V, los porcentajes que aportan cada uno de estos lípidos al contenido total fueron comparables entre las hembras V y el primer estadio

analizado de huevos.

### IV.3.A.c Análisis de los ácidos grasos

En esta sección se presenta el análisis realizado por GLC de los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos a partir de los lípidos totales de los DI (Tabla IV.1), la HL (Tabla IV.2), las gónadas (Tabla IV.3) y músculo (Tabla IV.4) tanto de machos como de hembras en distintos estadios del proceso de vitelogénesis. En las tablas se pueden observar los porcentajes de todos los ácidos grasos analizados incluyendo los que son constituyentes menores, pero de importancia metabólica sustancial, que experimentan variaciones durante la vitelogénesis como el eicosa-pentaenoato (C20: 5).

En cambio, las Figuras IV.11 a IV.14 solo contienen los datos de la variación de los cuatro ácidos grasos que han sido mayoritarios en las hembras durante la vitelogénesis y en los machos, los cuales presentan porcentajes mayores al 10% y juntos representan un 75-95% de los ácidos grasos total. En la Figura IV.11, se puede observar en los DI que el ácido graso mayoritario es el ácido oleico (18:1) el cual no varía significativamente durante la vitelogénesis (Figura IV.11). En cambio, el ácido palmítico (16:0) aumenta y el ácido linoleico (18:2) disminuye. En el caso de los machos se observa una mayor proporción de 18:1 que en las hembras.

**Tabla IV.1**

Porcentajes de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales de los divertículos intestinales de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. %AG: Porcentaje de ácidos grasos; PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas. En la tabla se presenta el listado de ácidos grasos con su nomenclatura simplificada.

Divertículos Intestinales					
% AG	PreV	Vt	V	PostV	Machos
14:0	0,61 $\pm$ 0,1	0,58 $\pm$ 0,11	1,59 $\pm$ 0,41	1,03 $\pm$ 0,5	0,93 $\pm$ 0,03
15:0	0,13 $\pm$ 0,08	0,26 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,14	0,18 $\pm$ 0,02
16:0	15,9 $\pm$ 0,62	16,16 $\pm$ 1,62	27,1 $\pm$ 6,04	10,69 $\pm$ 3,69	21,21 $\pm$ 2,92
16:1	2,91 $\pm$ 1,88	5,6 $\pm$ 2,76	4,1 $\pm$ 1,47	3,99 $\pm$ 3,21	3,99 $\pm$ 0,72
17:0	0,6 $\pm$ 0,3	0,54 $\pm$ 0,18	0,69 $\pm$ 0,37	0,63 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,29
17:1	0,21 $\pm$ 0,13	0,65 $\pm$ 0,35	0,3 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,18	ND
18:0	13,9 $\pm$ 5,29	17,68 $\pm$ 5,54	14,19 $\pm$ 2,05	13,77 $\pm$ 1,07	11,68 $\pm$ 2,59
18:1	34,68 $\pm$ 6,5	34,68 $\pm$ 6,52	38,14 $\pm$ 3,01	34,23 $\pm$ 3,2	51,65 $\pm$ 5,62
18:2	27,02 $\pm$ 0,48	23,99 $\pm$ 7,22	7,88 $\pm$ 3,75	30,13 $\pm$ 2,34	7,27 $\pm$ 1,76
18:3	1,86 $\pm$ 1,33	3,06 $\pm$ 2,47	1,01 $\pm$ 0,31	3,52 $\pm$ 2,47	0,86 $\pm$ 0,3
20:0	1,14 $\pm$ 0,4	0,59 $\pm$ 0,38	2,1 $\pm$ 1,48	1,56 $\pm$ 0,38	1,72 $\pm$ 0,85
20:4	ND	ND	ND	ND	ND
20:5	1 $\pm$ 0,74	0,83 $\pm$ 0,76	1,74 $\pm$ 1,6	2,63 $\pm$ 0,76	0,61 $\pm$ 0,29

**Tabla IV.2**

Porcentajes de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales de la hemolinfa de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores representan las medias de los análisis  $\pm$  DE. Aplica las mismas abreviaturas que para la Tabla IV.1.

Hemolinfa					
% AG	PreV	Vt	V	PostV	Machos
14:0	1,93 $\pm$ 1,35	0,49 $\pm$ 0,16	1,2 $\pm$ 1,02	1,04 $\pm$ 0,1	0,55 $\pm$ 0,12
15:0	0,57 $\pm$ 0,28	0,29 $\pm$ 0,13	0,34 $\pm$ 0,3	0,26 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,07
16:0	27,08 $\pm$ 8,46	14,92 $\pm$ 1,65	17,94 $\pm$ 0,35	14,75 $\pm$ 152	11,83 $\pm$ 0,2
16:1	ND	1,73 $\pm$ 0,57	2,63 $\pm$ 0,25	1,18 $\pm$ 0,19	1,77 $\pm$ 0,08
17:0	1,15 $\pm$ 0,38	0,7 $\pm$ 0,22	0,7 $\pm$ 0,2	0,58 $\pm$ 0,23	0,6 $\pm$ 0,09
17:1	0,3 $\pm$ 0,17	0,28 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,13	0,24 $\pm$ 0,1
18:0	20,98 $\pm$ 5,76	14,2 $\pm$ 5,59	13 $\pm$ 0,66	12,33 $\pm$ 2,98	10 $\pm$ 0,96
18:1	32,73 $\pm$ 9,41	34,65 $\pm$ 5,59	38,11 $\pm$ 2,5	36,73 $\pm$ 7,07	36,32 $\pm$ 0,55
18:2	12,93 $\pm$ 4,49	26,74 $\pm$ 0,87	21,52 $\pm$ 0,23	27,89 $\pm$ 3,22	34,02 $\pm$ 1,28
18:3	1,34 $\pm$ 0,86	2,66 $\pm$ 1,41	1,61 $\pm$ 0,68	2,81 $\pm$ 0,63	1,41 $\pm$ 0,26
20:0	1,85 $\pm$ 1,48	1,52 $\pm$ 0,97	1,01 $\pm$ 0,77	0,74 $\pm$ 0,54	0,59 $\pm$ 0,28
20:4	ND	ND	ND	ND	ND
20:5	ND	1,01 $\pm$ 0,66	0,8 $\pm$ 0,13	0,84 $\pm$ 0,44	1,95 $\pm$ 0,6

**Tabla IV.3**

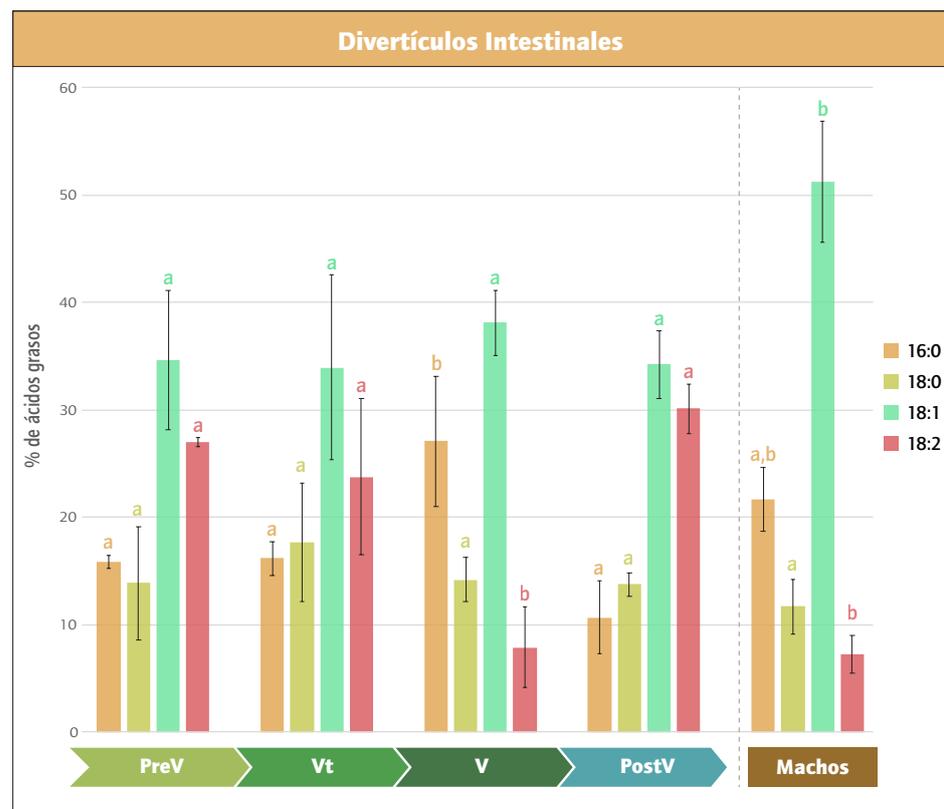
Porcentajes de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales de las gónadas de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores representan las medias de los análisis  $\pm$  DE. Aplica las mismas abreviaturas que para la Tabla IV.1.

Gónadas					
% AG	PreV	Vt	V	PostV	Machos
14:0	0,94 $\pm$ 0,86	0,5 $\pm$ 0,19	0,54 $\pm$ 0,15	1,1 $\pm$ 0,07	1,7 $\pm$ 0,16
15:0	0,23 $\pm$ 0,2	0,14 $\pm$ 0,1	0,08 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,26	0,41 $\pm$ 0,16
16:0	12,91 $\pm$ 1,55	20,09 $\pm$ 3,35	15,67 $\pm$ 1,2	14,62 $\pm$ 0,68	14,64 $\pm$ 0,11
16:1	2,42 $\pm$ 0,74	2,48 $\pm$ 1,17	2,26 $\pm$ 0,44	2,16 $\pm$ 1,15	2,47 $\pm$ 0,61
17:0	1,31 $\pm$ 0,23	0,67 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,48	0,78 $\pm$ 0,01
17:1	0,79 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,4	ND
18:0	17,86 $\pm$ 0,02	15,09 $\pm$ 4,15	11,24 $\pm$ 1,09	12,16 $\pm$ 2,72	15,13 $\pm$ 1,61
18:1	47,64 $\pm$ 0,91	32,52 $\pm$ 5,25	34,36 $\pm$ 5	35,72 $\pm$ 4,66	30,92 $\pm$ 2,37
18:2	10,99 $\pm$ 0,97	25,97 $\pm$ 5,36	28,3 $\pm$ 5,36	27,24 $\pm$ 1,68	28,7 $\pm$ 0,24
18:3	3,91 $\pm$ 2,56	0,99 $\pm$ 0,61	2,84 $\pm$ 1,23	2,16 $\pm$ 0,19	1,85 $\pm$ 0,4
20:0	1,13 $\pm$ 0,19	0,07 $\pm$ 0,42	0,76 $\pm$ 0,18	0,99 $\pm$ 0,5	0,96 $\pm$ 0,04
20:4	ND	ND	0,05 $\pm$ 0,01	ND	0,75 $\pm$ 0,05
20:5	ND	0,49 $\pm$ 0,22	1,01 $\pm$ 0,14	1,68 $\pm$ 0,57	2,06 $\pm$ 0,2

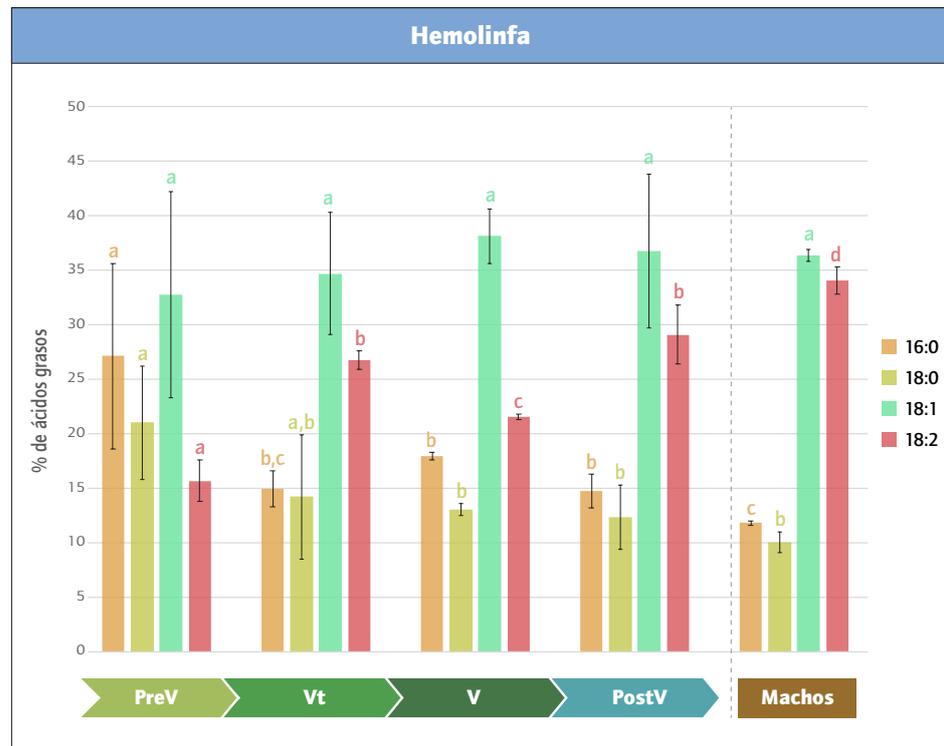
**Tabla IV.4**

Porcentajes de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales del músculo de hembras en diferentes estadios de la vitelogenénesis y de machos. Los valores representan las medias de los análisis ± DE. Aplica las mismas abreviaturas que para la Tabla IV.1.

Músculo					
% AG	PreV	Vt	V	PostV	Machos
14:0	0,22 ± 0,18	0,4 ± 0,09	0,96 ± 0,11	0,32 ± 0,1	0,58 ± 0,11
15:0	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,72 ± 0,34	0,16 ± 0,01	0,25 ± 0,05
16:0	7,29 ± 0,9	10,54 ± 0,3	17,02 ± 0,67	6,99 ± 0,72	18,98 ± 1,89
16:1	0,79 ± 0,11	1,55 ± 0,29	2,02 ± 0,71	0,73 ± 0,21	0,5 ± 0,14
17:0	0,74 ± 0,09	1,54 ± 0,57	1,19 ± 0,17	0,54 ± 0,07	1,83 ± 0,18
17:1	0,21 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,45 ± 0,14	0,47 ± 0,15	0,24 ± 0,12
18:0	19,96 ± 1,38	14,94 ± 2,37	21,86 ± 2,82	16,49 ± 1,9	42,9 ± 0,95
18:1	22,24 ± 0,41	24,39 ± 4,94	29,64 ± 2,71	20,13 ± 2,05	11,29 ± 5,04
18:2	36,01 ± 3,01	33,87 ± 2,3	21,49 ± 1,45	44,09 ± 1,2	1,42 ± 0,53
18:3	3,91 ± 1,26	3,66 ± 2,96	1,21 ± 0,45	2,47 ± 0,47	0,5 ± 0,72
20:0	8,43 ± 2,55	0,56 ± 0,08	1,26 ± 0,96	0,71 ± 0,16	7,66 ± 7,1
20:4	ND	ND	ND	ND	ND
20:5	ND	3,57 ± 1,04	2,15 ± 0,2	7,5 ± 0,69	0,67 ± 0,32



**Figura IV.11** Porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios de los divertículos intestinales de hembras en diferentes estadios de la vitelogenénesis y de machos. Los valores se presentan como las medias ± DE. Las diferentes letras sobre las barras (a y b) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas.

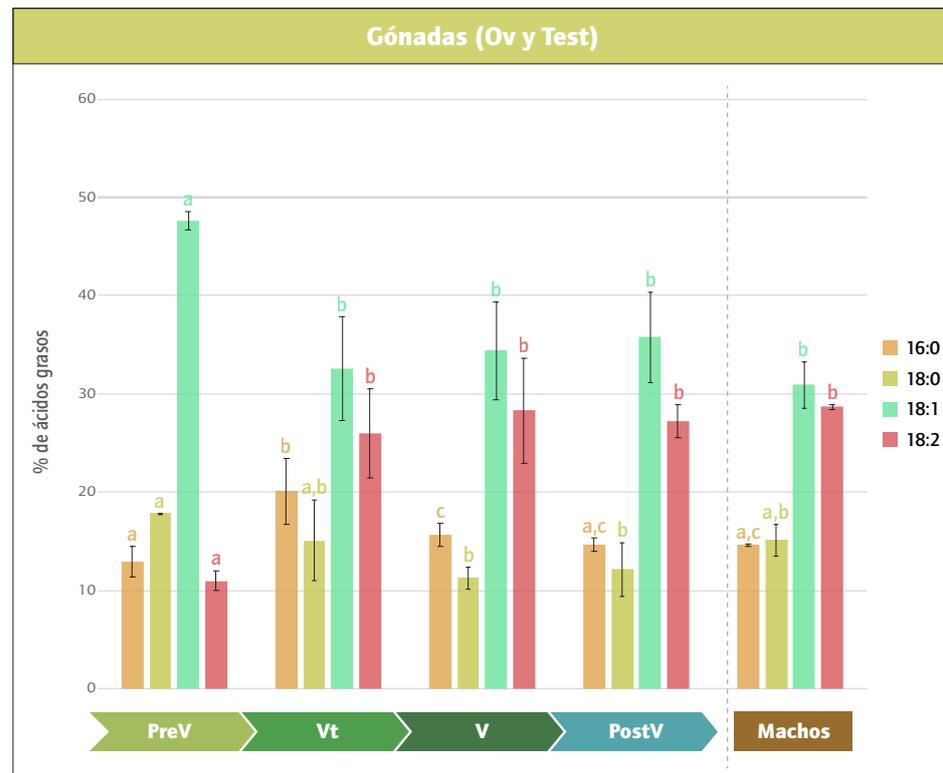


**Figura IV.12** Porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios de la hemolinfa de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras sobre las barras (a, b, c y d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.11.

En la Figura IV.12 se puede observar que en la HL el ácido graso predominante en el transcurso de la vitelogénesis es el C18:1. Las hembras PreV presentan un 32,7% de C18:1, junto con un 27% de C16:0 y un 21% de ácido esteárico (C18:0). Durante la vitelogénesis, se observa en la HL una disminución de los dos ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0), mientras que aumenta el porcentaje del C18:2. A diferencia de las hembras, los machos presentan mayor porcentaje de C18:2, y menor porcentaje de ácidos grasos saturados en la HL.

En contraste con el patrón observado en la HL, en los Ovs de las hembras PreV predomina el C18:1 con un 47%, mientras que el resto presentan porcentajes menores al 18% (Figura IV.13). Sin embargo, las proporciones de estos ácidos grasos pasan a ser comparables a los observados en la HL a medida transcurre el proceso, observándose un aumento en el C18:2 y una ligera disminución del C18:1. Los machos presentan porcentajes comparables a los de las hembras PostV.

Por el contrario, en el músculo (Figura IV.14) las hembras PreV presentan un predominio de C18:2 con un 36%, el cual disminuye durante el proceso alcanzando valores cercanos al 20%. En cambio, el C16:0 y el C18:1 aumentan desde 7,2% a un 17% y desde un 22% a un 30% respectivamente. Por el contrario, en los machos el ácido graso mayoritario de los músculos es el C18:0 con un 42%, seguido del C16:0 con un 19%.

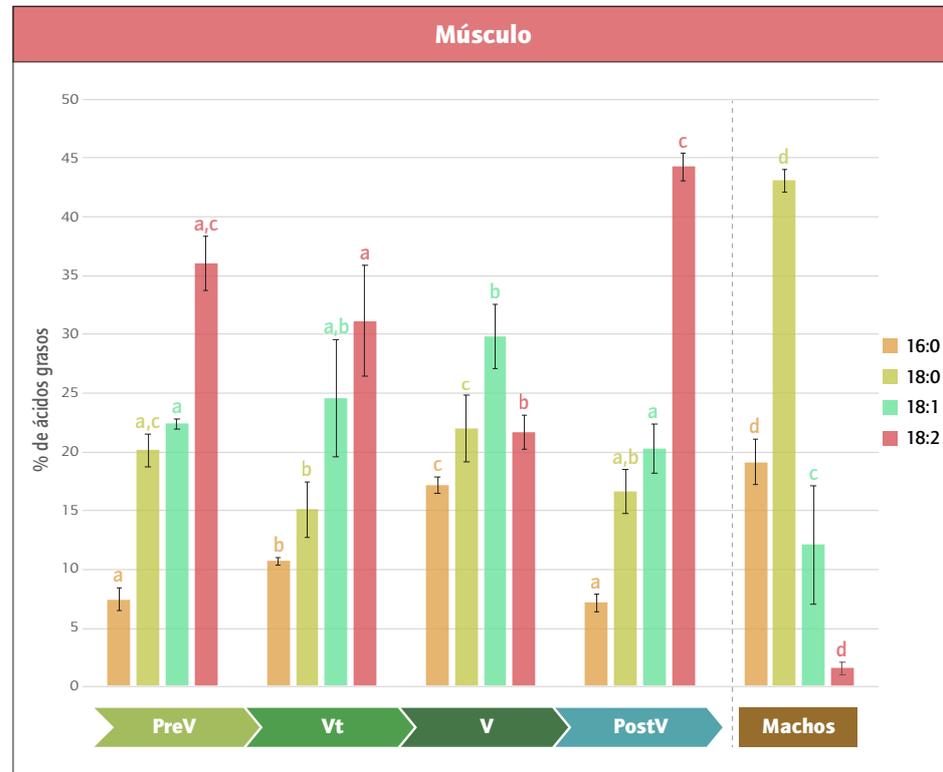


**Figura IV.13** Porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios de las gónadas de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis y de machos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras sobre las barras (a y b) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.11.

### IV.3.B Discusión

Como previamente Laino y colaboradores describieron mediante el uso de ensayos *in vivo* e *in vitro* con lípidos radiomarcados, los DI representan el principal órgano del metabolismo y almacenamiento de lípidos en las arañas (Laino *et al.* 2009; Laino *et al.* 2011a). El aumento observado en la concentración de lípidos totales en los DI al final de la vitelogénesis, desde las hembras Vt a las V, reforzaría observaciones previas donde se describe que la segunda fase de acumulación de vitelo solo se produce cuando hay el alimento disponible (Foelix 2011). A su vez, el aumento observado en el tamaño de los oocitos y en el peso del Ov durante el proceso de vitelogénesis fue acompañado de una acumulación progresiva de lípidos en este órgano. De esta manera, el aumento en la concentración de lípidos en los DI durante la vitelogénesis podría estar asociado al posterior transporte y acumulación de los lípidos en el Ov, como ha sido descrito previamente para otros artrópodos (Teshima & Kanazawa 1983; Castille & Lawrence 1989; Ziegler & van Antwerpen 2006).

Con estos resultados se hubiese esperado que la concentración de lípidos en la HL hubiera aumentado durante la vitelogénesis debido a que este tejido es



**Figura IV.14** Porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios del músculo de hembras en diferentes estadios de la vitelogenésis y de machos. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras sobre las barras (a, b, c y d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.11.

la única vía de transporte de los lípidos hacia el Ov. Sin embargo, se observó un aumento en el volumen total de la HL lo cual podría permitir un suministro mayor de lípidos al Ov en las hembras V. De todas maneras, con estos resultados no es posible descartar la hipótesis de una posible síntesis endógena de estos lípidos en el Ov como se ha descrito previamente en algunos crustáceos (Vazquez Boucard *et al.* 2002) e insectos (Lubzens *et al.* 1981; Ferenz 1985; Ziegler & van Antwerpen 2006).

Por otra parte, el aumento de los lípidos en los DI podría darse en virtud de sustentar el metabolismo de las hembras durante el proceso de oviposición y el posterior mantenimiento de la ooteca debido a que son eventos energéticamente muy costosos para las hembras. Ruhland y colaboradores (2016) determinaron que la oviposición y la atención posterior que las madres brindan para el cuidado de sus crías implica un costo energético alto para las hembras de *P. saltans*, observándose una disminución particular de los niveles de lípidos durante esta etapa. En el caso de *P. pythagoricus*, las hembras prácticamente no se alimentan luego de la oviposición dedicándose al cuidado de la ooteca, la cual defienden ferozmente (Galiano 1971). De manera similar, se sugirió en el camarón *P. monodon* que las reservas de lípidos acumuladas en el hepatopáncreas serían necesarias para satisfa-

cer los requerimientos energéticos durante y luego de la oviposición (Millamena & Pascual 1990). En cambio, los machos presentaron concentraciones de lípidos en todos los órganos que fueron comparables a los valores de las hembras PreV y PostV. Esta similitud probablemente refleje los niveles basales de concentración necesarios para mantener la homeostasis lipídica que cumpla con los requisitos metabólicos de los individuos.

Durante la vitelogénesis, los Ovs deben incorporar todos los nutrientes necesarios para cumplir con los requerimientos energéticos y estructurales que implica el desarrollo de los embriones, pero también para sustentar la demanda energética que implica el proceso de emergencia, dispersión, y otras actividades postemergentes antes de que los juveniles sean capaces de alimentarse (Anderson 1978; Tralalon *et al.* 2018). La composición lipídica del Ov de las hembras V se correlaciona fuertemente con la composición observada en los huevos de *P. pythagoricus* (Figura IV.10). En el Ov y en los huevos de *P. pythagoricus* los principales lípidos energéticos fueron los triacilglicerolos, los cuales representaron un 23% de los lípidos totales. Este valor fue equiparable al observado en los huevos de *S. malitiosa* donde los triacilglicerolos representaron un 25% de los lípidos totales (Laino *et al.* 2013). A su vez, el Ov contenía cerca de un 66% de lípidos estructurales (considerando la suma de los porcentajes de los tres lípidos analizados: fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina), valor comparable al de los huevos de *P. pythagoricus* donde estos lípidos representaron cerca el 70% de los lípidos totales. Asimismo, en los huevos de *S. malitiosa* se observó un valor similar, representando cerca del 64% de los lípidos totales. Este predominio de lípidos estructurales se observó también en *P. monodon*, donde los lípidos polares fueron los principales responsables del aumento de la concentración de lípidos de los Ovs durante la maduración ovárica (Millamena & Pascual 1990).

Durante el proceso de vitelogénesis, el contenido de fosfatidiletanolamina en el Ov aumentó llegando a representar un 41% de los lípidos totales en las hembras V, convirtiéndose en el principal lípido de este órgano. Este valor no solo fue consistente con lo observado en los huevos, sino también con los porcentajes de lípidos de las LVs de *P. pythagoricus* donde se estableció que la fosfatidiletanolamina era el principal lípido (Laino *et al.* 2011b). Entre las diferentes funciones, las características fisicoquímicas distintivas de fosfatidiletanolamina le permiten modular la viscosidad de las membranas de las células eucariotas. Se ha observado en células de insectos, casi desprovistas de esteroides, que la fosfatidiletanolamina era un regulador clave de la fluidez de la membrana frente a los cambios de temperatura (Dawaliby *et al.* 2016). Este rol podría tomar relevancia en los individuos en desarrollo más aún si consideramos que hasta el momento no se ha comprobado la síntesis *de novo* de colesterol ni en arácnidos ni en crustáceos (Zandee 1967;

Teshima & Kanazawa 1971, 1983; Kean et al. 1985). Sin embargo, se requerirán de futuros estudios para determinar el rol de la fosfatidiletanolamina durante la vitelogenénesis y el desarrollo de *P. pythagoricus*.

Acompañando la caracterización de lípidos realizada en los Ov, en la HL se observó un aumento en el contenido de fosfatidiletanolamina desde un 4,5% en las PreV a un 39% en el V, con una disminución concomitante de fosfatidilcolina. De esta manera, probablemente esta gran cantidad de fosfatidiletanolamina tenga como destino final su acumulación en el Ov, debido a que en las hembras PostV este contenido de fosfatidiletanolamina disminuye a un 19%, volviendo a ser la fosfatidilcolina el lípido estructural principal en la HL (41%) (Figura IV.7). Esto podría sustentarse si consideramos que en el músculo no se observaron diferencias significativas en el contenido de fosfatidiletanolamina durante el proceso (Figura IV.9). De esta manera, la fosfatidiletanolamina se generaría en los DI, el órgano biosintético principal de las arañas, luego este fosfolípido se transportaría vía HL al Ov para ser finalmente endocitado y acumulado en los oocitos. Por otra parte, la disminución en el porcentaje de fosfatidilcolina en la HL durante la vitelogenénesis probablemente ocurra para mantener el equilibrio en el contenido de lípidos polares en las lipoproteínas circulantes de *P. pythagoricus*. Esto podría deberse a la capacidad de carga de las lipoproteínas, ya que se ha observado que la cantidad de lípidos que pueden transportar las lipoproteínas en arañas se encontraría restringido debido a que las lipoproteínas mantendrían las mismas apolipoproteínas, lo que indicaría una ausencia de lipoproteínas intercambiables (Cunningham et al. 1994; Cunningham et al. 2007). Cunningham y colaboradores (1999) observaron la capacidad *in vitro* de la Hc de *P. pythagoricus* de unirse a lípidos, sugiriendo una posible adaptación de esta proteína capaz de transportar una cantidad variable de lípidos bajo diferentes condiciones fisiológicas. Esa proteína presentaba una gran capacidad de unión para la fosfatidilcolina de manera que el aumento en la concentración de este fosfolípido podía reemplazar a los esteroides unidos a la proteína. Si bien en este trabajo no se analizó la capacidad de unión de la fosfatidiletanolamina a la Hc, las variaciones observadas en el contenido de fosfatidiletanolamina durante la vitelogenénesis puedan estar asociadas también con la unión preferencial de este fosfolípido para su transporte en respuesta a las variaciones fisiológicas durante el proceso. Asimismo, el gran contenido de fosfatidiletanolamina observado en los huevos, y en las LVs de *P. pythagoricus* como componente de estas partículas lipoproteicas (Laino et al. 2011b), confirmaría que la fosfatidiletanolamina se incorporaría a los Ov para formar parte del vitelo.

En contraste a lo observado en los DI y en los Ovs, los respectivos sitios de síntesis y almacenamiento de los lípidos durante este proceso, el contenido de lípidos en el músculo fue menor, resultado que se correlaciona con lo descrito pre-

viamente en escorpiones (Laino *et al.* 2015). Si la HL es la vía principal de transporte de lípidos, la disminución en el contenido de fosfatidilcolina del músculo podría asociarse a la disminución de la cantidad de este mismo lípido en HL. De este modo el músculo no sería un tejido que participe activamente durante el proceso de vitelogenénesis. Si bien los porcentajes son minoritarios, el pequeño aumento de triacilgliceroles observado en los músculos durante el proceso podría producirse en virtud de generar reserva para el tejido, ya que en las hembras PostV se observó una disminución en el contenido de los triacilgliceroles junto con un aumento significativo de ácidos grasos libres en este tejido (Figura IV.9). Esto sugeriría que luego de la oviposición aumentaría la demanda energética para satisfacer las necesidades fisiológicas que implica el tiempo de cuidado de la ooteca hasta la emergencia de los juveniles.

Por otra parte, la concentración de lípidos en los DI, testículos y músculo de los machos es comparable al de las hembras PreV y PostV, sin embargo, la concentración de lípidos en la HL es mayor al de las hembras. Esto se asociaría a las tasas metabólicas sustancialmente más altas que los machos presentan en comparación a las hembras (Shillington 2005). Las desigualdades observadas, especialmente en las gónadas, podrían deberse a las diferentes necesidades metabólicas que requieren ambos sexos y a la carga energética diferencial asociada a los diferentes roles reproductivos (Herrmann & Roberts 2017).

A lo largo del tiempo, se ha demostrado que las diferentes dietas pueden afectar la composición de los ácidos grasos del músculo y del hepatopáncreas en algunas especies de artrópodos (Kucharski & Da Silva 1991; Vinagre & Da Silva 1992; Carvalho *et al.* 2012). Sin embargo, a partir de los datos obtenidos, el contenido de ácidos grasos en el músculo y los DI de las hembras PreV de *P. pythagoricus* coincide con la escasa información disponible para escorpiones y arañas, lo que sugeriría que cualquier variación que pueda generarse por las diversas dietas en estos arácnidos es mínima. Los principales ácidos grasos fueron C18:1, C18:2 y, en menor medida, C18:0 y C16:0, patrón que también se observó en los análisis de cuerpos enteros y en los DI de otras tres especies de arañas araneomorfas (Uscian & Stanley-Samuelson 1994; Laino *et al.* 2009) como también en el hepatopáncreas de escorpiones (El-Salhy *et al.* 1981; Uscian & Stanley-Samuelson 1994; Laino *et al.* 2015b). Debemos enfatizar que los DI presentaron un enriquecimiento de C18:2 y un empobrecimiento de C16:0, patrón que se refleja luego en los valores observados en la HL durante la vitelogenénesis. Este patrón coincide con el descrito por El-Salhy y colaboradores (1981), donde los autores sugirieron que el hepatopáncreas de escorpiones contenía varios ácidos grasos con cierto grado de intercambio con la HL.

Por otra parte, encontramos que el Ov se enriqueció en C18:2 y se empobre-

ció en C18:0 durante la vitelogénesis. Este mismo patrón se observó también en la HL, lo que sugiere que este ácido graso sería transportado vía HL específicamente hacia el Ov. La disminución significativa en C18:2 en los DI y en el músculo refuerzan esta hipótesis. La dinámica de los lípidos en *P. pythagoricus* implicaría la incorporación clara de ácidos grasos poliinsaturados al Ov. Los porcentajes similares de ácidos grasos insaturados presentes en las LVs de *P. pythagoricus* y en los huevos de *S. malitiosa* respaldarían aún más esta hipótesis (Laino et al. 2011b; Laino et al. 2013).

## IV.4 Caracterización proteica

En esta sección se presenta el análisis y los resultados obtenidos de los componentes proteicos de los diferentes órganos y tejidos analizados (DI, HL y gónadas), tanto de las hembras en los diferentes estadios de la vitelogénesis (PreV, Vt, V y PostV) como de los machos. Los análisis con SDS-PAGE y Western Blot fueron realizados a partir de agrupaciones de las muestras (3 grupos por estadio, n=6).

### IV.4.A Resultados

#### I.4.A.a Contenido total y concentración de proteínas solubles

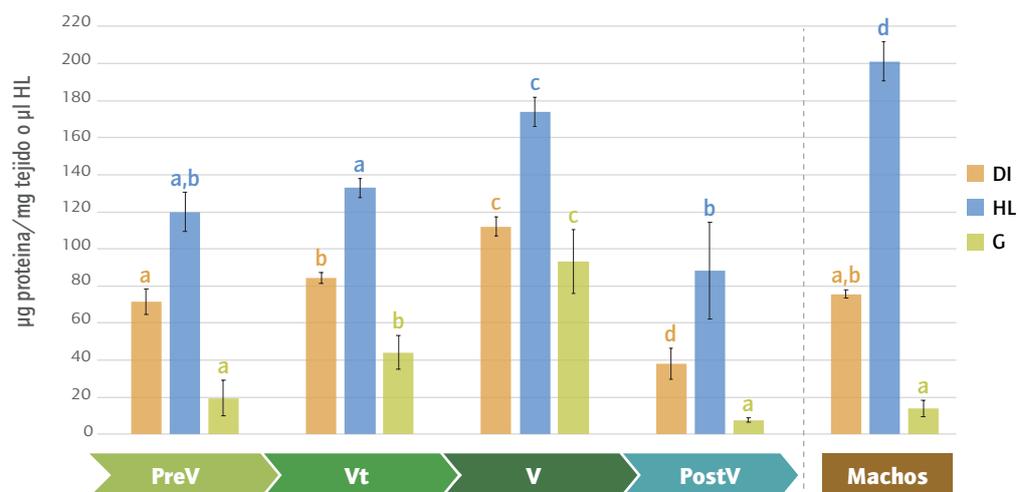
Con el objetivo de analizar las variaciones en el contenido de proteínas, en las Figura IV.15 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas solubles utilizando el método colorimétrico de Lowry et al. (1951) de los DI, gónadas y HL de las hembras y los machos. Los valores se encuentran expresados como  $\mu\text{g}$  de proteínas/mg de peso húmedo (DI o gónada) y/o  $\mu\text{g}$  de proteínas/ $\mu\text{l}$  de HL.

La concentración de proteína en los DI aumentó significativamente desde la etapa PreV con  $68,96 \pm 3,86 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de DI, hasta la etapa de V con un valor promedio de  $111 \pm 3,11 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de DI. Luego de la puesta, el contenido de proteínas disminuye de manera significativa alcanzando concentraciones promedio de  $37,88 \pm 8,44 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de DI en las PostV. Los machos presentan valores de concentración de proteínas comparables al de las hembras PreV y Vt ( $75,55 \pm 2,22 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de DI).

Asimismo, el contenido de proteína en la HL aumenta significativamente desde las hembras PreV con  $119,92 \pm 10,67 \mu\text{g}$  de proteínas/ $\mu\text{l}$  de HL, hasta las V alcanzando valores promedio de  $173,99 \pm 1,48 \mu\text{g}$  de proteínas/ $\mu\text{l}$  de HL. Luego de la puesta, estos valores disminuyen alcanzando en las hembras PostV concentraciones de proteínas comparables al de las hembras PreV ( $88,25 \pm 26,05 \mu\text{g}$  de proteínas/ $\mu\text{l}$  de HL). La concentración de proteínas en los machos presenta valores

promedio de  $203,84 \pm 21,24 \mu\text{g}$  de proteínas/ $\mu\text{l}$  de HL.

En las gónadas, el contenido de proteínas del Ov de las hembras varía significativamente durante la vitelogénesis. En un inicio, las hembras PreV presentan valores promedios de  $19,5 \pm 9,5 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de Ov, los cuales aumentan durante el proceso (Figura IV.15). El primer aumento significativo se observa entre las hembras PreV a las Vt, donde la concentración de proteínas aumenta 2,25 veces alcanzando valores promedios de  $43,98 \pm 9,16 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de Ov en las hembras Vt. El segundo aumento significativo se observa entre las Vt y las V, donde la concentración de proteínas del Ov aumenta 2,11 veces observándose un valor promedio de  $93,1 \pm 17,3 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de Ov en las hembras V. Durante la fase de degeneración ovárica, la concentración de proteínas por mg de Ov disminuye significativamente, descendiendo a valores de  $7,6 \pm 1,27 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de Ov en las hembras PostV. En contraste, los machos presentaron valores de concentración comparables con las hembras PreV, con promedios de  $13,8 \pm 4,6 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de testículo.



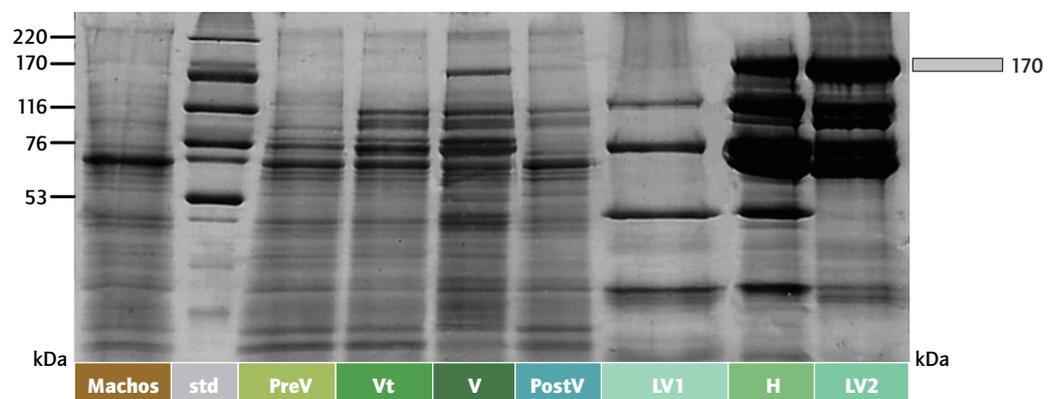
**Figura IV.15** Concentración de las proteínas solubles presentes en los divertículos intestinales (DI), la hemolinfa (HL) y las gónadas (G) de machos y hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los valores se presentan como las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ . PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas.

#### IV.4.A.b Caracterización proteica

En esta sección se presentan los resultados obtenidos por el análisis SDS-PAGE de las proteínas solubles presentes en los DI, HL y gónadas de las hembras en diferentes estadios de vitelogénesis y de los machos. Para acompañar el análisis y la caracterización de los diferentes órganos y/o tejidos, en las presentes corridas electroforéticas se sembraron también muestras de LVI y LV2 de *P. pythagoricus* previamente aisladas junto con muestras de proteínas solubles obtenidas del ho-

mogenato de huevos (Estadio I, menos de 12 h luego de la puesta). Del análisis de SDS-PAGE de las diferentes muestras (Figura IV.16, IV.17 y IV.18), se puede observar que la LVI presenta las subunidades de 120, 75, 46 y 30 kDa y que en la LV2 se destacan principalmente las subunidades de 170, 120, 109, 75, 67 y 30 kDa, mientras que la muestra de huevos presenta las subunidades de ambas LVs (170, 120, 109, 75, 67, 46 y 30 kDa).

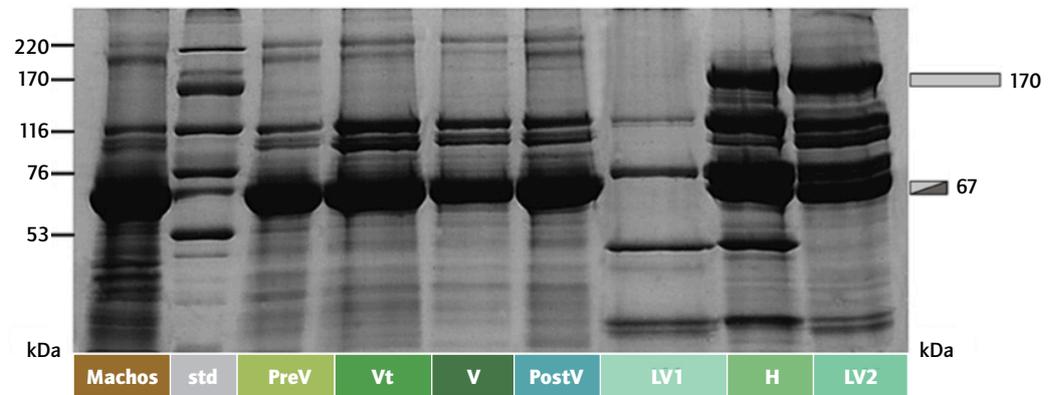
En la Figura IV.16 se presenta el desarrollo electroforético de las proteínas de los DI de las hembras en los distintos estadios de la vitelogénesis (PreV, Vt, V y PostV) y de los machos. En cada calle del gel se sembraron 20  $\mu\text{g}$  de cada una de las muestras y 5  $\mu\text{l}$  del estándar de proteínas de peso molecular conocido. En esta figura se observa que el patrón de proteínas es comparable entre los diferentes estadios de las hembras, sobre todo en los polipéptidos de pesos moleculares inferiores a 70 kDa. La principal diferencia entre los estadios es la presencia de un polipéptido de 170 kDa en las hembras V, y dos subunidades de 120 kDa y de 109 kDa respectivamente, que se visibilizan en las Vt y se mantienen en las V. Por otra parte, se observa un polipéptido de 75 kDa que se encuentra presente desde las PreV hasta las V, el cual no se observa luego de la puesta (PostV). Además, este polipéptido se encuentra también presente en la LVI. Por otra parte, el polipéptido de 67 kDa se encuentra siempre presente, tanto en machos como en hembras.



**Figura IV.16** SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4-23%): análisis de las proteínas de los divertículos intestinales de machos y de hembras en diferentes estadios del proceso de vitelogénesis. El rectángulo a la derecha indica el polipéptido destacable de los divertículos intestinales vinculado al proceso de vitelogénesis de *P. pythagoricus*. PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas; LV1 y LV2: lipovitelinas aisladas del citosol de huevo; H: homogenato de huevos; kDa: kilodalton; std: estándar de peso molecular.

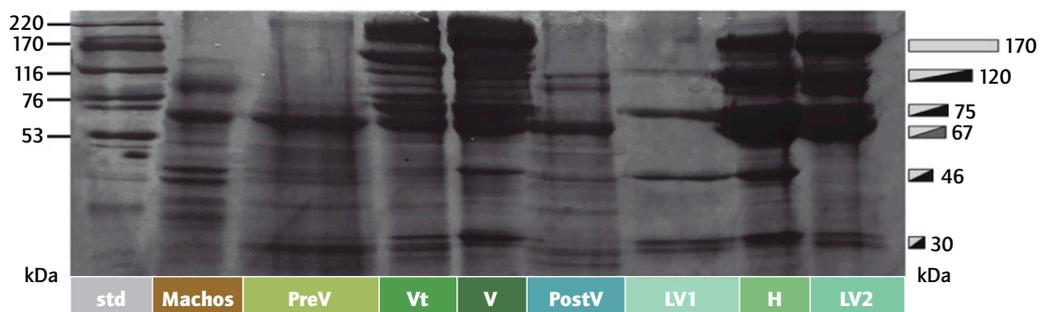
En la Figura IV.17 se presentan los resultados del desarrollo electroforético de las proteínas de la HL de las hembras en los distintos estadios de la vitelogénesis y de los machos. En líneas generales, los perfiles exhiben los mismos patrones caracterizados por las subunidades de 120 kDa, 109 kDa y 67 kDa. Además, se observa la presencia minoritaria de otras subunidades de mayor peso molecular como es el

caso de la subunidad de 170 kDa (también se visualiza en la Figura IV.19A).



**Figura IV.17** SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4-23%): análisis de las proteínas de la hemolinfa de machos y de hembras en diferentes estadios del proceso de vitelogénesis. Los rectángulos a la derecha indican los polipéptidos destacables de la hemolinfa vinculados al proceso de vitelogénesis de *P. pythagoricus*. Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.16.

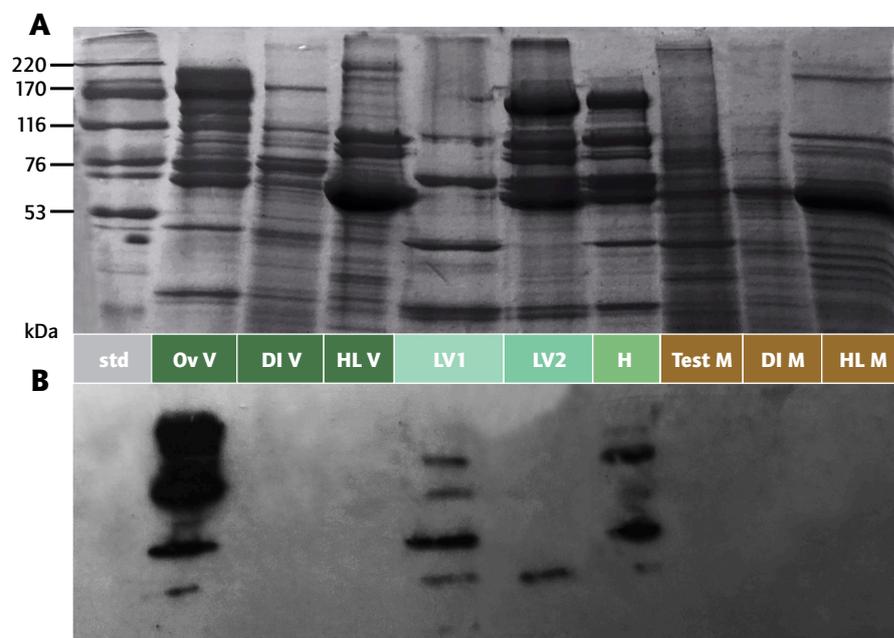
En la Figura IV.18 se presenta el desarrollo electroforético de las proteínas de las góadas de las hembras en los distintos estadios de la vitelogénesis (PreV, Vt, V y PostV) y de los machos. Tanto en los testículos de los machos como los Ovs de las hembras se observó la presencia del polipéptido de 67 kDa. Durante la vitelogénesis, los polipéptidos 46 y 30 kDa de los Ovs comienzan a visibilizarse en las hembras Vt y se mantienen en los Ovs de las hembras V. Luego de la puesta, estos polipéptidos se encuentran ausentes en los Ovs de hembras PostV. Asimismo, los polipéptidos de 250, 170 y 75 kDa también están presentes en los Ovs de las Vt y V, y no se observan en los Ovs de las hembras PostV. Por el contrario, las dos subunidades de 120 y 109 kDa estuvieron presentes tanto en las hembras Vt y V como en las PostV. En contraste, en los testículos de los machos se distinguen los polipéptidos de 93, 48 y 44 kDa, como también el polipéptido de 67 kDa.



**Figura IV.18** SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4-23%): análisis de las proteínas de las góadas de machos y de hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los rectángulos a la derecha indican los polipéptidos destacables de los ovarios vinculados al proceso de vitelogénesis de *P. pythagoricus*. Aplica las mismas abreviaturas que para la Figura IV.16.

En las Figura IV.19 y en la Figura IV.20 se presentan los resultados obtenidos del SDS-PAGE (A) y del Western Blot (B). En los geles generados para este análisis se sembraron 15  $\mu\text{g}$  de cada muestra exceptuando en los casos donde se especifique.

En la Figura IV.19A se observa el análisis por SDS-PAGE de la HL, gónadas y DI de hembras V y de machos junto con el análisis de las muestras de LV1, LV2 y del homogenato de huevos. A su vez, en la Figura IV.19B se presenta el análisis por Western Blot de las mismas muestras que la Figura IV.19A utilizando anticuerpos policlonales anti-LV.



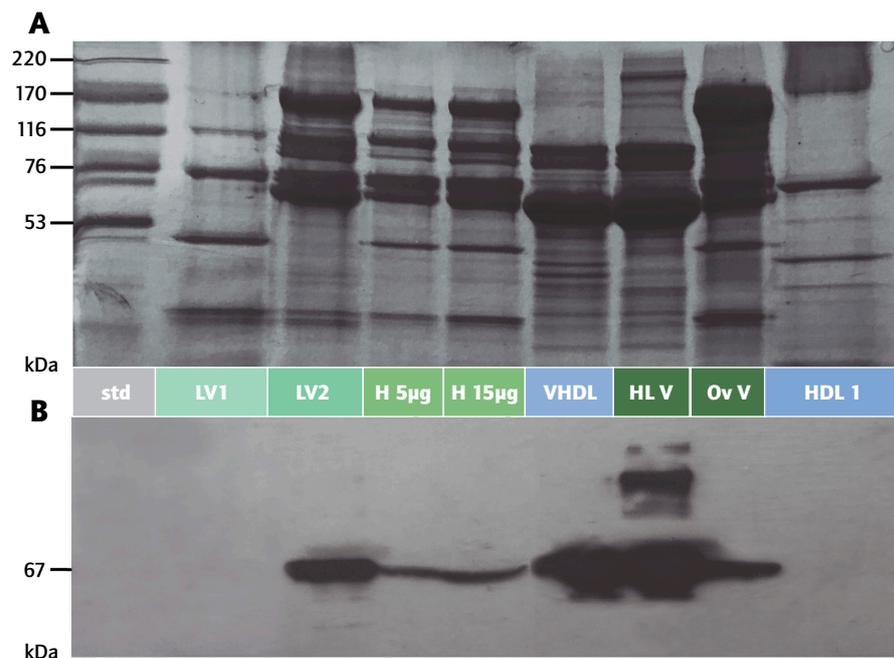
**Figura IV.19** (A) SDS-PAGE (4–23%); (B) Inmunotransferencia utilizando anticuerpo policlonal anti-LV. Ov V: muestra de ovarios de las hembras vitelogénicas tardías; DI V: muestra de los divertículos intestinales de las hembras vitelogénicas tardías; HL V: muestra de hemolinfa de las hembras vitelogénicas tardías; LV1 y LV2: lipovitelinas aisladas de citosol de huevo; H: homogenato de huevos; Test M: muestra de testículos de machos; DI M: muestra de los divertículos intestinales de machos; HL M: muestra de hemolinfa de machos; kDa: kilodalton; std: estándar de peso molecular.

A partir del análisis del Western Blot, se revela la presencia de los polipéptidos inmunorreactivos de 120, 75, 46 y 30 kDa de la LV1, y la presencia de los mismos en los Ovs de las hembras V y en el homogenato de huevos (Figura IV.19B). Sin embargo, solo se observa la presencia de la subunidad 30 kDa de la LV2. Por el contrario, los tejidos de los machos como también los DI y la HL de hembras V no presentaron inmunoreactividad.

En la Figura IV.20A se presenta el análisis por SDS-PAGE de las muestras de lipoproteínas hemolinfáticas (VHDL y HDLI) y las LVs (LV1 y LV2) de *P. pythagoricus*, junto con las muestras de Ov y HL de hembras V y muestras de homogenato de

huevos. De las muestras de homogenato de huevos se sembraron dos calles, una con 5  $\mu\text{g}$  de la muestra y la otra con 15  $\mu\text{g}$ . En la Figura IV.20B se presenta el análisis por Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-Hc de las mismas muestras que en la Figura IV.20A. La migración de las dos lipoproteínas hemolinfáticas bajo las mismas condiciones electroforéticas se ha determinado previamente (Cunningham et al. 1994; Cunningham & Pollero 1996) y se incluyeron en este ensayo como controles.

En la Figura IV.20B se puede observar la ausencia de inmunoreactividad de la LVI y de la HDLI, lipoproteína utilizada como control, ya que la subunidad de 67 kDa estaba ausente en la LVI, y, como fue previamente descrito, la HDLI no contiene Hc en su estructura. Por el contrario, se puede observar la inmunoreactividad de la subunidad de 67 kDa en la LV2, el homogenato de huevos y la VHDL, la cual comparte identidad inmunológica con la Hc.

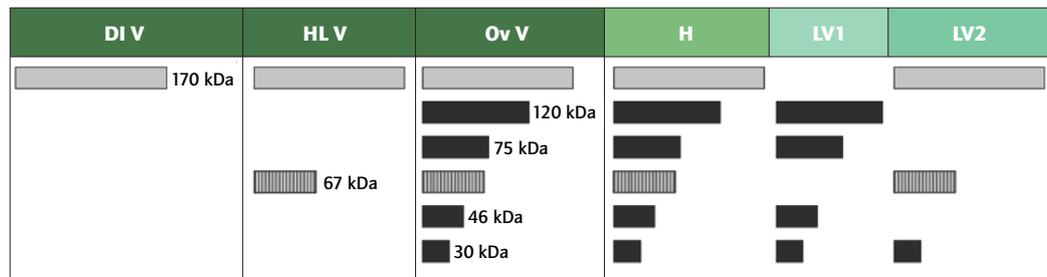


**Figura IV.20** (A) SDS-PAGE (4-23%); (B) Inmunotransferencia utilizando anticuerpo policlonal anti-Hc. LV1 y LV2: lipovitelinas aisladas de citosol de huevo; H: homogenato de huevos (5 y 15  $\mu\text{g}$ ); Ov V: muestra de ovarios de las hembras vitelogénicas tardías; HL V: muestra de hemolinfa de las hembras vitelogénicas tardías; VHDL: Lipoproteína hemolinfática de muy alta densidad de *P. pythagoricus*; HDL1: Lipoproteína hemolinfática de alta densidad de *P. pythagoricus*; kDa: kilodalton; std: estándar de peso molecular.

En el esquema de la Figura IV.21 se representan las principales subunidades proteicas vinculadas al proceso de vitelogénesis que también están presentes en los homogenato de huevos y en las LVs. De esta manera, en este esquema se visualizan las subunidades presentes en los DI, HL y Ovs de las hembras V como también en los homogenato de huevos, la LV1 y la LV2. Con el rectángulo gris se indican aquellos polipéptidos que presentan igual peso molecular (kDa) pero no

presentan inmunoreactividad con ninguno de los anticuerpos utilizados (anti-LV y anti-Hc). En cambio, aquellos polipéptidos que se identifican con el anticuerpo anti-LV se visualizan con rectángulos negros, mientras que los que se identifican con el anticuerpo anti-Hc se visualizan con rectángulos a rayas.

Se puede observar que la subunidad de 170 kDa se encuentra presente en los DI, HL y Ovs de las hembras V, como también en el homogenato de huevos y en la LV2, sin presentar inmunoreactividad con ninguno de los anticuerpos. Por otro lado, las subunidades de 120, 75, 46 y 30 kDa se encuentran en los Ovs de las hembras V, en el homogenato de huevos y LV1, y exhiben inmunoreactividad con el anticuerpo policlonal anti-LV. En cambio, la subunidad de 67 kDa que presenta inmunoreactividad con el anticuerpo policlonal anti-Hc, esta presente en la HL y Ov de las hembras V, como también en el homogenato de huevos y en LV2.



**Figura IV.21** Representación esquemática de las subunidades de proteínas vinculadas al proceso de la vitelogenénesis de *P. pythagoricus*, presente en los diferentes órganos y/o tejidos de las hembras V, en el homogenato de huevos, la LV1 y la LV2. Todas las subunidades de proteínas representadas por rectángulos se detectaron en los geles mediante tinción con el colorante Coomassie Brilliant Blue. : Polipéptidos sin inmunoreactividad; : Polipéptidos inmunoreactivos con el anticuerpo policlonal anti-Hc; : Polipéptidos inmunoreactivos con el anticuerpo policlonal anti-LV. DI V: DI de las hembras vitelogénicas tardías; HL V: HL de las hembras vitelogénicas tardías; Ov V: Ov de las hembras vitelogénicas tardías; H: homogenato de huevos; LV1 y LV2: LV aisladas de citosol de huevo.

#### IV.4.A.c Secuencias extremo N-terminal

El procedimiento automatizado de reacciones de degradación de Edman permitió identificar las secuencias N-terminales que se presentan en la Tabla IV.5. En esta tabla se exhiben la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de los polipéptidos correspondientes a las subunidades de 75, 67, 46 y 30 kDa obtenidas a partir de las proteínas de los homogenato de huevos de *P. pythagoricus*.

Al realizar una búsqueda en la base de datos, se determinó que la secuencia N-terminal analizada de la subunidad de 67 kDa presentaba una similitud con la subunidad de Hc 6 de la araña *C. salei* (número de acceso CAC44757.1), presentando un 77% de homología. Los polipéptidos de 75, 47 y 30 kDa, que están presentes en los Ovs de las hembras V y en el homogenato de huevos y que además son reconocidos por el anticuerpo policlonal anti-LV, no presentan secuencias identificables con ningún péptido informado hasta el momento.

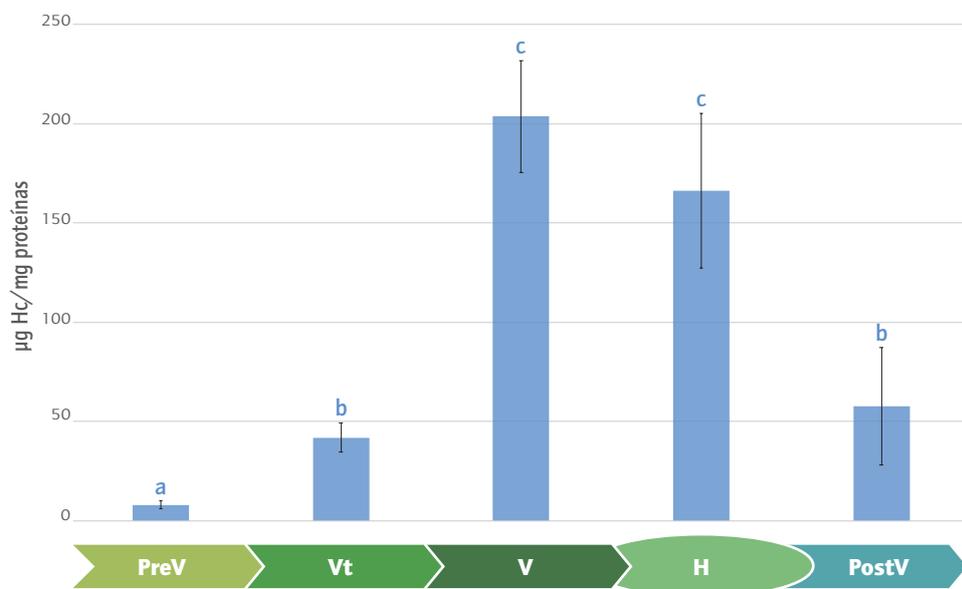
**Tabla IV.5**

Secuencias de aminoácidos N-terminales de las subunidades de 75, 67, 46 y 30 kDa presentes en el homogenato de huevo de *P. pythagoricus*. Las asignaciones entre paréntesis son tentativas y la "X" indica que no se encontró ningún aminoácido asignable para esa posición.

Peso Molecular	Secuencia N-Terminal		
	1	5	10
75 kDa	A	E K M A D W(S)	K Y L K E
67 kDa	V	V K E K E D R I	L E X F E
46 kDa	S	I M Y N E K D D I	X V E N R
30 kDa	(G)	P F Q R Q S Q X A T	(R)

**IV.4.A.d Cuantificación de hemocianina**

A partir de la identificación del polipéptido de Hc de 67 kDa en los Ovs de las hembras V y en el homogenato de huevos de *P. pythagoricus* con el anticuerpo policlonal anti-Hc (Figura IV.21), como también la confirmación de su identidad a partir de la secuencia del extremo N-terminal, se realizó la cuantificación del contenido Hc mediante el método de ELISA en los Ovs de las hembras durante la vitelogénesis como también en los homogenato de huevos .



**Figura IV.22** Concentración de hemocianina (Hc) en los Ov de las hembras en diferentes estadios de la vitelogénesis. Los valores se presentan como las medias ± DE. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), n=6. PreV: hembras previtelogénicas; Vt: hembras vitelogénicas tempranas; V: hembras vitelogénicas tardías; PostV: hembras postvitelogénicas; H: homogenato de huevos.

En la Figura IV.22 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación, donde los valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína. Durante el proceso de vitelogénesis, se puede observar un aumento en la concentración de Hc en las proteínas de los Ovs de las hembras, con un aumento inicial de 5,3 veces desde  $7,95 \pm 2,11 \mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína en el estadio PreV a una concentración de  $41,87 \pm 7,8 \mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína en las hembras Vt. Luego, se produce otro aumento significativo en las hembras V alcanzando valores promedios de  $203,52 \pm 28,33 \mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína (4,9 veces más que las Vt). Después de la puesta, la concentración de Hc disminuyó en los Ovs de las hembras PostV llegando a valores de  $57,61 \pm 29,69 \mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína. Por otra parte, la concentración de Hc observada en los homogenato de huevos fue comparable al de las hembras V, con una concentración de Hc de  $166,21 \pm 39,11 \mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína.

#### IV.4.B Discusión

Durante el proceso de la vitelogénesis, se produce un aumento progresivo en la concentración de proteínas de los DI, lo que refleja una síntesis continua de proteínas en ese órgano. Este aumento en la concentración de las proteínas en los DI se acompaña del aumento en la concentración de las proteínas en la HL durante la vitelogénesis, tejido que tiene como función el transporte de oxígeno y nutrientes.

Durante el análisis de los componentes lipídicos en hembras de *P. pythagoricus*, se observó un aumento en la concentración de lípidos durante la vitelogénesis, con un predominio de fosfolípidos tanto en HL como en los Ovs. Los fosfolípidos son uno de los principales componentes de las lipoproteínas hemolinfáticas en crustáceos (Yepiz-Plascencia et al. 2000), insectos (Beenackers et al. 1985) y arácnidos (Cunningham et al. 2007). Se ha demostrado que tanto el cuerpo graso de los insectos como el hepatopáncreas de los crustáceos son sitios de síntesis de lipoproteínas, las cuales pueden ser específicas o no del sexo (Beenackers et al. 1985; Yepiz-Plascencia et al. 2000). Previamente, se ha reportado para *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Acrididae) la síntesis de las apolipoproteínas (apoLp-II / I) en el cuerpo graso las cuales son componentes de una HDL (Weers et al. 1992). Posteriormente, estas apolipoproteínas se homologaron con la principal proteína precursora del vitelo en los decápodos (Avarre et al. 2007). Sin embargo, se ha descrito la presencia de proteínas hemolinfáticas en los Ovs de *Blattella germanica* (Blattodea, Insecta) con un alto contenido de lípidos pero que no estaban aso-

ciadas a Vgs. A parte de las Vgs, otras proteínas cumplirían funciones fisiológicas importantes durante la vitelogenésis y el desarrollo de los huevos (Beenackers et al. 1985). De esta manera, los respectivos aumentos en el contenido de proteínas y lípidos en los DI durante la vitelogenésis, junto con el claro predominio de los fosfolípidos en la HL y en los Ovs, sugerirían que durante la vitelogenésis de *P. pythagoricus* se produciría un aumento de las lipoproteínas en la HL.

Acompañando la disminución significativa del contenido de lípidos totales de los DI (Figura IV.5), especialmente en el contenido de triacilgliceroles (Figura IV.6), las hembras PostV también manifestaron una reducción pronunciada en la concentración de proteínas en los DI, suceso consistente con la falta de ingesta de alimentos durante este período. De esta manera, parte de los recursos generados durante la vitelogenésis podrían destinarse también para el mantenimiento de las madres, compensando metabólicamente el esfuerzo generado durante el proceso de oviposición y el posterior período de cuidado de la ooteca previamente mencionado. Asimismo, al igual que en la concentración de lípidos, el contenido de proteínas de los DI de los machos presentó valores comparables con en las hembras PreV y PostV.

En los animales ovíparos, durante el proceso de vitelogenésis, se produce un aumento considerable en el tamaño de los oocitos y el peso del Ov como resultado de la acumulación de nutrientes. Durante la vitelogenésis, la concentración de proteínas en el Ov aumentó significativamente como se ha observado previamente para otras especies donde se describió la acumulación continua de proteínas y lípidos en los oocitos durante este proceso (Trabalon et al. 1998; Vazquez Boucard et al. 2002; Pourié & Trabalon 2003). Si bien el aumento fue continuo, las hembras V presentaron valores significativamente mayores en este período donde el peso del Ov y el tamaño de los oocitos aumentaba. Este patrón de aumento del contenido proteico durante la oogenésis se ha observado también en los camarones *Litopenaeus merguensis* y *Penaeus schmitti*, donde la cantidad de proteína en el Ov alcanzaba el valor máximo en el momento donde el peso del Ov y el tamaño de los oocitos aumentaban (Marangos et al. 1988; Auttarat et al. 2006). En la araña *E. atrica* el contenido de proteínas del Ov en las hembras V es mayor en comparación con las hembras que presentaban oocitos previtelogénicos (Pourié & Trabalon 2003). Además, parte del aumento de las proteínas del Ov podría darse a partir de una síntesis endógena. Se ha reportado en la araña *Trichonephila clavata* (= *Nephila clavata*) (Araneae: Araneidae) un aumento en la cantidad de ribosomas de los oocitos (Choi & Moon 2003) que podría facilitar la síntesis de proteínas durante la vitelogenésis. De esta manera, estos cambios estructurales probablemente indiquen el comienzo de la síntesis endógena del vitelo como se ha observado previamente en el ácaro *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida: Ixodidae) (de Oliveira et al. 2005).

La disminución en el contenido de proteínas del Ov en las hembras PostV luego de la puesta, sugiere que todo el contenido acumulado en los oocitos durante el proceso fue transferido a los huevos. A su vez, el perfil electroforético general de los polipéptidos presente en los Ovs de las hembras V fue muy similar al de los huevos y al de las LVs. La pérdida de gran parte de estos polipéptidos en los Ovs de las hembras PostV respaldaría aún más la hipótesis de que el destino final de estas proteínas son los huevos de *P. pythagoricus*. En el hemíptero *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) casi el 80% del contenido total de las proteínas de los oocitos correspondían a las Vns (Oliveira *et al.* 1986), mientras que en otros insectos se encontró que las Vns constituía entre un 60-90% de las proteínas totales del vitelo (Kunkel & Nordin 1985; Yamashita & Indrasith 1988). En los arácnidos, se ha observado en algunas garrapatas que las Vns representan aproximadamente el 80% de las proteínas totales del huevo, mientras que en la araña *S. malitiosa*, las LVs representan más del 60% de las proteínas del huevo (Laino *et al.* 2013).

Utilizando los factores de conversión de 4,3 kcal/ g de proteínas y 7,9 kcal/ g de lípidos descritos por Beninger (1984), cuyos coeficientes fueron aplicados en estudios previos de artrópodos y otros invertebrados (Heras *et al.* 1998; García-Guerrero *et al.* 2003; Laino *et al.* 2013; Trabalon *et al.* 2018), el contenido total de proteínas presente en los Ovs de las hembras V proporcionaría 274 calorías/g de huevos (62% de la energía total disponible en el Ov de las hembras V), mientras que los lípidos proporcionarían 166 calorías/g de huevos. Estos valores se asemejan a los valores observados en *S. malitiosa* y *P. saltans*, donde las proteínas representaron respectivamente un 60% y 71% de equivalente energético (Laino *et al.* 2013; Trabalon *et al.* 2018). Aunque hasta el momento es escasa la información sobre la contribución energética de las proteínas durante la vitelogénesis de las arañas, el alto porcentaje de proteínas presentes indicaría que estos componentes serían un recurso valioso durante este proceso.

El sistema circulatorio transporta gases y distribuye nutrientes, aportando diferentes sustratos y macromoléculas a los diversos órganos y tejidos y eliminando a su vez los desechos (McMahon *et al.* 1997; Glenn *et al.* 2010). En algunos artrópodos y moluscos, el sistema circulatorio presenta como pigmento respiratorio soluble la Hc la cual presenta una fuerte afinidad por el oxígeno. Este pigmento respiratorio se ha establecido como una macromolécula versátil, que no solo transporta gases sino también contribuye a la homeostasis, hemostasia y a la defensa inmune de los organismos (Zhuang *et al.* 2015). Las estrategias de generar estas grandes estructuras macromoleculares, con subunidades que se agregan y / o polimerizan para producir moléculas de mayor tamaño con muchos sitios de unión, no solo disminuyen la presión osmótica, sino que también proporcionan una solución al problema de cargar oxígeno con alta afinidad en la interfaz respiratoria

y descargar el oxígeno donde se necesita (Linzen *et al.* 1985; van Holde *et al.* 2001). En *P. pythagoricus* se pudo observar un aumento en la concentración de las proteínas hemolinfáticas durante la vitelogénesis, hecho que acompañó el progresivo aumento y acumulación de proteínas en los Ovs como también se observó en la araña *E. atrica* (Pourié & Tralalon 2003). Asimismo, representada por la subunidad de 67 kDa (monómero de Hc)(Cunningham & Pollero 2003), se pudo determinar la presencia de Hc en el Ov de las hembras V (Figura IV.7) y su acumulación durante la vitelogénesis (Figura IV.9). En las arañas, la Hc puede representar hasta cerca de un 80% de las proteínas de la HL, de manera que un aumento en el contenido de proteínas de la HL necesariamente implicaría un aumento en el contenido de Hc en ese tejido, el cual permitiría la acumulación posterior de esa proteína hemolinfática en los oocitos.

Si bien, se ha descrito la presencia de Hc en el Ov, en embriones y en el líquido perivitelino de varios crustáceos (Busselen 1971; Wache *et al.* 1988; Terwilliger & Dumler 2001), hasta la actualidad el único reporte disponible para el subfilum Chelicerata era la presencia de cuatro hexámeros en el Ov de *A. hentzi* (Kempter 1986). Sin embargo, los resultados de ese estudio no proporcionaban ninguna información adicional sobre la acumulación de Hc en los oocitos, y mucho menos su relación con el desarrollo embrionario. A partir de los resultados obtenidos en el marco de esta tesis, tanto la presencia como la acumulación de Hc en los oocitos reforzaría las hipótesis previas donde se describe el posible secuestro e incorporación de Hc en el Ov y su posterior acumulación en los gránulos de vitelo (Yamashita & Indrasith 1988). Este proceso se ha descrito también para algunos decápodos, donde se determinó la incorporación de Hc materna desde la HL a los oocitos por endocitosis (Wache *et al.* 1988; Terwilliger & Dumler 2001). Según lo descrito por Kempter para el subfillum Chelicerata, la molécula de Hc de 4 hexámeros que se detectó en el Ov de *A. hentzi* era similar o idéntica a la Hc hemolinfática materna (Kempter 1986). La identificación a partir de la secuencia N-terminal de la Hc en el homogenato de huevos y en la LV2 de *P. pythagoricus*, indicaría que la Hc posiblemente sintetizada en los cianocitos es liberada a la HL, se transporta y se acumula en los Ovs para luego ser transferida a los huevos. La incorporación de este pigmento respiratorio proveería a los huevos de un pool inicial de Hc durante el inicio del desarrollo hasta que los individuos sean capaces de sintetizar su propia Hc. En algunos cefalópodos, se ha observado que la síntesis de Hc se da una semana previa al nacimiento (Wolf & Declair 1979). Por otra parte, se ha observado en algunos crustáceos que esta proteína es endocitada por los oocitos desde la HL, asegurando así la presencia de ese pigmento respiratorio esencial durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Durliat 1984; Busselen 1971; Fielder *et al.* 1971; Gilchrist & Lee 1972; Sugita & Sekiguchi 1979; Terwilliger & Dumler 2001).

En los artrópodos la Vg puede generarse a partir de diferentes orígenes: (1) una fuente extraovárica como el cuerpo graso en insectos, el hepatopáncreas en crustáceos o en el cuerpo graso o intestinos medios de los ácaros, y/o (2) a partir de una síntesis en el Ov (Hagedorn & Kunkel 1979; Rosell & Coons 1992; Serrano-Pinto *et al.* 2004; Boldbaatar *et al.* 2010; Wilder *et al.* 2010). En líneas generales, la síntesis de Vg en insectos se da en tejidos extraováricos, se libera a la HL y se transporta a los Ovs, donde allí se produce la captación de las Vgs e incorporación de las proteínas a los oocitos en desarrollo. Sin embargo, varios trabajos plantean la presencia de una síntesis endógena (ovárica) de LV en ciertos insectos y crustáceos (Bownes & Hames 1977; Zhai *et al.* 1984; Melo *et al.* 2000; Pateraki & Stratakis 2000; Avarre *et al.* 2003; Serrano-Pinto *et al.* 2004).

En arañas, el primer reporte de una proteína que podría estar relacionada con una Vg fue descrita en *E. atrica* donde se determinó que una proteína de 47 kDa se encontraba en la HL, los Ovs y en huevos de esta especie (Pourié & Trabalon 2003). En los últimos años se han desarrollado nuevos trabajos en torno a la temática, en donde se ha descrito la expresión de diferentes Vgs como ocurre en *P. pseudoannulata* y en *P. tepidariorum* (Guo *et al.* 2018; Bednarek *et al.* 2019). En la araña lobo *P. pseudoannulata* se identificaron tres Vgs (PpVg1, PpVg2 y PpVg3) los cuales se expresaron principalmente en hembras adultas (Guo *et al.* 2018), sin embargo, los autores no brindan información acerca del sitio de expresión de las mismas ni tampoco el número de subunidades de las Vgs. En cambio, Bednarek y colaboradores (2019) analizaron la presencia de Vg en varios tejidos de las hembras de *P. tepidariorum*, tanto a nivel transcripcional determinando dos genes que codificaban Vgs (PtVg4 y PtVg6), como también la identificación de las subunidades proteicas (Bednarek *et al.* 2019). A partir de los resultados obtenidos durante el análisis de la vitelogénesis en *P. pythagoricus*, se identificaron varias subunidades proteicas en los Ovs de las hembras, muchas de las cuales se encontraron también en los huevos y en las LVs. La detección de una proteína de 250 kDa en los Ovs de las hembras V, y la ausencia en esta subunidad en hembras PreV y PostV, podría indicar que esta proteína cumpliría un rol importante durante este proceso. La ausencia de polipéptidos de peso molecular mayor a 170 kDa en los huevos y que se encontraban presentes en los Ovs de las hembras V, podría deberse a la escisión proteolítica de estos polipéptidos, proceso que se observó en otros artrópodos (Chinzei *et al.* 1983; Don-Wheeler & Engelmann 1997; Tufail & Takeda 2008). Se ha observado en el ácaro *R. microplus* que las subunidades de mayor peso molecular de las Vns sufren proteólisis durante la embriogénesis, debido a la acción de una fosfatasa de 45 kDa (Silveira *et al.* 2006).

Asociado a estas observaciones, Bednarek y colaboradores describieron para *P. tepidariorum* la presencia de tres subunidades de Vg una de 250 kDa y otras de bajo

peso molecular (47 kDa y 30 kDa), las cuales se expresan en el intestino medio, en el Ov y en la HL de estas hembras (Bednarek et al. 2019). En *P. pythagoricus* se pudo identificar también la presencia de subunidades de bajo peso molecular (46 y 30 kDa) (Figura IV.5) en los Ovs de las hembras durante el proceso de vitelogénesis, especialmente en las hembras V. Estas subunidades se encontraron también en el homogenato de huevos, asociándose principalmente a polipéptidos de las LVs. En definitiva, de todos los polipéptidos presentes en el Ov que también se encontraron en los huevos de *P. pythagoricus*, se puede resaltar la presencia de los péptidos de 120, 75, 46 y 30 kDa, los cuales son componentes de la LVI. En cambio, la LV2, que comparte el polipéptido de 30 kDa con LVI, presentó las subunidades de 67 kDa y 170 kDa en común con proteínas de la HL y los DI respectivamente. Por otra parte, los resultados obtenidos de esta investigación indicarían que los polipéptidos de bajo peso molecular (46 y 30 kDa), junto con otros polipéptidos presentes en el tejido ovárico y en los huevos de *P. pythagoricus*, deben haber surgido a partir de una síntesis ovárica (autosíntesis) ya que esas subunidades no fueron detectadas ni en los DI ni en la HL.

Los hallazgos reportados en esta tesis han proporcionado las secuencias N-terminales de las subunidades de 75, 46 kDa y 30 kDa, pero desafortunadamente estas subunidades no se identificaron con ningún péptido reportado hasta el momento. Esto probablemente se deba a la escasa información sobre las secuencias de proteínas en arañas, problemática previamente expuesta por Pourié y Trabalon (2003). Actualmente solo existe una secuencia N-terminal de la LV de *S. malitiosa* (base de conocimiento de Uniprot, número de acceso C0HJAS) junto a la secuencia del péptido de 47 kDa presente en los Ovs vitelogénicos de *E. atrica* (Pourié & Trabalon 2003). La presencia del polipéptido de 46 kDa en los Ovs de las hembras V y en la LVI de *P. pythagoricus*, junto con la presencia de un polipéptido de 47 kDa tanto en *E. atrica* (Pourié & Trabalon 2003) como también en *P. tepidariorum* (Bednarek et al. 2019) y su vinculación con Vgs en estas especies, sugiere que esta subunidad sería fundamental y estaría directamente vinculada al proceso de vitelogénesis de arañas ya que se encontró presente en diferentes especies de distintas familias.

De esta manera, las proteínas vinculadas a la vitelogénesis en *P. pythagoricus* probablemente se produzcan a partir de origen predominantemente ovárico, involucrando los péptidos de 120, 75, 46 y 30 kDa; y otros de origen extraováricos, uno derivado de los DI y representado por un péptido de 170 kDa; y el otro de origen hemolinfático a partir de la subunidad de 67 kDa identificada como Hc.

## IV.5 Conclusiones generales

A partir de las hipótesis planteadas, los objetivos propuestos y los resultados obtenidos con la metodología aplicada en el presente capítulo, podemos resaltar las siguientes conclusiones:

- Contrario a lo esperado, el índice hepatosomático no disminuye con el aumento del índice gonadosomático, siendo este último un buen indicador del estado reproductivo de las hembras.
- Durante la vitelogénesis, se observa un aumento significativo en la concentración de lípidos y proteínas en los divertículos intestinales.
- El diámetro de los oocitos aumenta durante la vitelogénesis acumulando gránulos de vitelo y observándose un aumento significativo en la concentración de lípidos y proteínas.
- Los fosfolípidos son los principales lípidos que se transportan por vía hemolinfática y se acumulan en los ovarios, observándose un aumento específico y significativo del contenido de fosfatidiletanolamina durante la vitelogénesis.
- Los ovarios acumulan principalmente fosfolípidos y triacilgliceroles durante la vitelogénesis.
- Los huevos presentan el mismo perfil de lípidos y proteínas como también concentraciones comparables con los ovarios de las hembras vitelogénicas tardías.
- Los ovarios acumulan hemocianina durante la vitelogénesis, contenido que posteriormente se observa en los huevos de la especie.
- Los machos presentan cantidades de lípidos y proteínas comparables a los de las hembras previtelogénicas y postvitelogénicas.
- Las hembras vitelogénicas tempranas representan un estadio intermedio.
- Los componentes proteicos de las lipovitelinas presentan polipéptidos que provendrían principalmente del ovario (120, 75, 46 y 30 kDa) y, en menor medida, del aporte de los divertículos intestinales (170 kDa) y de la hemolinfa (67 kDa con identidad de hemocianina).

# V

## Análisis bioquímico del desarrollo de *Polybetes pythagoricus*

- V.1 Introducción
- V.2 Aspectos generales
- V.3 Caracterización lipídica
- V.4 Caracterización proteica y concentración de carbohidratos
- V.5 Conclusiones generales

### V.1 Introducción

La embriogénesis es un proceso a través del cual el embrión adquiere forma y se desarrolla, comenzando desde la fecundación e involucrando una serie de procesos dinámicos que incluyen la división, el crecimiento, la migración y la diferenciación de las células con el fin de generar estructuras de organización más complejas. La sucesiva aparición de niveles progresivamente más complejos puede darse solo en presencia de los recursos necesarios que satisfagan las necesidades regulatorias y metabólicas del embrión. El metabolismo del embrión se encuentra fuertemente regulado, coexistiendo múltiples vías de biosíntesis implicadas en el desarrollo (Matova & Cooley 2001) como también en el mantenimiento somático del embrión (Geister *et al.* 2008). Los animales ovíparos son un modelo ideal para el estudio del desarrollo, debido a que sus huevos presentan una composición y una cantidad de recursos determinada cuyas variaciones pueden seguirse durante el desarrollo embrionario (García *et al.* 2008; Geister *et al.* 2008; Trabalón *et al.* 2018). En el caso específico de las arañas, los recursos presentes en el huevo deben proveer la energía suficiente para sostener el costo metabólico que implica no solo el desarrollo embrionario sino también los períodos de emergencia y dispersión de los juveniles y otras actividades postemergentes, antes de que las arañas puedan ser independientes y autosuficientes (Anderson 1978; Trabalón *et al.* 2018).

La utilización de los recursos energéticos entra en taxas es muy variable al igual que los tiempos requeridos para completar el desarrollo embrionario, los cuales pueden ser desde 30 h hasta más de 3 meses (Hinton 1981). Como previamente se mencionó, dentro de los distintos recursos, se producen gránulos de vitelo que resultan de vital importancia para la supervivencia de las crías. Si bien los lípidos serían el recurso principal en insectos, crustáceos y ácaros (van Handel 1993; García *et al.* 2004; Campos *et al.* 2006; Geister *et al.* 2009; Santos *et al.* 2011; Santana *et al.* 2014), la gran demanda energética del embrión en desarrollo podría suplirse tam-

bién por el aporte de las proteínas y los carbohidratos (Mohamed 2000; Campos et al. 2006; Santana et al. 2014). El agotamiento del vitelo es un punto crítico para las arañas debido a que puede dar lugar a la competencia por la presa o al canibalismo (Yip & Rayor 2014). Por otra parte, a pesar de los recientes avances, la información asociada al proceso de formación de las LVs, su posterior consumo y utilización en arañas es verdaderamente escasa y muy reciente (Trabalon et al. 2018; Bednarek et al. 2019; Laino et al. 2020). La única información brindada hasta el momento sobre el consumo de los recursos energéticos durante el desarrollo fue descripta para la araña *P. saltans*, donde se analizó el rol que cumplían los triacilglicerol, carbohidratos y las proteínas durante el desarrollo embrionario y postembrionario (Trabalon et al. 2018), como así también el consumo de las reservas residuales de las LVs luego de la emergencia (Laino et al. 2020).

La escasa información sobre esta temática dificulta la generalización del uso de los diferentes recursos durante el desarrollo para un grupo tan diverso y particular como son las arañas. De esta manera, con el fin de avanzar en la comprensión del papel desempeñado por las diferentes biomoléculas durante el desarrollo y lograr una vinculación con el proceso de vitelogénesis, en este capítulo se presenta el análisis realizado y los resultados obtenidos durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Para una mejor interpretación y organización de los resultados obtenidos, este capítulo se encuentra dividido en tres secciones: “Aspectos generales”, “Caracterización lipídica” y “Caracterización proteica y concentración de carbohidratos”.

Las **hipótesis** planteadas para el presente estudio fueron:

- Durante el desarrollo de *P. pythagoricus*, el contenido de agua de los individuos disminuye.
- Los triacilglicerol son la principal fuente de energía lipídica durante el desarrollo embrionario y postembrionario.
- Las reservas de lipovitelin, se consumen de manera gradual durante el desarrollo..
- A partir del consumo de lipovitelin, el contenido de fosfolípidos disminuye durante el desarrollo.
- El glucógeno se consume de manera gradual durante el desarrollo.
- La síntesis y aumento del contenido de hemocianina se da en etapas posteriores al desarrollo embrionario.

Los **objetivos** específicos planteados para esta investigación durante el desarrollo de *P. pythagoricus* fueron:

- Analizar la variación del peso húmedo y seco de los individuos.
- Cuantificar y analizar las variaciones en el contenido de lípidos y ácidos grasos.

- Cuantificar y analizar las variaciones en el contenido total de proteínas y carbohidratos.
- Cuantificar el contenido y determinar las etapas donde se produce el consumo. de las lipovitelinas.
- Cuantificar el contenido de hemocianina.

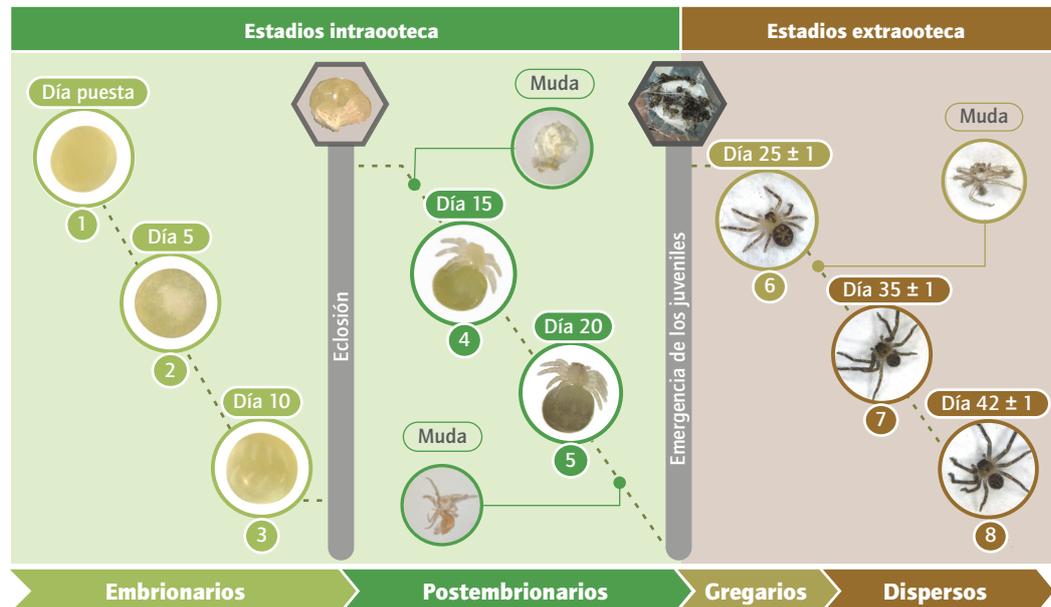
## V.2 Aspectos generales

Como fue previamente mencionado, el análisis del desarrollo de *P. pythagoricus* fue dividido en cinco estadios intraooteca y tres estadios extraooteca. Los estadios intraooteca utilizados para este análisis fueron separados temporalmente (5 días de diferencia entre cada uno), mientras que los estadios extraooteca fueron separados a partir de los eventos de emergencia de los juveniles de la ooteca y la aparición de la primera muda postemergencia. En esta sección, se presenta la descripción de los estadios analizados y los resultados obtenidos de los pesos de los individuos y las velocidades de los juveniles emergentes.

### V.2.A. Resultados

#### V.2.A.a Etapas del desarrollo de *Polybetes pythagoricus*

En la Figura V.1 se presenta un esquema con los ocho estadios analizados del desarrollo de *P. pythagoricus*. Los cinco estadios intraooteca se dividen en tres estadios embrionarios (Estadio 1 a 3) y dos estadios postembrionarios (Estadio 4 y 5). El Estadio 1 está representado por huevos esféricos de  $1,91 \pm 0,11$  mm, con la coloración verde característica de los huevos de *P. pythagoricus*, los cuales se encuentran sueltos dentro de la ooteca sin ninguna sustancia que los mantenga unidos. Como previamente se mencionó durante el desarrollo se genera el eje dorsoventral del embrión y se produce la inversión del mismo, apreciándose con claridad cerca del día 10 (Estadio 3) las extremidades de los embriones. Luego de la eclosión, el primer estadio postembrionario analizado (Estadio 4) resulta de la eliminación de una exuvia de coloración blanca y está representado por juveniles libres inmóviles (juveniles de 15 días después de la oviposición). Estos juveniles presentan una cutícula sin pigmentación y un opistosoma prominente. El segundo estadio postembrionario analizado (Estadio 5) esta representado por juveniles de 20 días después de la oviposición. Estos juveniles se diferencian del estadio anterior por la presencia de una cutícula ligeramente pigmentada. Si bien ambos estadios pueden presentar movimientos frecuentes de sus patas, ninguno posee la capacidad de locomoción y el opistosoma duplica el tamaño del prosoma.



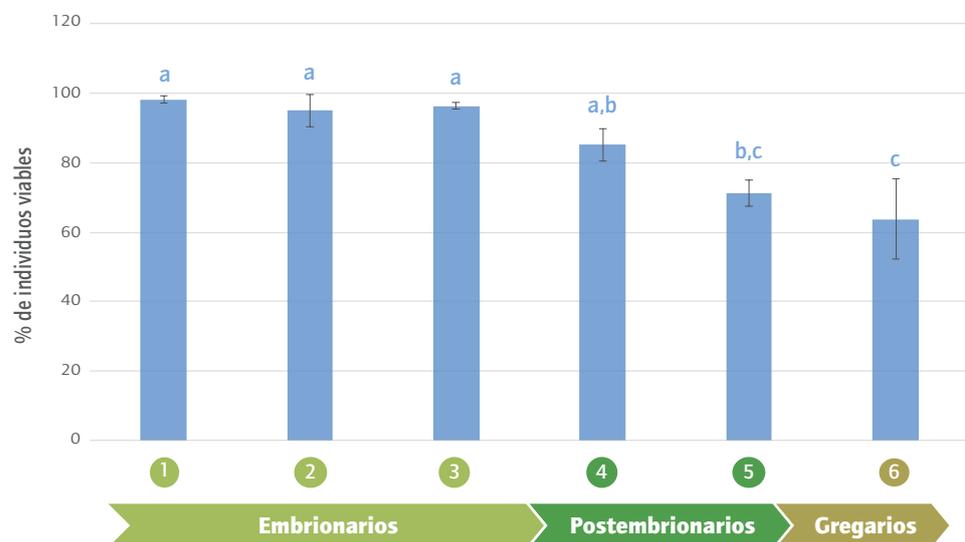
**Figura V.1** Estadios analizados del desarrollo de *P. pythagoricus*. En la figura se dividen los grupos experimentales en dos secciones: los estadios intraooteca y los estadios extraooteca. Los estadios intraooteca incluyen los estadios 1 al 3 pertenecientes al período de desarrollo embrionario y los estadios 4 y 5 pertenecientes al período postembrionario. Los estadios extraooteca incluye el estadio 6 representado por juveniles gregarios y los estadios 7 y 8 representados por juveniles dispersos. Las barras verticales grises representan los dos acontecimientos destacables: la eclosión, que separa los estadios embrionarios de los postembrionarios, y la emergencia de los juveniles, que separa los estadios intraooteca de los estadios extraooteca analizados. La línea de puntos conecta temporalmente los estadios y arriba de cada imagen se presentan los días totales transcurridos durante el desarrollo. Con las líneas continuas se señalan las mudas observadas entre los estadios analizados.

A los  $22 \pm 1$  días los juveniles mudan, produciendo una exuvia de coloración rosada y de estructura definida, dando lugar a un estadio más activo con capacidad de locomoción ( $0,68 \pm 0,13$  cm/seg). A los  $25 \pm 1$  días estos juveniles activos emergen de la ooteca, dando lugar al primer estadio emergente analizado (Estadio 6). La emergencia de las arañas puede darse en presencia o no de la madre, pudiendo no solo emerger sino también continuar su desarrollo en ausencia de ella. El Estadio 6 está representado por juveniles gregarios que se mantienen juntos y en contacto constante con la superficie de la ooteca. Estos juveniles presentan patas más largas que el estadio anterior, un opistosoma con un tamaño comparable al del prosoma y una pigmentación más marcada, especialmente en el opistosoma. A los 10 días de la emergencia ( $35 \pm 1$  días después de la puesta), estos juveniles mudan eliminando una exuvia más rígida con una coloración rosada oscura y dando lugar a los estadios dispersos (Estadios 7 y 8). Tanto en el Estadio 7 ( $35 \pm 1$  días después de la oviposición) como en el Estadio 8 ( $42 \pm 1$  días después de la oviposición), diferenciados temporalmente por una semana, los juveniles abandonan la vida gregaria movilizándose con mayor agilidad que el estadio gregario ( $6,25 \pm 1,08$  cm/seg). Su pigmentación oscura está mucho más marcada, tanto en el prosoma como en el opistosoma, y las patas adquieren la posición lateralizada característica de *P.*

*pythagoricus*. A su vez, estos juveniles dispersos presentan un opistosoma ligeramente más pequeño que el prosoma.

### V.2.A.b Viabilidad de los individuos

La Figura V.2 presenta los porcentajes de viabilidad durante el desarrollo embrionario y postembrionario (Estadios intraooteca) y el primer estadio emergente (Estadio 6), teniendo en cuenta los huevos y/o los juveniles viables presentes en cada ooteca. Durante el desarrollo embrionario el porcentaje de viabilidad presenta un promedio de  $96,5 \pm 2\%$  de individuos viables. Luego de la eclosión, el porcentaje de viabilidad comienza a disminuir desde el Estadio 4 con un  $85,17 \pm 4,7\%$  a un  $63,6 \pm 11\%$  en el Estadio 6 cuando los juveniles emergen.



**Figura V.2** Porcentajes de individuos viables (%) durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden: Embrionario (Estadios 1 a 3), Postembrionario (Estadio 4 y 5) y juveniles gregarios (Estadio 6).

### V.2.A.c Número de individuos y mediciones generales.

A partir del análisis general de cada ooteca, en la Tabla V.1 se presenta para cada estadio analizado el número promedio de individuos de cada ooteca como también los valores del peso húmedo y peso seco expresados en miligramos (mg) por individuo. El número promedio de individuos por ooteca se encuentra entre un mínimo de  $131 \pm 45$  y un máximo de  $281 \pm 29$ , hallándose en ciertos casos excepcionales ootecas con más de 400 individuos (Estadio 3).

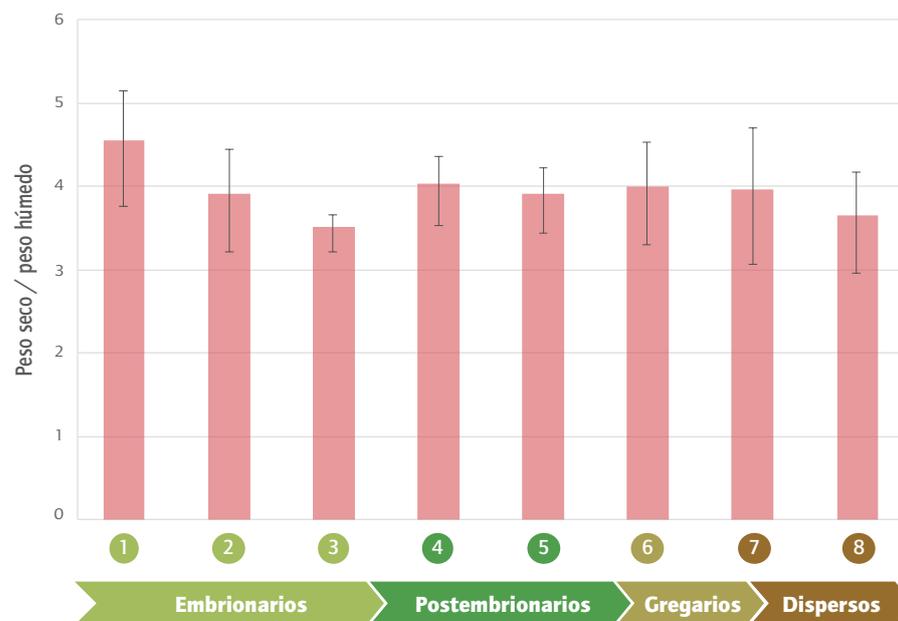
En los estadios embrionarios los valores de peso húmedo máximo alcanzan los  $5,48 \pm 0,62$  mg/individuo. A su vez, los valores de peso seco por individuo mantienen el mismo patrón que el peso húmedo para cada estadio representados por

**Tabla V.1** Análisis de las ootecas: Número total de individuos por ooteca y valores de peso húmedo y seco por individuo (mg/individuo) durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores se expresan como las medias  $\pm$  DE.

Estadios	Embrionarios			Postembrionarios		Gregarios	Dispersos	
	1	2	3	4	5		7	8
Cantidad total de individuos	209 $\pm$ 114	281 $\pm$ 29	256 $\pm$ 164	189 $\pm$ 68	131 $\pm$ 45	217 $\pm$ 48	144 $\pm$ 45	272 $\pm$ 8
Peso húmedo (mg/individuo)	4,24 $\pm$ 0,23	4,96 $\pm$ 0,4	5,48 $\pm$ 0,62	7,33 $\pm$ 1,31	5,83 $\pm$ 0,8	4,94 $\pm$ 0,4	4,52 $\pm$ 1,19	6,45 $\pm$ 1,46
Peso seco (mg/individuo)	0,92 $\pm$ 0,4	1,22 $\pm$ 0,33	1,59 $\pm$ 0,26	1,87 $\pm$ 0,47	1,51 $\pm$ 0,17	1,04 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,47	1,76 $\pm$ 0,52

un  $24,17 \pm 5,3\%$  del peso del individuo. En los estadios postembrionarios, el peso de los juveniles presenta promedios de  $7,3 \pm 1,31$  mg/individuo en el Estadio 4 y  $5,83 \pm 0,8$  mg/individuo en el Estadio 5, mientras que el peso seco mantiene un porcentaje comparable representado un  $25,7 \pm 2,5\%$  del peso de cada individuo. Luego de la emergencia, los pesos húmedos y pesos secos de los juveniles gregarios y dispersos son similares, representando el peso seco un  $27,6 \pm 4,48\%$  del peso del individuo.

Para determinar la variación del contenido acuoso durante el desarrollo, se analizó la relación entre el peso húmedo y el peso seco de cada individuo en los ocho estadios analizados. Los resultados se encuentran en la Figura V.3 donde se puede observar que los valores promedios varían entre un mínimo de  $3,5 \pm 0,23$  y un máximo de  $4,3 \pm 0,6$ , pero no presentan diferencias significativas. Durante el



**Figura V.3** Variación en la relación del peso húmedo (mg por individuo) y el peso seco (mg por individuo) durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE, n=12. Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden: Embrionario (Estadios 1 a 3), Postembrionario (Estadio 4 y 5) y juveniles gregarios (Estadio 6).

desarrollo, el contenido de agua por individuo representa en promedio el  $75,4 \pm 5,1\%$  del peso del individuo.

### V.2.B. Discusión

El proceso de embriogénesis puede ser notablemente diverso entre las distintas especies, especialmente durante las primeras etapas de desarrollo (Lemaire & Marcellini 2003), pero en el caso particular de las arañas hay varios factores que pueden contribuir a esta diversidad. Por un lado, el tiempo que implica el proceso completo de embriogénesis. A temperaturas comparables, el tiempo de embriogénesis en arañas varía desde 8 días como en *P. tepidariorum* (Hilbrant et al. 2012) hasta ciclos de entre 13 a 15 días como en *P. saltans* (Trabalon et al. 2018), *C. salei* (Melchers 1963; Stollewerk & Seyfarth 2008) y *P. pythagoricus* (Figura V.1). Además, se han observado variaciones en la duración del proceso dentro una misma especie (*Xerolycosa nemoralis*, Araneae: Lycosidae) dependieron del sitio donde se desarrollan, variando no solo las primeras etapas de desarrollo y sino también los niveles de mortalidad de los huevos y los embriones según la ubicación espacial de los individuos (Babczyńska et al. 2014). Por otro lado, el tamaño y el peso del huevo podrían ser un segundo factor los cuales varían entre las especies. A lo largo de las diferentes familias, se pueden encontrar huevos de menos de 0,5 mg y 1 mm de diámetro (Anderson 1990; Trabalon et al. 2018) hasta huevos de más de 2 mm (Galiano 1971) con pesos de hasta 4 mg como ocurre en *P. pythagoricus* (Tabla V.1). El tamaño y el peso del huevo están correlacionados con el contenido de agua y con la cantidad de nutrientes que presentan. Estos recursos serán posteriormente consumidos por los embriones y juveniles en desarrollo, permitiendo el mantenimiento del metabolismo hasta que los juveniles puedan alimentarse. Todos estos factores pueden afectar la supervivencia y la viabilidad de los individuos. Trabalon y sus colaboradores describieron que las tasas de mortalidad de *P. saltans* eran relativamente bajas, pero el número de individuos disminuyó progresivamente desde las primeras etapas embrionarias hasta la aparición de los juveniles (Trabalon et al. 2018). En cambio, durante el desarrollo de *P. pythagoricus* la viabilidad de los individuos comenzaría a disminuir principalmente durante los estadios posteriores a la eclosión.

A partir de las diferentes investigaciones realizadas, se ha descrito el uso de huevos infértiles como fuente de alimento para los juveniles viables denominados "huevos tróficos". Estos huevos pueden ser colocados por la madre luego de la emergencia de las arañas (Kim & Roland 2000) o simplemente los mismos huevos no viables presentes dentro de la ooteca pueden ser utilizados luego de la eclosión por los juveniles intraooteca (Galiano 1971). Sin embargo, esto no ocurre en todas las especies de arañas. Durante el desarrollo de la araña *P. saltans*, Tra-

balon y colaboradores determinaron que los huevos no viables no representaban una fuente de alimento para los juveniles en desarrollo debido a que estos huevos se encontraban dentro de la ooteca incluso luego de que emergieran los juveniles (Trabalon *et al.* 2018), siendo las reservas del huevo el único recurso energético de los juveniles viables. Si bien se ha descrito que durante el desarrollo postembriionario de *P. pythagoricus* los juveniles pueden alimentarse de los huevos no viables (Galiano 1971), la presencia de estos huevos en estadios avanzados del desarrollo como también la disminución o la ausencia de variaciones en la concentración de las principales fuentes de reserva analizadas (ver más adelante), indicaría que este suceso podría darse a niveles bajos representando una contribución muy despreciable a las reservas de los juveniles viables.

La pérdida de agua en los huevos representa un desafío para diferentes artrópodos los cuales emplean una amplia gama de recursos para prevenirlo (Mazzini *et al.* 1984; Speake & Thompson 1999; Fan *et al.* 2008). En el caso de las arañas, los huevos se encuentran rodeados por un cocón de seda el cual presenta diversas formas y colores que varían según la especie. Entre los múltiples factores que pueden afectar el desarrollo de los embriones y de los juveniles, se encuentra el estrés térmico e hídrico (Bristowe 1941; Nørgaard 1956; Schaefer 1976; Hieber 1985). Si bien, algunos autores consideran que el cocón de seda puede prevenir la pérdida de agua, hay varios reportes que describen lo contrario (Bristowe 1941; Schaefer 1976; Opell 1984; Foelix 2011; Babczyńska *et al.* 2014). A partir del análisis realizado, el cocón de seda en *P. pythagoricus* puede llegar a representar hasta un 5,5% del peso de la ooteca y considerando que, en condiciones de temperatura y humedad controladas, el contenido de agua representó el mismo porcentaje en todos los estadios intraooteca (período embrionario y postembriionario) el cocón de seda podría ser una posible barrera de protección contra la desecación. Sorpresivamente, no se observaron diferencias significativas en la relación en la variación del peso seco en relación al peso húmedo, a diferencia de varios insectos donde las variaciones del peso seco han sido desde un 13% hasta un 66% (Ludwig & Ramazzotto 1965; Yurkiewicz & Oelsner 1969).

### V.3 Caracterización lipídica

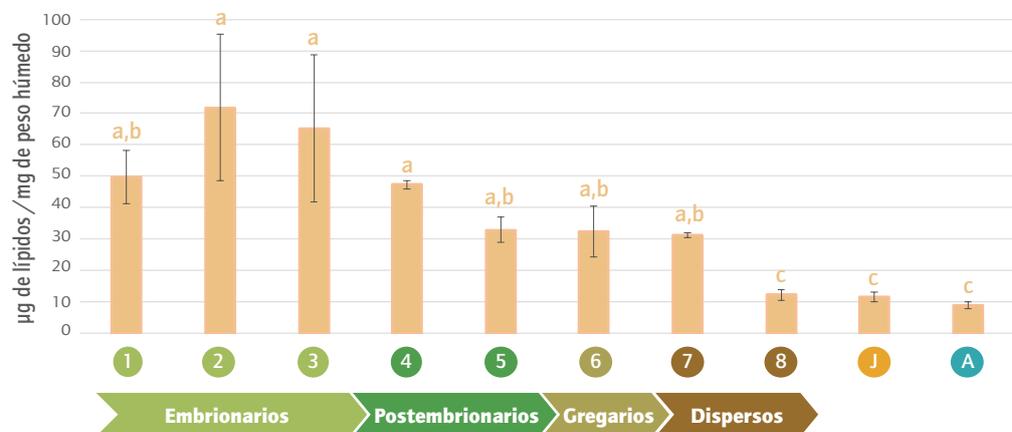
En esta sección se presenta los resultados obtenidos del análisis de los componentes lipídicos durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Para complementar estos resultados, se analizaron muestras de cuerpo entero de adultos (hembras PreV) y de juveniles de estadios avanzados en el desarrollo.

### V.3.A Resultados

#### V.3.A.a Concentración de lípidos totales

En esta sección se presentan los resultados obtenidos a partir de la extracción y cuantificación de los lípidos totales para cada estadio del desarrollo analizado de *P. pythagoricus*. Los respectivos valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de lípidos por mg de peso húmedo.

En la Figura V.4 se presentan los valores de concentración de lípidos totales durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Durante el desarrollo embrionario la concentración de lípidos totales es variable siendo de  $60,47 \pm 19 \mu\text{g}$  de lípidos/mg de peso húmedo. Si bien los valores no presentan diferencias significativas en el período postembrionarios, se observa una tendencia a la disminución del contenido de lípidos llegando a concentraciones de  $32,98 \pm 8 \mu\text{g}$  de lípidos/mg de peso húmedo una vez que los juveniles emergen de la ooteca (Estadio 6). Finalmente, la concentración de lípidos totales disminuye significativamente en los estadios dispersos (Estadio 8) con una concentración de  $12,3 \pm 1,7 \mu\text{g}$  de lípidos/mg de peso húmedo y manteniéndose con un promedio de  $10,25 \pm 1,9 \mu\text{g}$  de lípidos/mg de peso húmedo en los juveniles avanzados y los adultos obtenidos en el campo (J y A).



**Figura V.4** Concentración de lípidos totales durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergente; 7 y 8: juveniles dispersos; J: juveniles libres de desarrollo avanzado; A: ejemplares adultos (PreV).

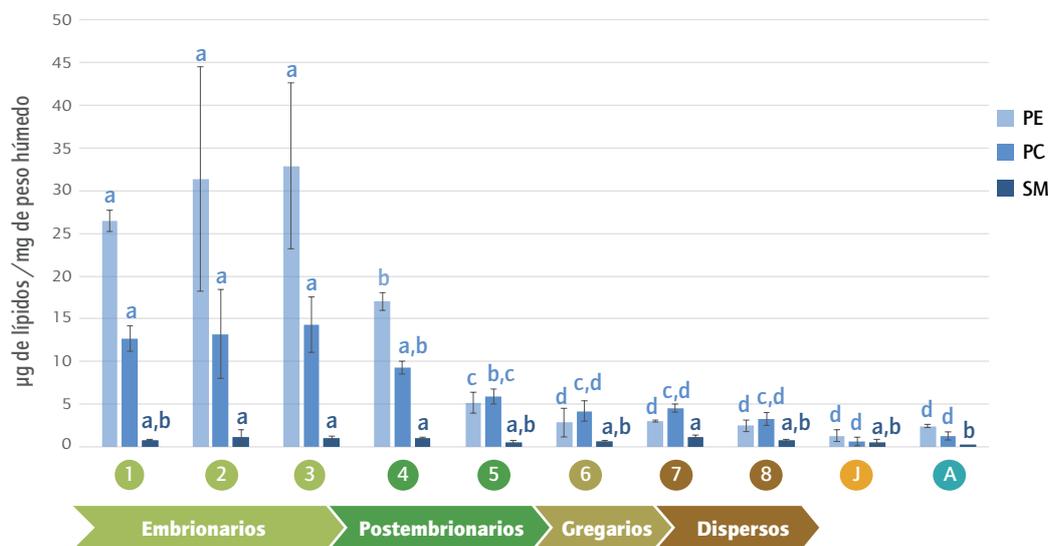
#### V.3.A.b Composición lipídica

En esta sección se presenta el análisis obtenido a partir de la cuantificación por TLC-FID de las distintas clases de lípidos en los diferentes estadios analizados del desarrollo, incluyendo los juveniles avanzados y los adultos obtenidos en el

campo. Los respectivos valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de lípidos por mg de peso húmedo para cada lípido analizado.

En la Figura V.5 se observa la concentración de los principales fosfolípidos analizados: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM). La fosfatidiletanolamina representa el principal fosfolípido durante el desarrollo embrionario con valores promedio entre los estadios de  $29,86 \pm 6 \mu\text{g}$  de fosfatidiletanolamina/mg de peso húmedo. Luego de la eclosión, el contenido de fosfatidiletanolamina disminuye a medida transcurre del desarrollo postembrionario hasta que los juveniles emergen de la ooteca (Estadio 6), alcanzando una concentración comparable a la de los adultos (A).

Comparable al patrón observado con la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina disminuye de manera gradual durante el desarrollo postembrionario. Con valores promedio de  $13,61 \pm 1,8 \mu\text{g}$  de fosfatidilcolina/mg de peso húmedo durante el desarrollo embrionario (Estadio 1 a 3), la concentración de fosfatidilcolina disminuye alcanzando valores de  $4,19 \pm 1,25 \mu\text{g}$  de fosfatidilcolina/mg de peso húmedo cuando los juveniles emergen de la ooteca (Estadio 6) y alcanzando en los adultos una concentración de  $1,3 \pm 0,5 \mu\text{g}$  de fosfatidilcolina/mg de peso húmedo (A).



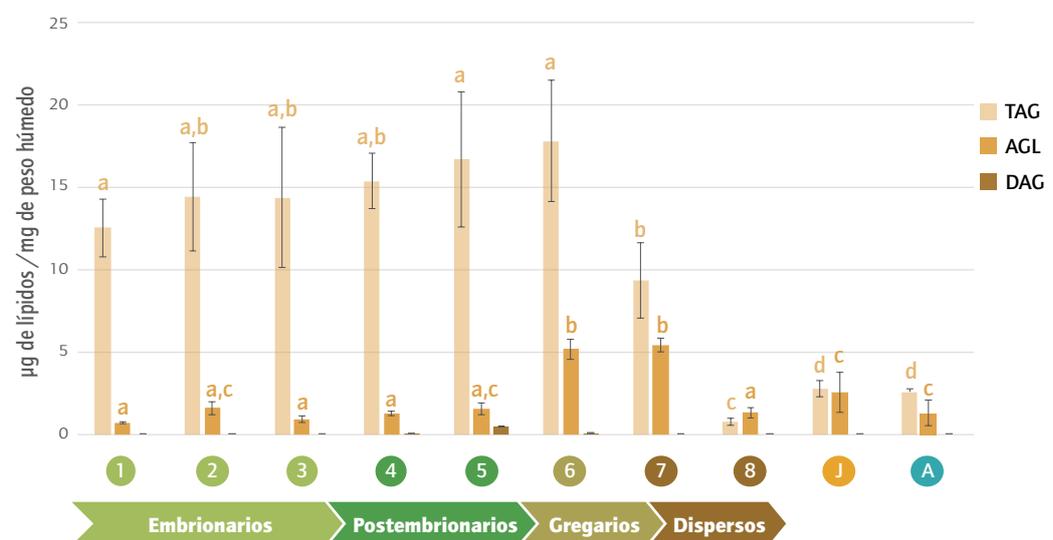
**Figura V.5** Concentración de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina en los diferentes estadios del desarrollo analizados de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c, d y e) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina. Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; J: juveniles libres de desarrollo avanzado; A: ejemplares adultos (PreV).

En cambio, la concentración de esfingomielina se mantiene relativamente constante con valores promedio de  $0,85 \pm 0,37 \mu\text{g}$  de esfingomielina/mg de peso húmedo durante el desarrollo. En los adultos se observan los valores mínimos con

una concentración promedio de  $0,28 \pm 0,02 \mu\text{g}$  de esfingomielina/mg de peso húmedo (A).

En la Figura V.6 se observa la concentración de los principales lípidos energéticos: triacilgliceroles, ácidos grasos libres y diacilgliceroles. Durante el desarrollo hasta la emergencia de los juveniles gregarios (Estadio 6) las concentraciones de estos lípidos permanecen relativamente constantes. Durante este período los triacilgliceroles mantienen una concentración que va desde  $12,55 \pm 1,8$  a  $17,8 \pm 3,7 \mu\text{g}$  de triacilgliceroles/mg de peso húmedo. En los estadios de dispersión estos valores disminuyen hasta concentraciones promedio de  $0,84 \pm 0,16 \mu\text{g}$  de triacilgliceroles/mg de peso húmedo. En los estadios más avanzados, estos valores aumentan alcanzando en los adultos concentraciones promedio de  $2,6 \pm 0,2 \mu\text{g}$  de triacilgliceroles/mg de peso húmedo (A).

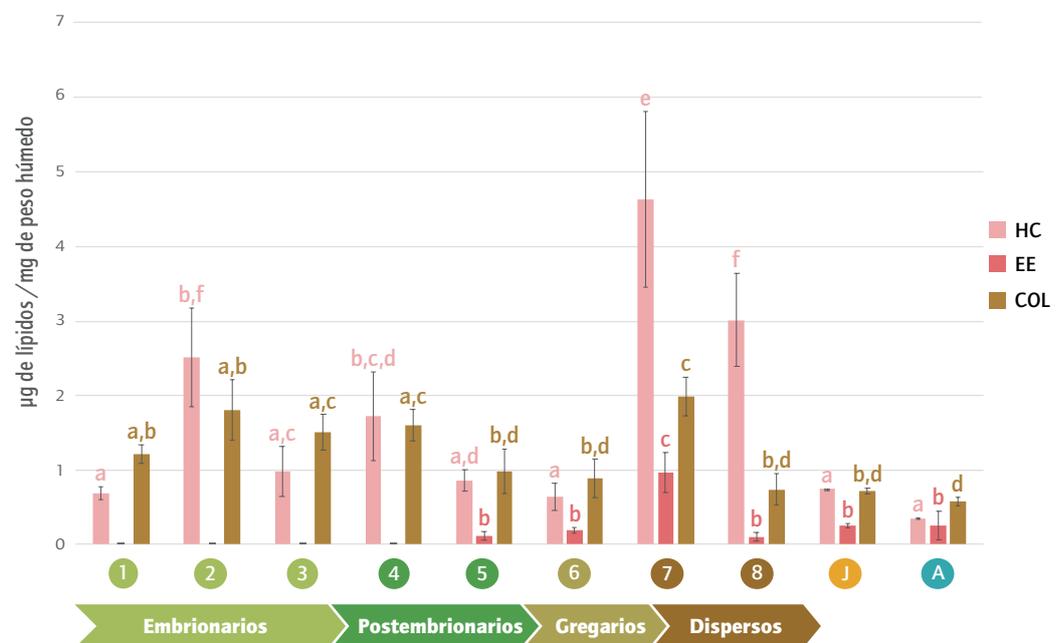
Durante el desarrollo intraooteca, los ácidos grasos libres mantienen concentraciones constantes con valores promedio de  $1,23 \pm 0,23 \mu\text{g}$  de ácidos grasos libres/mg de peso húmedo, tanto en los estadios embrionarios como en los postembrionarios (Figura V.6). Una vez que los juveniles emergen (Estadio 6) la concentración de los ácidos grasos libres aumenta a  $5,2 \pm 0,63 \mu\text{g}$  de ácidos grasos libres/mg de peso húmedo, concentración que disminuye luego en los juveniles que se dispersan alcanzando en adultos valores de  $1,2 \pm 0,8 \mu\text{g}$  de ácidos grasos libres/mg de peso húmedo (A). En el caso de los diacilgliceroles, solo se observan una menor proporción en estadios postembrionarios.



**Figura V.6** Concentración de triacilgliceroles, ácidos grasos libres y diacilgliceroles en los diferentes estadios del desarrollo analizados de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ),  $n=3$ . TAG: triacilgliceroles; AGL: ácidos grasos libres; DAG: diacilgliceroles. Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; J: juveniles libres de desarrollo avanzado; A: ejemplares adultos (PreV).

En la Figura V.7 se observa la concentración de algunos lípidos moduladores y otros implicados en la señalización: hidrocarburos, esteroides esterificados y colesterol. El contenido de hidrocarburos aumenta durante el desarrollo embrionario y luego permanece relativamente constante durante el desarrollo postembrionario hasta que los juveniles gregarios emergen con valores promedio de  $1,03 \pm 0,55 \mu\text{g}$  de hidrocarburos/mg de peso húmedo. Luego de la primera muda postemergente (Estadio 7) las concentraciones aumentan alcanzando valores de  $4,63 \pm 1,19 \mu\text{g}$  de hidrocarburos/mg de peso húmedo y disminuyendo en estadios avanzados llegando en adultos a valores de  $0,34 \pm 0,01 \mu\text{g}$  de hidrocarburos/mg de peso húmedo (A).

Los valores de colesterol durante el desarrollo embrionario y postembrionario fluctúan entre  $1,21 \pm 0,12$  y  $1,51 \pm 0,25 \mu\text{g}$  de colesterol/mg de peso húmedo (Figura V.7), los cuales descienden a valores promedio de  $0,89 \pm 0,28 \mu\text{g}$  de colesterol/mg de peso húmedo cuando los juveniles emergen (Estadio 6). Luego se observa un incremento en los estadios dispersos alcanzando valores de  $1,98 \pm 0,3 \mu\text{g}$  de colesterol/mg de peso húmedo el cual disminuye en estadios avanzados llegando en adultos a valores promedio de  $0,58 \pm 0,06 \mu\text{g}$  de colesterol/mg de peso húmedo. Ciertos niveles de esteroides esterificados se detectan a partir de los estadios postembrionarios, con valores de concentración bajos de  $0,15 \pm 0,05 \mu\text{g}$



**Figura V.7** Concentración de hidrocarburos, esteroides esterificados y colesterol en los diferentes estadios del desarrollo analizados de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c, d, e y f) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . HC: hidrocarburos; EE: esteroides esterificados; COL: colesterol. Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; J: juveniles libres de desarrollo avanzados; A: ejemplares adultos (PreV).

de esteroides esterificados/mg de peso húmedo, alcanzando el valor máximo  $0,96 \pm 0,28 \mu\text{g}$  de esteroides esterificados/mg de peso húmedo cuando los juveniles mudan y se dispersan (Estadio 7). En adultos estos valores descienden a concentraciones de  $0,26 \pm 0,2 \mu\text{g}$  de esteroides esterificados/mg de peso húmedo.

### V.3.A.c Análisis de los ácidos grasos

En esta sección se presenta el análisis realizado por GLC de los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos a partir de los lípidos totales en los ocho estadios del desarrollo (Estadio 1 a 8), observándose en la Tabla V.2 todos los ácidos grasos cuantificados en los ocho estadios analizados.

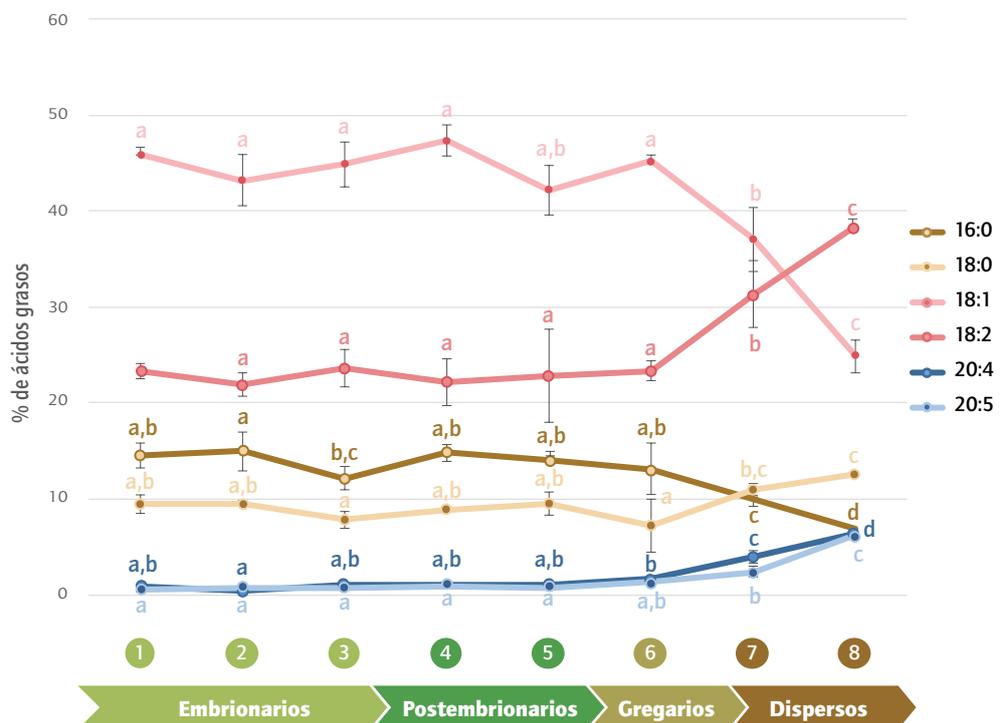
**Tabla V.2** Porcentajes de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales de los distintos estadios del desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE, n=3. Porcentajes de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales del músculo de hembras en diferentes estadios de la vitelogenénesis y de machos. Los valores representan las medias de los análisis  $\pm$  DE. Los números indican los estadios analizados y los rectángulos de arriba los períodos del desarrollo que comprenden. %AG: Porcentaje de ácidos grasos; 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos.

AG%	Embrionarios			Postembrionarios		Gregarios	Dispersos	
	1	2	3	4	5	6	7	8
14:0	0,27 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,2	0,46 $\pm$ 0,06
15:0	0,06 $\pm$ 0,008	0,03 $\pm$ 0,004	0,09 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,005	0,05 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,05
16:0	14,55 $\pm$ 1,33	14,98 $\pm$ 2,04	12,14 $\pm$ 1,2	14,84 $\pm$ 0,91	14,01 $\pm$ 0,05	13,1 $\pm$ 2,7	9,97 $\pm$ 0,44	6,89 $\pm$ 0,16
16:1	1,6 $\pm$ 0,57	2,54 $\pm$ 0,5	2,87 $\pm$ 0,61	2,21 $\pm$ 0,29	2,91 $\pm$ 1	3,77 $\pm$ 0,76	1,36 $\pm$ 0,8	0,74 $\pm$ 0,02
17:0	0,49 $\pm$ 0,08	0,36 $\pm$ 0,007	0,6 $\pm$ 0,1	0,43 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,001	0,55 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,04
17:1	0,34 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,001	0,51 $\pm$ 0,1	0,47 $\pm$ 0,28	0,46 $\pm$ 0,002	0,42 $\pm$ 0,28
18:0	9,52 $\pm$ 0,57	9,59 $\pm$ 0,29	7,9 $\pm$ 1,39	8,94 $\pm$ 0,2	9,45 $\pm$ 1,9	7,19 $\pm$ 2,73	11,03 $\pm$ 0,65	12,56 $\pm$ 0,17
18:1	45,94 $\pm$ 0,42	43,19 $\pm$ 2,63	44,83 $\pm$ 2,32	47,35 $\pm$ 1,62	42,18 $\pm$ 2,59	45,2 $\pm$ 0,32	37,04 $\pm$ 3,37	24,87 $\pm$ 1,72
18:2	23,36 $\pm$ 0,82	21,93 $\pm$ 1,23	23,65 $\pm$ 1,99	22,18 $\pm$ 2,47	22,88 $\pm$ 4,88	23,39 $\pm$ 0,73	31,34 $\pm$ 3,47	38,46 $\pm$ 0,43
18:3	2,18 $\pm$ 2,36	5,324 $\pm$ 0,95	5,03 $\pm$ 0,66	1,1 $\pm$ 0,84	4,82 $\pm$ 0,82	2,25 $\pm$ 0,67	0,76 $\pm$ 0,3	1,02 $\pm$ 0,02
20:0	0,26 $\pm$ 0,015	0,44 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,28	1,15 $\pm$ 0,15
20:4	0,85 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,19	1,13 $\pm$ 0,18	1,65 $\pm$ 0,27	3,96 $\pm$ 0,66	6,46 $\pm$ 0,77
20:5	0,57 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,55	0,73 $\pm$ 0,41	1,37 $\pm$ 0,27	2,42 $\pm$ 0,57	6,28 $\pm$ 0,86

Por otra parte, en la Figura V.8 se presentan los cambios porcentuales de los principales ácidos grasos analizados que presentaron variaciones significativas. Durante el desarrollo embrionario y postembrionario los porcentajes de los ácidos grasos permanecen relativamente constantes manteniendo valores comparables entre los estadios hasta que los juveniles emergen (Estadio 6). Sin embargo, luego de la primera muda emergente que da lugar a los estadios dispersos (Estadio 7 y 8) se observaron grandes variaciones en el contenido de los ácidos grasos de estos juveniles. Comparando el estadio de juveniles gregarios (Estadio 6) con el último estadio de juveniles dispersos analizados (Estadio 8), se observó que el porcentaje

de 16:0 disminuye desde un  $13,1 \pm 2,7\%$  hasta un  $6,9 \pm 0,16\%$ .

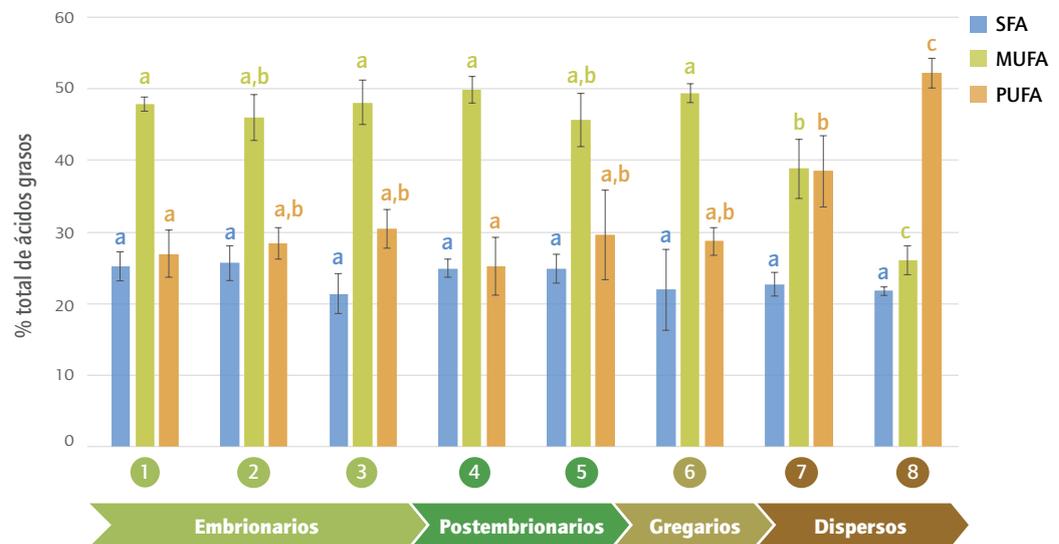
Por el contrario, el 18:0 se enriquece durante este período desde un  $7,2 \pm 7,2\%$  a un  $12,6 \pm 0,17\%$ . En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados, inicialmente el 18:1 presenta un  $45,2 \pm 0,3\%$  en el estadio gregario y luego este valor disminuye hasta un  $24,8 \pm 1,7\%$  en los juveniles dispersos. Por el contrario, el 18:2 se enriquece desde un  $23,4 \pm 0,7\%$  a un  $38,45 \pm 0,4\%$ . Por otra parte, se observa un incremento en los porcentajes de los ácidos grasos 20:4 y 20:5 desde valores menores al 1,5% hasta valores cercanos al 6%.



**Figura V.8** Porcentajes de los principales ácidos grasos (%) en los diferentes estadios del desarrollo analizados de *P. pythagoricus*. Ácido palmítico (16:0), Ácido esteárico (18:0), Ácido oleico (18:1), Ácido linoleico (18:2), Ácido eicosatetraenoico (20:4) y Ácido eicosapentanoico (20:5). Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ),  $n=3$ . Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos.

A partir de la sumatoria de los distintos ácidos grasos analizados durante el desarrollo, en la Figura V.9 se presentan los porcentajes totales de los ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Durante el desarrollo de *P. pythagoricus* el porcentaje de SFA permanece relativamente constante, mientras que el contenido de los ácidos grasos insaturados varía luego de que los juveniles emergen de la ooteca. El porcentaje de los MUFA disminuye desde un  $49,45 \pm 1,35\%$  en el estadio 6 hasta un  $26,04 \pm 2,02\%$  en el estadio 8, con un aumento concomitante del porcentaje de los PUFA

desde un  $28,6 \pm 1,93\%$  en el estadio 6 a un  $52,2 \pm 2,08\%$  en el estadio 8.



**Figura V.9** Porcentaje total de ácidos grasos (%) saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) en los diferentes estadios del desarrollo analizados de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE de la suma de los porcentajes de los distintos tipos de ácidos grasos. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos

### V.3.B Discusión

En las especies ovíparas, los lípidos presentes en el vitelo son una de las principales fuentes de energía para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de los individuos. Se ha observado que las larvas de insectos holometábolos y juveniles de arácnidos presentan mayor contenido de lípidos que los adultos y, a su vez, si estas reservas se mantienen hasta la madurez podrían compensar parte o la totalidad de la energía requerida para las etapas de la vida adulta en algunas especies (Lease & Wolf 2011). De la misma manera, durante el desarrollo de *P. pythagoricus* se pudo observar que los estadios intraooteca y los juveniles emergentes gregarios presentaron una concentración de lípidos mayor que los juveniles dispersos y los adultos.

A lo largo del tiempo, se ha destacado que los lípidos energéticos representan un recurso importante para el desarrollo embrionario en insectos, ácaros y crustáceos (Van Handel 1993; Garcia et al. 2004; Campos et al. 2006; Geister et al. 2009; Santos et al. 2011). Sin embargo, en algunas arañas esto no parece ocurrir. Los huevos de *P. pythagoricus* contienen inicialmente un 72,2% de lípidos estructurales (cercano a los  $40 \mu\text{g}$  de fosfolípidos/mg de peso húmedo) y solo 24,3% de lípidos energéticos (aproximadamente un  $13,3 \mu\text{g}$  de lípidos energéticos/mg de peso húmedo). Esto coincide con el análisis realizado en la araña *S. malitiosa*, donde se

observó que los huevos presentaban un  $67 \pm 27\%$  de lípidos estructurales (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina) y solo un  $26,6 \pm 18,5\%$  de lípidos energéticos (triacilgliceroles y ácidos grasos libres) quedando un  $5,5 \pm 3,7\%$  de otros lípidos (colesterol, esteroides esterificados y hidrocarburos) (Laino et al. 2013). En cambio, en *P. saltans*, otra especie de la familia Lycosidae, los lípidos energéticos son mayoritarios representando un  $51,5 \pm 8,1\%$ , seguido por un  $33,1 \pm 1,2\%$  de lípidos estructurales y  $12,8 \pm 4\%$  para el resto (colesterol, esteroides esterificados, hidrocarburos y lisofosfatidilcolina) (Trabalon et al. 2018). Según los autores, la diferencia encontrada en la composición lipídica de los huevos de estas arañas podría deberse a la diferencia en el tipo de alimentación, como se ha observado entre la hemolinfa de *A. californicum* y *Brachypelma albopilosum* (Araneae: Theraphosidae) (Schartau & Leidescher 1983).

Los resultados obtenidos acrecientan la idea de que los fosfolípidos parecieran tener un rol muy importante durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Durante el análisis de la vitelogénesis de *P. pythagoricus* se pudo observar un aumento en el contenido de fosfolípidos en los oocitos, alcanzando en los Ovs de las hembras V un valor aproximado de  $66,6\%$ , mientras que los lípidos energéticos solo representaron un  $30\%$ . Este gran contenido de lípidos podría estar asociado a una función estructural relacionado con la formación de los cuerpos vitelínicos presentes en los oocitos de muchas familias de arañas, los cuales han sido identificados como retículo endoplásmico rugoso que estaría asociado a la formación del vitelo (von Wittich 1845; André & Rouiller 1957; Sotelo & Trujillo-Cenóz 1957). Posteriormente y utilizando como modelo la araña *Clubiona* sp. (Araneae: Clubionidae), Jedrzejowska & Kubrakiewicz (2010) caracterizaron los “cuerpos de Balbiani” diferenciándolos del “núcleo de vitelo”, demostrando que este últimos se caracterizaba por contener cisternas del retículo endoplásmico, mitocondrias y otros orgánulos. A su vez, dentro de los lípidos componentes de las LVs de *P. pythagoricus*, los fosfolípidos representan un gran porcentaje cercano al  $50\%$ , siendo la fosfatidiletanolamina el fosfolípido mayoritario (Laino et al. 2011b). Este gran porcentaje de fosfatidiletanolamina coincide con lo reportado para algunos embriones de crustáceos (Wang et al. 2015).

Si bien la estructura de la fosfatidiletanolamina sugería que su función es estructural, el consumo durante el período postembrionario provee evidencia considerable de que este fosfolípido podría tener una función energética y no solo estructural como han sugerido algunos autores para los lípidos estructurales (Hagen et al. 1996; Albessard et al. 2001; Mayzaud et al. 2003). Se ha observado que los fosfolípidos pueden actuar como un combustible energético durante el desarrollo temprano de algunos crustáceos (Clarke et al., 1985; Sibert et al. 2004). Esta hipótesis podría verse reforzada por el escaso contenido de este fosfolípido

en juveniles y adultos dispersos (0,4% y 0,21% del contenido inicial de fosfatidiletanolamina), quedando en evidencia que luego de la eclosión, la fosfatidiletanolamina se hidrolizaría principalmente durante los estadios postembrionarios. Por otra parte, la hidrólisis de este fosfolípido podría proveer una fracción de etanolamina que modifica covalentemente las proteínas (Vance & Tasseva 2013). Asimismo, la fosfatidilcolina consumida durante el desarrollo postembrionario podría proveer una fracción de colina necesaria para el metabolismo de los grupos metilo y para la neurotransmisión (Tocher *et al.* 1985). El gran consumo de fosfolípidos durante las etapas postembrionarias revelaría que la actividad de fosfolipasa sería mayor que la actividad de la lipasa. En contraste, la concentración de esfingomielina permaneció constante a durante el desarrollo exhibiendo posiblemente un rol estructural, debido a que la combinación de diferentes lípidos permite garantizar la integridad de las membranas (Merrill Jr. & Sandhoff 2002; van Meer *et al.* 2008) contribuyendo en parte a su rigidez (Simons & Ikonen 1997; Guan *et al.* 2009).

Con una importancia destacable, los triacilglicerolos se encuentran en el vitelo formando las gotas lipídicas (Walther & Farese 2012; Schie *et al.* 2013; Bik *et al.* 2020) y representando moléculas energéticas destacables por su gran capacidad calórica y su forma de almacenamiento (Jedrzejowska & Kubrakiewicz 2010; Laino *et al.* 2011b, 2013). En *P. pythagoricus* el contenido de triacilglicerolos disminuyó en los estadios de dispersión, consumiéndose cerca del 50% luego de la primera muda fuera de la ooteca (Estadio 7) y casi la totalidad de esta reserva después de una semana (Estadio 8). Este tipo de hidrólisis tardía de los triacilglicerolos también se observó en la araña *P. saltans* (Trabalon *et al.* 2018) y en algunos crustáceos (González-Baró *et al.* 2000). Aunque no se puede descartar la síntesis *de novo* de ácidos grasos libres, a partir de los resultados obtenidos se puede inferir que el aumento de la concentración de los ácidos grasos libres en los juveniles gregarios (Estadio 6) probablemente se deba a la hidrólisis de los fosfolípidos, principalmente de la fosfatidiletanolamina, mientras que en los juveniles dispersos podría deberse a la hidrólisis de los triacilglicerolos.

En las arañas, los hidrocarburos podrían desempeñar diversas funciones tales como representar la primera barrera química para la entrada de patógenos, servir como kairomonas para hongos y bacterias entomopatógenos (Lecuona *et al.* 1991), participar en el control de la homeostasis hídrica (Hadley 1981; Gibbs 1998) o tener un rol activo en la comunicación química entre congéneres (Blomquist & Bagnères 2010). En el presente trabajo, la presencia de hidrocarburos varía principalmente en algunas etapas embrionarias y en los estadios de juveniles dispersos. Esto puede deberse posiblemente a la síntesis *de novo* como se ha descrito en insectos (Fan *et al.* 2008), donde se observaron aumentos en el contenido de hidrocarburos durante las etapas tempranas del desarrollo y en el primer estadio de ninfa. Por otro lado,

la presencia de colesterol no varió significativamente entre las etapas analizadas a pesar del rol clave del colesterol y esteroides esterificados, debido a que son componentes de membranas y precursores de hormonas de la muda (Andersen 1979; Merzendorfer & Zimoch 2003; Martin-Creuzburg *et al.* 2007). Si bien en los adultos las concentraciones son menores, está claro que los hidrocarburos, colesterol y esteroides esterificados poseen un rol biológico fundamental en la formación de ecdisteroides (Andersen 1979; Merzendorfer & Zimoch 2003; Martin-Creuzburg *et al.* 2007). Sin embargo, la falta de información en relación con el tema dificulta la interpretación adecuada del papel desempeñado por estos lípidos en el desarrollo embrionario de las arañas.

Los requerimientos nutricionales en las etapas iniciales del desarrollo embrionario difieren entre las especies (Sargent *et al.* 1989) reflejando diferentes tipos de dieta y adaptaciones metabólicas (Morais *et al.* 2002; Rosa *et al.* 2007). Sin embargo, en escorpiones y en algunas arañas se observó que cualquier variación que puedan generar las diferentes dietas no son variaciones significativas que se reflejen en el contenido de ácidos grasos, a diferencia de lo descrito para otros artrópodos (Kucharski & Da Silva 1991; Vinagre & Da Silva 1992; Carvalho *et al.* 2012). Los huevos de *P. pythagoricus* contienen principalmente ácidos grasos insaturados, un 45,94% de 18:1 y un 23,36% de 18:2, y ácidos grasos saturados, un 14,55% de 16:0 y 9,52% de 18:0; y otra minoría con porcentajes inferiores al 2,1%. Estos ácidos grasos mayoritarios fueron almacenados en los Ovs durante la vitelogénesis, coincidiendo también con el patrón general de ácidos grasos de las LVs componentes del vitelo (Laino *et al.* 2011b). Este patrón de ácidos grasos también se observó en dos miembros de la familia Lycosidae, *S. malitiosa* y *P. saltans*, especies que presentaban los ácidos grasos 18:2, 18:1, 16:0 y 18:0 como ácidos grasos mayoritarios (Laino *et al.* 2013; Trabalon *et al.* 2018). Aunque se describe que en algunos insectos la composición de los ácidos grasos permanece constante durante el desarrollo embrionario (Hoppe *et al.* 1975), en otros artrópodos el consumo parece ser diferencial, ya que algunos ácidos grasos se consumen mientras otros aumentan durante la embriogénesis (Figueiredo *et al.* 2012). En el caso de las arañas, el porcentaje total de SFA, MUFA y PUFA permaneció constante hasta que los juveniles emergieron de la ooteca (Estadio 6), sin embargo, posteriormente el porcentaje de MUFA disminuyó con el aumento concomitante de PUFA en los juveniles dispersos y con un cambio específico en la composición de ácidos grasos dentro de estos grupos.

El empobrecimiento de 16:0 se equilibró con el enriquecimiento de 18:0, lo que explica la ausencia de variación de SFA durante todo el desarrollo, principalmente en las etapas dispersas donde el consumo de triacilglicérols fue evidente. Además de ser una fuente importante de energía se observó que los derivados de 16:0, como el ácido 14-metilhexadecanoico, se encuentran en la seda al igual que

otros lípidos los cuales poseen una importante actividad antimicrobiana garantizada por el efecto protector del grupo metilo (Heimer 1988; Tahir *et al.* 2017), algo destacable teniendo en cuenta que la producción activa de seda ya tiene lugar desde el momento que los juveniles emergen de la ooteca. En el caso de los ácidos grasos insaturados, se produjo un empobrecimiento del 18:1 y un enriquecimiento del 18:2, ácido graso con un rol destacable en la fisiología celular, inmunidad y reproducción (Malcicka *et al.* 2018). Las especies de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos y los triacilglicerolos pueden ser similares en ambos tipos de lípidos. En líneas generales, los lípidos energéticos tienen principalmente ácidos grasos saturados y los fosfolípidos poseen mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Innis 1991). Este patrón no se correlacionaría con la disminución del contenido de fosfolípidos durante el desarrollo en *P. pythagoricus*, donde se observó un consumo de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina durante el desarrollo postembrionario y un consumo de triacilglicerolos a partir de la emergencia de los juveniles de la ooteca. Sin embargo, en los juveniles dispersos el contenido de los ácidos 20:4 y 20:5 aumentan seis veces más en comparación a los estadios intraooteca. Estos ácidos grasos son considerados esenciales para los artrópodos ya que no los pueden sintetizar (D'Abramo *et al.* 1997 Gonzalez-Felix *et al.* 2003a, 2003b). La importancia de los ácidos grasos de 20C radica en el hecho de que son precursores de eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) (Meijer *et al.* 1986; Stanley-Samuelson *et al.* 1991; Petzel 1993; Stanley-Samuelson & Pedibhotla 1996; Stanley 2000; Reddy *et al.* 2004). Numerosos trabajos sobre artrópodos describen la importante función de los eicosanoides en la defensa contra los microorganismos a través de reacciones inmunes (Stanley-Samuelson *et al.* 1991; Morishima *et al.* 1997; Park *et al.* 2003), la cual sería de vital importancia para la supervivencia de los juveniles recién dispersados.

#### **V.4 Caracterización proteica y concentración de carbohidratos**

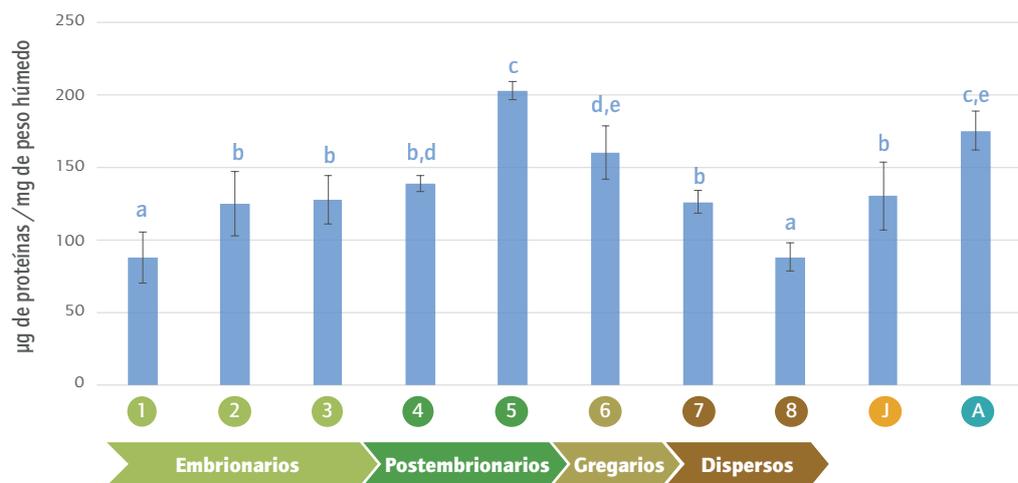
En esta sección se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de los componentes proteicos y el contenido de glucógeno de los diferentes estadios del desarrollo analizados. Para complementar estos resultados, se analizaron muestras de cuerpo entero de adultos (hembras PreV) y de juveniles de estadios avanzados en el desarrollo. Tanto los análisis con SDS-PAGE como los Western Blot fueron realizados por triplicado.

## V.4.A Resultados

### V.4.A.a Concentración de proteínas solubles y caracterización proteica

En la Figura V.10 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas solubles para cada estadio analizado. Los valores se encuentran expresados como  $\mu\text{g}$  de proteínas por mg de peso húmedo.

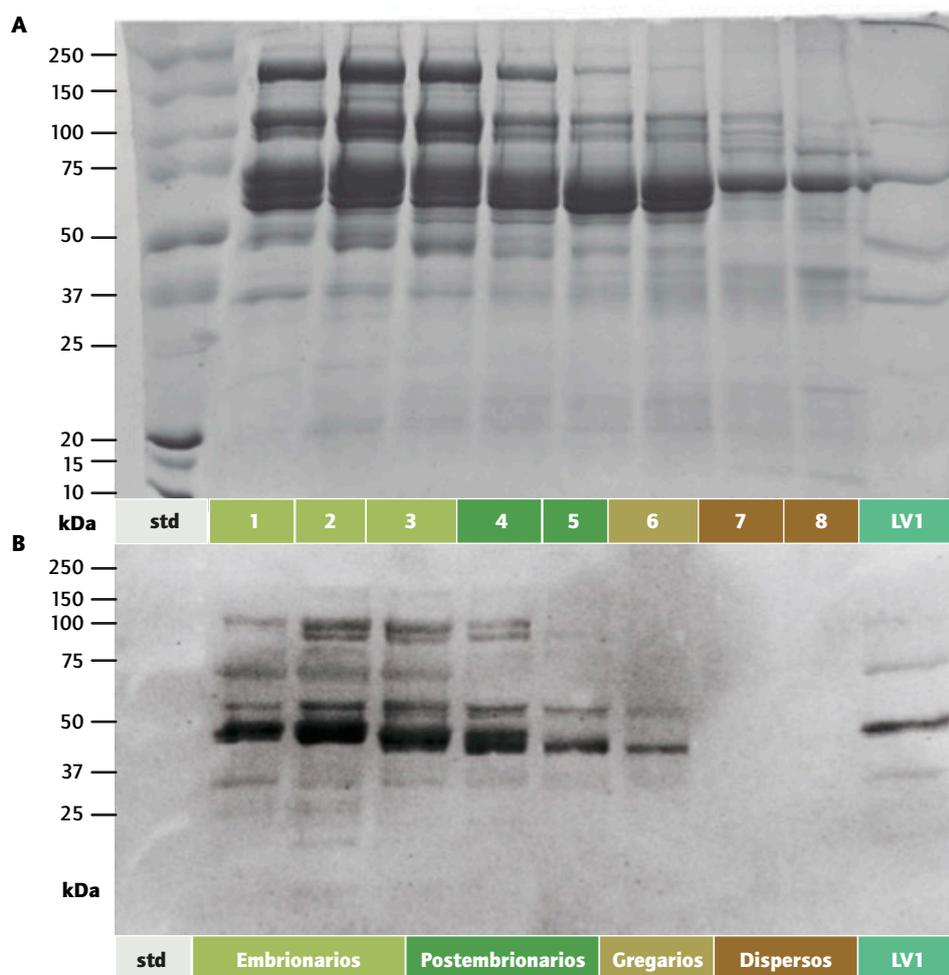
Durante el desarrollo embrionario y postembrionario se observa un aumento en la concentración de proteínas desde  $87,73 \pm 17,58 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de peso húmedo a  $138,5 \pm 5,3 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de peso húmedo en el Estadio 4. En el Estadio 5 la concentración aumenta alcanzando un valor de  $203,01 \pm 6,47 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de peso húmedo. En los estadios emergentes, estos valores disminuyen hasta los  $88,06 \pm 9,84 \mu\text{g}$  de proteínas/mg de peso húmedo en el Estadio 8. En los juveniles avanzado en el desarrollo y en los adultos se observa un aumento significativo en la concentración de proteína (J y A).



**Figura V.10** Concentración de proteínas solubles durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b, c, d y e) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; J: juveniles libres de desarrollo avanzado; A: ejemplares adultos (PreV).

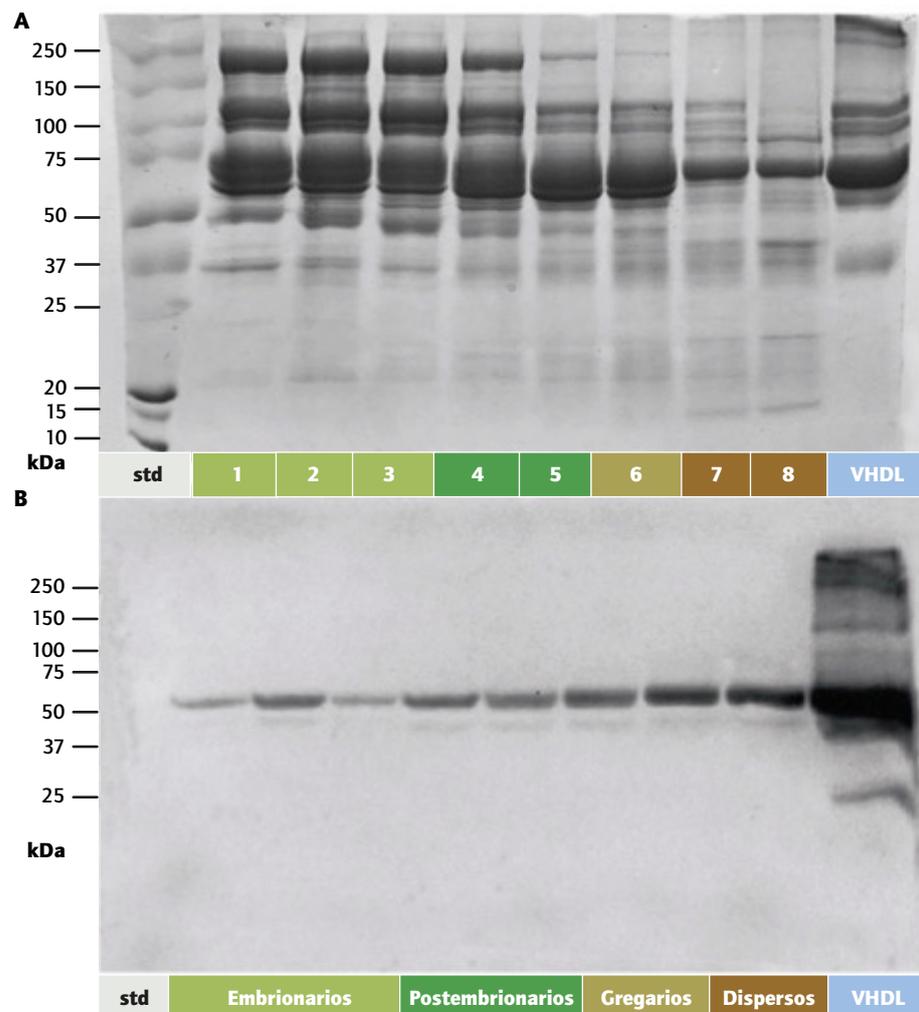
En esta sección también se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis SDS-PAGE de las proteínas solubles presentes en los diferentes estadios del desarrollo analizados. Para acompañar el análisis y la caracterización, en las presentes corridas electroforéticas se sembraron también muestras de LVI (Figura V.11A) o VHDL (Figura V.12A) de *P. pythagoricus*. En los geles que se observan en las Figuras V.11A y V.12A se sembraron  $20 \mu\text{g}$  de cada una de las muestras, indicados debajo de cada gel, y  $5 \mu\text{l}$  del estándar de proteínas de peso molecular conocido.

En la Figura V.11A y V.12A, considerando los principales polipéptidos presentes inicialmente en los huevos, que fueron previamente descritos y resaltados durante el proceso de vitelogénesis, se puede observar que durante el desarrollo embrionario los individuos presentan el mismo perfil proteico compuesto por los polipéptidos de 170 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 67 kDa, 46 kDa y 30 kDa (Estadio 1-3). Después de la eclosión, ya no se observa más el polipéptido de 75 kDa (Estadio 4), y los polipéptidos de 170 kDa y 120 kDa comienzan a disminuir hasta que dejan de ser detectados por completo antes del primer estadio emergente (Estadio 6 a 8). Los polipéptidos de bajo peso molecular se consumen de manera diferencial. El polipéptido de 30 kDa deja de ser detectado cuando el embrión eclosiona del huevo (Estadio 4) mientras que el de 46 kDa deja de observarse cuando los juveniles se dispersan (Etapa 7 y 8). Por el contrario, el polipéptido de 67 kDa se encuentra presente en todas las etapas.



**Figura V.11** (A) SDS-PAGE (4-23%) (20  $\mu$ g de cada muestra) (B) Inmunotransferencia utilizando el anticuerpo policlonal anti-LV (15  $\mu$ g de cada muestra) durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; kDa: kilodalton; std: estándar de peso molecular; LV1: lipovitellina 1 aislada del citosol de huevo de *P. pythagoricus*.

Complementando este análisis, en la Figura V.11B se presenta el análisis por Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-LV de las mismas muestras (15  $\mu\text{g}$  de cada muestra) y manteniendo el mismo orden que en la Figura V.11B. En esta figura se puede observar por inmunoreactividad la presencia de los polipéptidos de 120 kDa, 75 kDa, 46 kDa y 30 kDa de la LVI y que también pueden observarse durante el desarrollo embrionario (Estadio 1 a 3). Una vez que el embrión eclosiona se puede observar que el polipéptido de 75 kDa es consumido completamente (Estadio 4). Durante el desarrollo postembrionario el polipéptido de 120 kDa comienza a disminuir, desapareciendo por completo luego de la emergencia de los juveniles de la ooteca (Estadio 6). En los juveniles gregarios (Estadio 6) solo quedan los polipéptidos de bajo peso molecular (46 kDa y poco visible el de 30 kDa), mientras que en los juveniles dispersos no se detecta por inmunoreactividad ningún polipéptido con este anticuerpo (Estadios 7 y 8).



**Figura V.12** (A) SDS-PAGE (4-23%) (20  $\mu\text{g}$  de cada muestra) (B) Inmunotransferencia utilizando anticuerpo policlonal anti-Hc (15  $\mu\text{g}$  de cada muestra) durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; kDa: kilodalton; std: estándar de peso molecular; VHDL: Lipoproteína hemolinfática de muy alta densidad de *P. pythagoricus*.

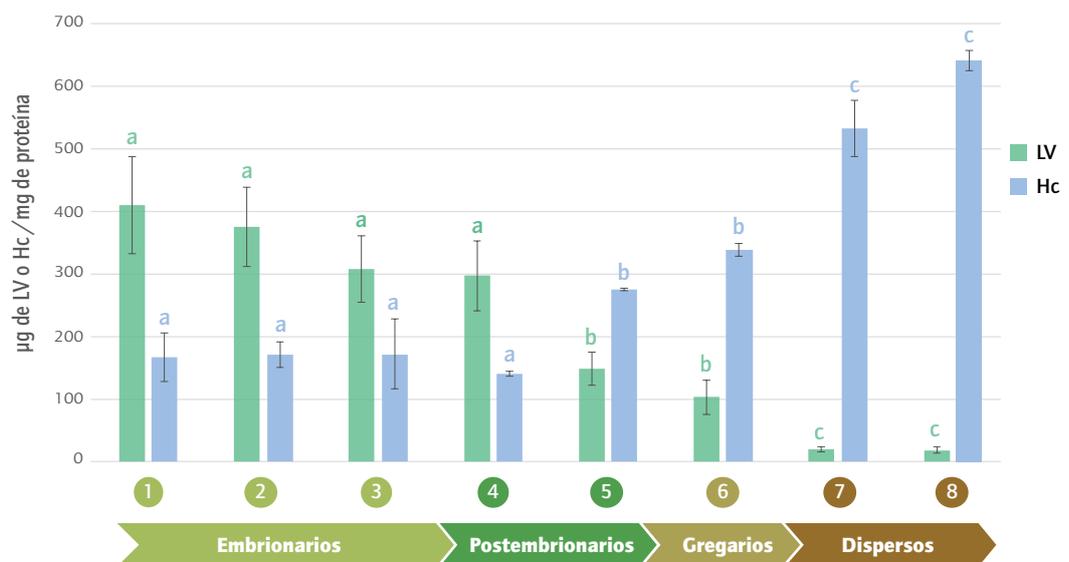
En la Figura V.12B se presenta el análisis por Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-Hc de las muestras (15  $\mu\text{g}$  de cada muestra) y manteniendo el mismo orden de muestras que en la Figura V.12A.

A partir de este análisis se puede observar la presencia del polipéptido de 67 kDa durante todas las etapas del desarrollo, tanto intraooteca como extraooteca, con una tendencia a intensificarse en las etapas dispersión (Estadio 7 y 8).

#### V4.A.b Cuantificación de lipovitelina y hemocianina

Con el objetivo de cuantificar las variaciones observadas en el contenido de LV y Hc durante el desarrollo, en la Figura V.13 se observan los resultados obtenidos a partir de la cuantificación del contenido de LV y Hc en los distintos estadios analizados (Estadio 1-8) mediante el método de ELISA utilizando los anticuerpos policlonales anti-LV y anti-Hc. Los valores se encuentran expresados como  $\mu\text{g}$  de LV por mg de proteínas y/o  $\mu\text{g}$  de Hc por mg de proteínas.

Con una concentración inicial de  $410 \pm 77,7 \mu\text{g}$  de LV/mg de proteínas (Estadio 1), se observa durante el desarrollo embrionario una tendencia a la disminución de la concentración de LV, alcanzando luego de la eclosión una concentración promedio de  $296,8 \pm 55,8 \mu\text{g}$  de LV/mg de proteínas (Estadio 4). Durante el desarrollo postembrionario hasta la emergencia de los juveniles de la ooteca, el contenido de LV disminuye significativamente alcanzando en los juveniles gregarios emergentes una concentración promedio de  $102,89 \pm 27,6 \mu\text{g}$  de LV/mg de proteínas (Estadio 6). Luego de la dispersión, estos valores se reducen a concentraciones mínimas de



**Figura V.13** Variación de la concentración de lipovitelina y hemocianina durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias  $\pm$  DE. Las diferentes letras (a, b y c) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; LV: concentración de lipovitelina; Hc: concentración de hemocianina.

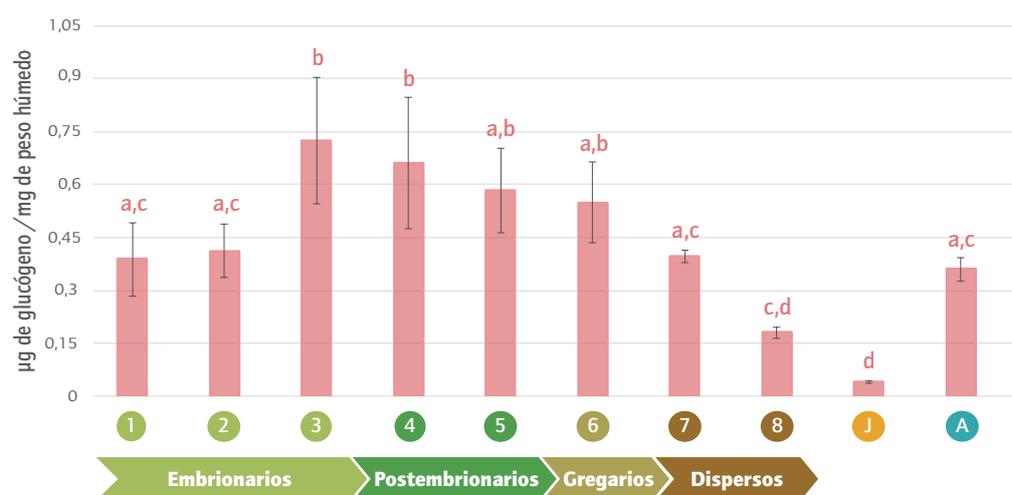
18,05 ± 5,5  $\mu\text{g}$  de LV/ mg de proteínas (Estadio 7 y 8), representando menos del 0,03% de las proteínas totales. En cuanto al contenido de Hc, durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión del huevo los valores de concentración se mantienen relativamente constantes con un promedio de 159,22 ± 27,93  $\mu\text{g}$  de Hc/mg de proteína. Posteriormente, estos valores de concentración de Hc aumentan. En los juveniles gregarios la concentración de Hc alcanza valores promedio de 338,9 ± 10,75  $\mu\text{g}$  de Hc/mg de proteínas, mientras que en el último estadio disperso (Estadio 8) llega a un valor máximo de 641,58 ± 16,47  $\mu\text{g}$  de Hc/mg de proteínas.

#### V.4.A.c Cuantificación de glucógeno.

En esta sección se presenta el análisis realizado del contenido de glucógeno durante el desarrollo de *P. pythagoricus*, el cual se cuantificó utilizando el método de Antrona modificado. Los resultados se encuentran expresados como  $\mu\text{g}$  de glucógeno por mg de peso húmedo.

En la Figura V.14 se puede observar la concentración de glucógeno durante el período embrionario, el cual alcanza valores de 0,725 ± 0,18  $\mu\text{g}$  de glucógeno/mg de peso húmedo en el último estadio embrionario analizado (Estadio 3).

Luego de la eclosión, la concentración de glucógeno disminuye gradualmente hasta el último estadio disperso (Estadio 8) alcanzando valores de 0,18 ± 0,02  $\mu\text{g}$  de glucógeno/mg de peso húmedo. Finalmente, los valores de concentración de glucógeno son notablemente más bajos en el juvenil avanzado en el desarrollo (J). En cambio, en los ejemplares adultos estos valores aumentan a valores promedios de 0,36 ± 0,04  $\mu\text{g}$  de glucógeno/mg de peso húmedo.



**Figura V.14** Concentración de glucógeno durante el desarrollo de *P. pythagoricus*. Los valores representan las medias ± DE. Las diferentes letras (a, b, c y d) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . Los números en el eje de abscisas indican los estadios analizados y las flechas los períodos del desarrollo que comprenden. 1-3: estadios embrionarios; 4 y 5: estadios postembrionarios; 6: juveniles gregarios emergentes; 7 y 8: juveniles dispersos; J: juveniles libres de desarrollo avanzado; A: ejemplares adultos (PreV).

#### V4.B. Discusión

Si bien puede darse la superposición de reacciones catabólicas y anabólicas proteicas, los cambios observados durante el desarrollo embrionario de *P. pythagoricus* indicarían que las proteínas serían una pequeña fuente de energía para los embriones. Este hecho se ha observado previamente en algunas especies de insectos y ácaros donde el contenido de proteínas no varía significativamente durante la embriogénesis (Agrell & Lundquist 1973; Kamel & Ragaa 1981; Campos *et al.* 2006). Sin embargo, esta dinámica no se observa en todas las especies de arañas. Durante el análisis del desarrollo embrionario de *P. saltans* se observó un consumo gradual de las proteínas, aún cuando los niveles de LV no disminuían (Trabalon *et al.* 2018). La ausencia de variación en la concentración de proteínas durante el desarrollo embrionario de *P. pythagoricus*, mientras el contenido de LV se consume gradualmente, sugeriría que en el desarrollo existiría un equilibrio entre la síntesis de nuevas proteínas y la degradación de las proteínas del vitelo, como se ha observado en otros artrópodos (Kamel & Ragaa 1981; Campos *et al.* 2006).

Analizando el desarrollo postembrionario de *P. pythagoricus*, Galiano (1971) describió que los juveniles que comienzan a emerger de la ooteca son capaces de producir su propia seda la cual utilizan para movilizarse ágilmente sobre el cocón. Este tipo de actividad requiere necesariamente una movilización activa de todo tipo de reserva, incluyendo las proteínas y LVs, más aún considerando que estos juveniles aún viven de las reservas del vitelo ya que no son capaces de cazar presas (Galiano 1971). En cambio, en los estadios de dispersión (Estadio 7 y 8), se produjo una disminución en el contenido de proteínas totales y un agotamiento de las reservas de LV probablemente dada por la intensa actividad de estas arañas en comparación con los juveniles gregarios (Estadio 6). Luego de la dispersión, estos juveniles pueden comenzar a cazar sus propias presas y abandonar completamente la ooteca (Galiano 1971), independencia que se refleja en el aumento del contenido de proteínas totales posiblemente debido al consumo de presas. Se ha descrito que el crecimiento de las arañas puede maximizarse a partir de dietas ricas en proteínas necesarias para producir nuevos tejidos (Jensen *et al.* 2011; Wilder 2011).

Por otra parte, a partir de los resultados de la caracterización proteica se pudo determinar el consumo diferencial de los polipéptidos de la LV. De esta manera, las subunidades de mayor peso molecular (120 y 75 kDa) de la LV se consumieron principalmente en los estadios postembrionarios, mientras que los de bajo peso molecular (46 y 30 kDa) fueron consumidos en los estadios emergentes (Figura V.11). Probablemente, durante el desarrollo, los polipéptidos de mayor peso molecular podrían encontrarse más expuestos a las enzimas proteolíticas que los de menor peso molecular, hecho que se ha registrado anteriormente en otros artrópodos donde se observó que las subunidades mayores de las LVs eran más sus-

ceptibles al ataque enzimático (Ezquieta & Vallejo 1986; Lee *et al.* 1997; Garcia *et al.* 2008). De esta manera, la proteólisis de la LV estaría vinculada a las necesidades energéticas y estructurales del organismo en desarrollo (Perona & Vallejo 1985; Perona *et al.* 1988; Lu & Warner 1991; Warner *et al.* 1995).

Hay una gran cantidad de trabajos que exponen la importancia de la Hc en el transporte de oxígeno en medio acuoso, siendo la función principal de esta proteína tanto en artrópodos como en otros invertebrados. A lo largo del tiempo, se ha demostrado la presencia de Hc en los huevos de diferentes especies de artrópodos (Busselen 1971; Gilchrist & Lee 1972; Terwilliger & Terwilliger 1982), presencia que también se pudo determinar para este modelo de araña. Como se mencionó previamente, la presencia de Hc materna en los huevos de *P. pythagoricus* posiblemente se deba a la endocitosis de la Hc por parte de los oocitos y su incorporación al vitelo. De esta manera, este contenido de Hc podría brindarle al embrión un pool inicial de esta proteína que supliera las necesidades del embrión hasta que pueda ser capaz de sintetizar la suya, más aún si consideramos que la Hc no es solo una proteína que transporta oxígeno sino también una proteína que puede almacenar esta molécula (Foelix 2011; Starrett *et al.* 2013). Durante el desarrollo de las arañas, existe un proceso llamado “inversión” durante el cual ocurren grandes cambios en la organización del cuerpo del embrión que resultan en la incorporación del vitelo (Wolff & Hilbrant 2011). De esta manera, el embrión podría incorporar este pool inicial de Hc junto con el vitelo, sosteniendo de esta forma la demanda de oxígeno que no podría satisfacerse mediante la difusión simple debido a las grandes tasas de metabolismo aeróbico involucradas durante el desarrollo embrionario (Rakshpal 1962; Ingrisich 1987). Por otra parte, esto toma más relevancia si consideramos que los huevos son estructuras pequeñas e isotérmicas con su microclima local desafiados a menudo por la escasez de oxígeno en entornos fluctuantes incluso a temperaturas ligeramente altas (Woods & Hill 2004; Woods *et al.* 2005).

Aunque no podemos descartar la síntesis temprana de Hc embrionaria, podríamos considerar que durante el desarrollo los mayores niveles de expresión de Hc se dan en etapas avanzadas como fue descrito para algunos artrópodos (Chen *et al.* 2015; Pick *et al.* 2010), incluidos algunos miembros del Subphylum Chelicerata, donde se ha observado un aumento en el contenido de Hc después de la primera muda embrionaria (Sugita & Sekiguchi 1979). El aumento en la concentración de Hc durante el desarrollo postembrionario podría permitir a los juveniles adquirir nuevas herramientas para lidiar con el entorno luego de la eclosión, ya que la Hc posee una gran variedad de funciones entre las que se destacan la participación en la defensa contra los patógenos y el transporte de lípidos, como también ser componente de la cutícula y presentar actividad fenoxidasa. Esta última función que esta asociada al proceso de esclerotización es destacable si consideramos que

en este estadio (Estadio 5) comienza a evidenciarse el proceso de pigmentación de la cutícula (Figura V.1). Aunque en varias especies de crustáceos se describe que la Hc embrionaria puede diferir de la Hc materna (Bussele 1971; Wache *et al.* 1988; Terwilliger & Dumler 2001), a partir de los datos presentados en el marco de esta tesis, se podría considerar al menos que la Hc de la descendencia presentaría la misma identidad inmunológica que la Hc de la madre como ocurre en algunos crustáceos y quelicerados (Sugita & Sekiguchi 1979; Durliat 1984; Kempter 1986).

Los carbohidratos son de gran importancia, encontrándose asociados con las Vgs formando glucoproteínas que luego son almacenadas en el vitelo y que participan activamente durante la embriogénesis (Mohamed 2000; Campos *et al.* 2006; Santos *et al.* 2008; Santana *et al.* 2014; Trabalon *et al.* 2018). Aunque el glucógeno almacenado en los huevos se consume antes de las primeras etapas embrionarias, se ha observado que el contenido del mismo puede aumentar en las últimas etapas embrionarias en *Drosophila melanogaster*, momento en el que se da la organogénesis (Yamazaki & Nusse 2002; Waltero *et al.* 2020). Esto podría asociarse a lo observado durante el desarrollo embrionario de *P. pythagoricus*, donde un aumento en la concentración de glucógeno fue observado en estadios avanzados donde la organogénesis ya era evidente (Estadio 3). A su vez, diferentes fuentes de carbohidratos, tal como el glucógeno, pueden ser importantes para la biosíntesis de quitina en etapas avanzadas de desarrollo la cual requiere grandes cantidades de glucosa (Chippendale 1985). En *P. pythagoricus* se observó un consumo gradual y constante de estos carbohidratos a partir del período postembrionario, evento previamente reportado para la araña *P. saltans* (Trabalon *et al.* 2018). Sin embargo, estas reservas en los huevos de *P. pythagoricus* no alcanzan a representar el 1%, acompañando las observaciones previas donde se ha descrito que la glicosilación de las LVs en esta especie era mínima representando menos del 2% (Laino *et al.* 2011b). Sin embargo, el porcentaje de glicosilación de la LV de la araña *S. malitiosa* fue mayor (3,6%) siendo el contenido total un 17% de la masa de los huevos (Laino *et al.* 2013), mientras que la araña *P. saltans* muestra un nivel intermedio con valores de 2,7% (Trabalon *et al.* 2018).

A partir de los resultados expuestos y las comparaciones realizadas, es claro que el conocimiento de los recursos energéticos que sostienen el desarrollo embrionario y postembrionario en las arañas es bastante limitado. Una de las razones principales es el escaso estudio del vitelo de estos organismos, ya que en algunas especies de artrópodos se estudian las Vgs/ LVs como la única o principal fuente de energía (Lee 1991; Cunningham *et al.* 2001; Garcia *et al.* 2006, 2008; Walker *et al.* 2006), sin embargo, se sabe que las LVs no son el único recurso. En los huevos de la araña *S. malitiosa* se ha determinado que un gran porcentaje de los lípidos no se encuentra relacionado o vinculados a las LVs (Laino *et al.* 2013). A pesar de la pre-

sencia de una gran cantidad de estudios sobre el rol de las diferentes biomoléculas durante el desarrollo de varias especies de artrópodos, los escasos estudios en arañas y las diferentes maneras en que los autores expresan los resultados hacen que la interpretación, comparación y articulación de los mismos sea bastante complejo y se convierta en un gran desafío para realizar generalizaciones del proceso.

## V.5 Conclusiones generales

A partir de las hipótesis planteadas, los objetivos propuestos y los resultados obtenidos con la metodología aplicada en el presente capítulo, podemos resaltar las siguientes conclusiones:

- Durante el desarrollo de *P. pythagoricus*, en condiciones de temperatura y humedad controladas, el contenido de agua no varía significativamente.
- Los fosfolípidos, especialmente la fosfatidiletanolamina, son el principal recurso lipídico consumido durante el desarrollo postembrionario.
- Los triacilgliceroles se consumen cuando los juveniles comienzan a dispersarse.
- Los ácidos grasos libres aumentan durante los estadios postembrionarios hasta la primera muda luego de la emergencia (Estadio 7).
- Luego de la eclosión el glucógeno se consume gradualmente, pero representa menos del 1% de las reservas.
- Las reservas de lipovitelininas se consumen gradualmente durante el desarrollo.
- El consumo de las lipovitelininas es diferencial: Las subunidades de mayor peso molecular se consumen principalmente durante el desarrollo postembrionario, mientras que las subunidades de bajo peso molecular se consumen durante las etapas posteriores a la emergencia, agotándose estas reservas luego de la dispersión.
- El contenido de hemocianina aumenta a partir de los estadios postembrionarios avanzados.

## VI Conclusiones y consideraciones finales

En los organismos ovíparos, la vitelogénesis representa el proceso estacionario más importante mediante el cual las hembras acumulan todos los recursos necesarios que serán transferidos a los huevos. De esta manera, este proceso en el que intervienen diferentes tipos de biomoléculas asegura que todos los recursos acumulados en los ovarios y destinados a la producción de los huevos, permitan el desarrollo adecuado y la supervivencia de la descendencia.

A pesar de ser considerado uno de los grupos de animales más importantes y diversos, el estudio de la vitelogénesis y la vinculación de este proceso con el desarrollo en las arañas ha sido relegado durante mucho tiempo. Esta problemática ha impedido el aporte de estudios que analicen los aspectos bioquímicos y fisiológicos de estos procesos complejos, los cuales son necesarios para comprender de manera integral y global la reproducción y el desarrollo de este grupo de artrópodos.

A partir de los objetivos planteados, la metodología aplicada y los resultados obtenidos, este trabajo de tesis permitió analizar diferentes aspectos bioquímicos que ocurren durante la vitelogénesis de *P. pythagoricus* y, por primera vez para un modelo de araña, permitió vincular la vitelogénesis con el desarrollo determinando los diferentes recursos que se movilizan y se consumen durante los distintos períodos que comprende este proceso.

A modo de conclusión podemos destacar que durante la vitelogénesis las hembras de *P. pythagoricus* sufren cambios anatómicos, aumentando progresivamente el peso corporal y el tamaño del opistosoma. Acompañando estos cambios, se produce un incremento del peso de las gónadas y del diámetro de los oocitos, los cuales llegan a ocupar gran parte del ovario y del opistosoma. A su vez, el índice gonadosomático calculado durante las distintas etapas de la vitelogénesis, y acompañado de un análisis morfológico y morfométrico, sería un buen parámetro para determinar el estado reproductivo de las hembras de *P. pythagoricus* y podría ser aplicado para futuros estudios.

Durante este proceso se incrementa el contenido de lípidos totales en los divertículos intestinales, siendo siempre los triacilgliceroles los lípidos mayoritarios, y se observa un aumento en la concentración de proteínas totales. Este aumento se acompaña de un incremento en el volumen hemolinfático en las hembras vitelogénicas tardías y en el contenido de estas biomoléculas en la hemolinfa, las cuales serán finalmente transportadas y acumuladas en los oocitos. Finalmente, las hembras acumulan cantidades considerables de lípidos y proteínas en las gónadas y se observa un incremento en el tamaño de los gránulos de vitelo en los oocitos. Dentro de los diferentes componentes del vitelo, las lipovitelinas de *P. pythagoricus* son un recurso fundamental que se consume de manera gradual durante el desarrollo hasta que los juveniles se dispersan. Los componentes proteicos de las lipovitelinas presentan polipéptidos que parecen provenir principalmente del ovario (endógeno, 120, 75, 46 y 30 kDa), y, en menor medida, del aporte extraovárico de los divertículos intestinales (170 kDa) y de la hemolinfa (67 kDa con identidad de hemocianina). Futuros estudios serán necesarios para comprobar que estos sean los sitios de síntesis de estas subunidades.

En cuanto al contenido de lípidos, los ovarios se cargan de cantidades considerables de fosfolípidos, especialmente de fosfatidiletanolamina, y de triacilgliceroles, reservas que serán transferidas a los huevos y consumidas posteriormente por los juveniles en desarrollo. Asimismo, los ovarios acumulan cantidades sustanciales de hemocianina durante la vitelogénesis, la cual formaría parte de los gránulos de vitelo como componente de la LV2. La hemocianina acumulada progresivamente brindaría a los embriones de un pool inicial de esta importante proteína hasta que los individuos puedan generar su propia hemocianina en estadios más avanzados del desarrollo.

Luego de la puesta, en las hembras postvitelogénicas disminuye considerablemente el tamaño del opistosoma, el peso corporal y se produce una reducción en las concentraciones de lípidos y proteínas en los ovarios. Asimismo, el contenido de lípidos de los divertículos intestinales disminuye considerablemente en las hembras postvitelogénicas, reduciéndose el gran contenido de triacilgliceroles que presentaba este órgano en etapas anteriores. De esta manera, parte de los recursos acumulados durante la vitelogénesis podrían darse en virtud de sustentar el metabolismo de las hembras durante la oviposición y el posterior período de mantenimiento y cuidado de la ooteca. Esta hipótesis se puede enfatizar si consideramos también que durante esta etapa se observan nuevos oocitos previtelogénicos que marcarían el inicio de un nuevo ciclo de este proceso, implicando el requerimiento de la movilización de las reservas de las hembras.

Durante el desarrollo embrionario de *P. pythagoricus* se comienzan a consumir de manera gradual y constante las lipovitelinas presentes en el vitelo. Sin

embargo, el mayor consumo y movilización de los distintos recursos acumulados durante el proceso de vitelogénesis se produce a partir del período postembrionario. En este período los juveniles movilizan principalmente las reservas de fosfolípidos previamente acumulados por las hembras, especialmente la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, mientras que al mismo tiempo se observa el consumo de las subunidades de mayor peso molecular de las lipovitelinas, y comienzan a movilizarse las escasas reservas de glucógeno. En etapas avanzadas del desarrollo, cuando los juveniles comienzan a adquirir cierta pigmentación cuticular, se observa un incremento de la concentración de hemocianina la cual aumenta hasta la dispersión de los juveniles.

Una vez que las arañas emergen de la ooteca, los juveniles adquieren cierta capacidad de locomoción que los hace considerablemente más activos. A partir de estos estadios comienzan a movilizarse las reservas de triacilglicerol con el consiguiente aumento significativo de los niveles de ácidos grasos libres. A su vez, se intensifica el consumo de las subunidades de bajo peso molecular de las lipovitelinas, las cuales se agotan completamente una vez que los juveniles se dispersan. En este período, disminuye la concentración de las principales biomoléculas y reservas acumuladas durante la vitelogénesis y las arañas se dispersan abandonando completamente la ooteca e independizándose. A partir de este momento hasta la vida adulta, las arañas mantienen estos niveles bajos de concentraciones de las principales biomoléculas analizadas, destacándose solo el aumento en la concentración de las proteínas y de los triacilglicerol respecto a los juveniles dispersos.

A partir de todo lo expuesto en este trabajo de tesis y lo concluido respecto a diferentes aspectos bioquímicos de estos procesos esenciales analizados, es importante enfatizar la necesidad de futuras investigaciones que se aborden de manera interdisciplinaria y que impliquen la generación de nuevos aportes donde se analicen distintos aspectos de forma global e integral que enriquezcan el conocimiento sobre este destacable grupo de artrópodos

# Bibliografía

## A

- Abdu U., Yehezkel G., & Sagi A. **2000**. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, *37*(1), 75-83.
- Abid Ali S., Gunter Grossmann J., Abbasi A., & Voelter W. **2007**. Structural and conformational analysis of scorpion (*Buthus indicus*) hemocyanin using low resolution techniques. *Protein peptide lett.*, *14*(5), 481-488.
- Ackman R.G., McLeod C.A., & Banerjee A.K. **1990**. An overview of analyses by Chromarod-latroscan TLC-FID. *JPC-J Planar Chromat*, *3*, 450-490.
- Adachi K., Endo H., Watanabe T., Nishioka T., & Hirata T. **2005**. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. *Pigm. Cell. Res.*, *18*(2), 136-143.
- Agrell I.P., & Lundquist A.M. **1973**. Physiological and biochemical changes during insect development. En: Rockstein M. (eds) *The physiology of insecta*. *Academic Press*, pp. 159-247.
- Aguilera F., McDougall C., & Degnan B.M. **2013**. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evol. Biol.*, *13*(1), 96.
- Aguirre S.A., Frede S., Rubiolo E.R., & Canavoso L.E. **2008**. Vitellogenesis in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas' disease. *J. Insect Physiol.*, *54*(2), 393-402.
- Akiyama-Oda Y., & Oda H. **2003**. Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. *Development*, *130*(9), 1735-1747.
- Akiyama-Oda Y., & Oda H. **2006**. Axis specification in the spider embryo: dpp is required for radial-to-axial symmetry transformation and sog for ventral patterning. *Development*, *133*(12), 2347-2357.
- Albessard E., Mayzaud P., & Cuzin-Roudy J. **2001**. Variation of lipid classes among organs of the northern krill *Meganyctiphanes norvegica*, with respect to reproduction. *Comp. Biochem. Phys. A*, *129*(2-3), 373-390.
- Andersen S.O. **1979**. Biochemistry of insect cuticle. *Annu. Rev. Entomol.*, *24*(1), 29-59.
- Anderson J.F. **1978**. Energy content of spider eggs. *Oecologia*, *37*(1), 41-57.
- Anderson J.F. **1990**. The size of spider eggs and estimates of their energy content. *J. Arachnol.*, *18*(1), 73-78.
- André J. **1958**. Etude morphologique au microscope électronique de l'ovocyte de la Tégénaire (Aranéide). *Bull. Micros. Appel*, *8*, 93-97.
- André J., & Rouiller C. **1957**. The ultrastructure of the vitelline body in the oocyte of the spider *Tegenaria parietina*. *J. Biophys. Biochem. Cy.*, *3*(6), 977.
- Alliel P.M., Dautigny A., Lamy J., Lamy J.N., & Jollés P. **1983**. Cell-free synthesis of hemocyanin from the scorpion *Androctonus australis*. Characterization of the translation products by monospecific antisera. *Eur. J. Biochem.*, *134*(3), 407-414.

- Arcos-Ortega G.F., Serrano-Silvas S.R., Rodríguez-Jaramillo C., Acuña-Gómez E.P., Schofield-Astorga D.C., & Olave-Solar C.D. **2019**. Oogenesis of *Lithodes santolla*: histological and histochemical characterization. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 47(3), 480-491.
- Armas, L.F., Alegre Barroso, A., Barba Díaz, R., Rodríguez-Cabrera, T.M., Alayón García, G. & Pérez González, A. **2017**. Arácnidos. En: Mancina C.A. & Cruz D.D.(eds) Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas. *Editorial AMA*, La Habana, pp. 502.
- Armendano A., & González A. **2010**. Comunidad de arañas (Arachnida, Araneae) del cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) en Buenos Aires, Argentina. *Rev. Biol. Trop.*, 58(2), 757-767.
- Arrese E.L., & Soulages J.L. **2010**. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Ann. Rev. Entomol.*, 55, 207-225.
- Austad S.N. **1984**. Evolution of sperm priority patterns in spiders. En: Smith R.L. (ed) Sperm competition and the evolution of animal mating systems. *Academic Press*, pp. 223-249.
- Auttarat J., Phiriyangkul P., & Utarabhand P. **2006**. Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguensis*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 143(1), 27-36.
- Avarre J.C., Michelis R., Tietz A., & Lubzens E. **2003**. Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs. *Biol. Reprod.*, 69(1), 355-364.
- Avarre J.C., Lubzens E., & Babin P.J. **2007**. Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol. Biol.*, 7(1), 3.
- Averdam A., Markl J., & Burmester T. **2003**. Subunit sequences of the 4×6-mer hemocyanin from the golden orb-web spider, *Nephila inaurata*: Intramolecular evolution of the chelicerate hemocyanin subunits. *Eur. J. Biochem.*, 270(16), 3432-3439.
- Babczyńska A., Binkowski M., Bednarek A. *et al.* **2014**. X-ray microtomography for imaging of developing spiders inside egg cocoons. *Arthropod Struct. Dev.*, 43(6), 595-603.
- Babin P.J., Bogerd J., Kooiman F.P., Van Marrewijk W.J., & van der Horst D.J. **1999**. Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J. Mol. Evol.*, 49(1), 150-160.
- Baird S., Kelly S.M., Price N.C. *et al.* **2007**. Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1774(11), 1380-1394.
- Ballweber P., Markl J., & Burmester T. **2002**. Complete hemocyanin subunit sequences of the hunting spider *Cupiennius salei*: recent hemocyanin remodeling in entelegyne spiders. *J. Biol. Chem.*, 277(17), 14451-14457.
- Barker P., & Gibson R. **1979**. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol.*, 17, 285-346.
- Bednarek A.W., Sawadro M.K., Nicewicz L., & Babczyńska A.I. **2019**. Vitellogenins in the spider *Parasteatoda tepidariorum*—expression profile and putative hormonal regulation of vitellogenesis. *BMC Evol. Biol.*, 19(1), 4.
- Beenackers A.M.T., van der Horst D.J., & van Marrewijk W.A. **1985**. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog. Lipid Res.*, 24(1), 19-67.
- Beninger P.G. **1984**. Seasonal variations of the major lipid classes in relation to the reproductive activity of two species of clams raised in a common habitat: *Tapes decussatus* L.(Jeffreys, 1863) and *T. philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 79(1), 79-90.
- Bik E., Ishigaki M., Blat A. *et al.* **2020**. Lipid Droplet Composition Varies Based on Medaka Fish Eggs Development as Revealed by NIR-, MIR-, and Raman Imaging. *Mol.*, 25(4), 817.

- Blackburn D.G. **1999**. Viviparity and oviparity: evolution and reproductive strategies. En: Knobil E. & Neill J.D. (eds). Encyclopedia of reproduction. *Academic Press*, pp. 994-1003.
- Blomquist G.J., & Bagnères A.G. **2010**. Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology. *Cambridge University Press*, pp. 506.
- Bolaños N., Lutz G., & Herrera C.H. **2003**. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. *Editorial Universidad de Costa Rica*, pp. 140.
- Boldbaatar D., Umemiya-Shirafuji R., Liao M., Tanaka T., Xuan X., & Fujisaki K. **2010**. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. *J. Insect Physiol.*, 56(11), 1587-1598.
- Bownes M., & Hames B.D. **1977**. Accumulation and degradation of three major yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, 200(1), 149-156.
- Bownes M. **1982**. Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Q. Rev. Biol.*, 57(3), 247-274.
- Bownes M., Ronaldson E., Mauchline D., & Martinez A. **1993**. Regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Int. J. Insect Morphol.*, 22(2-4), 349-367.
- Brennan M.D., Weiner A.J., Goralski T.J., & Mahowald A.P. **1982**. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 89(1), 225-236.
- Briegel H. **1990**. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.*, 36(3), 165-172.
- Bristowe W.S. **1941**. The comity of spiders, Vol. II. *Ray Society*, pp. 230-560.
- Brown S.G. **1985**. Mating behavior of the golden-orb-weaving spider, *Nephila clavipes*: II. Sperm capacitation, sperm competition, and fecundity. *J. Comp. Psychol.*, 99(2), 167.
- Budd G.E., & Telford M.J. **2009**. The origin and evolution of arthropods. *Nature*, 457(7231), 812-817.
- Bulet P., Stöcklin R., & Menin L. **2004**. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, 198(1), 169-184.
- Burchfield H.P., & Storrs E.E. **1975**. Analysis for organophosphorus insecticides and metabolites. *J. Chromatog. Sci.*, 13(5), 202-211.
- Burmester T. **2001**. Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol. Biol. Evol.*, 18(2), 184-195.
- Burmester T. **2002**. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J. Comp. Physiol. B*, 172(2), 95-107.
- Busselen P. **1971**. The presence of haemocyanin and of serum proteins in the eggs of *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* and *Portunus holsatus*. *Comp. Biochem. Phys. A*, 38(2), 317-328.
- Byrne B.M., Gruber M., & Ab G. **1989**. The evolution of egg yolk proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 53(1), 33-69.
- C** Campos R.E., & Sy V.E. **2006**. Variation in the hatching response of *Ochlerotatus albifasciatus* egg batches (Diptera: Culicidae) in temperate Argentina. *Mem. I. Oswaldo Cruz*, 101(1), 47-53.
- Canavoso L.E., Jouni Z.E., Karnas K.J., Pennington J.E., & Wells M.A. **2001**. Fat metabolism in insects. *Ann. Rev. Nut.*, 21(1), 23-46.
- Carvalho M., Sampaio J.L., Palm W., Brankatschk M., Eaton S., & Shevchenko A. **2012**. Effects of diet and development on the *Drosophila lipidome*. *Mol. Syst. Biol.*, 8(1), 600.
- Castille F.L., & Lawrence A.L. **1989**. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus*

- (L.). *J. Crustacean Biol.*, 9(2), 202-211.
- Cerenius L., Jiravanichpaisal P., Liu H.P., & Soderhall I. **2010**. Crustacean immunity. En: Söderhäll K. (ed) In Invertebrate immunity. *Springer*, pp. 239-259.
- Chang C.F., Shih T.W., & Hong H.H. **1993**. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergh*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 105(3-4), 609-615.
- Chang C.F., Lee F.Y., Huang Y.S., & Hong T.H. **1994**. Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn, *Penaeus monodon*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 25(3), 185-191.
- Chapman A.D. **2009**. Numbers of living species in Australia and the world, 2nd ed. *Report for the Australian Biological Resources Study*, pp. 80.
- Charniaux-Cotton H. **1985**. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *Am. Zool.*, 25(1), 197-206.
- Chen B., Ma R., Ma G. *et al.* **2015**. Haemocyanin is essential for embryonic development and survival in the migratory locust. *Insect Mol Biol.*, 24(5), 517-527.
- Chen H.Y., Ho S.H., Chen T.I., Soong K., Chen I.M., & Cheng J.H. **2007**. Identification of a female-specific hemocyanin in the mud crab, *Scylla olivacea* (Crustacea: Portunidae). *Zool. Stud.*, 46(2), 194.
- Chen J.S., Sappington T.W., & Raikhel A.S. **1997**. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J. Mol. Evol.*, 44(4), 440-451.
- Chino H., Downer R.G.H., Wyatt G.R., & Gilbert L.I. **1981**. Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect haemolymph. *Insect Biochem.*, 11(4), 491.
- Chino H., Yamagata M., & Sato S. **1977**. Further characterization of lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.*, 7(2), 125-131.
- Chinzei Y., Chino H., & Takahashi K. **1983**. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Comp. Physiol.*, 152(1), 13-21.
- Chippendale G.M. **1985**. Insect embryogenesis, morphology, physiology, genetical and molecular aspects. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. *Pergamon Press*, pp. 319-385.
- Choi Y.S., & Moon M.J. **2003**. Fine structure of the ovarian development in the Orb-web Spider, *Nephila clavata*. *Entomol. Res.*, 33(1), 25-32.
- Charniaux-Cotton H. **1985**. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *Am. Zool.*, 25(1), 197-206.
- Clarke A., Skadsheim A., & Holmes L.J. **1985**. Lipid biochemistry and reproductive biology in two species of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda). *Mar. Biol.*, 88(3), 247-263.
- Coates C.J., Bradford E.L., Krome C.A., & Nairn J. **2012**. Effect of temperature on biochemical and cellular properties of captive *Limulus polyphemus*. *Aquaculture*, 334, 30-38.
- Coates C.J., & Nairn J. **2014**. Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev Comp. Immunol.*, 45(1), 43-55.
- Coates C.J., & Decker H. **2017**. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cell Mol. Life Sci.*, 74(2), 293-317.
- Coddington J.A. **2005**. Phylogeny and classification of spiders. En: Ubick D, Cushing P. & Paquin P. (eds) *Spiders of North America: an identification manual*. *American Arachnology Society*, pp. 18-24

- Coddington J.A., & Colwell R.K. **2001**. Arachnids. En: Levin S.A. (ed) Encyclopedia of Biodiversity. *Academic Press*, pp. 199-218
- Coddington J.A., Giribet G., Harvey M.S., Prendini L., & Walter D.E. **2004**. Arachnida. En Cracraft J. & Donoghue M.J. (eds.) Assembling the Tree of Life. *Oxford University Press*, pp. 296-318.
- Cong Y., Zhang Q., Woolford D. *et al.* **2009**. Structural mechanism of SDS-induced enzyme activity of scorpion hemocyanin revealed by electron cryomicroscopy. *Structure*, 17(5), 749-758.
- Cordeiro F.A., Amorim F.G., Anjolette F.A., & Arantes E.C. **2015**. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *J. Ven. Anim. Toxins*, 21(1), 24.
- Costa F.G., & Capocasale R.M. **1985**. La producción de ootecas de *Lycosa malitiosa* Tullgren (Araneae, Lycosidae) III. Distribución de las oviposiciones en el tiempo. *Aracnologia (Montevideo)*, 5, 1-14.
- Costa F.G., & Pérez-Miles F. **2002**. Reproductive biology of uruguayan theraphosids (Araneae, Mygalomorphae). *J. Arachnol.*, 30(3), 571-587.
- Costa-Paiva E.M., Schrago C.G., Coates C.J., & Halanych K.M. **2018**. Discovery of novel hemocyanin-like genes in Metazoans. *Biol. Bull.*, 235(3), 134-151.
- Craig C.L., & Catherine L. **2003**. Spiderwebs and silk: tracing evolution from molecules to genes to phenotypes. *Oxford University Press*, pp. 256.
- Cuff M.E., Miller K.I., van Holde K.E., & Hendrickson W.A. **1998**. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, 278(4), 855-870.
- Cunningham M., Pollero R., & Gonzalez A. **1994**. Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free acids and triacylglycerols as the major lipid classes by a high-density lipoprotein fraction isolated from plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 109(2-3), 333-338.
- Cunningham M., & Pollero R.J. **1996**. Characterization of lipoprotein fractions with high content of hemocyanin in the hemolymphatic plasma of *Polybetes pythagoricus*. *J. Exp. Zool.*, 274(5), 275-280.
- Cunningham M., Gómez C., & Pollero R. **1999**. Lipid binding capacity of spider hemocyanin. *J. Exp. Zool.*, 284(4), 368-373.
- Cunningham M., González A., & Pollero R. **2000**. Characterization of lipoproteins isolated from the hemolymph of the spider *Latrodectus mirabilis* (Araneae, Theridiidae). *J. Arachnol.*, 28(1), 49-55.
- Cunningham M., Garcia F., & Pollero R.J. **2007**. Arachnid lipoproteins: comparative aspects. *Comp. Biochem. Phys. C*, 146(1-2), 79-87.
- Cunningham M., Laino A., Romero S., & Garcia C.F. **2020**. Arachnid Hemocyanins. En: Hoeger U. & Harris J.R. (eds) Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. *Springer*, pp. 219-231.
- D'Abramo L.R., Conklin D.E., & Akiyama D.M. **1997**. Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, Vol. 6. *World Aquaculture Society*, pp. 587.
- Dadzie S., & Wangila B.C.C. **1980**. Reproductive biology, length-weight relationship and relative condition of pond raised *Tilapia zilli* (Gervais). *J. Fish Biol.*, 17(3), 243-253.
- Damsgaard C., Fago A., Hagner-Holler S., Malte H., Burmester T., & Weber R.E. **2013**. Molecular and functional characterization of hemocyanin of the giant African millipede, *Archispirostreptus gigas*. *J. Exp. Biol.*, 216(9), 1616-1623.

- Dautel H., & Kahl O. **1999**. Ticks (Acari: Ixodoidea) and their medical importance in the urban environment. En: Proceedings of the Third International Conference on Urban Pests, 19-22, p.p. 73-82
- Dawaliby R., Trubbia C., Delporte C.R. *et al.* **2016**. Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, 291(7), 3658-3667.
- Deb R., Sajjanar B., Devi K. *et al.* **2013**. Feeding animals with GM crops: Boon or bane?. *Indian J. Biotechnol.*, 12, 311-322.
- Decker H., & Rimke T. **1998**. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 273(40), 25889-25892.
- Decker H., & Tuzek F. **2000**. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences*, 25(8), 392-397.
- Decker H., Ryan M., Jaenicke E., & Terwilliger N. **2001**. SDS-induced Phenoloxidase Activity of Hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.*, 276(21), 17796-17799.
- de Oliveira P.R., Bechara G.H., Denardi S.E., Nunes É.T., & Mathias M.I.C. **2005**. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.*, 110(2), 146-156.
- de Oliveira P.R., Mathias M.I.C., & Bechara G.H. **2007**. Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch, 1844)(Acari: Ixodidae): role for pedicel cells. *Vet. Parasitol.*, 143(2), 134-139.
- Denardi S.E., Bechara G.H., de Oliveira P.R., Nunes E.T., Saito K.C., & Mathias M.I.C. **2004**. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, 125(3-4), 379-395.
- Depledge M.H., & Bjerregaard P. **1989**. Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 43(2), 207-223.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., van Dorsselaer A., Rodriguez J., & Bachere E. **1997**. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, 272(45), 28398-28406.
- Dhadialla T.S., & Raikhel A.S. **1990**. Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *J Biol. Chem.*, 265(17), 9924-9933.
- Di Cosmo A., Di Cristo C., & Paolucci M. **2001**. Sex steroid hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle. *J. Exp. Zool.*, 289(1), 33-47.
- Dolashka-Angelova P., Lieb B., Velkova L. *et al.* **2009**. Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Bioconjugate Chem.*, 20(7), 1315-1322.
- Don-Wheeler G., & Engelmann F. **1997**. The biosynthesis and processing of vitellogenin in the fat bodies of females and males of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem. Mol.*, 27(11), 901-918.
- Durliat M. **1984**. Occurrence of plasma proteins in ovary and egg extracts from *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 78(3), 745-753.
- E** Eberhard W.G., & Huber B.A. **2010**. Spider genitalia: precise maneuvers with a numb structure in a complex lock. En: Leonard J.L. & Córdoba-Aguilar A. (eds) The evolution of primary sexual characters in animals. *Oxford University Press*, pp. 249-284.
- Edgecombe G.D., & Legg D.A. **2014**. Origins and early evolution of arthropods. *Palaeontology*, 57(3), 457-468.

## F

- El-Sherif S.S., El-Khodary G.M., & Ghonim A.Z. **2012**. Ovarian cycle and scanning electron micrographs of the spawned egg of female mantis shrimp *Oratosquilla massavensis* (Alexandria, Egypt). *J. Basic. Appl. Zool.*, *65*(2), 116-124.
- Engvall E., & Perlmann P. **1972**. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, *109*(1), 129-135.
- Eernisse D.J., Terwilliger N.B., & Terwilliger R.C. **1988**. The red foot of a lepidopleurid chiton: Evidence for tissue hemoglobins. *Veliger*, *30*(3), 244-247.
- Ezquieta B., & Vallejo C.G. **1986**. Lipovitellin inhibition of *Artemia* trypsin-like proteinase: a role for a storage protein in regulating proteinase activity during development. *Arch. Biochem. Biophys.*, *250*(2), 410-417.
- Fahrenheit W.H. **1970**. The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *J. Cell. Biol.*, *44*(2), 445.
- Fan Y., Eliyahu D., & Schal C. **2008**. Cuticular hydrocarbons as maternal provisions in embryos and nymphs of the cockroach *Blattella germanica*. *J. Exp. Biol.*, *211*(4), 548-554.
- Fatima H., Ayub Z., Ali S.A., & Siddiqui G. **2013**. Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). *Türk J. Zool.*, *37*(3), 334-347.
- Fernandez-Moran H., Van Bruggen E., & Ohtsuki M. **1966**. Macromolecular organization of hemocyanins and apohemocyanins as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, *16*(1), 191-207.
- Ferré L.E. **2012**. Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decápoda: Parastacidae): ensayos *in vitro* e *in vivo* (Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Ferré L.E., Medesani D.A., García C.F., Grodzielski M., & Rodríguez E.M. **2012**. Vitellogenin levels in hemolymph, ovary and hepatopancreas of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) during the reproductive cycle. *Rev. Biol. Trop.*, *60*(1), 253-261.
- Ferretti N., Pompozzi G., Copperi S., Pérez-Miles F., & González A. **2012**. Mygalomorph spider community of a natural reserve in a hilly system in central Argentina. *J. Insect Sci.*, *12*(1), 31.
- Fielder D.R., Rao K.R., & Fingerman M. **1971**. A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as revealed by disc electrophoresis. *Comp. Biochem. Phys. B*, *39*(2), 291-297.
- Figueiredo J., Lin J., Anto J., & Narciso L. **2012**. The consumption of DHA during embryogenesis as an indicative of the need to supply DHA during early larval development: a review. *J. Aquac. Res. Dev.*, *3*(5), 1.
- Foelix R. **2011**. Biology of spiders. *Oxford University Press*, pp. 428.
- Folch J., Lees M., & Stanley G.S. **1957**. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, *226*(1), 497-509.
- Forster R.R., & Platnick N.I. **1977**. A review of the spider family Symphytognathidae (Arachnida, Araneae). Una revisión de la familia de arañas Symphytognathidae (Arachnida, Araneae). *Am. Mus. Novit.*, 2619, 1-29.
- Fowler H.G., & Gobbi N. **1988**. Communication and synchronized molting in a colonial araneid spider, *Eriophora bistrata*. *Experientia*, *44*(8), 720-722.
- Francke O.F. **2014**. Biodiversidad de Arthropoda (Chelicerata: Arachnida ex Acari) en México. *Rev. Mex. Biodivers.*, *85*, 408-418.

## G

- Fredericq L. **1878**. Sur l'hémocyanine, substance nouvelle du sang de poulpe. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 137, 996-998.
- Ferenz H.J. **1985**. Triacylglycerol synthesis in locust oocytes. *Naturwissenschaften*, 72(11), 602-603.
- Fruttero L.L., Frede S., Rubiolo E.R., & Canavoso L.E. **2011**. The storage of nutritional resources during vitellogenesis of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the pathways of lipophorin in lipid delivery to developing oocytes. *J. Insect. Physiol.*, 57(4), 475-486.
- Fruttero L.L., Leyria J., & Canavoso L.E. **2017**. Lipids in Insect Oocytes: From the Storage Pathways to Their Multiple Functions. *Results Probl. Cell Differ.*, 63, 403-434 .
- Galiano M.E. **1971**. El desarrollo postembrionario larval en especies de género *Polybetes* Simon, 1897 (Araneae, Sparassidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 28, 221-225.
- Galiano, M.E. **1979**. Datos adicionales sobre el ciclo vital de *Polybetes pythagoricus* (Holmberg, 1874) (Araneae, Eusparassidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 35, 75-86.
- García C.F., Cunningham M., González-Baró M.R., Garda H., & Pollero R. **2002**. Effect of fenitrothion on the physical properties of crustacean lipoproteins. *Lipids*, 37(7), 673-679.
- García F., Gonzalez-Baró M.R., Garda H., Cunningham M., & Pollero R. **2004**. Fenitrothion-induced structural and functional perturbations in the yolk lipoproteins of the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, 39(4), 389-396.
- García F., Cunningham M.L., Garda H., & Heras H. **2008**. Embryo lipoproteins and yolk lipovitellin consumption during embryogenesis in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae). *Comp. Biochem. Phys. B*, 151(3), 317-322.
- García C.F., & Heras H. **2012**. Vitellogenin and Lipovitellin from the prawn *Macrobrachium borellii* as hydrocarbon pollution biomarker. *Mar. Pollut. Bull.*, 64(8), 1631-1636.
- García-Guerrero M., Villarreal H., & Racotta I.S. **2003**. Effect of temperature on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comp. Biochem. Phys. A*, 135(1), 147-154.
- Gardiner M.S. **1927**. Oogenesis in *Limulus polyphemus*, with especial reference to the behavior of the nucleolus. *J. Morphol.*, 44(2), 217-264.
- Geister T.L., Lorenz M.W., Hoffmann K.H., & Fischer K. **2008**. Adult nutrition and butterfly fitness: effects of diet quality on reproductive output, egg composition, and egg hatching success. *Front. Zool.*, 5(1), 10.
- Geister T.L., Lorenz M.W., Hoffmann K.H., & Fischer K. **2009**. Energetics of embryonic development: effects of temperature on egg and hatchling composition in a butterfly. *J. Comp. Physiol. B*, 179(1), 87-98.
- Gellissen G., Hennecke R., & Spindler K.D. **1991**. The site of synthesis of hemocyanin in the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Experientia*, 47(2), 194-195.
- Gerschman B.S., & Schiapelli R.D. **1965**. El género *Polybetes* Simon, 1897, en la Argentina (Araneae-Sparassidae). *Revista del Museo argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (Ent.)*, 1, 313-339.
- Gibbs A.G. **1998**. Water-proofing properties of cuticular lipids. *Am. Zool.*, 38(3), 471-482.
- Gilchrist B.M., & Lee W.L. **1972**. Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson, 1857). *Comp. Biochem. Phys. B*, 42(2), 263-294.
- Giorgi F., Snigirevskaya E.S., & Raikhel A.S. **2005**. The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion. En: Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. (eds) *Progress in Vitellogenesis: Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. XII. *Science Publishers, Inc., Enfield, USA- Plymouth, UK*, pp.

33-68

- Glenn J.D., King J.G., & Hillyer J.F. **2010**. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J. Exp. Biol.*, 213(4), 541-550.
- González A. **1981**. Desarrollo postembrionario de *Latrodectus mirabilis*, *Latrodectus corallinus* y *Latrodectus antheratus* (Araneae, Theridiidae). *Physis*, Secc. C, 39(97), 83-91.
- González A., Scioscia C., & Gonzalez S.E. **1998**. Arañas ponzoñosas. *Museo*, 13, 49-54.
- González-Baró M.R., Heras H., & Pollero R.J. **2000**. Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*. *J. Exp. Zool.*, 286(3), 231-237.
- González-Félix M.L., Gatlin Iii D.M., Lawrence A.L., & Perez-Velazquez M. **2003a**. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n $\omega$ 3 and n $\omega$ 6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival, and fatty acid composition. *Aquac. Nutr.*, 9(2), 115-122.
- González-Félix M.L., Lawrence A.L., Gatlin III D.M., & Perez-Velazquez M. **2003b**. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquac. Nutr.*, 9(2), 105-113.
- Granado L.C., Ranvaud R., & Peláez J.R. **2007**. A spiderless arachnophobia therapy: comparison between placebo and treatment groups and six-month follow-up study. *Neural Plat.*
- Grismado C.J., Ramírez M.J., & Izquierdo M.A. **2014**. Araneae: Taxonomía, diversidad y clave de identificación de familias de la Argentina. *Biodiversidad de artrópodos argentinos*, 3, 55-94.
- Grossmann J.G., Ali S.A., Abbasi A. *et al.* **2000**. Low-resolution molecular structures of isolated functional units from arthropodan and molluscan hemocyanin. *Biophysical Journal*, 78(2), 977-981.
- Guan X.L., Souza C.M., Pichler H. *et al.* **2009**. Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol. Biol. Cell*, 20(7), 2083-2095.
- Guo J., Wang L., Wu H. *et al.* **2018**. Molecular characterization and expression of vitellogenin genes from the wolf spider *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae). *Physiol. Entomol.*, 43(4), 295-305
- H** Hadley N.F. **1981**. Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition, and waterproofing function. *Biol. Rev.*, 56(1), 23-47.
- Hagedorn H.H., & Kunkel J.G. **1979**. Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 24(1), 475-505.
- Hagner-Holler S., Schoen A., Erker W. *et al.* **2004**. A respiratory hemocyanin from an insect. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101(3), 871-874.
- Hall M., Vanheusden M.C., & Soderhall K. **1995**. Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 216(3), 939-946.
- Harnish D.G., & White B.N. **1982**. Insect vitellins: identification, purification, and characterization from eight orders. *J. Exp. Zool.*, 220(1), 1-10.
- Hauke T.J., & Herzig V. **2017**. Dangerous arachnids—Fake news or reality? *Toxicon*, 138, 173-183.
- Hauerland N.H., & Bowers W.S. **1989**. Comparative studies on arthropod lipoproteins. *Comp. Biochem. Phys. B*, 92(1), 137-141.
- Hayward A., Takahashi T., Bendena W.G., Tobe S.S., & Hui J.H. **2010**. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans.

- FEBS letters*, 584(6), 1273-1278.
- Hagen W., Van Vleet E.S., & Kattner G. **1996**. Seasonal lipid storage as overwintering strategy of Antarctic krill. *Marine Ecology Progress Series*, 134, 85-89.
- Heimer S. **1988**. Wunderbare Welt der Spinnen, Urania. Verlag Leipzig Jena Berlin (Urania).
- Hennecke R., Gellissen G., Spindler-Barth M., & Spindler K.D. **1990**. Haemocyanin synthesis in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Invertebrate Dioxide Carriers*, 503-506.
- Heras H., & Pollero R.J. **1990**. Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 140(1-2), 29-38.
- Heras H., & Pollero R. **1992**. Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tehuelchus*. *BBA-Lipid Lipid Met.*, 1125(3), 245-250.
- Heras H., Garin, C.F., & Pollero R.J. **1998**. Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Zool.*, 280(6), 375-383.
- Herrmann S.K., & Roberts J.A. **2017**. Dehydration resistance and tolerance in the brush-legged wolf spider (*Schizocosa ocreata*): a comparison of survivorship, critical body water content, and water-loss rates between sexes. *Can. J. Zool.*, 95(6), 417-423.
- Hieber C.S. **1985**. The "insulation" layer in the cocoons of *Argiope aurantia* (Araneae: Araneidae). *J. Therm. Biol.*, 10(3), 171-175.
- Hieber C.S. **1992**. Spider cocoons and their suspension systems as barriers to generalist and specialist predators. *Oecologia*, 91(4), 530-535.
- Hilbrant M., Damen W.G., & McGregor A.P. **2012**. Evolutionary crossroads in developmental biology: the spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Development*, 139(15), 2655-2662.
- Hinton H.E. **1981**. Biology of insect eggs. Vol. I. Pergamon Press.
- Hoeger U., & Schenk S. **2020**. Crustacean Hemolymph Lipoproteins. En: Hoeger U. & Harris J. (eds) Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Protein. Springer, pp. 35-62.
- Holm A. **1952**. Experimentelle untersuchungen uber die entwicklung und entwicklungsphysiologie des spinnenembryos. *Zool. Bidr. Uppsala*, 29, 293-424.
- Hoppe K.T., Hadley N.F., & Trelease R.N. **1975**. Changes in lipid and fatty acid composition of eggs during development of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 21(8), 1427-1430.
- Horigane M., Shinoda T., Honda H., & Taylor D. **2010**. Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Mol. Biol.*, 19(4), 501-515.
- Huber B.A., Nuñez O.M., & Ung C.L.M. **2015**. Revision, phylogeny, and microhabitat shifts in the Southeast Asian spider genus *Aetana* (Araneae, Pholcidae). *Eur. J. Taxon.*, 162, 1-78.
- Humphreys W.F. **1983**. The surface of spiders' eggs. *J. Zool.*, 200(3), 303-316.
- Ibanez F., Levy J. & Tamborindeguy C. **2017**. Identification and expression analyses of vitellogenin in *Bactericera cockerelli* (Šulc). *J. Insect Physiol.*, 98, 205-213.
- Ikon N., & Ryan R.O. **2017**. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1859(6), 1156-1163.
- Ingrisch S. **1987**. Oxygen consumption by developing and diapausing eggs of *Eupholidoptera smyrnensis* (Orthoptera: Tettigoniidae). *J. Insect Physiol.*, 33(11), 861-865.

- Innis S.M. **1991**. Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.*, 30(1), 39-103.
- Iwanaga S., & Kawabata S.I. **1998**. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front. Biosci.*, 3, D973-D984.
- Iyapparaj P., Revathi P., Ramasubburayan R., *et al.* **2013**. Antifouling activity of the methanolic extract of *Syringodium isoetifolium*, and its toxicity relative to tributyltin on the ovarian development of brown mussel *Perna indica*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 89, 231-238.
- Izumi S., Yano K., Yamamoto Y., & Takahashi S.Y. **1994**. Yolk proteins from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.*, 40(9), 735-746.
- J**
- Jaenicke R. **1999**. Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 71(2), 155-241.
- Jaenicke E., Decker H., Gebauer W., Markl J., & Burmester T. **1999**. Identification, structure, and properties of hemocyanins from diplopod Myriapoda. *J. Biol. Chem.*, 274(41), 29071-29074.
- Jaenicke E., & Decker H. **2008**. Kinetic properties of catecholoxidase activity of tarantula hemocyanin. *FEBS J.*, 275(7), 1518-1528.
- Jalal F., Mushtaq S., Parvez S., Rana S.A., & Suhail A. **2010**. Partial characterization of hemolymph of different spider species of citrus orchards. *Int. J. Agric. Biol.*, 12(447), e450.
- James A.M., & Oliver J.H. **1996**. Vitellogenin concentrations in the haemolymph and ovaries of *Ixodes scapularis* ticks during vitellogenesis. *Exp. Appl. Acarol.*, 20(11), 639-647.
- James A.M., & Oliver Jr J.H. **1997**. Purification and partial characterization of vitellin from the black legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochem. Molec.*, 27(7), 639-649.
- Jedrzejowska I., & Kubrakiewicz J. **2010**. Yolk nucleus—the complex assemblage of cytoskeleton and ER is a site of lipid droplet formation in spider oocytes. *Arthropod. Struct. Dev.*, 39(5), 350-359.
- Jensen K., Mayntz D., Toft S., Raubenheimer D., & Simpson S.J. **2011**. Prey nutrient composition has different effects on *Pardosa* wolf spiders with dissimilar life histories. *Oecologia*, 165(3), 577-583.
- K**
- Kageyama Y., Kinoshita T., Umesono Y., Hatakeyama M., & Oishi K. **1994**. Cloning of cDNA for vitellogenin of *Athalia rosae* (Hymenoptera) and characterization of the vitellogenin gene expression. *Insect Biochem. Molec.*, 24(6), 599-605.
- Kamel M.Y., & Hamed R.R. **1981**. Purification and characterization of pyrophosphatase from developing embryos of *Hyalomma dromedarii*. *Insect Biochem.*, 11(6), 691-698.
- Kanazawa A., & Koshio S. **1994**. Lipid nutrition of the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda, Palinuridae): a review. *Crustaceana*, 67(2), 226-232.
- Kato S., Matsui T., Gatsogiannis C., & Tanaka Y. **2017**. Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. *Biophys. Rev.*, 10(2), 191-202.
- Kawooya J.K., Osir E.O., & Law J.H. **1986**. Physical and chemical properties of microvitellogenin. A protein from the egg of the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 261(23), 10844-10849.
- Kean J.C., Castell J.D., Boghen A.G., D'abramo L.R., & Conklin D.E. **1985**. A re-evaluation of the lecithin and cholesterol requirements of juvenile lobster (*Homarus americanus*) using crab protein-based diets. *Aquaculture*, 47(2-3), 143-149.
- Kempter B. **1983**. Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*. *Naturwissenschaften*, 70(5), 255-256.
- Kempter B., Markl J., Brenowitz M., Bonaventura C., & Bonaventura J. **1985**. Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits. II. Xiphosuran (*Limulus*) and spider (*Eurypelma, Cupiennius*) hemocyanin. *Biol. Chem.*, 366(1), 77-86.

- Kempton B. **1986**. Intracellular hemocyanin and site of biosynthesis in the spider *Eurypelma californicum*. En: Linzen B. (ed) In *Invertebrate Oxygen Carriers*. Springer, pp. 489-494.
- Khoo L., Robinette D.W., & Noga E.J. **1999**. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Mar. Biotechnol.*, 1(1), 44-51.
- Kim K.W. **2001**. Social facilitation of synchronized molting behavior in the spider *Amaurobius ferox* (Araneae, Amaurobiidae). *J. Insect Behav.*, 14(3), 401-409.
- Kim K.W., Roland C., & Horel A. **2000**. Functional value of matriphagy in the spider *Amaurobius ferox*. *Ethology*, 106(8), 729-742.
- Kluck G.E., Cardoso L.S., De Cicco N.N., Lima M.S., Folly E., & Atella G.C. **2018**. A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick-Borne Dis.*, 9(4), 850-859.
- Kucharski L.C., & Da Silva R.S.M. **1991**. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Phys. A*, 99(1-2), 215-218.
- Kuhn-Nentwig L., Kopp L.S., Nentwig W. *et al.* **2014**. Functional differentiation of spider hemocytes by light and transmission electron microscopy, and MALDI-MS-imaging. *Dev. Comp. Immunol.*, 43(1), 59-67.
- Kulkarni G.K., Glade L., & Fingerman M. **1991**. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on *in vitro* synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *J. Crustacean Biol.*, 11(4), 513-522.
- Kunkel J.G., & Pan M.L. **1976**. Selectivity of yolk protein uptake: comparison of vitellogenins of two insects. *J. Insect Physiol.*, 22(6), 809-818.
- Kunkel J.G., & Nordin J.H. **1985**. Yolk proteins. *Compreh. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1, 83-111.
- Kusche K., Ruhberg H., & Burmester T. **2002**. A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(16), 10545-10548.
- Kyomo J. **1988**. Analysis of the relationship between gonads and hepatopancreas in males and females of the crab *Sesarma intermedia*, with reference to resource use and reproduction. *Mar. Biol.*, 97(1), 87-93.
- L** Laemmli U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lagueux M., Harry P., & Hoffmann J.A. **1981**. Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of *Locusta*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 24(3), 325-338.
- Laino A., Cunningham M.L., García F., & Heras H. **2009**. First insight into the lipid uptake, storage and mobilization in arachnids: Role of midgut diverticula and lipoproteins. *J. Insect Physiol.*, 55(12), 1118-1124.
- Laino A., Cunningham M.L., Heras H., & Garcia F. **2011a**. In vitro lipid transfer between lipoproteins and midgut-diverticula in the spider *Polybetes pythagoricus*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 160(4), 181-186.
- Laino A., Cunningham M.L., Heras H., & Garcia F. **2011b**. Isolation and characterization of two vitellins from eggs of the spider *Polybetes pythagoricus* (Araneae: Sparassidae). *Comp. Biochem. Phys. B*, 158(2), 142-148.
- Laino A., Cunningham M., Costa F.G., & Garcia C.F. **2013**. Energy sources from the eggs of the wolf spider *Schizocosa malitiosa*: isolation and characterization of lipovitellins. *Comp. Biochem. Phys. B*, 165(3), 172-180.
- Laino A., Lavarías S., Suárez G., Lino A., & Cunningham M. **2015a**. Characterization of phenoloxidase activity from spider *Polybetes pythagoricus* hemocyanin. *J. Exp. Zool. Part A*, 323(8), 547-555.

- Laino A., Mattoni C., Ojanguren-Affilastro A., Cunningham M., & Garcia C.F. **2015b**. Analysis of lipid and fatty acid composition of three species of scorpions with relation to different organs. *Comp. Biochem. Phys. B*, *190*, 27-36.
- Laino A., Cunningham M., Garcia F., & Trabalon M. **2020**. Residual vitellus and energetic state of wolf spiderlings *Pardosa saltans* after emergence from egg-sac until first predation. *J. Comp. Physiol. B*, *90*, 261-274.
- Lamy J., Lamy J., Bonaventura J., & Bonaventura C. **1980**. Structure, function, and assembly in the hemocyanin system of the scorpion *Androctonus australis*. *Biochemistry*, *19*(13), 3033-3039.
- Leafloor J.O., Risi K.W., & Ankney C.D. **1996**. Social enhancement of wing molt in female mallards. *Can. J. Zool.*, *74*(7), 1376-1378.
- Lease H.M., & Wolf B.O. **2011**. Lipid content of terrestrial arthropods in relation to body size, phylogeny, ontogeny and sex. *Physiol. Entomol.*, *36*(1), 29-38.
- Lecuona R., Riba G., Cassier P., & Clement J.L. **1991**. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. *J. Invertebr. Pathol.*, *58*(1), 10-18.
- Lee R.F., & Puppione D.L. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *J. Exp. Zool.*, *248*(3), 278-289.
- Lee R.F. **1991**. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. En: Wang L.C.H.B. (ed) Advances in comparative and environmental physiology. *Springer*, Berlin, Heidelberg, pp. 187-207.
- Lee R.F., & Walker A. **1995**. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.*, *271*(5), 401-412.
- Lee F.Y., Shih T.W., & Chang C.F. **1997**. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin. *Gen. Comp. Endocr.*, *108*(3), 406-415.
- Lee S.Y., Lee B.L., & Söderhäll K. **2003**. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.*, *278*(10), 7927-7933.
- Legg D.A., Sutton M.D., & Edgecombe G.D. **2013**. Arthropod fossil data increase congruence of morphological and molecular phylogenies. *Nat. Commun.*, *4*(1), 1-7.
- Lemaire P., & Marcellini S. **2003**. Early animal embryogenesis. *Biologist*, *50*(3), 136-140.
- Levene H. **1960**. Robust Tests for Equality of Variances. En: Olkin I. (ed) Contributions to probability and statistics. *Palo Alto, CA: Stanford University Press*, pp. 278-292.
- Li H. & Zhang S. **2017**. Functions of vitellogenin in eggs. En: Kloc M. (ed) Oocytes. Results and problems in cell differentiation. *Springer, Cham*, pp. 389-401.
- Linzen B., Soeter N.M., Riggs A.F. *et al.* **1985**. The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, *229*(4713), 519-524.
- Liu, Y., Chen, M., Su, J. *et al.* **2015**. Identification and characterization of a novel Microvitellogenin from the Chinese Oak silkworm *Antheraea pernyi*. *PLoS ONE*, *10*(6), e0131751.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., & Randall R.J. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, *193*, 265-275.
- Lozano-Fernandez J., Tanner A.R., Giacomelli M. *et al.* **2019**. Increasing species sampling in chelicerate genomic-scale datasets provides support for monophyly of Acari and Arachnida. *Nat. Commun.*, *10*(1), 1-8.
- Lu J., & Warner A.H. **1991**. Immunodetection of thiol proteinase levels in various populations of *Artemia* cysts and during development. *Biochem. Cell Biol.*, *69*(2-3), 96-101.

## M

- Lubzens E., Tietz A., Pines M., & Applebaum S.W. **1981**. Lipid accumulation in oocytes of *Locusta migratoria migratorioides*. *Insect Biochem.*, 11(3), 323-329.
- Lubzens E., Ravid T., Khayat M., Daube N., & Tietz A. **1997**. Isolation and characterization of the high-density lipoproteins from the hemolymph and ovary of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan): Apoproteins and lipids. *J. Exp. Zool.*, 278(6), 339-348.
- Ludwig D., & Ramazzotto L.J. **1965**. Energy sources during embryogenesis of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 58(4), 543-546.
- Machado E.A., Atella G.C., Gondim K.C., de Souza W., & Masuda H. **1996**. Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem.*, 31(2), 185-196.
- Mangum C.P., Scott, J.L., Black R.E., Miller K.I., & van Holde K.E. **1985**. Centipedal hemocyanin: its structure and its implications for arthropod phylogeny. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(11), 3721-3725.
- Magnus K.A., Hazes B., Ton-That H., Bonaventura C., Bonaventura J., & Hol W.G. **1994**. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 19(4), 302-309.
- Malcicka M., Visser B., & Ellers J. **2018**. An evolutionary perspective on linoleic acid synthesis in animals. *Evol. Biol.*, 45(1), 15-26.
- Marangos C., Ramos L., & Oliva M. **1988**. Variations in protein levels in the hemolymph, hepatopancreas and ovary of *Penaeus schmitti* during ovarian maturation (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Arch. Int. Phys. Bioch.*, 96(5), 179-190.
- Marcondes C.B. & Dantas-Torres F. **2017**. Diseases caused by Acari (ticks and mites). En: Marcondes C. (ed) Arthropod Borne Diseases. *Springer, Cham*, pp. 537-548.
- Markl J., Schmid R., Czichos-tiedt S., & Linzen B. **1976**. Haemocyanins in Spiders, III. Chemical and Physical Properties of the Proteins in *Dugesiella* and *Cupiennius* Blood. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 357(2), 1713-1726.
- Markl J. **1986**. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.*, 171(1), 90-115.
- Markl J. & Decker H. **1992**. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. En: Mangum C.P. (ed) Blood and tissue oxygen carriers. *Springer, Berlin, Heidelberg*, pp. 325-376
- Markl J., Moeller A., Martin A.G., Rheinbay J., Gebauer W., & Depoix F. **2009**. 10-A cryoEM structure and molecular model of the myriapod (*Scutigera*) 6×6mer hemocyanin: understanding a giant oxygen transport protein. *J. Mol. Biol.*, 392(2), 362-380.
- Markl J. **2013**. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *BBA-Proteins Proteom.*, 1834(9), 1840-1852.
- Martín-Durán J.M., de Mendoza A., Sebé-Pedrós A., Ruiz-Trillo I., & Hejnal A. **2013**. A broad genomic survey reveals multiple origins and frequent losses in the evolution of respiratory hemerythrins and hemocyanins. *Genome Biol. Evol.*, 5(7), 1435-1442.
- Martin-Creuzburg D., Westerlund S.A., & Hoffmann K.H. **2007**. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Gen. Comp. Endocr.*, 151(1), 66-71.
- Matova N., & Cooley L. **2001**. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev. Biol.*, 231(2), 291-320.
- Mayzaud P., Boutoute M., & Alonzo F. **2003**. Lipid composition of the euphausiids *Euphausia vallentini* and *Thysanoessa macrura* during summer in the Southern Indian Ocean. *Antarct. Sci.*, 15(4), 463.

- Mazzini M., Callaini G., & Mencarelli C. **1984**. A comparative analysis of the evolution of the egg envelopes and the origin of the yolk. *Ital. J. Zool.*, 51(1-2), 35-101.
- McMahon B.R., Wilkens J.L., & Smith P.J. **1997**. Invertebrate circulatory systems. En: Dantzer W.H. (ed) Handbook of physiology section 13: comparative physiology. *American Physiological Society, Oxford University Press, New York*, pp. 931-1008.
- Meijer L., Brash A.R., Bryant R.W., Ng K., Maclouf J., & Sprecher H. **1986**. Stereospecific induction of starfish oocyte maturation by (8R)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.*, 261(36), 17040-17047.
- Melchers M. **1963**. Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide. *Zool. Jb., Abt. System., Ökol. u. Geogr.* 91, 1-90
- Melo A.C.A., Valle D., Machado E.A. *et al.* **2000**. Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol.*, 30(7), 549-557.
- Merrill Jr A.H., & Sandhoff K. **2002**. Sphingolipids: Metabolism and cell signaling. En: Vance D.E. & Vance J.E. (eds) New comprehensive biochemistry. *Elsevier*, 36, pp. 373-407
- Merzendorfer H., & Zimoch L. **2003**. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, 206(24), 4393-4412.
- Meusy J.J. **1980**. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea: a review. *Reprod. Nutr. Dev.*, 20(1A), 1-21.
- Meusy J.J., Junera H., Cledon P., & Martin M. **1983**. La vitellogénine chez un Crustacé Décapode Natantia, *Palaemon serratus* Pennant. Mise en évidence, comparaison immunologique avec les vitellines, site de synthèse et rôle des pédoncules oculaires. *Reprod. Nutr. Dev.*, 23(3), 625-640.
- Meusy J.J., & Payen G.G. **1988**. Female reproduction in malacostracan Crustacea. *Zool. Sci.*, 5(2), 217-265.
- Michalik P., & Uhl G. **2005**. The male genital system of the cellar spider *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775)(Pholcidae, Araneae): development of spermatozoa and seminal secretion. *Front. Zool.*, 2(1), 1-12.
- Millamena O.M., & Pascual F.P. **1990**. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *J. World Aquacult. Soc.*, 21(2), 116-121.
- Mollemberg M., Zara F.J., & Santana W. **2017**. Morphology and ultrastructure of the adult ovarian cycle in Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Majoidea). *Helgoland Mar. Res.*, 71(1), 1-14.
- Mohamed S.A. 2000.  $\alpha$ -Amylase from developing embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 126(1), 99-108.
- Morais S., Narciso L., Calado R., Nunes M.L., & Rosa R. **2002**. Lipid dynamics during the embryonic development of *Plesionika martia martia* (Decapoda; Pandalidae), *Palaemon serratus* and *P. elegans* (Decapoda; Palaemonidae): relation to metabolic consumption. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 242, 195-204.
- Morishima I., Yamano Y., Inoue K., & Matsuo N. **1997**. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS letters*, 419(1), 83-86.
- Morishita R., Aparecida Ferreira S., Santiago Filha A., & Ditzel Faraco C. **2003**. Studies on oogenesis and oviposition in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). *Anat. Rec. Part A*, 273(1), 575-582.
- Morrison W.R., & Smith L.M. **1964**. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5(4), 600-608.
- Moskalik B., & Uetz G.W. **2016**. Female feeding history impacts gonad development and reproductive

timing in the wolf spider *Schizocosa ocreata* (Hentz, 1844). *J. Arachnol.*, 44(2), 171-175.

Munson J.P. **1898**. The ovarian egg of *Limulus*. A contribution to the problem of the centrosome and yolk nucleus. *J. Morphol.*, 15(2), 111-220.

Muñoz G., Donghi S., & Cerisola H. **1990**. Vitellogenesis in the crayfish *Rhyncocinetes typus*: role of hepatopancreas in lipid yolk biosynthesis. *Cellular Mol. Biol.*, 36(5), 531.

## N

Nentwig W. **2012**. The species referred to as *Eurypelma californicum* (Theraphosidae) in more than 100 publications is likely to be *Aphonopelma hentzi*. *J. Arachnol.*, 40(1), 128-130.

Niimi T., Yoshimi T., & Yamashita O. **1993**. Vitellin and egg-specific protein as metal-binding proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sc. Japan*, 62(4), 310-318.

Nørgaard E. **1956**. Environment and behaviour of *Theridion saxatile*. *Oikos*, 7(2), 159-192.

Nyffeler M., & Sterling W. L. **1994**. Comparison of the feeding niche of polyphagous insectivores (Araneae) in a Texas cotton plantation: estimates of niche breadth and overlap. *Environ. Entomol.*, 23(5), 1294-1303.

Nyffeler M., Sterling W.L., & Dean D.A. **1994**. How spiders make a living. *Environ. Entomol.*, 23(6), 1357-1367

## O

Okumura T., Yoshida K., & Nikaido H. **2004**. Ovarian development and hemolymph vitellogenin levels in laboratory-maintained protandric shrimp, *Pandalus hypsinotus*: measurement by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA). *Zool. Sci.*, 21(10), 1037-1047.

Okuno A., Katayama H., & Nagasawa H. **2000**. Partial characterization of vitellin and localization of vitellogenin production in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 126(3), 397-407.

Oliveira G.T., Hack C., Almerão M., Bond-Buckup G., & Dutra B.K. **2011**. Tissue composition and haemolymphatic metabolites during gonadal development in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda) maintained in experimental culture. *Rev. Bras. Biocienc.*, 9(1), 64-71.

Opell B.D. **1984**. Phylogenetic review of the genus *Miagrammopes* (*sensu lato*) (Araneae, Uloboridae). *J. Arachnol.*, 12(2), 229-240.

Osaki H. **1972**. Electron microscope studies on developing oocytes of the spider, *Plexippus paykulli*. *Ann. Zool. Japan*, 45(4), 187-200.

Ouriel W. **2016**. Ovarian development in the western black widow spider *Latrodectus Hesperus*. (Tesis Doctoral, Universidad de Fullerton, California State University).

## P

Pan J.Y., Zhang Y.L., Wang S.Y., & Peng X.X. **2008**. Dodecamer is required for agglutination of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin with bacterial cells and red blood cells. *Mar. Biotechnol.*, 10(6), 645-652.

Pan M.L., Bell W.J., & Telfer W.H. **1969**. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*, 165(3891), 393-394.

Park Y., Kim Y., Putnam S.M., & Stanley D.W. **2003**. The bacterium *Xenorhabdus nematophilus* depresses nodulation reactions to infection by inhibiting eicosanoid biosynthesis in tobacco hornworms, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem.*, 52(2), 71-80.

Pateraki L.E., & Stratakis E. **2000**. Synthesis and organization of vitellogenin and vitellin molecules from the land crab *Potamon potamios*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 125(1), 53-61.

Paul R.J., Bihlmayer S., Colmorgen M., & Zahler S. **1994**. The open circulatory system of spiders (*Eurypelma californicum*, *Pholcus phalangioides*): a survey of functional morphology and physiology. *Physiol. Zool.*, 67(6), 1360-1382.

Pérez-González A., Rubio G.D., & Ramírez M.J. **2016**. Insights on vulval morphology in Ochyroceratinae with a rediagnosis of the subfamily and description of the first Argentinean species (Araneae:

- Synspermiata: Ochyroceratidae). *Zool. Anz.*, 260, 33-44.
- Perona R., & Vallejo C.G. **1985**. Acid hydrolases during *Artemia* development: a role in yolk degradation. *Comp. Biochem. Phys. B*, 81(4), 993-1000.
- Perona R., Bés J.C., & Vallejo C.G. **1988**. The degradation of yolk in the brine shrimp *Artemia*. Involvement of the lysosomal system by biochemical and morphological studies. *Biol. Cell*, 63, 361-366.
- Petzel D.H. **1993**. Prostanoids and fluid balance in insects. En: Stanley-Samuelson D. & Nelson D.R. (eds) *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. University of Nebraska Press, Lincoln, pp. 139-178.
- Pezzi M., Giglio A.M., Scozzafava A., Filippelli O., Serafino G., & Verre M. **2016**. Spider bite: a rare case of acute necrotic arachnidism with rapid and fatal evolution. *Case Rep. Emerg. Med.*
- Pick C., Schneuer M., & Burmester T. **2009**. The occurrence of hemocyanin in Hexapoda. *FEBS J.*, 276(7), 1930-1941.
- Pick C., Schneuer M., & Burmester T. **2010**. Ontogeny of hemocyanin in the ovoviviparous cockroach *Blaptica dubia* suggests an embryo-specific role in oxygen supply. *J. Insect Physiol.*, 56(5), 455-460.
- Pick C., Scherbaum S., Hegedüs E. *et al.* **2014**. Structure, diversity and evolution of myriapod hemocyanins. *FEBS J.*, 281(7), 1818-1833.
- Pillay K.K., & Nair N.B. **1973**. Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. *Mar. Biol.*, 18(3), 167-198.
- Pourié G., & Trabalon M. **2003**. The role of 20-hydroxyecdysone on the control of spider vitellogenesis. *Gen.Comp. Endocr.*, 131(3), 250-257.
- Punzo, F. **1982**. Hemolymph chemistry of lycosid spiders. *Comp. Biochem. Phys. B*, 71(4), 703-707.
- Punzo, F. **1989**. Composition of the hemolymph of mygalomorph spiders (Orthognatha). *Comp. Biochem. Phys. A*, 93(4), 757-760.
- Puppione D.L., Jensen D.F., & O'Connor J.D. **1986**. Physicochemical study of rock crab lipoproteins. *Biochim. Biophys.*, 875(3), 563-568.
- Raikhel A.S., & Dhadialla T.S. **1992**. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Ann. Rev. Entomol.*, 37(1), 217-251.
- Rajulu G.S. **1969**. Blood proteins of *Scolopendra morsitans*, a centipede (Chilopoda: Myriapoda). *Cur Sci.*
- Rakshpal R. **1962**. Diapause in the eggs of *Gryllus pennsylvanicus* Burmeister (Orthoptera: Gryllidae). *Can. J. Zool.*, 40(2), 179-194.
- Rao M.S., Rajitha B., Pavitra E., & Anjaneyulu N. **2007**. Identification and changes copper profile in different tissues during vitellogenesis of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Biol. Sci.*, 7(6), 989-992.
- Reddy R.D., Keshavan M.S., & Yao J.K. **2004**. Reduced red blood cell membrane essential polyunsaturated fatty acids in first episode schizophrenia at neuroleptic-naive baseline. *Schizophrenia Bull.*, 30(4), 901-911.
- Riechert S.E., & Lockley T. 1984. Spiders as biological control agents. *Ann. Rev. Entomol.*, 29(1), 299-320.
- Robinson M.H. **1982**. Courtship and mating behavior in spiders. *Ann. Rev. Entomol.*, 27(1), 1-20.
- Riciluca K.C.T., Sayegh R.S.R., Melo R.L.D., & Silva Jr P.I. **2012**. Rondonin an antifungal peptide from

## S

- spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in immunology*, 2, 66-71.
- Rodríguez-González H., Hernández-Llamas A., Villarreal H., Saucedo P.E., García-Ulloa M., & Rodríguez-Jaramillo C. **2006**. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. *Aquaculture*, 254(1-4), 637-645.
- Rosa R., Calado R., Narciso L., & Nunes M.L. **2007**. Embryogenesis of decapod crustaceans with different life history traits, feeding ecologies and habitats: a fatty acid approach. *Mar. Biol.*, 151(3), 935-947.
- Rosas Zavala A., Almeida Leñero K., & Barba Behrens N.Y **1996**. La hemocianina: ¿Existen los seres de sangre azul?. *Educación Química*, 7(1), 36-43.
- Rosell R., & Coons L.B. **1992**. The role of the fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick, *Dermacentor variabilis*. *Int. J. Parasitol.*, 22(3), 341-349.
- Ruhland F., Pétilion J., & Trabalon M. **2016**. Physiological costs during the first maternal care in the wolf spider *Pardosa saltans* (Araneae, Lycosidae). *J. Insect Physiol.*, 95, 42-50.
- Saba ,M., Awan D.S., & Yousaf, S. **2020**. Spider as a biological agent in pest control-A Review. *J. Wildl. Manag.*, 4(1), 27-34.
- Sabatier J.M., & Waard M. **2013**. Animal toxins in the world of modern biotechnology. En: Kastin A.J. (ed) Handbook of biologically active peptides. *Elsevier, United States*, pp. 407-15.
- Salvato B., & Beltramini M. **1990**. Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of binuclear copper active site. *Life. Chem. Rep.*, 8, 1-47.
- Sato Y., & Yamashita O. **1991**. Structure and expression of a gene coding for egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 21(5), 495-505.
- Sanggaard K.W., Dyrland T.F., Bechsgaard J.S. *et al.* **2016**. The spider hemolymph clot proteome reveals high concentrations of hemocyanin and von Willebrand factor-like proteins. *BBA-Proteins Proteom.*, 1864(2), 233-241.
- Santana C.C., Do Nascimento J.S., Costa M.M., da Silva A.T., Dornelas C.B., & Grillo L.A. **2014**. Embryonic development of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae): Dynamics of energy source utilization. *J. Insect Sci.*, 14(1), 280.
- Santos R., Mariano A.C., Rosas Oliveira R. **2008**. Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem.*, 67(2), 55-62.
- Santos R., Rosas Oliveira R., Saraiva F.B., Majerowicz D., & Gondim K.C. **2011**. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem.*, 77(1), 1-16.
- Sappington T.W., & Raikhel A.S. **1998**. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Molec.*, 28(5-6), 277-300.
- Sargent J., McEvoy L., Estevez A. *et al.* **1999**. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1-4), 217-229.
- Schacht K., & Scheibel T. **2011**. Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules*, 12(7), 2488-2495.
- Schaefer M. **1976**. An analysis of diapause and resistance in the egg stage of *Floronia bucculenta* (Araneida: Linyphiidae). *Oecologia*, 25(2), 155-174.
- Schartau W., & Leidescher T. **1983**. Composition of the hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*. *J. Comp. Physiol.*, 152(1), 73-77.
- Schenk S., Schmidt J., Hoeger U., & Decker H. **2015**. Lipoprotein-induced phenoloxidase-activity in tarantula hemocyanin. *BBA-Proteins Proteom.*, 1854(8), 939-949.

- Scherbaum S., Hellmann N., Fernández R., Pick C., & Burmester T. **2018**. Diversity, evolution, and function of myriapod hemocyanins. *BMC Evol. Biol.*, *18*(1), 107.
- Schie I.W., Nolte L., Pedersen T.L. *et al.* **2013**. Direct comparison of fatty acid ratios in single cellular lipid droplets as determined by comparative Raman spectroscopy and gas chromatography. *Analyst*, *138*(21), 6662-6670.
- Schnapp D., Kemp G.D., & Smith V.J. **1996**. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.*, *240*(3), 532-539.
- Scioscia C.L. **1984**. Análisis del crecimiento en *Polybetes pythagoricus* (Holmberg, 1874)(Araneae, Sparassidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.*, *43*(1-4).
- Scott C., Gerak C., McCann S., & Gries G. **2018**. The role of silk in courtship and chemical communication of the false widow spider, *Steatoda grossa* (Araneae: Theridiidae). *J. Ethol.*, *36*(2), 191-197.
- Seitz K.A. **1971**. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ovaentwicklung und Oogenese bei *Cupiennius salei* Keys. (Araneae, Ctenidae). *Z. Morphol. Oekol. Tiere*, *69*(4), 283-317.
- Senff-Ribeiro A., da Silva P.H., Chaim O.M. *et al.* **2008**. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.*, *26*(3), 210-218.
- Senkbeil E.G., & Wriston Jr J.C. **1981**. Hemocyanin synthesis in the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Phys. B*, *68*(1), 163-171.
- Serrano-Pinto V., Landais I., Ogliastro M.H. *et al.* **2004**. Vitellogenin mRNA expression in *Cherax quadricarinatus* during secondary vitellogenic at first maturation females. *Mol. Reprod. Dev.*, *69*(1), 17-21.
- Shapiro S.S., & Wilk M.B. **1965**. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, *52*(3/4), 591-611.
- Shanbaky N.M., Mansour M.M., & Helmy N. **1990**. Changes in total hemolymph and ovarian proteins during oogenesis in *Argas (Argas) hermanni* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.*, *27*(6), 982-985.
- Shechter A., Aflalo E.D., Davis C., & Sagi A. **2005**. Expression of the reproductive female-specific vitellogenin gene in endocrinologically induced male and intersex *Cherax quadricarinatus* crayfish. *Biol. Reprod.*, *73*(1), 72-79.
- Shillington C. **2005**. Inter-sexual differences in resting metabolic rates in the Texas tarantula, *Aphonopelma anax*. *Comp. Biochem. Phys. A*, *142*(4), 439-445.
- Sibert V., Ouellet P., & Brêthes J.C. **2004**. Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. *Mar. Biol.*, *144*(6), 1075-1086.
- Silveira A.B., Castro-Santos J., Senna R., Logullo C., Fialho E., & Silva-Neto M.A. **2006**. Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: effect of dephosphorylation on VT proteolysis. *Insect Biochem. Molec.*, *36*(3), 200-209.
- Simons K., & Ikonen E. **1997**. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, *387*(6633), 569-572.
- Smija M.K., & Devi A.R.S. **2015**. Oocyte development and female reproductive cycle in the freshwater crab *Travancoriana schirnerae*. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.*, *15*(3), 691-703.
- Soares T., Napoleão T.H., Ferreira F.R., & Paiva P.M. **2015**. Hemolymph and hemocytes of tarantula spiders: physiological roles and potential as sources of bioactive molecules. En: Jenkins O.P. (ed) *Advances in Animal Science and Zoology*. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 113-130.

- Sotelo J.R., & Trujillo-Cenóz O. **1957**. Electron microscope study of the vitelline body of some spider oocytes. *J. Cell Biol.*, 3(2), 301-310.
- Soulages J.L., & Wells M.A. **1994**. Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv. Protein Chem.*, 45, 371-415.
- Souty C., & Picaud J.L. **1981**. Vitellogenin synthesis in the fat body of the marine crustacean Isopoda, *Idotea balthica* basteri, during vitellogenesis. *Repro. Nutr. Dev.*, 21(1), 95-101.
- Spaziani E.P., & Hinsch G.W. **1997**. Variation in selected unsaturated fatty acids during vitellogenesis in the Florida freshwater crayfish *Procambarus paeninsulanus*. *Invertebr. Reprod. & Dev.*, 32(1), 21-25.
- Speake B.K., & Thompson M.B. **1999**. Comparative aspects of yolk lipid utilisation in birds and reptiles. *Poult. Avian. Biol. Rev.*, 10(4), 181-211.
- Speck J., & Barth F.G. **1982**. Vibration sensitivity of pretarsal slit sensilla in the spider leg. *J. Comp. Physiol.*, 148(2), 187-194.
- Sritunyalucksana K., & Söderhäll K. **2000**. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 197(1-3), 53-69.
- Stanley-Samuelson D.W., Jensen E., Nickerson K.W., Tiebel K., Ogg C.L., & Howard R.W. **1991**. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(3), 1064-1068.
- Stanley-Samuelson D.W., & Pedibhotla V.K. **1996**. What can we learn from prostaglandins and related eicosanoids in insects? *Insect Biochem. Mol.*, 26(3), 223-234.
- Stanley D.W. **2010**. Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems, Vol. 86. *Princeton University Press*, pp. 290.
- Starrett J., Hedin M., Ayoub N., & Hayashi C.Y. **2013**. Hemocyanin gene family evolution in spiders (Araneae), with implications for phylogenetic relationships and divergence times in the infraorder Mygalomorphae. *Gene*, 524(2), 175-186.
- Stoeva S., Rachev R., Severov S., Voelter W., & Genov N. **1995**. Carbohydrate content and monosaccharide composition of *Rapana thomasiana grosse* (Gastropoda) hemocyanin and its structural subunits. Comparison with gastropodan hemocyanins. *Comp. Biochem. Phys. B*, 110(4), 761-765.
- Stollewerk A., & Seyfarth E.A. **2008**. Evolutionary changes in sensory precursor formation in arthropods: embryonic development of leg sensilla in the spider *Cupiennius salei*. *Dev. Biol.*, 313(2), 659-673.
- Stuber M., & Nentwig W. **2016**. How informative are case studies of spider bites in the medical literature? *Toxicon*, 114, 40-44.
- Subramoniam T. **2011**. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Sci.*, 77(1), 1-21.
- Sugita H., & Sekiguchi K. **1979**. Protein components in the perivitelline fluid of the embryo of the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. *Dev. Biol.*, 73(2), 183-192.
- Swevers L., Raikhel A.S., Sappington T.W., Shirk P., & Latrou K. **2005**. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. En: Gilbert L.I., Gill S. & Latrou K. (eds) *Reproduction and Development*, Vol. 1. *Elsevier*, pp. 87-155.
- Tahir H.M., Zahra K., Zaheer A., & Samiullah K. **2017**. Spider silk: An excellent biomaterial for medical science and industry. *Punjab Univ. J. Zool.*, 32(1), 143-154.
- Tarabaev C.K., & Sheykin A.A. **1990**. Spiders as predators in apple-tree crowns in south-eastern Kazakhstan. *Acta Zool. Fennica*, 190, 363-366.

- Tasseva G., Bai H.D., Davidescu M., Haromy A., Michelakis E., & Vance J.E. **2013**. Phosphatidylethanolamine deficiency in mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.*, *288*(6), 4158-4173.
- Telfer W.H., & Pan M.L. **1988**. Adsorptive endocytosis of vitellogenin, lipophorin, and microvitellogenin during yolk formation in *Hyalophora*. *Arch. Insect Biochem.*, *9*(4), 339-355.
- Telfer W.H., & Woodruff R.I. **2002**. Ion physiology of vitellogenic follicles. *J. Insect Physiol.*, *48*(10), 915-923.
- Telford M.J., Bourlat S.J., Economou A., Papillon D., & Rota-Stabelli O. **2008**. The evolution of the Ecdysozoa. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B*, *363*(1496), 1529-1537.
- Tellam R.L., Kemp D., Riding G. *et al.* **2002**. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet. Parasitol.*, *103*(1-2), 141-156.
- Teshima S.I., & Kanazawa A. **1971**. Bioconversion of progesterone by the ovaries of crab, *Portunus trituberculatus*. *Gen. Comp. Endocr.*, *17*(1), 152-157.
- Teshima S., & Kanazawa A. **1980**. Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci.*, *46*(1), 57-62.
- Teshima S.I., & Kanazawa A. **1983**. Digestibility of dietary lipids in the prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, *49*(6), 963-966.
- Till W.M. **1961**. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Mem. Entomol. Soc. South Afr.*, *6*, 1-124.
- Tokareva O., Jacobsen M., Buehler M., Wong J., & Kaplan D.L. **2014**. Structure–function–property–design interplay in biopolymers: Spider silk. *Acta Biomater.*, *10*(4), 1612-1626.
- Trabalon M., Bautz A.M., Moriniere M., & Porcheron P. **1992**. Ovarian development and correlated changes in hemolymphatic ecdysteroid levels in two spiders, *Coelotes terrestris* and *Tegenaria domestica* (Araneae, Agelenidae). *Gen. Comp. Endocr.*, *88*(1), 128-136.
- Trabalon M., Ruhland F., Laino A., Cunningham M., & Garcia F. **2018**. Embryonic and post-embryonic development inside wolf spiders' egg sac with special emphasis on the vitellus. *J. Comp. Physiol. B*, *188*(2), 211-224.
- Troy S., Anderson W.A., & Spielman A. **1975**. Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp. Biochem. Phys. B*, *50*(3), 457-461.
- Tsang W.S., Quackenbush L.S., Chow B.K., Tiu S.H., He J.G., & Chan S.M. **2003**. Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas. *Gene*, *303*, 99-109.
- Terwilliger R.C., & Terwilliger N.B. **1985**. Molluscan hemoglobins. *Comp. Biochem. Phys. B*, *81*(2), 255-261.
- Terwilliger N.B. **1991**. Arthropod (*Cyamus scammoni*, Amphipoda) hemoglobin structure and function. En: Vinogradov S.N. & Kapp O.H. (eds) Structure and function of invertebrate oxygen carriers. *Springer, New York*, pp. 59-63.
- Terwilliger N.B. **1998**. Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. Exp. Biol.*, *201*(8), 1085-1098.
- Terwilliger N., & Dumler K. **2001**. Ontogeny of decapod crustacean hemocyanin: effects of temperature and nutrition. *J. Exp. Biol.*, *204*(5), 1013-1020.
- Tocher D.R., Fraser A.J., Sargent J.R., & Gamble J.C. **1985**. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids*, *20*(2), 69.
- Tseng D.Y., Chen Y.N., Liu K.F., Kou G.H., Lo C.F., & Kuo C. M. **2002**. Hepatopancreas and ovary are sites

of vitellogenin synthesis as determined from partial cDNA encoding of vitellogenin in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 42(2-3), 137-143.

Tsukimura B. **2001**. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *Am. Zool.*, 41(3), 465-476.

Tufail M., & Takeda M. **2008**. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.*, 54(12), 1447-1458.

## U

Uhl G. **2000**. Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae). En: Toft S. & Scharff N. (eds.) European Arachnology 2000. *Aarhus University Press, Aarhus*, pp. 145-156.

Uscian J.M., & Stanley-Samuelson D.W. **1994**. Fatty acid compositions of phospholipids and triacylglycerols from selected terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Phys. B*, 107(3), 371-379.

## V

Vachon M. **1957**. Contribution à l'étude du développement postembryonnaire des araignées. Première note. Généralités et nomenclature des stades. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 82, 337-354.

Valle D. **1993**. Vitellogenesis in insects and other groups: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1-26.

van Antwerpen R., Pham D.Q.D., & Ziegler R. **2005**. Accumulation of lipids in insect oocytes. En: Raikhel A.S. (ed) Progress in Vitellogenesis. *Science Publishers, Enfield, USA*, pp. 265-287

van Bruggen E.F. **1980**. Hemocyanin: the mystery of blue blood. *Trends Biochem. Sci.*, 5(7), 185-188.

van der Horst D.J., Roosendaal S.D., & Rodenburg K.W. **2009**. Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. *Mol. Cell Biochem.*, 326(1-2), 105-119.

van Handel E. **1985**. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1(3), 299-301.

van Handel E. **1993**. Fuel metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) embryo. *J. Insect Physiol.*, 39(10), 831-833.

van Herp F. **1993**. Importance of reproductive biological knowledge for application of biotechnology in aquaculture: crustaceans as an example. *J. Mar. Biotechnol.*, 1, 17-20.

van Holde K.E., & Miller K.I. **1982**. Haemocyanins. *Q. Rev. Biophys.*, 15(1), 1-129.

van Holde K.E., & Miller K.I. **1995**. Hemocyanins. *Adv. Protein Chem.*, 47, 1-81

Van Meer G., Voelker D.R., & Feigenson G.W. **2008**. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol Cell Bio.*, 9(2), 112-124.

van Schaick E.J.M., Schutter W.G., Gaykema W.P.J., Schepman A.M.H., & Hol W.G.J. **1982**. Structure of *Panulirus interruptus* hemocyanin at 5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 158(3), 457-485.

Vance J.E., & Tasseva G. **2013**. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.*, 1831(3), 543-554.

Vazquez Boucard C.G., Levy P, Ceccaldi H.J., & Brogren C.H. **2002**. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 281(1-2), 63-75.

Vetter R.S., & Isbister G.K. **2008**. Medical aspects of spider bites. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 409-429.

Vinagre A.S., & Da Silva R.S. **1992**. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Phys. A*, 102(3), 579-583.

Von Reumont B.M., Campbell L.I., & Jenner R.A. **2014**. Quo vadis venomics? A roadmap to neglected venomous invertebrates. *Toxins*, 6(12), 3488-3551.

## W

- von Wittich W.H. **1845**. Observationes quaedam de araneorum ex ovo evolutione. *Ploetz*.
- Voit R., Feldmaier-Fuchs G., Schweikardt T., Decker H., & Burmester T. **2000**. Complete Sequence of the 24-mer Hemocyanin of the *Tarantula Eurypelma californicum* Structure And Intramolecular Evolution Of The Subunits. *J. Biol. Chem.*, 275(50), 39339-39344.
- Wache S., Terwilliger N.B., & Terwilliger R.C. **1988**. Hemocyanin structure changes during early development of the crab *Cancer productus*. *J. Exp. Zool.*, 247(1), 23-32.
- Walker A., Ando S., Smith G.D., & Lee R.F. **2006**. The utilization of lipovitellin during blue crab (*Callinectes sapidus*) embryogenesis. *Comp. Biochem. Phys. B*, 143(2), 201-208.
- Wallace R.A., Walker S.L., & Hauschka P.V. **1967**. Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapods. *Biochemistry*, 6(6), 1582-1590.
- Waltero C., Martins R., Calixto C. *et al.* **2020**. The hallmarks of GSK-3 in morphogenesis and embryonic development metabolism in arthropods. *Insect Biochem. Molec.*, 118, 103307.
- Walther T.C., & Farese Jr R.V. **2012**. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 81, 687-714.
- Wang Y., Tang T., Gu J. *et al.* **2015**. Identification of five anti-lipopolysaccharide factors in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish Shellfish Immun.*, 46(2), 252-260.
- Warburg M.R., Elias R., & Rosenberg M. **2002**. The hepatopancreas of *Scorpio maurus* fuscus; seasonal changes in mass and water content as related to gender and oogenesis. *J. Zool.*, 256(4), 479-488.
- Ward D.A., Sefton E.M., Prescott M.C. *et al.* **2010**. Efficient identification of proteins from ovaries and hepatopancreas of the unsequenced edible crab, *Cancer pagurus*, by mass spectrometry and homology-based, cross-species searching. *J. Proteomics*, 73(12), 2354-2364.
- Warner A.H., Perz M.J., Osahan J.K., & Zielinski B.S. **1995**. Potential role in development of the major cysteine protease in larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Cell Tissue Res.*, 282(1), 21-31.
- Waxman L. **1975**. The structure of annelid and mollusc hemoglobins. *J. Biol. Chem.*, 250(10), 3790-3795.
- Weers P.M., van der Horst D.J., van Marrewijk W.J., van den Eijnden M., van Doorn J.M., & Beenackers A.M. **1992**. Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 33(4), 485-491.
- Weers P.M., & Ryan R.O. **2006**. Apolipoprotein III: role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol.*, 36(4), 231-240.
- Wheeler D.E., & Kawooya J.K. **1990**. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch. Insect Biochem.*, 14(4), 253-267.
- Wilder M.N., Okumura T., & Tsutsui N. **2010**. Reproductive mechanisms in Crustacea focusing on selected prawn species: vitellogenin structure, processing and synthetic control. *Aqua-BioScience Monographs*, 3(3), 73-110.
- Wilder S.M. **2011**. Spider nutrition: an integrative perspective. *Adv. Insect Physiol.*, 40, 87-136.
- Wirkner C.S., & Huckstorf K. **2013**. The circulatory system of spiders. En: Nentwig W. (ed) Spider Ecophysiology. *Springer*, pp. 15-27.
- Wojda I., Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., & Kordaczuk J. **2020**. Insect Defense Proteins and Peptides. En: Hoeger U. & Harris J.R (eds) Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. *Springer*, pp. 81-121.
- Wolf G., & Declair W. **1979**. A study of embryonic copper proteins and hemocyanins in *Sepia officinalis* L. *Biol. Jb. Dodonaea*, 47, 130-136.

- Wolff C., & Hilbrant M. **2011**. The embryonic development of the central American wandering spider *Cupiennius salei*. *Front. Zool.*, 8(1), 1-35.
- Woods H.A., & Hill R.I. **2004**. Temperature-dependent oxygen limitation in insect eggs. *J. Exp. Biol.*, 207(13), 2267-2276.
- Woods H. A., Bonnacaze R.T., & Zrubek B. **2005**. Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, 208(7), 1297-1308.
- World Spider Catalog **2021**. World Spider Catalog. Version 21.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, Acceso: Febrero 2021.
- Wurdak E., & Ramousse R. **1984**. Organisation sensorielle de la larve et de la première nymphe chez l'araignée *Araneus suspicax* (O. Pickard-Cambridge). *Rev. Arachnol.*, 5, 287-299.
- Wyatt G.R., & Pan M.L. **1978**. Insect plasma proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 47(1), 779-817.
- X** Xu X.H., Yan B.L., Xu J.T., & Xu G.C. **2014**. Biochemical composition dynamics of the ovaries and hepatopancreas at different physiological stages of the female marine crab, *Charybdis japonica*. *J. Crustacean Biol.*, 34(1), 61-69.
- Y** Yamaguchi T. **2001**. Seasonal change of the hepatopancreas index in the males of the fiddler crab, *Uca lactea*. *Crustaceana*, 74(7), 627-634.
- Yamashita O., & Indrasith L.S. **1988**. Metabolic Fates of Yolk Proteins during Embryogenesis in Arthropods: (Arthropods/embryogenesis/yolk proteins/limited proteolysis/protease). *Dev. Growth Differ.*, 30(4), 337-346.
- Yamazaki H., & Nusse R. **2002**. Identification of DCAP, a drosophila homolog of a glucose transport regulatory complex. *Mech. Develop.*, 119(1), 115-119.
- Yan F, Zhang Y, Jiang R. *et al.* **2011**. Identification and agglutination properties of hemocyanin from the mud crab (*Scylla serrata*). *Fish Shellfish Immun.*, 30(1), 354-360.
- Yang F, Xu H.T., Dai Z.M., & Yang W.J. **2005**. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 142(4), 456-464.
- Yang C., Pan H., Liu Y., & Zhou X. **2015**. Stably expressed housekeeping genes across developmental stages in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *PLoS one*, 10(3), e0120833.
- Yepiz-Plascencia G., Vargas-Albores F., & Higuera-Ciapara I. **2000**. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*, 191(1-3), 177-189.
- Yip E.C., & Rayor L.S. **2014**. Maternal care and subsocial behaviour in spiders. *Biol. Rev.*, 89(2), 427-449.
- Yuan H.X., Xu X., Sima Y.H., & Xu S.Q. **2013**. Reproductive toxicity effects of 4-nonylphenol with known endocrine disrupting effects and induction of vitellogenin gene expression in silkworm, *Bombyx mori*. *Chemosphere*, 93(2), 263-268.
- Yurkiewicz W.J., & Oelsner J. **1969**. Neutral lipid metabolism during embryonic development of the Indian-meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner). *Comp. Biochem. Physiol.*, 28(2), 955-959.
- Z** Zafar M.S., & Al-Samadani K.H. **2014**. Potential use of natural silk for bio-dental applications. *J. Taibah Univ. Med. Sci.*, 9(3), 171-177.
- Zandee D.I. **1967**. The absence of cholesterol synthesis in *Sepia officinalis* L. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, 75(3), 487-491.
- Zhai Q.H., Postlethwait J.H., & Bodley J.W. **1984**. Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.*, 14(3), 299-305.
- Zhang G., Lu Z.Q., Jiang H., & Asgari S. **2004**. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO)

- activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochem. Molec.*, 34(5), 477-483.
- Zhang Y., Wang S., Xu A., Chen J., Lin B., & Peng X. **2006**. Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization. *J. Proteome Res.*, 5(4), 815-821.
- Zhuang J., Coates C.J., Zhu H., Zhu P., Wu Z., & Xie L. **2015**. Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. *Dev. Comp. Immunol.*, 49(1), 96-102.
- Ziegler R., & Ibrahim M.M. **2001**. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.*, 47(6), 623-627.
- Ziegler R., & van Antwerpen R. **2006**. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol.*, 36(4), 264-272.