

Tesis Doctoral

Aclimatación térmica y salina en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Papel fisiológico de la hormona hiperglucemiante

Prymaczok, Natalia Cecilia

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Prymaczok, Natalia Cecilia. (2012). Aclimatación térmica y salina en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Papel fisiológico de la hormona hiperglucemiante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Prymaczok, Natalia Cecilia. "Aclimatación térmica y salina en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Papel fisiológico de la hormona hiperglucemiante". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Aclimatación térmica y salina en juveniles de la langosta de
agua dulce *Cherax quadricarinatus*.**

Papel fisiológico de la hormona hiperglucemiante

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Natalia Cecilia Prymaczok

Director de tesis: Dr. Daniel Alberto Medesani

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Animal Comparada, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2012

Aclimatación térmica y salina en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Papel fisiológico de la hormona hiperglucemiante

En esta tesis estudiamos la respuesta fisiológica de individuos de *C. quadricarinatus*, una langosta de agua dulce originaria de los ríos del norte de Australia, expuestos a condiciones de estrés térmico, salino, o a la combinación de ambos factores. Demostramos que la combinación de ambos tratamientos produjo una inhibición en la ganancia de peso de los juveniles avanzados expuestos. El efecto de la temperatura sobre la fisiología del animal fue notable; la disminución de la temperatura impidió, en los juveniles expuestos, la eficiente regulación de los niveles de Na^+ y K^+ y generó incrementos superiores al 100 % en los niveles de glucosa, en hemolinfa. A su vez, la tasa metabólica varió levemente ante las diferentes condiciones ensayadas. Con el objetivo de estudiar la participación de la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) en este tipo de estrés, medimos sus niveles de expresión por RT-PCR. Con ello demostramos que CHH se induce, bajo condiciones de estrés, en el tejido nervioso del pedúnculo ocular, sitio en el cual CHH es sintetizada, almacenada y secretada. Luego de producir CHH recombinante (rCqCHH) en bacterias, demostramos que la administración prolongada de esta hormona condujo a una disminución en los niveles de glucógeno en el hepatopáncreas y a un aumento de glucosa en la hemolinfa. Contrariamente, los niveles de glucógeno se mantuvieron estables en el músculo abdominal, luego de la administración de rCqCHH. Demostramos también que el aumento de los iones Na^+ y K^+ inducido por condiciones de alta salinidad, disminuyó por la administración de rCqCHH. Finalmente, las condiciones de estrés utilizadas en este trabajo condujeron a una desregulación en la expresión de PEPCK, enzima fundamental de la gluconeogénesis. En su conjunto, estos resultados sugieren una participación directa de la hormona CHH en el metabolismo energético asociado al mantenimiento de la homeostasis bajo condiciones de estrés térmico y salino. En línea con esta hipótesis, demostramos que bajo las condiciones de estrés mencionadas, los animales inyectados con rCqCHH poseen un significativo incremento en la ganancia de peso (200-300 %). El descubrimiento de la función de CHH como modulador del metabolismo energético en condiciones de estrés térmico y salino puede contribuir al desarrollo de nuevas tecnologías que puedan ser utilizadas para estimular el crecimiento de *C. quadricarinatus* en condiciones subóptimas, favoreciendo así la producción de la especie con fines comerciales.

Palabras claves: *Cherax quadricarinatus*, crecimiento, temperatura, salinidad, estrés, CHH.

Thermal and saline acclimation of freshwater juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus*. Physiological role of the hyperglycemic hormone

In this thesis we studied the physiological response of individuals of *C. quadricarinatus*, an Australian freshwater crayfish, to salinity, cold shock, or the combinatory of both kind of stress. We demonstrated that both treatments lead to an inhibition of weight gain, respect the controls. The effect of temperature on the physiology of the animal was remarkable; the decrease in temperature prevented, at the exposure animals, the efficient regulation of Na^+ and K^+ levels and increased more than 100% the glucose levels, in the hemolymph. In turn, the metabolic rate varied slightly in different conditions tested. With the aim of studying the involvement of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) hormone in this kind of stress, its expression levels were quantified by RT-PCR. We found that CHH is induced by stress conditions in eyestalk, the organ in which CHH is synthesized and secreted. We produced recombinant CHH (rCqCHH) in bacteria and administrated in to *C. quadricarinatus* individuals; the long-term administration of CHH decreased the glycogen levels in hepatopancreas, but increased the glucose levels in hemolymph. Oppositely, the glycogen levels remained unchanged in abdominal muscle upon CHH administration. Also, we demonstrated that the high-salinity induced increase of Na^+ y K^+ ions is inhibited after recombinant CHH administration. Finally, the stress conditions used in this work lead to a deregulation of PEPCK, the main enzyme of glyconeogenesis. Overall, these results suggest a direct involvement of CHH in the energetic metabolic rate associated to the homeostasis maintenance upon salinity and cold shock stress. In accordance with this hypothesis, we demonstrated that the animals injected with CHH showed a significant increase of weight gain (200-300 %). The discovery of CHH as a modulator of the energetic metabolic rate in salinity and cold shock stress will contribute to the development of novel technologies used to stimulate the growth of *C. quadricarinatus* in suboptimal conditions, and to the improvement of the knowledge related to its culture for commercial aims.

Keywords: *Cherax quadricarinatus*, growth, salinity, temperature, stress, CHH.

AGRADECIMIENTOS

Al ANPCyT y CONICET, por su sistema de becas internas doctorales de iniciación y perfeccionamiento que me permitió realizar este trabajo de investigación durante los últimos 5 años, dando culminación a una primera y esencial etapa de formación.

A la Universidad de Buenos Aires por su apoyo constante a la investigación y por brindarme una vez más la oportunidad de pertenecer a esta gran Casa de Estudios. Y particularmente agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haber sido el lugar en el que desarrollé mis actividades científico-académicas con plena libertad y satisfacción, otorgándome todos los conocimientos que hoy me permiten nuevamente alcanzar la meta.

A mi director de Tesis, Daniel Medesani, gracias por haber confiado en mí y haberme guiado en mi formación como científico, por tantos años de aprendizaje, de paciencia y amistad.

Al Dr. Enrique Rodríguez, por haberme permitido ingresar al laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio (a los viejos, a los nuevos y a los de siempre) que me acompañaron en este camino: Anu, Ale, Vero, Lili, Laurita, Jime, Mati, Carito, Naty, Anita, Fer, Lia, Lu, Marcos y Vane. A ellos muchas gracias, porque cada uno con su granito de arena me ayudo a realizar este trabajo, e hicieron que los días de trabajo sean más placenteros. Especialmente les quiero agradecer a Verín y a “las chicas del 50” por su ayuda desinteresada.

Agradezco especialmente a mamá y papá, por haberme enseñado desde siempre el valor de la verdad, la paz, la justicia y la humildad. Por el esfuerzo que realizaron para que yo pudiera finalizar mis estudios.

A Maru y Raul, por acompañarme en esta etapa brindándome su apoyo y ayudándome cuando lo necesite.

Por último, le dedico esta tesis a mis dos amores: Juan que siempre me escuchó, aconsejó y acompañó; porque nunca dejó de alentarme y siempre confió en mí. Y a Matu porque su existir me cambió la vida. Gracias a los dos por hacerme feliz cada día!

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
1. INTRODUCCIÓN	9
1.I BIOLOGÍA DE LA ESPECIE Y SU CULTIVO.....	10
1.I.A. Biología general de <i>Cherax quadricarinatus</i>	11
1.I.B. Regulación osmótica e iónica.....	15
1.I.B.a Regulación neuroendocrina	19
1.I.C. Metabolismo energético.....	20
1.II. ESTRÉS.....	22
1.II.A. Compensación a variaciones en la temperatura y la salinidad del agua.....	23
1.III. HORMONA HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTACEOS (CHH).....	25
1.III.A. Localización de neuronas neurosecretoras.....	26
1.III.B. Aspectos fisiológicos.....	27
1.IV. ACUICULTURA.....	29
1.IV.A. Acuicultura de Crustáceos.....	31
1.V. OBJETIVO GENERAL.....	33
2. CAPITULO I. Evaluación del estrés térmico y salino en juveniles de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>	
2.I. OBJETIVOS.....	35
2.I.A. Efecto de la aclimatación de juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> a bajas temperaturas y diferentes salinidades.....	36
2.I.A.a. MATERIALES Y METODOS.....	36

2.I.A.a.i Diseño experimental.....	36
2.I.A.a.ii. Análisis estadístico de datos.....	45
2.I.A.b. RESULTADOS.....	46
2.I.B. Efecto, a corto plazo (estrés agudo), del cambio en las condiciones óptimas de temperatura y salinidad.....	56
2.I.B.a. MATERIALES Y METODOS.....	56
2.I.B.a.i. Diseño experimental.....	56
2.I.B.a.ii. Análisis estadístico de datos.....	57
2.I.B.b. RESULTADOS.....	58
2.II. DISCUSION.....	63
2.II.A. Efecto de la aclimatación gradual y sostenida (estrés crónico) a bajas temperaturas y diferentes salinidades en juveniles de <i>C. quadricarinatus</i>	63
2.II.B. Efecto del cambio repentino (estrés agudo) en las condiciones óptimas de temperatura y salinidad en juveniles de <i>C. quadricarinatus</i>	72
3. CAPITULO II. Participación de la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos en la respuesta al estrés térmico y salino de juveniles de <i>Cherax quadricarinatus</i>	
3.I. OBJETIVOS.....	77
3.I.A. Obtención de CHH recombinante de <i>C. quadricarinatus</i> y generación de anticuerpos anti-rCqCHH.....	78
3.I.A.a. MATERIALES Y METODOS.....	78
3.I.A.a.i. Clonado de rCqCHH en vectores de expresión procariota.....	78
3.I.A.a.ii. Obtención de proteínas recombinantes nativas.....	83
3.I.A.a.iii. Confirmación de la producción de proteínas recombinantes en geles SDS – PAGE.....	83
3.I.A.a.iv. Generación de anticuerpos anti-rCqCHH.....	85
3.I.A.a.v. Técnica de Western Blot.....	86
3.I.A.a.vi. Detección de CHH en hemolinfa y pedúnculo ocular.....	87

3.I.A.a.vii. Inmuhistoquímica.....	88
3.I.A.a.viii. Determinación de la actividad biológica de rCqCHH.....	89
3.I.A.a.xi. Análisis de estadístico de datos.....	90
3.I.A.b. RESULTADOS.....	91
3.I.A.b.i. Detección de CHH en hemolinfa y pedúnculo ocular por la técnica Western Blot.....	91
3.I.A.b.ii. Detección inmunohistoquímica de CHH en pedúnculo ocular.....	92
3.I.A.b.iii. Ensayo de actividad biológica de rCqCHH.....	94
3.I.B. Administración de rCqCHH a animales aclimatados a distintas combinaciones de temperatura y salinidad.....	96
3.I.B.a. MATERIALES Y METODOS.....	96
3.I.B.a.i. Análisis estadístico de datos.....	98
3.I.B.b. RESULTADOS.....	99
3.I.C. Evaluación del tipo de efecto de rCqCHH sobre órganos blanco, ensayos <i>in vitro</i>	108
3.I.C.a. MATERIALES Y METODOS.....	108
3.I.C.a.i Análisis estadístico de datos.....	110
3.I.C.b. RESULTADOS.....	111
3.II. DISCUSION.....	113
3.II.A. Obtención de CHH recombinante de <i>C. quadricarinatus</i> y generación de anticuerpos anti-rCqCHH.....	113
3.II.B. Administración de rCqCHH a animales aclimatados a distintas combinaciones de temperatura y salinidad.....	119
3.II.C. Evaluación del tipo de efecto de rCqCHH sobre órganos blanco, ensayos <i>in vitro</i>	125
4. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	127
5. BIBLIOGRAFIA.....	131

**Aclimatación térmica y salina en juveniles de la langosta de
agua dulce *Cherax quadricarinatus*.**

Papel fisiológico de la hormona hipergluceante

**Thermal and saline acclimation of freshwater juvenile
crayfish *Cherax quadricarinatus*.**

Physiological role of the hyperglycemic hormone

1. INTRODUCCION

1.1. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE Y SU CULTIVO

De las investigaciones en el ámbito mundial que se han realizado en torno al cultivo de crustáceos decápodos, se ha puesto especial atención a las langostas de agua dulce que pertenecen a tres familias: Cambaridae, Astacidae y Parastacidae, distribuyéndose las dos primeras en el hemisferio norte, mientras que la última se restringe al hemisferio sur (Ponce *et al.*, 1999).

La familia Parastacidae contiene 14 géneros diferentes de los cuales 10 se encuentran en Australia. Tres de ellos, Astacopsis, Euastacus y Cherax contienen las especies de langostas de agua dulce más grandes en el mundo, siendo consecuentemente atractivas para su desarrollo en acuicultura (Morrissy *et al.*, 1990). Dentro del género Cherax, solamente tres especies han sido evaluadas como candidatas para la producción: la langosta “marrón” (*Cherax tenuimanus*), la “yabbie” (*Cherax destructor*) (Mills, 1989; Morrissy *et al.*, 1990) y la “red claw” (*Cherax quadricarinatus*), demostrando esta última mejores condiciones que las anteriores.

Las investigaciones revelaron que *C. quadricarinatus* es una especie que presenta un rápido crecimiento en pocos meses de cultivo y tolera altas temperaturas y relativamente bajas concentraciones de oxígeno disuelto, en relación a la langosta *C. tenuimanus*, la cual presenta un lento crecimiento anual y una estrecha tolerancia a las condiciones ambientales. Además, *C. quadricarinatus* tolera condiciones de cultivo a densidades de siembra relativamente altas y se la considera como no excavadora, a diferencia de *C. destructor*, la cual presenta un importante comportamiento excavatorio y agresivo, permitiendo sólo su cultivo a bajas densidades. Si bien *C. destructor* se cultiva extensivamente en Australia, su introducción está prohibida en muchos países del mundo, incluyendo Argentina, debido a su marcado hábito excavador. Por tanto, las ventajas físicas y biológicas que presenta entonces la especie *C. quadricarinatus*, frente a otras especies del mismo género, hicieron que fuera considerada una excelente opción para la acuicultura, mostrándose como la especie de langosta más promisoría para su cultivo.

En la actualidad, *C. quadricarinatus* se está cultivando no sólo en su lugar de origen, Australia, sino también en Nueva Zelanda, el Sudeste Asiático, China, Israel, África, América Central (Cuba y México), Sudamérica (Ecuador, Argentina y Uruguay, entre otros) y Norteamérica (Estados Unidos) (Masser & Rouse, 1997; García-Guerrero *et al.*, 2003; Dirección de Acuicultura, 2004). Existe actualmente en Argentina un gran interés por la cría comercial de esta especie, si bien la mayor parte

de nuestro País no presenta las condiciones climáticas óptimas para su cultivo. Desde hace más de una década, el cultivo de esta langosta ha sido introducido en el País con explotaciones a baja y mediana escala en las provincias de Mendoza, San Luis, Córdoba (Cuesta Blanca), Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Corrientes, Misiones y Tucumán. Sin embargo, su producción no prosperó en las provincias con clima templado, debido a que las bajas temperaturas registradas durante otoño e invierno han resultado desfavorables para el cultivo de la especie.

1.1.A. *Biología general de Cherax quadricarinatus*

La especie *C. quadricarinatus* puede ser encontrada en los ríos del noroeste de Queensland y en los territorios del noreste, que abarcan la zona subtropical de Australia (Jones, 2004). Esta especie muestra una marcada preferencia por los ríos con cursos de agua lentos, como también lagos y lagunas. Las fluctuaciones estacionales, que producen disminución del nivel de agua, hacen que *C. quadricarinatus* se mueva contra la corriente presumiblemente para alcanzar una fuente de agua más estable (Wingfield, 1998). En general, se las encuentra en áreas con altos niveles de oxígeno y abundante vegetación; están adaptadas a un amplio rango de temperaturas (10 a 36 °C), pero sin embargo, el crecimiento óptimo ocurre entre los 25 y 30 °C. Es una especie eurihalina capaz de sobrevivir en un amplio rango de salinidades, tolerando hasta 6 g/L de salinidad en las regiones donde habita y hasta 20 g/L en condiciones de laboratorio; a salinidades menores a 10 g/L son muy favorables la ganancia de peso y la supervivencia (Meade *et al.*, 2002).

En lo que se refiere a su alimentación, los adultos son oportunistas pero principalmente detritívoros, alimentándose de materia orgánica en descomposición; en tanto, los juveniles son carnívoros, ingiriendo pequeños organismos acuáticos (zooplancton) como principal fuente de alimento (Jones, 1995). Se ha observado la existencia de canibalismo, particularmente si hay superpoblación o escasez de alimento. Es una especie nocturna con grandes períodos de actividad poco antes del alba y justo después del anochecer. La temperatura del agua juega un papel importante en el nivel de actividad. A temperaturas extremas, la tasa de alimentación decrece al igual que la tasa metabólica, con la consecuente reducción en el crecimiento (Withnall, 2000).

Las características anatómicas básicas de las langostas de agua dulce son: la presencia de un cuerpo dividido en cefalotórax y abdomen, ambos cubiertos por un exoesqueleto que protege los órganos internos. En el cefalotórax existen un par de ojos prominentes, aunque su visión es pobre;

órganos sensoriales constituidos por un par de anténulas y un par de largas antenas, ambas sensitivas (táctiles y gustativas), que le permiten localizar el potencial alimento y sensar distintos factores de calidad de agua como temperatura y salinidad, entre otras funciones. Finalmente, presenta un par de largos quelípedos y cuatro pares de patas caminadoras, denominados pereiópodos, numerados de manera antero-posterior del 2 al 5 (Fig. 1).

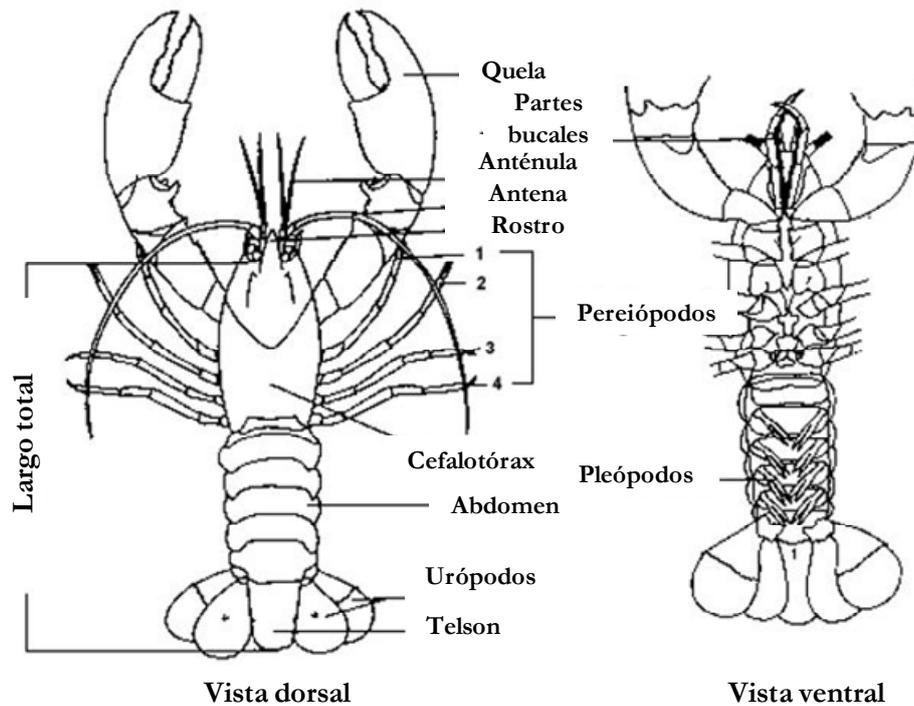


Figura 1. Características anatómicas de la especie

El abdomen por su parte consta de seis segmentos, cada uno de los cuáles está cubierto por una cutícula dura pero articulada con las adyacentes mediante una membrana flexible. Cada segmento abdominal, del segundo al quinto, posee un par de apéndices denominados en conjunto pleópodos. En el sexto segmento abdominal los pleópodos se alargan y son llamados urópodos, que junto con el telson forman el abanico caudal, el cual es usado para generar la propulsión del agua cuando la langosta necesita moverse rápidamente. Las hembras también usan el abanico caudal como cámara temporal de protección de los huevos durante la incubación.

En *C. quadricarinatus* las diferencias físicas entre machos y hembras son claras. Por ejemplo, los quelípedos son relativamente más grandes y gruesos en los machos que en las hembras; además, los machos poseen una membrana lateral suave y roja sobre la superficie externa de cada quelípedo, denominada “red patch”. No se sabe aún con certeza qué función cumple esta membrana, pero se

sugiere una relación directa con la conducta de apareamiento. En cuanto a las aberturas genitales, los machos poseen gonoporos en el quinto par de pereópodos, mientras que las hembras presentan estas aberturas en el tercer par.

Otras estructuras de particular importancia son los estatocistos y los gastrolitos. Los estatocistos son órganos de equilibrio y consisten en una pequeña cámara en el exoesqueleto. Dentro de cada cámara hay partículas sólidas llamadas estatolitos, los cuales ante el movimiento del animal estimulan una serie de pelos sensoriales que recubren las paredes internas del estatocisto. De esta manera, el cerebro recibe mensajes que son interpretados para mantener la correcta postura y orientación. Durante el proceso de muda los estatolitos se pierden junto con el viejo exoesqueleto, por lo cual también deben ser reemplazados. En cuanto a los gastrolitos, se denomina así a unas concreciones de carbonato de calcio depositadas en el estómago con forma de gruesos platillos; la función de estas estructuras es almacenar el calcio de la vieja cutícula para reutilizarlo en el endurecimiento de la nueva cutícula luego del proceso de muda (Jones, 1997).

El ciclo de vida de *C. quadricarinatus* se caracteriza por poseer un desarrollo directo, sin estadios larvales externos. La hembra transporta los huevos adheridos a sus pleópodos, replegando el pleon y formando una especie de “canasta” hasta el momento de la eclosión. La fecundidad varía con el tamaño de la hembra; la puesta ronda entre los 300 y 1000 huevos y el desarrollo embrionario alcanza las 10 semanas, tiempo en el cual se suceden los diferentes estadios larvales dentro del huevo. Una vez eclosionados se obtienen individuos juveniles idénticos a los adultos, los cuáles continúan utilizando a sus madres como refugio, hasta su total independencia. Bajo condiciones apropiadas de hábitat y disponibilidad de alimento, la langosta eclosionada crece rápidamente alcanzando la madurez sexual a los 12 meses. En la **Figura 2** se describe el ciclo de vida de la especie y las fases de producción en criadero.

El período reproductivo de la especie transcurre durante los meses de septiembre a marzo, tiempo en el cual la hembra puede ser impregnada por el macho en más de una ocasión. La reproducción en *C. quadricarinatus* depende de diversos factores, no sólo del momento del ciclo reproductivo en que se encuentren, sino de la temperatura del agua como así también de un fotoperíodo determinado.

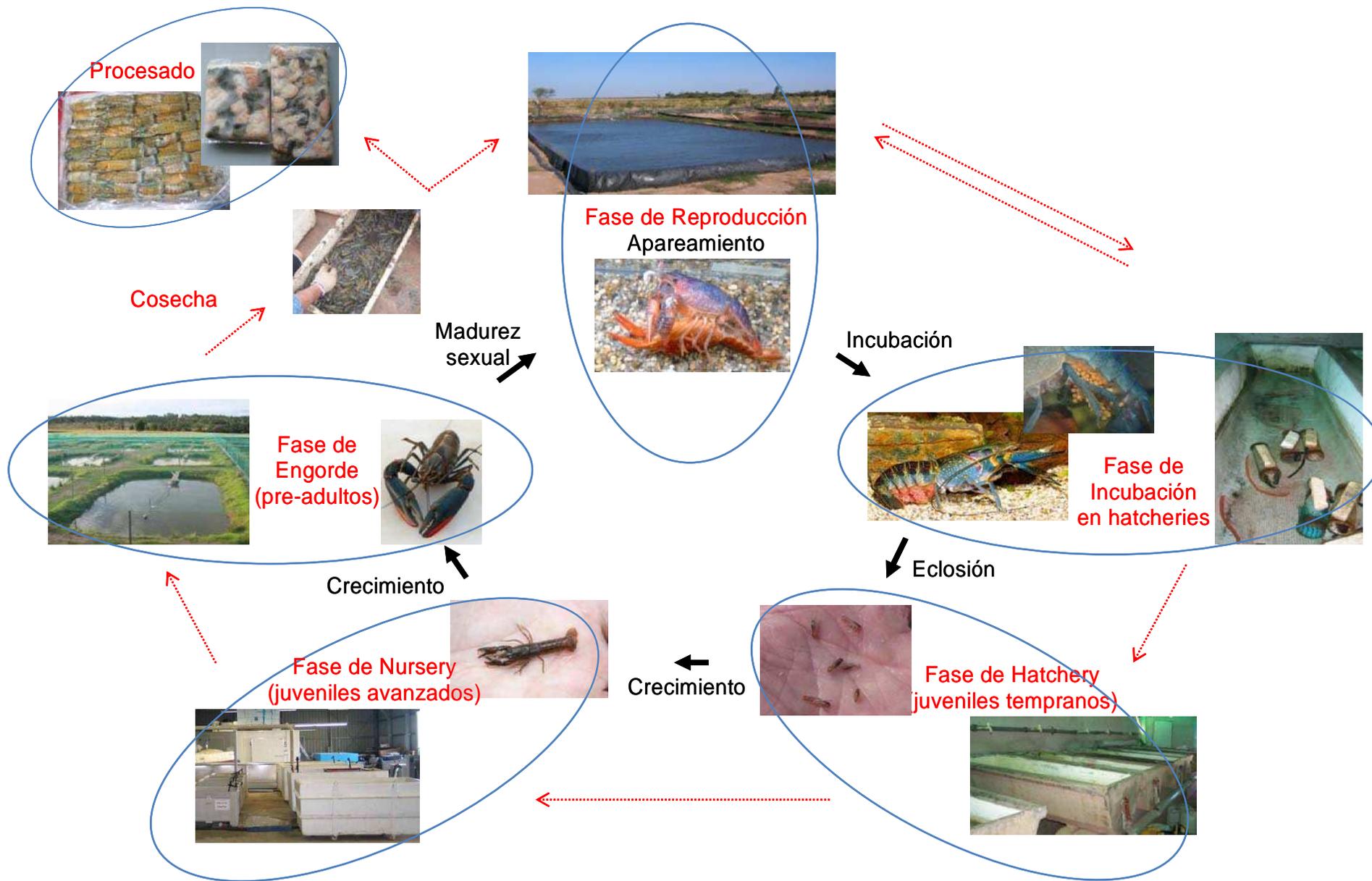


Figura 2. Diagrama ilustrativo representando el ciclo de vida (flechas negras) y el ciclo de producción en criadero (flechas rojas) de *Cherax quadricarinatus*. (extraído de Viau, 2010).

1.I.B. *Regulación Osmótica e Iónica*

El mayor problema que las especies animales tienen que afrontar es mantener (o restaurar en caso de perturbación) el volumen celular y un patrón básico de solutos intracelulares dentro de un rango estrecho, compatible con las diferentes actividades celulares. Esta función debe ser llevada a cabo a pesar de la amplia diversidad de ambientes y siempre resulta en un estado donde las células se encuentran en estado estacionario con su medio circundante, tal medio puede ser el ambiente externo, pero la mayor parte del tiempo es un fluido extracelular o la hemolinfa.

Como en otras especies animales, en los crustáceos han evolucionado mecanismos moleculares para asegurar un apropiado balance de solutos y agua (Péqueux, 1995). Los crustáceos exhiben todos los patrones de regulación osmótica posibles. Algunos animales son estenohalinos, tolerando solo un pequeño rango de concentraciones osmóticas externas, mientras que otros son eurihalinos, capaces de vivir en un amplio rango de salinidades (Mantel y Farmer, 1983). Además, se puede dividir a los crustáceos en dos grandes grupos, los osmoconformadores y los osmorreguladores, según cómo varíe la osmolaridad de los fluidos corporales en función de la osmolaridad del medio externo. En un organismo **conformador**, la concentración osmótica interna varía en igual medida que la del medio externo, por lo que la hemolinfa se torna isosmótica con respecto al medio externo. Por otro lado, los **reguladores** mantienen su concentración osmótica interna relativamente constante, sea esta más alta o más baja que la del medio externo, y lo pueden hacer en parte o a lo largo de todo el rango de tolerancia. Cabe mencionar que ambas estrategias no son puramente excluyentes ni absolutas, es decir, existen organismos con una capacidad relativa para regular, llamados débiles reguladores, como también organismos que osmorregulan o funcionan como osmoconformadores según el rango de osmolaridad del medio externo en que se encuentren.

Existen dos mecanismos principales por los cuales los fluidos corporales logran alcanzar un estado estacionario osmótico; los mecanismos **limitantes** que conducen a limitar la pérdida de solutos, algo que se logra reduciendo los gradientes que generan el flujo por difusión, o reduciendo el área o la permeabilidad de la superficie de intercambio. Por otro lado, están los mecanismos **compensatorios** que producen un movimiento de solutos en contra de su gradiente osmótico, de igual magnitud que la pérdida por difusión.

Los crustáceos de agua dulce, como la langosta *C. quadricarinatus*, poseen una hemolinfa hiperosmótica con respecto al medio externo, debiendo enfrentar así una constante pérdida de iones y ganancia de agua por difusión. A causa de estos fenómenos, las langostas de agua dulce deben regular fuertemente sus niveles iónicos y osmóticos por sobre los del medio que los rodea, por lo que varios factores están involucrados para compensar los problemas que implican la vida en agua dulce (McMahon, 2002). Los crustáceos de agua dulce minimizan los flujos de agua o iones adoptando principalmente **mecanismos limitantes**, que implican la reducción de la permeabilidad al agua o a los iones, o a ambos. Para ello, las langostas de agua dulce presentan un exoesqueleto formado por una gruesa cutícula calcificada, cuya baja permeabilidad restringe la pérdida de iones y disminuye el influjo pasivo de agua. Sin embargo, dado que ningún animal puede lograr una completa impermeabilidad, también se ponen en funcionamiento **mecanismos compensatorios** (Péqueux, 1995). La pérdida de iones es corregida por la captación activa de iones en las regiones donde existe una mayor permeabilidad, como las branquias; a su vez, el exceso de agua es eliminado por la glándula antenal que genera una orina hiposmótica al recaptar iones (Péqueux, 1995; Vogt, 2002). Muchas especies, a pesar de poseer una hemolinfa de alto contenido osmótico, producen grandes cantidades de orina de concentración entre un 10 y un 20 % respecto a su hemolinfa. De esta manera, eliminan el exceso de agua mientras que conservan las sales eficientemente.

Como se mencionó, las branquias son el principal lugar por donde ocurre la recaptación de iones monovalentes. En crustáceos de agua dulce, el mecanismo por el cual ocurre el transporte branquial de Na^+ y Cl^- no está del todo comprendido. En primer lugar, una bomba Na^+/K^+ ATPasa situada en la membrana basolateral de las células epiteliales branquiales genera el potencial electrogénico necesario para la captación de Na^+ desde el agua hacia el interior de la célula. La captación directa desde el medio ambiente es proporcionado por un intercambiador de Na^+/H^+ situado en la membrana apical (exterior) de la célula (Towle, 1990; Zare y Greenway, 1998). Este intercambiador parece ser electroneutro en la langosta *Orconectes limosus* (Straus & Grasinski, 1992), pero es electrogénico ($2\text{Na}^+:\text{H}^+$) en cangrejos del género *Carcinus* (Shetlar & Towle, 1989). Muchos otros sistemas de transporte de Na^+ están presentes en el sistema branquial de otros crustáceos (por ejemplo, un cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en la cara apical de las células), que también pueden estar presentes en las langostas de agua dulce. Al mismo tiempo, se han descrito mecanismos para el transporte de Cl^- que son independientes de Na^+ ; por ejemplo, en *Eriochier sinensis* se ha postulado la presencia de una bomba $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ATPasa basolateral. A su vez, existe evidencia sobre la existencia de una V-ATPasa en la membrana apical que actúa para aumentar la $[\text{HCO}_3^-]$ dentro de la célula branquial, lo cual incrementa la fuerza electromotriz para la captación de

Cl⁻ a través de un antiporter Cl⁻/HCO₃⁻ de la superficie apical (Onken *et al.*, 1991; Riestenpatt *et al.*, 1994; Onken y Putzenlechner, 1995). No existe demasiada evidencia directa de la presencia de estas vías en langostas de agua dulce. En la **Figura 3** se puede observar el mecanismo de transporte branquial de NaCl en un fuerte hiperosmorregulador.

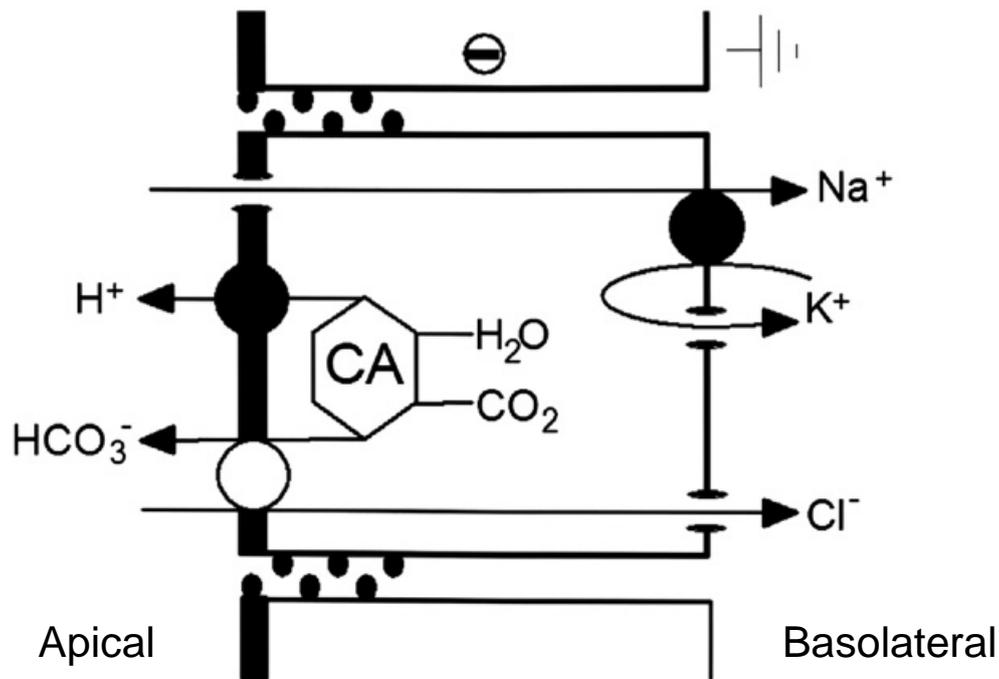


Figura 3. Mecanismo de absorción de NaCl a través de branquias de un crustáceo hiperosmorregulador (Onken y Riestenpatt, 1998). La absorción de Na⁺ ocurre vía canales sensibles a amilorida de la cara apical y una bomba Na⁺/K⁺-ATPasa basolateral. La absorción de Cl⁻ se realiza a través de un intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ apical y canales de Cl⁻ basolaterales. Los canales de K⁺ generan un potencial eléctrico negativo en las células. Una V(H⁺)-ATPasa en la cara apical genera un incremento celular de HCO₃⁻ ayudando a la absorción transapical de Cl⁻, y además hiperpolariza a la célula, permitiendo el ingreso transapical de Na⁺ y la salida de Cl⁻ a través de la membrana basolateral. (extraído de Freire *et al.*, 2008).

En cualquier caso, es importante la regulación osmótica del fluido intracelular (**regulación isosmótica**) implicada en el control del volumen y la osmolaridad de este fluido. De hecho, no hay célula alguna en los crustáceos que esté completamente preservada del estrés osmótico, cada vez que el animal se enfrenta con un cambio en la salinidad del medio externo. Los mecanismos implicados en este proceso ajustan el nivel de efectores osmóticos intracelulares para mantener el medio

intracelular isosmótico al medio extracelular, por ejemplo, y de este modo la hemolinfa evita la generación de gradientes osmóticos y flujos osmóticos de agua.

La participación de compuestos orgánicos en la osmorregulación celular es un proceso fundamental en todos los tejidos y tipos celulares. Los compuestos que poseen grupos amino, esencialmente los aminoácidos, aparecen como los solutos orgánicos (efectores osmóticos u osmolitos) de mayor importancia. En muchos casos la concentración de aminoácidos permanece baja y son otras sustancias, como por ejemplo los azúcares, los que actúan como efectores osmóticos esenciales. Se dice que los compuestos amino son solutos *compensatorios* porque no sólo pueden oponerse a los efectos disruptivos de los iones sobre las macromoléculas, sino que también permiten, en cierta forma, una regulación de la concentración intracelular de iones hacia valores cercanos al control. Esto implica que el reajuste osmótico luego de un shock hiperosmótico conducirá a un incremento en la cantidad intracelular de los principales iones inorgánicos; estos cambios son, sin embargo, sólo transitorios y en el curso del proceso de aclimatación los iones son reemplazados en el balance osmótico por solutos orgánicos. En este sistema regulatorio, los solutos orgánicos estarían compensando químicamente los efectos disruptivos de los iones sobre las estructuras macromoleculares, en las condiciones de estrés iniciales. Después de la aclimatación, ellos estarían compensando osmóticamente la brecha que dejan los iones al alcanzar su nivel normal (Gilles, 1997).

El mantenimiento de una composición más o menos constante de los fluidos extracelulares (**regulación anisomótica**) aparece como la estrategia más razonable y económica para preservar a los tejidos internos y las células de cambios violentos en el estado estacionario que podrían impedir procesos vitales o, al menos, inducir ajustes funcionalmente innecesarios. Como en la mayoría de los invertebrados, la osmolaridad de la hemolinfa de los crustáceos se debe principalmente a iones inorgánicos, esencialmente Na^+ y Cl^- . Como se ha mencionado previamente, dos tipos de mecanismos básicos, relevantes al sistema de bombas y difusión de iones, son los que están implicados en el control del nivel de NaCl en la hemolinfa: a) **procesos limitantes** que actúan sobre la permeabilidad de estructuras epiteliales para minimizar los movimientos difusivos de iones; b) **procesos compensatorios** que guían movimientos activos de NaCl para contrabalancear el flujo difusivo (Péqueux, 1995).

Por último, dado que el presente trabajo se realizó en juveniles hay que tener en consideración que estos poseen una mayor relación área/volumen respecto de los adultos, por lo que deben regular a diferentes niveles y utilizando mecanismos distintos. Las langostas juveniles tienen una superficie superior a los adultos, y dado que los movimientos de difusión de agua e iones son área dependiente, poseen una mayor pérdida de iones e influjo de agua aunque poseen el mismo nivel de permeabilidad. Por otro lado, el volumen relativamente bajo de los juveniles significa bajas concentraciones de iones y de agua, esto unido a las altas fuerzas de difusión nos indicaría que, en los juveniles, el movimiento de agua e iones podría ser mucho mayor.

1.I.B.a. *Regulación neuroendocrina*

Numerosos estudios en crustáceos decápodos han demostrado que la regulación osmótica e iónica es controlada por factores neuroendocrinos. Ciertas neurohormonas, producidas en los complejos órgano X-glándula del seno localizados en los pedúnculos oculares, participarían en la osmorregulación; estudios *in vivo* demuestran la existencia de más de un factor producido en los pedúnculos oculares, los cuales participarían en los procesos de osmorregulación e ionorregulación, es decir, en el equilibrio iónico y del agua corporal. Además, se ha visto que la inyección de extracto de pedúnculo ocular en animales ablacionados de sus pedúnculos, generalmente restauraba o incrementaba la regulación osmótica e iónica (Muramoto, 1988).

De las neurohormonas secretadas por la glándula del seno, se encontró en el cangrejo eurihalino *Pachygrapsus marmoratus* que la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) sería uno de los principales factores involucrados en la osmorregulación. Esta neurohormona actuaría a nivel de las glándulas antenales y sobre las branquias posteriores, controlando el transporte de los iones Na^+ y Cl^- (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000). Por otro lado, recientemente un trabajo demostró por primera vez en un crustáceo de agua dulce, *A. leptodactylus*, los efectos de una isoforma de CHH sobre parámetros osmorregulatorios, en particular la osmolaridad hemolinfática y la concentración de Na^+ (Serrano *et al.*, 2003). La regulación también se llevaría a cabo por monoaminas y hormonas peptídicas secretadas por los órganos pericárdicos (POs). Los POs son axones neurosecretorios que se encuentran adyacentes al corazón y secretan dopamina, serotonina, octopamina, proctolina y péptido cardioactivo hacia la hemolinfa (Morris, 2001). Sin embargo, hasta el momento la acción de las monoaminas no está del todo comprendida; los diversos resultados encontrados hacen difícil explicar un mecanismo de acción acorde al modelo de transporte iónico branquial.

1.I.C. *Metabolismo energético*

Los intermediarios del metabolismo de los crustáceos son básicamente los mismos que conocemos en otros organismos. Así, en algunas especies ha sido demostrada la conversión anaeróbica de glucógeno a lactato, o cómo la arginina-fosfato actúa como molécula de alta energía; se evidenció también la presencia de adenosina trifosfato (ATP) y de la enzima ATPasa, así como de fosforilasas, succínico deshidrogenasa y la citocromo oxidasa. Para los crustáceos, las principales vías metabólicas son la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) y la cadena respiratoria (Wolvekamp y Waterman, 1960). La fuente de energía relevante son los carbohidratos, constituyendo la glucosa y el glucógeno una tercera parte del pool de carbohidratos totales; aunque también fue demostrada la utilización de lípidos y proteínas.

En hemolinfa el azúcar preponderante es la glucosa, cuyo nivel es afectado por cambios en diferentes condiciones, como pueden ser el estadio de muda, el estrés, la actividad, el estadio de reproducción, el tiempo post-alimentación, la temperatura de aclimatación, entre otras. Además, existe una regulación neuroendocrina de la glucemia a cargo de la hormona CHH (Chang y O'Connor, 1983). Estos diversos efectos sugieren que la hemolinfa funciona como un lugar de almacenamiento transitorio para la glucosa removida de células o tejidos. Por otro lado, en la hemolinfa también se puede encontrar glucógeno almacenado en los hemocitos, células sanguíneas de libre circulación. Sin embargo, los principales tejidos de almacenamiento de glucógeno son el músculo y el hepatopáncreas. Los carbohidratos movilizados de los lugares de almacenamiento pueden seguir cuatro rutas principales: síntesis de quitina, producción de mucopolisacáridos, síntesis de ribosa y NADPH, o la glucólisis dando como producto final L-lactato, o CO_2 y agua (Herreid y Full, 1988).

La utilización de O_2 , la producción de CO_2 y el uso de fuentes de energía son una medida del metabolismo energético de las células y de un organismo intacto. Estos parámetros son modificados por factores ambientales y por el estado interno del organismo. Un índice del metabolismo energético (gasto de energía necesario para llevar a cabo todos los procesos metabólicos que ocurren en un organismo) es la tasa metabólica, la cual mide la conversión de energía química en calórica. La tasa metabólica puede ser estimada midiendo el consumo de oxígeno ya que en la respiración aeróbica se requiere oxígeno molecular para generar energía disponible para la célula. Dado que la

energía consumida por la célula debe ser rápidamente restaurada, es de esperar que a un mayor gasto energético ocurra también un mayor consumo de oxígeno por parte del organismo.

La energía asimilada derivada del alimento es utilizada en dos vías diferentes: de mantenimiento (vía catabólica) y de producción (vía anabólica). La vía catabólica requiere energía para satisfacer tres tipos de procesos:

- los procesos básicos necesarios para mantener la homeostasis interna en condiciones de reposo. El índice que denota la energía destinada para estos procesos es la tasa metabólica estándar (SMR),
- los procesos activos de locomoción, por ejemplo escape y predación, donde el índice que denota la energía destinada para estos procesos es la tasa metabólica activa (AMR), y
- los procesos digestivos y de captación-asimilación de alimentos, asignándole a la energía destinada para estos procesos el nombre de Acción Dinámica Específica.

La vía de producción (anabólica) mantiene la formación de tejidos (crecimiento, reemplazo de la cutícula o de tejidos perdidos, almacenamiento de energía, reproducción). Mientras que el mantenimiento estándar es un costo obligatorio, otros procesos tales como la actividad o producción pueden ser suprimidos temporalmente sin comprometer la supervivencia (Lucas, 1996). Por lo tanto, los requerimientos del mantenimiento estándar deberían ser satisfechos antes que la energía sea destinada hacia otros procesos, aumentando de esta forma la tasa metabólica estándar a expensas de una disminución de la cantidad de energía disponible para la producción (Rowe *et al.*, 2001). Entonces, en ausencia de procesos compensatorios, condiciones ambientales estresantes incrementarían la SMR, afectando negativamente el crecimiento, el almacenamiento de energía, y/o la reproducción. Se pueden citar diferentes ejemplos, como el aumento de la tasa metabólica estándar en la langosta *P. acutus* asociada con la exposición a contaminantes (Rowe *et al.*, 2001); y la disminución de energía disponible para el crecimiento en juveniles de *C. quadricarinatus* a salinidades mayores a 5 g/L, posiblemente debido a una mayor demanda energética de procesos tales como la osmorregulación y la ionorregulación (Meade *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha observado que un estado hipometabólico sería otra estrategia para sobrevivir ante condiciones ambientales adversas. De esta forma, la energía se conservaría reduciendo el crecimiento y la fecundidad, pero sin incrementar la energía utilizada para mantener la homeostasis (Ellis y Morris, 1995a, b; Ahern y Morris, 1999).

1.II. ESTRÉS

El estrés ambiental altera el equilibrio de un organismo, es decir, su estado homeostático, como consecuencia de la acción de un estímulo proveniente del medio, que recibe el nombre de agente estresante. Como respuesta a este estímulo, se desencadenan una serie de reacciones de comportamiento y/o fisiológicas con el fin de adaptarse lo mejor posible a esta nueva situación. En esta respuesta el organismo activa diferentes procesos que semejan ser simples, pero para que se puedan llevar a cabo un gran número de mecanismos de control fisiológico deben ser regulados de manera consecuente con las demandas del organismo (Morris, 1999). Desde el punto de vista fisiológico esta reacción es beneficiosa para el animal ya que le permite recuperar su estado homeostático anteriormente alterado. Si esta situación se convierte en crónica, el animal ya no tiene tanta capacidad para reaccionar y genera problemas en los procesos de crecimiento, reproductivos, osmorreguladores e inmunitarios que se reflejan a nivel de organismo, población y comunidad.

La respuesta a los cambios ambientales debe ser directa e inmediata, como la violenta contracción del músculo abdominal que permite que el animal escape a un estímulo peligroso, o debe involucrar respuestas compensatorias que involucren ajustes en uno o más procesos fisiológicos. Estas respuestas fisiológicas deben permitir al animal ajustar niveles internos de forma de compensar los cambios medioambientales y dependiendo de cómo reacciona el organismo a estos cambios puede ser de dos tipos, conformador o regulador. En un animal que es conformador, los niveles internos varían de acuerdo a como se modifica la variable ambiental; mientras que, un animal que regula mantiene sus niveles internos a pesar de la perturbación en el factor ambiental (McMahon, 2002).

La determinación de ciertos indicadores de estrés pueden ser usados para conocer el estado del organismo. Indicadores bioquímicos de estrés son típicamente componentes de la respuesta celular, la cual es incrementada como consecuencia de la exposición a condiciones ambientales que perturban la estructura proteica de la célula. La concentración de componentes bioquímicos del metabolismo cambia como resultado de la variación en las condiciones ambientales, produciendo alteraciones en el metabolismo que perjudican el comportamiento, la supervivencia, el crecimiento y el éxito reproductivo del animal (Dahlhoff, 2004).

1.II.A. *Compensación a variaciones en la temperatura y la salinidad del agua*

La temperatura y la salinidad son consideradas como dos de los factores más importantes que influyen sobre los organismos acuáticos, y los efectos biológicos asociados a estas variables son complejos. Brett (1979) consideró que la temperatura era el principal modificador del flujo de la energía, mientras que la salinidad sumaba una carga adicional a los requerimientos metabólicos del animal.

La temperatura corporal de los crustáceos es dependiente de la temperatura ambiental. De esta forma, cambios en la temperatura del ambiente tienden a afectar el metabolismo y la actividad del animal, aunque el efecto de la temperatura varía en los distintos componentes del metabolismo. Las especies que habitan ambientes con fluctuaciones de temperatura deben poseer un conjunto integrado de respuestas compensatorias ante la variación de este factor (Morris, 1999).

Aunque las langostas de agua dulce están sujetas a variaciones en la temperatura ambiental, los mecanismos de compensación fisiológica para los cambios de temperatura han sido poco estudiados. Rutledge (1981) y Rutledge y Pritchard (1981) demostraron que tanto la tasa metabólica estándar como el nivel de actividad se incrementaban al aumentar la temperatura de 10 a 20 °C. Los niveles de oxígeno y las características de unión y fijación del oxígeno en la hemolinfa también varían con la temperatura, pero depende del rango de temperaturas en que se midan estas variables (McMahon, 2002). A su vez, en crustáceos está bien establecido que los cambios en la temperatura se encuentran asociados con alteraciones en las frecuencias cardíaca y ventilatoria. La respuesta cardiovascular a los cambios en la temperatura ambiental debe compensar los cambios asociados en las demandas respiratorias. En gran medida, entre los efectos generados por el incremento en la temperatura corporal, y consecuentemente en el metabolismo, se encuentra la acidosis, facilitando la descarga de O₂ en los tejidos; así mismo, la acidosis provoca cambios en la configuración de proteínas que conlleva una disminución en la afinidad de la hemocianina por el O₂, con resultados similares en la solubilidad de los gases respiratorios.

Las langostas de agua dulce, aunque raramente, pueden ser encontradas en aguas donde existen fluctuaciones en la salinidad. Entre las especies que ocupan ambientes hipersalinos encontramos a *Pacifastacus leniusculus* y *Astacus leptodactylus* en Estados Unidos y ciertos países de Europa, respectivamente (Holdich *et al.*, 1997). *P. leniusculus* es una especie inusual ya que es capaz de

regular eficientemente el contenido de agua e iones hemolinfáticos tanto en un medio hiper- como hipo-osmóticos. Wheatly y McMahon (1982a) aclimataron grupos de *P. leniusculus* a <1, 25, 50 y 75 % de agua de mar y observaron que la osmolaridad hemolinfática aumentaba levemente en cada incremento, pero la mayor diferencia se encontró cuando la salinidad del medio era un 75 % del agua de mar (26 g/L), a la cual tanto la osmolaridad como la concentración de iones hemolinfáticos se mantuvieron por debajo de la línea isosmótica. Un caso particular son los niveles de Ca^{2+} , los cuales son regulados a un nivel constante por encima del ambiental. Por otro lado, los niveles de oxígeno en hemolinfa disminuyen significativamente con el aumento de la salinidad, pero la distribución de oxígeno se mantiene, en parte, por un incremento en la afinidad de la hemocianina por el oxígeno y por la utilización de reservas venosas. Durante la exposición a un medio hipersalino, la hemocianina cumple una función importante en el transporte de oxígeno, pero como parte de la respuesta compensatoria de *P. leniusculus*, también exhibe una reducción significativa en los niveles de hemocianina. Considerando el estado fisiológico de los animales que están sufriendo una disminución en el oxígeno hemolinfático, como también acidosis, este tipo de respuesta parece ser adaptativamente incorrecta (Wheatly y McMahon, 1982b).

La compensación fisiológica ante una condición estresante es un proceso que requiere energía, por lo cual el animal debe movilizar sustratos energéticos para poder sobrellevar metabólicamente el estrés (Barton y Schreck, 1987; Vijayan *et al.*, 1996, 1997), por lo que, para mantener un suministro constante de energía, el animal utiliza vías metabólicas tanto aeróbicas como anaeróbicas (Ho *et al.*, 2002). Este incremento de las demandas energéticas conlleva cambios en los sustratos energéticos de la hemolinfa como la glucosa, el lactato y los triglicéridos.

La variación en los niveles de glucosa en hemolinfa es una clara respuesta al estrés, la cual es iniciada por la hormona CHH (ver sección 1.III.); el incremento de esta hormona ante cambios en diferentes variables ambientales ha sido informado en una gran variedad de crustáceos (Yavuzcan Yildiz *et al.*, 2005; Santos y Keller, 1993; Kuo y Yang, 1999). La liberación de glucosa en la hemolinfa es un mecanismo que permite que diferentes procesos metabólicos básicos ocurran en condiciones donde los requerimientos energéticos son altos, permitiendo a los organismos lograr una compensación metabólica ante situaciones de estrés. A su vez, cuando los requerimientos energéticos son muy altos, la degradación de glucosa a través de la glucólisis se desarrolla en anaerobiosis con la consecuente acumulación de lactato en hemolinfa.

En lo que respecta particularmente a *C. quadricarinatus*, la especie esta clasificada como euritérmica y mesohalina (Meade *et al.*, 2002), y aunque tolera un amplio rango de temperaturas y salinidades, sólo en un rango estrecho de estos dos factores la sobrevivencia, la ganancia de peso y la eficiencia en el crecimiento son máximas (Austin, 1995; Karplus *et al.*, 1998; Meade *et al.*, 2002; Nyström, 2002). Si bien se han realizado numerosos estudios para optimizar su producción en criaderos, existen muy pocos informes analizando las respuestas compensatorias de la especie ante variaciones en las condiciones ambientales.

1.III. HORMONA HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTÁCEOS (CHH)

La CHH es un neuropéptido sintetizado y secretado, principalmente, por el complejo órgano X (OX) – glándula del seno (GS) localizado en el pedúnculo ocular de los crustáceos decápodos. La primera función que se le adjudicó a esta hormona fue la regulación de los niveles de glucosa en hemolinfa, pero actualmente es sabido que también está involucrada en el control del crecimiento, la reproducción, el balance iónico y la respuesta al estrés (Fanjul-Moles, 2006). CHH pertenece a una familia de péptidos que incluye a la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH), la Hormona Inhibidora de la Vitelogenénesis o Gonadal (VIH o GIH) y la Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular (MOIH). Todos estos péptidos están estructuralmente relacionados y poseen seis cisteínas conservadas que forman tres puentes disulfuro intramoleculares (Giulianini y Edomi, 2006).

Los miembros de esta familia pueden ser divididos en dos subgrupos, la subfamilia CHH y la subfamilia MIH (la cual también incluye a GIH y a MOIH), en base a sus estructuras primarias y la organización de proteínas precursoras. La familia puede ser clasificada en base a su estructura primaria y la organización peptídica de la prohormona. La subfamilia CHH o péptidos tipo I, posee una secuencia crítica de función desconocida llamada *péptido precursor-liberador de CHH*, que es el precursor de la hormona sin procesar (Weidemann *et al.*, 1989); mientras que la subfamilia MIH/VIH/MOIH o péptidos tipo II, que son de longitud variable, poseen una glicina en la posición 12 y no poseen el precursor antes mencionado (de Kleijn *et al.*, 1993, 1994; Chen *et al.*, 2005). La CHH madura tiene una longitud de 72 a 73 aminoácidos y el rango de homología entre las especies varía de un 40 a un 99 % (Marco, 2004). Poseen un extremo C-terminal amidado, y en muchos casos, piroglutamato como grupo que bloquea el extremo N-terminal (Fanjul-Moles, 2006; Giulianini y Edomi, 2006). La secuencia del extremo N-terminal de CHH, bloqueado o libre, es casi idéntica; dicha modificación serviría para proteger a la hormona de peptidasas (Rink *et al.*, 2010). A

su vez, la hormona presenta un residuo fenilalanina en la posición 3 que puede variar en su configuración L o D (Soyez *et al.*, 1994). Por otro lado, posee una modificación post-traducciona en el extremo C-terminal que estaría relacionada con la actividad biológica de la hormona (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008).

1.III. A. *Localización de neuronas neurosecretoras*

El sistema endocrino de las langostas de agua dulce esta conformado por varios órganos, cuyo origen puede ser neural o epitelial. Los centros neuroendocrinos son conjuntos de somas de neuronas neurosecretoras que sintetizan neurohormonas. Sus axones proyectan hacia el órgano neurohemal donde las neurohormonas se liberan hacia la hemolinfa (Vogt, 2002). Los órganos neuroendocrinos de las langostas de agua dulce incluyen al sistema órgano X-glándula del seno (OX-GS), al ganglio supraesofágico, al órgano post-comisural, al órgano pericárdico y al ganglio torácico. Mientras que los órganos endocrinos epiteliales (glándulas endocrinas) están compuestos por grupos de células epiteliales modificadas que sintetizan hormonas y las liberan hacia los senos hemolinfáticos adyacentes; son ejemplos de glándulas endocrinas el órgano mandibular (OM), el órgano Y, la glándula androgénica y el ovario.

Como en vertebrados, el sistema endocrino de las langostas de agua dulce está organizado jerárquicamente. El sistema OX-GS es análogo al eje hipotálamo-neurohipófisis de vertebrados y secreta tanto neurohormonas tróficas como efectoras. La GS es considerada el principal centro neurohemal de los decápodos y se encuentra localizada en la superficie del ganglio óptico, sobre el lado latero-dorsal entre la medula externa y la interna (**Fig. 4**). La GS está conectada por un tracto axonal con el OX, el cual está ubicado en el extremo ventral de la medula terminal. En los decápodos, el OX está formado por alrededor de 150-200 somas neuronales que constituyen una población heterogénea de células neurosecretoras que produce diferentes tipos de neuropéptidos (Cooke y Sullivan, 1982) que pueden separarse en dos familias funcionalmente distintas: la familia de las cromatoforinas, que incluye a la hormona concentradora de pigmentos rojos (RPCH) y a la hormona dispersante de pigmentos negros (PDH), y la familia CHH/MIH, de la cual hablamos anteriormente y en la cual se centrara nuestro estudio. Estos neuropéptidos son transportados a través de los axones y son almacenados en vesículas en los terminales axónicos que forman la glándula del seno, sitio donde quedan retenidos hasta su posterior liberación (Vogt, 2002).

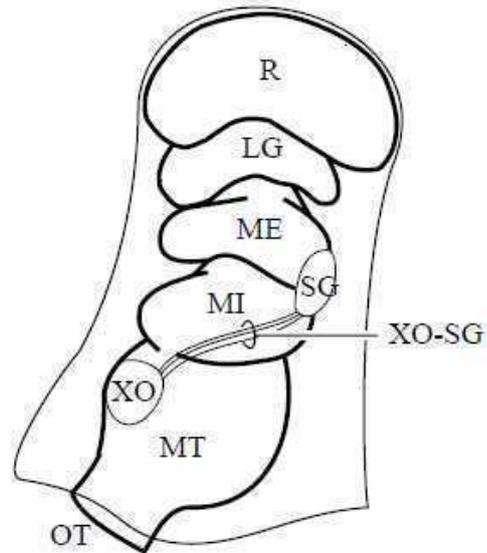


Figura 4. Representación esquemática del pedúnculo ocular de una langosta de agua dulce. R: retina; LG: lamina ganglionaris; ME: medula externa; MI: medula interna; GS: glándula del seno; OX: órgano X; OX-GS: tracto nervioso órgano X-glándula del seno; OT: tracto óptico (extraído de Escamilla-Chimal *et al.*, 2001).

Aunque el OX-GS es considerado el principal sitio de producción de CHH, se han detectado péptidos de la familia CHH/MIH en otros órganos de crustáceos. Los otros posibles sitios de producción de CHH son el órgano pericárdico (Keller *et al.*, 1985; Dircksen y Heyn, 1998; Dircksen *et al.*, 2000), la retina (Escamilla Chimal *et al.*, 2001), el ganglio supraesofágico, paraneuronas de la parte anterior y posterior del intestino (Chung *et al.*, 1999; Webster *et al.*, 2000).

1.III.B. Aspectos fisiológicos

La función principal que define a CHH esta relacionada con el control del metabolismo de los carbohidratos; ha sido ampliamente demostrado que la inyección de extracto de pedúnculo ocular u homogenatos de la GS, como también de CHH purificada, produjo hiperglucemia; además, se comprobó que el efecto producido por las diferentes fuentes hormonales era grupo- o especie-específico (Leuven *et al.*, 1982). La respuesta evocada es iniciada rápidamente (dentro de los 15–20 minutos) y sostenida por largos períodos. En general, la hiperglucemia es el resultado de la movilización de las reservas de glucógeno de órganos blanco, como el hepatopáncreas y el músculo abdominal, como consecuencia de la activación de la fosforilasa e inhibición de la glucógeno sintetasa (Sedlmeier, 1985; Sedlmeier y Dieberg, 1982; Sedlmeier y Keller, 1981). Aunque la

respuesta hiperglucémica es aparentemente adaptativa, permitiendo que estén disponibles para el organismo fuentes de energía de rápida metabolización, se ha sugerido que el aumento en los niveles de glucosa en hemolinfa se debería a una mayor concentración del carbohidrato dentro de las células de la que puede ser metabolizado, por lo cual, parte difunde fuera de la célula y así se genera la hiperglucemia (Santos y Keller, 1993a, b).

El significado adaptativo de la hiperglucemia es evidente cuando, al determinar la concentración de CHH en hemolinfa luego de exponer a los crustáceos a situaciones de estrés (como ser emersión, hipoxia, estrés térmico y salino) se observa un rápido incremento de la hormona (Chang *et al.*, 1998; Chung y Webster, 2005; Chung y Zmora, 2008; Keller y Orth, 1990; Kou y Yang, 1999; Webster, 1996). Además, en crustáceos con hábitos nocturnos como la langosta de agua dulce *A. leptodactylus*, la hiperglucemia es un resultado de la liberación de CHH al comienzo de la escotofase (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985; Kallen y Abrahamse, 1989; Kallen *et al.*, 1990). A su vez, el aumento en los niveles de glucosa parece regular negativamente la liberación de CHH; estudios en los que se inyectó glucosa han demostrado que dicho carbohidrato inhibe la liberación de CHH (Santos y Keller, 1993). A través de diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro* se pudo observar como ocurre la regulación de la síntesis y secreción de la hormona. Experimentos realizados *in vitro* permitieron observar que las neuronas productoras de CHH en el sistema OX-GS están bajo feedback negativo de la glucosa hemolinfática y responden a D-glucosa con una hiperpolarización que inhibe la liberación de CHH (Glowik *et al.*, 1997); al haber hipoglucemia, las células que secretan CHH se despolarizan induciendo la liberación de CHH y la posterior movilización de glucosa desde las reservas de glucógeno. A su vez, experimentos *in vivo* sugieren un segundo feedback, pero en este caso positivo; el lactato producido debido al aumento de la glucólisis estimula la liberación de CHH para, de esta forma, estimular la glucogenolisis (Santos y Keller, 1993a, b). Durante el transporte desde el órgano neurohemal al órgano blanco, CHH se encuentra unida a subunidades de hemocianina (Kallen *et al.*, 1990) y en el órgano blanco la hormona induce la movilización de glucosa desde las reservas de glucógeno, particularmente del hepatopáncreas y del músculo abdominal, y regula los ácidos grasos y fosfolípidos hemolinfáticos por catabolismo de las reservas de lípidos del hepatopáncreas (Kummer y Keller, 1993; Santos y Keller, 1993a; Santos *et al.*, 2001).

Aunque la principal función de CHH fue reconocida hace mucho tiempo, en los últimos años se ha demostrado que CHH es una hormona pleiotrópica involucrada en muchas otras funciones fisiológicas de gran importancia para los crustáceos. Una de las nuevas funciones de CHH

esta relacionada con la osmo/ionorregulación. En el cangrejo *Pachygrapsus marmoratus*, la perfusión de las branquias posteriores con extracto de glándula del seno o directamente con CHH incrementó el potencial transepitelial y el influjo de Na⁺ (Eckhardt *et al.*, 1995; Pierrot *et al.*, 1994; Spanings-Pierrot *et al.*, 2000); y en la langosta de agua dulce *A. leptodactylus*, la inyección de CHH incrementó la osmolaridad hemolinfática y los niveles de Na⁺ en animales con los pedúnculos oculares ablacionados (Serrano *et al.*, 2003). Otra función osmorregulatoria de CHH se encontró en *C. maenas*, cangrejo en el cual se observó la liberación de la hormona en células de la parte anterior y posterior del intestino, desde donde se secreta de forma masiva y temporalmente coordinada con el comienzo de la ecdisis; el efecto es la dipsogénesis y la subsecuente absorción de agua (Chung *et al.*, 1999).

1.IV. ACUICULTURA

Se denomina *Acuicultura* a la cría de organismos acuáticos como peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. Esta actividad supone la intervención en el proceso de producción, a través, por ejemplo, de reposición constante, alimentación, protección contra los depredadores, etc. También supone la propiedad individual o conjunta de la población producida. Con fines estadísticos, se considera que la acuicultura consta de los organismos acuáticos que recoge una persona o un grupo que es propietario de esos organismos durante su desarrollo, mientras que los organismos acuáticos que puede explotar el público como recurso común, con o sin la autorización correspondiente, son el producto de la pesca.

La pesca por captura y la producción acuícola representan una fuente de alimento importante en todo el mundo. El sector pesquero y acuícola es crucial para la seguridad alimentaria, la mitigación de la pobreza y el bienestar general. La acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, y a mayor ritmo que la población, con un incremento del suministro acuícola per cápita desde 0,7 kg. en 1970 hasta 7,8 kg. en 2008, lo que constituye un crecimiento medio anual del 6,6 %. En 2008, el mundo consumió 115 millones de toneladas de pescado, y se prevé que la demanda aumente. El pescado y los productos pesqueros son una fuente esencial y asequible de alimentos y proteínas de alta calidad (en 2008 el consumo alimenticio de pescado alcanzó un récord histórico de casi 17 kg. por persona, lo que proporcionó a más de 3.000 millones de personas el 15 % como mínimo de su consumo medio de proteínas animales). A pesar de la larga tradición de la práctica acuícola en algunos países, en el

contexto mundial, la acuicultura es un sector de producción de alimentos joven que ha crecido rápidamente en los últimos 50 años. La producción acuícola mundial se ha incrementado notablemente, desde menos de 1 millón de toneladas anuales en 1950 hasta los 52,5 millones de toneladas en 2008. La acuicultura sigue siendo un sector productivo de alimentos ricos en proteínas creciente, vigoroso e importante (FAO, 2010). Asia ha conservado su puesto, cada vez más dominante, en la producción acuícola mundial. Esta región generó el 88,8 % de la producción acuícola mundial en cantidad y el 78,7 % en valor en 2008, y por sí sola China generó el 62,3 % de la producción acuícola mundial en cantidad y el 51,4 % en valor en el mismo año. Las tendencias del crecimiento de la producción acuícola no son uniformes en todas las regiones. La región de América Latina y el Caribe presenta el mayor crecimiento medio anual (21,1 %), seguida por la región del Cercano Oriente (14,1 %) y la región de África (12,6 %).

En América Latina, la acuicultura en la última década experimentó un desarrollo significativo gracias al uso de las nuevas tecnologías y a los sistemas de producción que permitieron una producción más eficiente y eficaz. Ello ha hecho que la actividad sea percibida generalmente por los sectores públicos y privados como favorable y provechosa para el desarrollo económico de los países (NACA/FAO, 2001). Los cambios en las políticas macroeconómicas, estructuras institucionales, cuestiones legales y mercados domésticos e internacionales han permitido que el ambiente para el desarrollo de la acuicultura haya experimentado esta tendencia positiva en algunos países donde se ha mostrado un mayor crecimiento como Chile y Brasil. En general, el sector privado ha sido el promotor de tal desarrollo, especialmente en los países con mayor crecimiento en acuicultura.

El desarrollo de la acuicultura rural, en América Latina y el Caribe, aún depende de la asistencia técnica y económica que brindan los gobiernos; y aunque ésta es escasa, su desarrollo posee un potencial para contribuir al alivio de la pobreza (Morales y Morales, 2006). Es importante recalcar que la acuicultura rural no tiene un desarrollo histórico en esta región comparable a aquel en Asia. Dado que esta última es poco relevante, la producción acuícola no parecería tener un valor importante directo para la seguridad alimentaria, sin embargo, su aporte indirecto por generación de trabajo podría ser muy importante.

Entre las principales especies que se cultivan en América Latina y el Caribe se encuentran los salmónidos (salmones y truchas) en 9 países de la región, los camarones marinos reportados en 18 países y las tilapias reportada en 20 países. Estos tres grupos constituyen los principales cultivos regionales. En el caso de las especies endémicas se destacan el tambaqui o cachama (*Colossoma macropomum*) y el pacú (*Piaractus mesopotamicus*), que sostienen importantes cultivos en las cuencas de donde son originarias, aunque también han sido exportados a diferentes países intra- y extra-regionalmente. De igual forma los moluscos, particularmente bivalvos que se cultivan en seis países, y cuyas potencialidades se vienen desarrollando en los últimos años, constituyen un tipo de cultivo que ha mostrado un significativo incremento en la última década (FAO, 2005). Adicionalmente, se cultivan al menos otras 47 especies correspondientes a los siguientes grupos: carpas, carácidos, moluscos y macro algas, entre otros. En una década la producción acuícola de América Latina y el Caribe ha crecido en forma acelerada, mostrándose el mayor crecimiento en los salmónidos, camarones, tilapias, moluscos bivalvos y carácidos. En términos relativos, estos tres últimos grupos han crecido más que los camarones, si bien estos se consolidan como el cultivo más importante en la mayoría de los países.

1.IV.A. *Acuicultura de Crustáceos*

Los Crustáceos son un producto acuícola de suma importancia. La acuicultura de Crustáceos incluye la producción de un diverso rango de especies entre las que se encuentran los camarones marinos y de agua dulce, los cangrejos y las langostas marinas y de agua dulce. Durante el año 2008 la producción mundial de crustáceos estuvo distribuida de manera relativamente equilibrada entre el agua salobre (2,4 millones de toneladas o el 47,7 %), el agua dulce (1,9 millones de toneladas o el 38,2 %) y el agua de mar (0,7 millones de toneladas o el 14,1 %). Entre los crustáceos criados en agua dulce se incluyeron más de 0,5 millones de toneladas de la especie marina de camarón patiblanco (*Panaeus vannamei*) producido por China, que en los informes anteriores se había atribuido a la producción en agua salobre (FAO, 2010). La producción acuícola de todos los principales grupos de especies continuó aumentando en el período 2000-2008. La producción de crustáceos se incrementó en promedio un 15 % al año durante dicho período, más rápidamente que en la década previa. El rápido aumento de la producción de crustáceos refleja en gran medida el drástico incremento de la piscicultura de camarones patiblancos en China, Tailandia e Indonesia.

Cherax quadricarinatus, comúnmente llamada *redclaw*, es considerada de importancia comercial; se puede listar como atractivos destacables su rápido crecimiento, una alta eficiencia en la

conversión del alimento y el desarrollo directo de los huevos. Estas langostas de agua dulce son de gran tamaño, pudiendo alcanzar pesos de hasta 350 gramos con una elevada proporción de carne; además, otra característica sobresaliente es la capacidad de sobrevivir fuera del agua por prolongados períodos (Wingfield, 1998). Si bien esta especie fue introducida por primera vez en Argentina a principios de la década del '90 con el objetivo de desarrollar el cultivo para mercados de consumo, se la cultivó en acuarios comercializándose como mascotas desde años previos. Su crecimiento productivo en campo ha sido poco significativo y en los últimos años su volumen osciló debido a diferentes motivos. La baja producción observada se ha debido a: a) la ausencia de tecnología de cultivo desarrollada desde el Estado, b) una mala elección del sitio de cultivo en algunos casos y c) la falta de disponibilidad, principalmente, de post larvas o juveniles en el comercio, lo que obliga a un productor novel a realizar el ciclo de vida completo de la especie.

1.V. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la respuesta fisiológica de juveniles avanzados de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* a condiciones de estrés térmico y salino, evaluando la acción de la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) sobre procesos clave como son el metabolismo energético y la osmorregulación.

Los avances obtenidos en el presente trabajo de investigación podrían servir como base para una futura transferencia al ámbito productivo, dado el gran interés por el cultivo de esta especie en nuestro país, en particular, así como en América Latina.

2. CAPITULO I

EVALUACION DEL ESTRES TERMICO Y SALINO EN JUVENILES DE LA LANGOSTA DE AGUA DULCE

Cherax quadricarinatus

2.I. OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i. Estudiar la aclimatación gradual de juveniles de *C. quadricarinatus* a temperaturas bajas, tolerables para la especie en estudio, tanto en agua dulce (normal para esta especie) como a salinidades mayores.
- ii. Evaluar el metabolismo y la osmorregulación de los individuos de la especie en estudio, luego de la aclimatación a condiciones de estrés térmico y salino.
- iii. Evaluar la respuesta a corto plazo, de *C. quadricarinatus*, luego de la exposición a condiciones estresantes sin previa aclimatación (estrés agudo).
- iv. Determinar las posibles oscilaciones en los niveles de ARN mensajero (ARNm) de la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) y de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxiquinasa (PEPCK) por estrés térmico y osmótico.

2.I.A. Efecto de la aclimatación gradual y sostenida (estrés crónico) a bajas temperaturas y diferentes salinidades en juveniles de *C. quadricarinatus*

2.I.A.a. MATERIALES y MÉTODOS

2.I.A.a.i. Diseño experimental

Para el estudio se utilizaron 60 machos juveniles en intermuda de la especie *C. quadricarinatus*, adquiridos en un criadero comercial (*Ecopeces*, Santa Fe, Argentina) durante febrero de 2007. Las langostas fueron aclimatadas en el laboratorio durante dos semanas bajo condiciones controladas de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) y fotoperíodo (14 horas luz - 10 horas oscuridad). Se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces (Tetra Color®) y *Elodea sp ad libitum*. El agua utilizada durante la aclimatación y la fase experimental consistió en agua corriente de red declorada (dureza: 80 mg/L, como equivalentes de CaCO_3) y filtrada a través de filtros de resina de intercambio iónico, de carbón activado y de fibra sintética (Hidroquil).

Finalizado el período de aclimatación, cada animal fue pesado y colocado individualmente en un frasco de vidrio de 1,5 litros (L) de capacidad. El peso medio de los animales utilizados fue de $5,71 \pm 1,53$ gramos (g). Se asignaron al azar un total de 10 animales a cada uno de los grupos experimentales, acorde a ensayos previos realizados con la especie en estudio (Jones, 1997; Meade *et al.*, 2002). Quedando definidos los siguientes grupos:

Temperatura de 27 °C

Grupo 1: agua dulce de red

Grupo 2: salinidad de 5 g/L

Grupo 3: salinidad de 10 g/L

Temperatura de 20 °C

Grupo 4: agua dulce de red

Grupo 5: salinidad de 5 g/L

Grupo 6: salinidad de 10 g/L

La aclimatación a 20 °C se realizó gradualmente descendiendo la temperatura del agua a una tasa de 0,5 °C/ día, mientras que el pasaje de agua dulce a la salinidad correspondiente se realizó a una tasa de 1 g/L/ día. Para obtener la salinidad deseada se adicionaron sales artificiales para agua de mar (Marine Mix HW, Alemania) al agua de red declorada. Una vez alcanzadas las condiciones de

cada tratamiento, las langostas se mantuvieron de esa forma los 30 días que duró el ensayo. Durante el ensayo, los animales se alimentaron tres veces por semana, mientras que el agua fue renovada una vez a la semana. Diariamente, se controló la salinidad (Sper Scientific, $\pm 0,5$ g/L), el pH (Tracer pocketester, $\pm 0,01$ unidades) y la temperatura (± 1 °C) del agua de todos los frascos. Cuando fue necesario, el pH se corrigió adicionando NaCl o HCl de forma de mantener el valor en 7,5. Por otro lado, a lo largo de todo el ensayo se contabilizaron las muertes de forma de poder estimar la sobrevida.

Al finalizar la fase experimental, se determinó la tasa de consumo de oxígeno en una cámara isovolumétrica provista de un electrodo de oxígeno polarográfico (LUTRON DO-5510), el cual se encontraba conectado a una computadora. Para lograr que la concentración de oxígeno se mantuviese homogénea durante la medición, la cámara con un magneto en su interior se ubicó sobre un agitador magnético, impidiendo de esta forma la generación de gradientes. Cada langosta se ubicó dentro de una jaula que impedía que se moviera, y dicha jaula dentro de la cámara llena de agua. Luego de colocar al animal dentro de la cámara, se procedió a registrar el consumo de oxígeno durante 15 minutos. Al finalizar, se registró el peso corporal de cada animal mediante balanza digital (precisión de $\pm 0,1$ mg). Se consideró el peso húmedo, colocando a cada juvenil sobre un papel tissue para remover el exceso de agua. Posteriormente, se extrajeron de cada animal entre 100 y 200 μ l de hemolinfa con jeringa hipodérmica y aguja 27G; cada muestra se colocó en un tubo tipo eppendorf y se guardó a -20 °C hasta su utilización. Inmediatamente, las langostas fueron colocadas en un baño de hielo durante cinco minutos para ser anestesiadas y luego disecar los pedúnculos oculares, el hepatopáncreas y el músculo abdominal, los cuales fueron guardados a -70 °C hasta su utilización. Las langostas no fueron alimentadas las 24 horas previas a la determinación del consumo de oxígeno.

A partir de la determinación del peso corporal, se estimó la ganancia en peso para cada tratamiento de la siguiente manera:

$$\text{Ganancia en peso (\%)} = ((P_f - P_i) / P_i) \times 100$$

Donde P_i y P_f corresponden a los pesos inicial y final de la fase experimental, respectivamente.

Para determinar la tasa de consumo de oxígeno, primero se calculó el volumen de O₂ presente en la cámara respirométrica de acuerdo con el siguiente algoritmo:

$$\mu\text{g O}_2 = (\text{lectura en mg/L} * 1000) * \text{VC (L)}$$

donde:

VC = volumen neto de la cámara de medición. Corresponde al volumen total de la cámara menos el volumen ocupado por el electrodo, la jaula con la langosta y el buzo.

La tasa de consumo de oxígeno se calculó como la pendiente de la regresión de los μgO_2 remanentes en el respirómetro en función del tiempo (minutos), y se expresó en función del peso del animal (gramos).

A partir de las diferentes muestras biológicas extraídas en el momento de sacrificar el animal, se determinaron las siguientes variables:

Concentración de sodio y potasio hemolinfáticos. A partir de una dilución 1/400 de las muestras de hemolinfa, se midieron los iones utilizando un fotómetro de llama (Crudo Caamaño SRL, Argentina).

Niveles de aminoácidos libres en hemolinfa y músculo abdominal. La determinación se realizó mediante un método fluorométrico que se basa en la reacción de los aminoácidos con O-fthaldehído, en presencia de β -mercaptoetanol como agente reductor (Fisher *et al.*, 2001), utilizado exitosamente para este tipo de muestras en la especie en estudio (Prymaczok *et al.*, 2008); la fluorescencia se midió en un fluorómetro Bowman, usando una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

Niveles de glucógeno en hepatopáncreas y músculo abdominal. El glucógeno presente en el hepatopáncreas y en el músculo abdominal se extrajo según la metodología descrita por Van Handel (1965). Los niveles de glucógeno en las langostas fueron determinados como glucosa hidrolizada, luego de la hidrólisis ácida (HCl) y la neutralización (Na₂CO₃) siguiendo el método de Geary y colaboradores (1981).

Glucemia. A partir de alícuotas de 20 µl de cada muestra de hemolinfa o de la hidrólisis del glucógeno, se midió el contenido de glucosa mediante un kit enzimático-colorimétrico (Wiener Lab., Argentina). La absorbancia de cada muestra se midió en un espectrofotómetro a 505 nm (Jenco).

Determinación de los niveles de ARNm utilizando la técnica RT-PCR. La expresión de los distintos genes de interés (ver más adelante) fue determinada estimando sus niveles de ARN mensajero por medio de reacciones de Retrotranscripción (RT) y subsiguientes reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera, se estimó la expresión de diferentes genes en diferentes tejidos, a saber: de la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) en pedúnculo ocular, y de las enzimas Fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK), Glucógeno sintetasa (GS) y Glucógeno fosforilasa (GP) en músculo abdominal. A continuación se detalla el protocolo de la técnica y su puesta a punto en *C. quadricarinatus*.

Puesta a punto del aislamiento de ARN total de pedúnculos oculares de la langosta C. quadricarinatus. Se disecaron los pedúnculos oculares de cuatro hembras adultas, separando el tejido nervioso de cada pedúnculo de la cutícula y de los pigmentos oculares. Seguidamente, se realizó el aislamiento de ARN total de estos tejidos con TRI REAGENT (Molecular Research Center) según indicaciones del fabricante:

Homogenización

- Homogenizar 50 - 100 mg de tejido con 1 ml de TRI Reagent
- Incubar el homogenato 5 minutos a temperatura ambiente

Extracción de ARN

- Agregar 0,2 ml de cloroformo al homogenato y mezclar
- Incubar la muestra 10 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar por 15 minutos a 12.000 x g a 4 °C

Precipitación de ARN

- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo

- Agregar 0,5 ml de isopropanol y mezclar
- Incubar la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar durante 8 minutos a 12.000 x g (4 - 25 °C)

Lavado de ARN

- Agregar 1 ml de etanol 75 % al pellet de ARN
- Centrifugar por 5 minutos a 7.500 x g (4 - 25 °C)

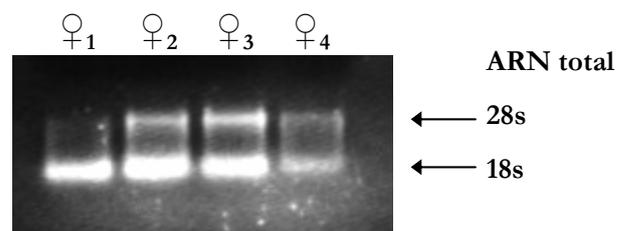
Solubilización

- Secar el pellet de ARN por 5 – 10 minutos
- Disolver con micropipeta en 50 µl de H₂O MiliQ
- Incubar por 10 minutos a 55 °C

Debido a que la extracción de ARN de pedúnculos oculares resultó poco eficiente para los objetivos planteados, luego de la homogenización mecánica del tejido se debió realizar una primera centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, de esta manera se elimino material insoluble como membranas celulares y polisacáridos. La concentración del ARN total purificado fue determinada por absorbancia, medida a 260 nm. La integridad del ARN total fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, visualizando como referencia la integridad de las subunidades ribosomales (18S y 28S). El ARN total fue guardado a -70 °C hasta su uso.

Tras una intensa puesta a punto, se logró generar un protocolo efectivo a partir del cual tanto la integridad como la cantidad de ARN aislada fue suficiente para llevar a cabo las reacciones necesarias que nos permitieron determinar los niveles del ARNm de CHH por RT-PCR (**Fig. 5**).

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de ARN total de pedúnculos oculares de cuatro hembras adultas. Se muestra las subunidades ribosomales 18S y 28S como medida de la integridad del ARN purificado.



Una vez que se logró extraer el ARN total, se determinó la cantidad mínima de tejido necesaria para llevar a cabo los análisis de RT-PCR de pedúnculo ocular de juveniles de *C. quadricarinatus*. Debido a que los pedúnculos oculares de las langostas utilizadas son muy pequeños, el ARN total de este tejido debió ser obtenido a partir de cuatro pedúnculos oculares (equivalente a dos animales). Este diseño experimental también permite disminuir la variabilidad entre animales.

Puesta a punto de la reacción de retrotranscripción (RT) del ARNm para generar DNA copia (cDNA). El ARN total extraído de los pedúnculos oculares se utilizó como molde para la reacción de retrotranscripción. Para la síntesis del cDNA por retrotranscripción se utilizó la enzima M-MLV (Promega) según indicaciones del fabricante, usando oligo-dT como primer. Con este procedimiento se obtuvo el cDNA. Todo el proceso de puesta a punto del aislamiento de ARNm y posterior RT fue evaluado por reacciones de PCR empleando primers específicos para el cDNA de β -actina de *Cherax quadricarinatus*, los cuales se diseñaron a partir de la secuencia de β -actina informada en el trabajo de Martínez-Pérez et. al, 2005 (GenBank: AY430093.1)

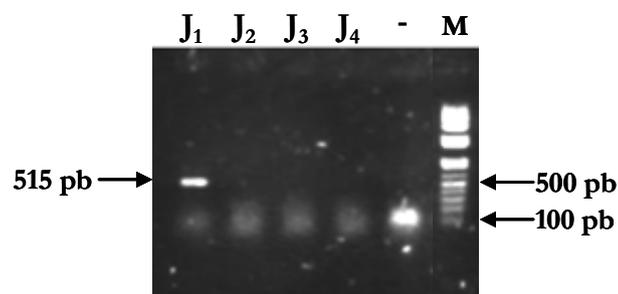


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de β -actina. La extracción de ARN se realizó a partir de pedúnculos oculares de juveniles (J). El (-) corresponde a un control negativo en el cual no se utilizó retrotranscriptasa, indicando ausencia de DNA genómico en la purificación de RNA. Los números a la derecha indican los marcadores de peso molecular conocido (M, 1KbPlus de Invitrogen) y el de la izquierda indica la banda específica de β -actina (\approx 515 pb).

Como se observa en la **Figura 6**, en las calles pertenecientes a los juveniles 2, 3 y 4 no se visualiza la presencia del producto de PCR de β -actina, indicando una extracción de ARN ineficiente. Esto puede deberse a que son extracciones de ARNm preliminares en las cuales se utilizó, como parte del proceso de puesta a punto, el protocolo descrito en Chomezynski y Sacchi,

1987; a diferencia de lo mencionado anteriormente, la extracción de ARN del juvenil 1 se realizó con TRI REAGENT (Molecular Research Center) de manera exitosa.

Puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la determinación del ARNm de CHH en pedúnculos oculares. Se realizaron distintos protocolos de reacciones de PCRs para amplificar el cDNA de la hormona. Como control interno de los diferentes protocolos de PCR se utilizó como templado el vector plasmídico conteniendo el cDNA de CHH de *C. quadricarinatus*, descrito por el grupo del Dr. Sagi (GenBank: DQ095778.1). De esta forma, se seleccionaron las condiciones óptimas para las posteriores reacciones en las que se utilizó cDNA total de pedúnculos oculares. Las reacciones se realizaron en un termociclador DNAEngine (BIORAD) utilizando la enzima Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Para ello, fueron diseñados primers específicos para la secuencia de CHH reportada, los cuales se detallan a continuación:

primer sentido: 5'ATGAGCTCCAGGTGTTTGATCAGGCGTGT`3

primer antisentido: 5'ATGGGCCCTAACATATTCGTCGACCACGTCT`3

Tras optimizar diferentes protocolos, se obtuvo finalmente uno con el cual la amplificación del cDNA de CHH fue eficiente y no se observaron bandas inespecíficas (**Fig. 7**). Dicho programa de PCR fue el siguiente:

Un ciclo inicial de 94 °C por 1 minuto (desnaturalización inicial del DNA), 35 ciclos sucesivos de: 94 °C por 45 segundos (desnaturalización del DNA), 58 °C por 1 minuto (hibridación de primers con el templado, también llamada Temperatura de annealing), 72 °C por 40 segundos (elongación de la Taq). Finalmente, fue realizada una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Para la amplificación del cDNA de β -actina el programa de PCR empleado fue el siguiente:

Un ciclo inicial de 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos sucesivos de: 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 1 minuto, 72 °C por 40 segundos. Finalmente, fue realizada una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1,5 % y detectados por tinción con SYBR® Safe DNA (Invitrogen).

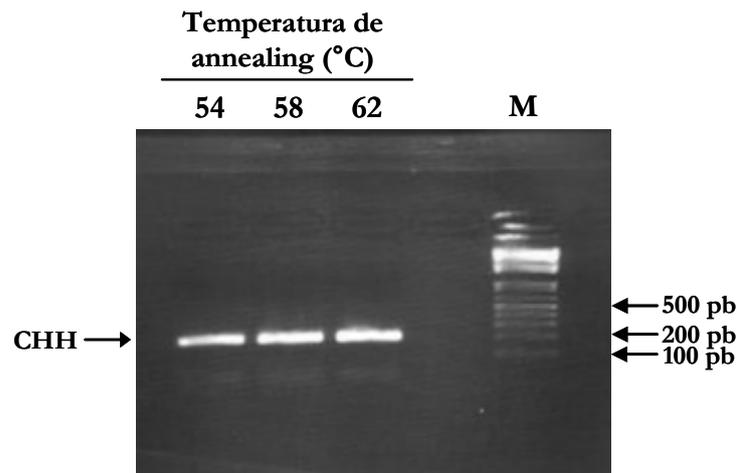


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR, utilizando cDNA total y primers específicos para la hormona CHH. Al realizar la PCR con el protocolo optimizado, se probaron tres temperaturas de annealing (°C) diferentes indicadas en cada una de las calles. Se observa que las temperaturas 58 y 62 °C son mas eficientes que 54 °C. Los números a la derecha indican los marcadores de peso molecular conocido (M, 1KbPlus de Invitrogen), en cDNA de CHH (flecha) contiene 200pb.

Para la realización del análisis de RT – PCR en músculo abdominal la puesta a punto de la técnica fue más sencilla en este tejido que en pedúnculo ocular, no sólo por la mayor disponibilidad de tejido sino porque el músculo posee bajos niveles de sustancias contaminantes que inhiban la posterior reacción de retrotranscripción. La extracción de ARN se realizó a partir de, aproximadamente, 100 mg de tejido utilizando TRI REAGENT según se describe para pedúnculo ocular. Luego de la reacción de retrotranscripción, el cDNA obtenido fue utilizado como molde para reacciones de PCR empleando primers específicos para PEPCK (primer sentido: 5´CTAGATTCTGCACCCCCGCC´3, primer antisentido: 5´TCATGGCGAAAGGGTTCGTGC´3), GP (primer sentido: 5´ TAYGARAARCCNAARMG´3, primer antisentido: 5´ GGNCKNGCYTTYTCCCA´3), GS (primer sentido: 5´TTYACNACNCAYGCNAC´3, primer antisentido: 5´ATRTCNSCNCYTTTRTT´3). En el caso de la enzima PEPCK los primers fueron diseñados a partir de la secuencia informada en Tsang y colaboradores, 2008 (GenBank: EU427217.1); para las otras dos enzimas, debido a que aún no se conocen las secuencias para *C. quadricarinatus*, se diseñaron primers degenerados a partir de las secuencias reportadas para otras especies (Nagai *et al.*, 2011).

Para la amplificación del cDNA de las enzimas el programa de PCR utilizado fue:

Un ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos sucesivos de: 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 45 segundos, 72 °C por 60 segundos. Finalmente, fue realizada una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1,8 % y detectados por tinción con SYBR® Safe DNA (Invitrogen).

La **Figura 8** muestra una de las reacciones de PCR de la puesta a punto de la técnica para la enzima PEPCK en músculo abdominal. Como se puede observar, también se intentó obtener un protocolo efectivo de RT – PCR en hepatopáncreas, para las tres enzimas, pero sin resultados satisfactorios.

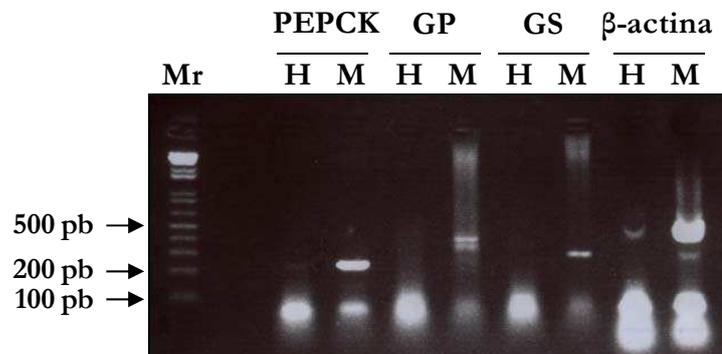


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de cDNA de β-actina y de las enzimas PEPCK, GP y GS. Los tejidos utilizados fueron hepatopáncreas (H) y músculo abdominal (M). A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular conocido (Mr, 1KbPlus de Invitrogen).

En todos los casos, para normalizar la cantidad de cDNA total utilizado como molde en las distintas PCRs, se analizó la expresión del gen de β-actina (gen housekeeping). El programa utilizado para la amplificación de β-actina fue igual que el descrito para CHH, con la diferencia que la cantidad de ciclos fue de 30. Los primers utilizados fueron:

primer sentido: 5'GACTGAGCGTGGCTACTCCTTCAC`3

primer antisentido: 5'GACTCGTCGTACTCCTCCTTGGTG`3

Con el objetivo de obtener una aproximación semicuantitativa, de los resultados obtenidos, las bandas obtenidas por electroforesis en geles de agarosa, correspondientes a los productos de PCR, fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ. En todos los casos se cuantificaron las densidades ópticas correspondientes a cada banda del producto de PCR de interés, como así también la correspondiente PCR de β -actina. En todos los casos se grafica el cociente entre la Densidad Óptica (DO) del producto de PCR de interés y la densidad óptica de la banda de β -actina correspondiente.

2.I.A.a.ii. **Análisis estadístico de datos**

Se analizó la sobrevivencia utilizando el Test de Fisher, mientras que para el resto de las variables medidas, los grupos experimentales se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (temperatura y salinidad de aclimatación) utilizándose el programa Statistica (StatSoft, Inc., versión 8.0). Se comprobaron los supuestos del ANOVA utilizando los test de Levene (homocedacia) y Kolmogorov-Smirnov (normalidad). Cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó un test paramétrico de comparaciones múltiples (Test de Tuckey). El nivel de significancia del análisis fue del 5 % (Sokal y Rohlf, 1981).

2.I.A.b. RESULTADOS

El primer parámetro que decidimos determinar para los ensayos planteados en este trabajo fue la supervivencia frente a variaciones en la temperatura y salinidad por un periodo relativamente prolongado de tiempo (estrés crónico). Al analizar la mortalidad a lo largo del ensayo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Sólo se registró la muerte de un animal en el grupo control expuesto a 20 °C, la cual fue atribuida a eventos estocásticos consecuentes de la manipulación de los animales y no a los tratamientos utilizados en el ensayo.

También, nos propusimos determinar si las condiciones experimentales afectan el crecimiento de las langostas; lo que observamos fue que los animales expuestos a 20 °C mostraron una ganancia en peso menor que las langostas aclimatadas a 27 °C, independientemente de la salinidad a la que se encontraban. Aunque la disminución de ganancia en peso se observó en todos los grupos expuesto a bajas temperaturas, dicha diferencia respecto de los grupos a 27 °C sólo fue significativa ($p < 0,05$) entre los grupos aclimatados a 10 g/L (**Fig. 9**).

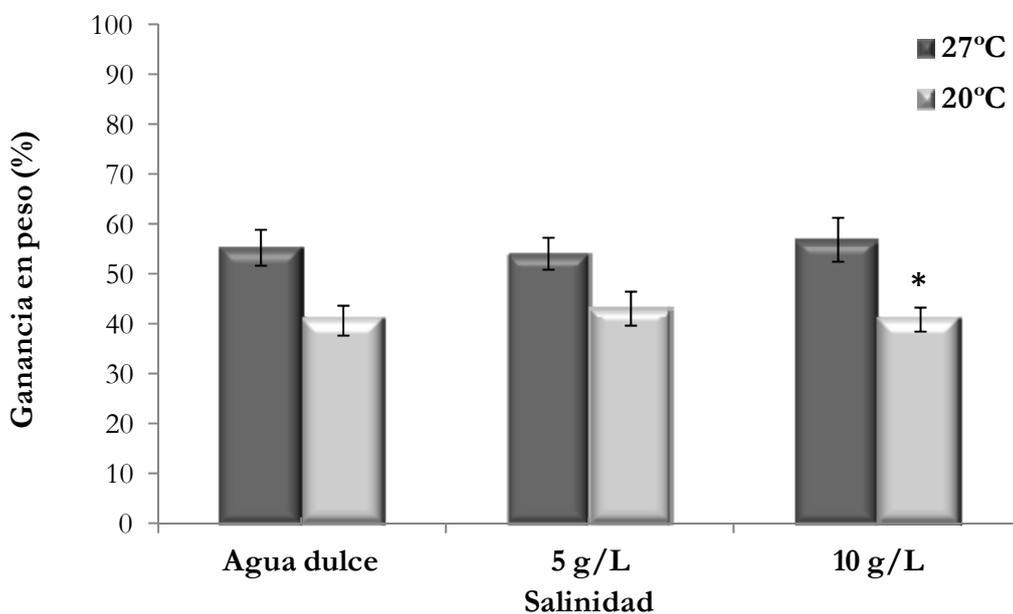


Figura 9. Efecto del estrés crónico asociado al cambio de temperatura y/o salinidad sobre la ganancia en peso de juveniles de *C. quadricarinatus* al final del ensayo. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar. El asterisco representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas, para cada salinidad.

Se determinó la tasa metabólica de *C. quadricarinatus* bajo condiciones de estrés térmico y salino, ya que esta tasa refleja el metabolismo energético y es un buen indicador del estado fisiológico del animal. Las langostas expuestas a 5 y 10 g/L presentaron una tasa metabólica levemente superior a la de los individuos control, en ambas temperaturas ensayadas. A su vez, los tres grupos aclimatados a 20 °C tuvieron tasas metabólicas mayores con respecto a sus pares aclimatados a 27 °C. Aunque la tendencia es evidente en los grupos ensayados, en ningún caso se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$, **Tabla 1**).

Temperatura (°C)	Salinidad (g/L)	Peso Inicial	Peso Final	Tasa metabólica ($\mu\text{gO}_2/\text{min/g}$)	N final
27	0	4,39 ± 0,22	6,79 ± 0,31	1,10 ± 0,16	10
27	5	4,74 ± 0,24	7,29 ± 0,35	1,96 ± 0,40	10
27	10	4,35 ± 0,21	6,81 ± 0,36	1,30 ± 0,34	10
20	0	4,44 ± 0,26	6,25 ± 0,35	1,59 ± 0,15	9
20	5	4,38 ± 0,27	6,28 ± 0,43	2,29 ± 0,23	10
20	10	4,71 ± 0,31	6,63 ± 0,42	2,17 ± 0,20	10

Tabla 1. Tasa metabólica (estimada por el consumo de oxígeno) de juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el período de exposición (30 días) a las condiciones de estrés. Además, se indican los pesos inicial y final en cada grupo experimental, así como el número de individuos que finalizaron el ensayo. Los valores se expresan como la media ± el error estándar.

Debido a que ha sido extensivamente demostrado que en crustáceos, la exposición a diversos factores estresantes produce hiperglucemia, se decidió determinar los niveles de glucosa en hemolinfa. La concentración de glucosa fue significativamente ($p < 0,05$) superior en las langostas aclimatadas a 20 °C, a todas las salinidades ensayadas. Si bien los niveles de glucosa aumentaron en ambas temperaturas acorde se incrementaba la salinidad, este aumento fue aun mas notable en los grupos expuestos a 20 °C donde, tanto para 5 g/L como para 10 g/L, el aumento fue significativamente ($p < 0,05$) diferente al grupo control. Por otro lado, a 27 °C, y a pesar de que la tendencia al incremento es evidente en todas las salinidades ensayadas, sólo los animales expuestos a 10 g/L presentaron un incremento significativo ($p < 0,05$) en la concentración de glucosa respecto a su grupo control (**Fig. 10**).

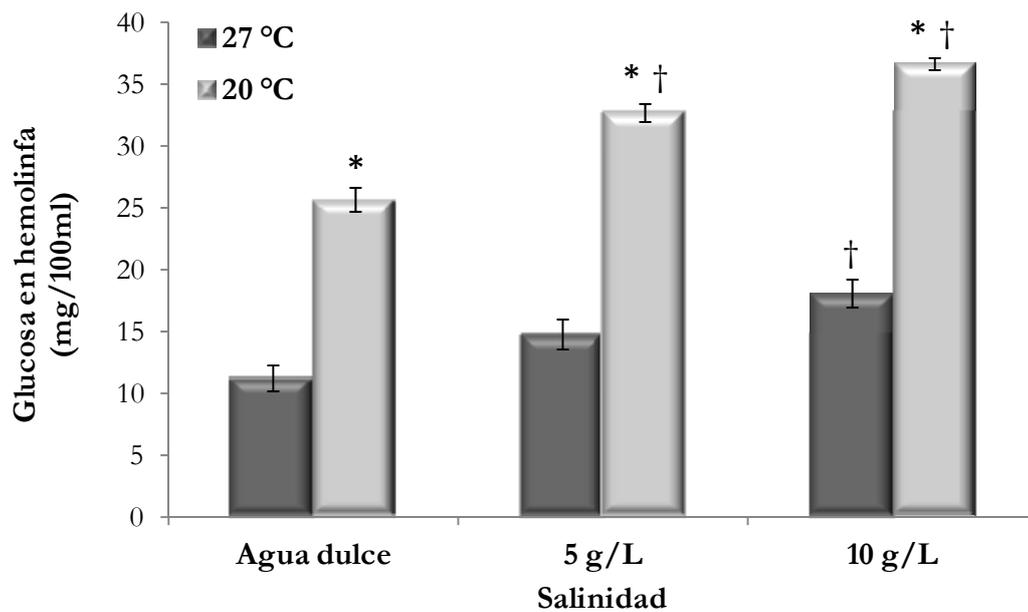


Figura 10. Nivel de glucosa en hemolinfa de juveniles de *C. quadricarinatus* bajo condiciones crónicas de estrés térmico y salino. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas, para cada salinidad. Las cruces corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control, para cada temperatura.

Dado que las reservas de glucógeno son utilizadas en el proceso de adaptación ante cambios de diversos factores ambientales, nos propusimos cuantificar sus niveles en hepatopáncreas y músculo abdominal. Al determinar la concentración de glucógeno en hepatopáncreas, se observó que los niveles medidos en las langostas expuestas a 27 °C fueron superiores a los niveles de aquellas expuestas a 20 °C, en todas las salinidades ensayadas; sin embargo, esta diferencia sólo fue significativa entre los grupos expuestos a 5 g/L ($p < 0,05$). También se observó que los niveles de glucógeno a ambas temperaturas se incrementaron acorde aumentaba la salinidad; mientras que a 27 °C este incremento fue significativo a 5 y 10 g/L, respecto del grupo en agua dulce, a 20 °C sólo el grupo expuesto a 10 g/L difirió significativamente ($p < 0,05$) del control respectivo (**Fig. 11A**). En cuanto a las reservas de glucógeno en músculo abdominal, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas a cualquiera de las salinidades ensayadas, siendo mayor en aquellos animales mantenidos a 27 °C. Pero, a diferencia de lo observado en hepatopáncreas, en músculo abdominal sólo a 20 °C los niveles de glucógeno aumentaron significativamente ($p < 0,05$) al incrementarse la salinidad (**Fig. 11B**).

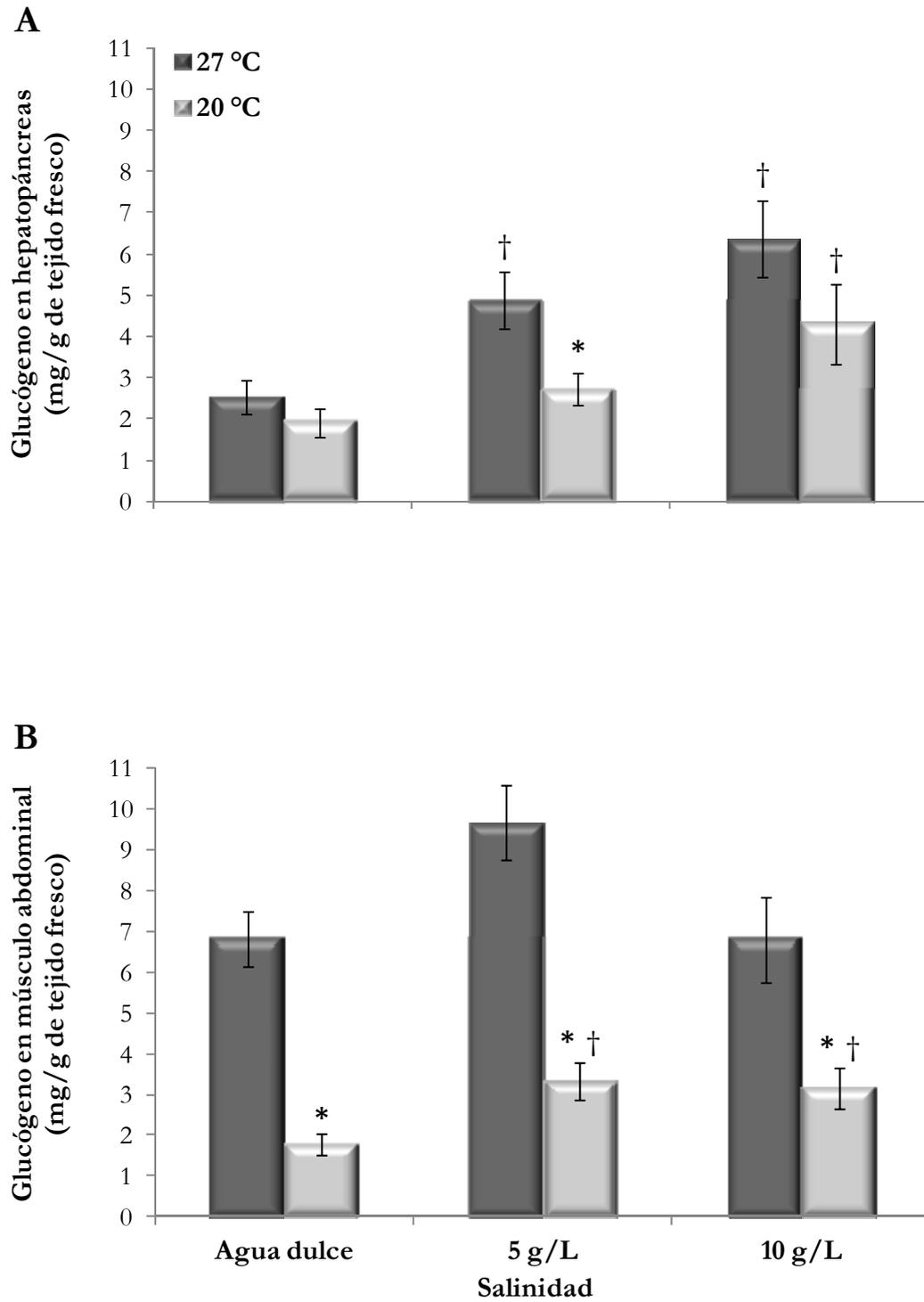


Figura 11. Niveles de glucógeno de juveniles de *C. quadricarinatus* bajo condiciones crónicas de estrés térmico y salino. **A)** Hepatopáncreas, **B)** Músculo abdominal. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas, para cada salinidad. Las cruces corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control, para cada temperatura.

Para determinar la capacidad osmo-ionorreguladora de las langostas bajo estrés térmico y salino, se determinaron los niveles de los iones sodio y potasio en hemolinfa. Al analizar la concentración de sodio, se observó que todos los grupos expuestos a 20 °C poseían niveles superiores a los expuestos a 27 °C. El incremento fue significativo ($p < 0,05$) solamente en los animales aclimatados a 5 y 10 g/L (**Fig. 12A**). Al comparar entre salinidades a las diferentes temperaturas, pudo observarse que la concentración de sodio se mantuvo relativamente constante entre los grupos a 27 °C. Por otro lado, a 20 °C la concentración iónica de los animales expuestos a 10 g/L fue significativamente ($p < 0,05$) superior respecto a su grupo control (**Fig. 12A**). En lo que respecta al ion potasio, se observó que en todas las salinidades a 27 °C, los niveles se mantenían constantes sin observarse diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$ **Fig. 12B**). Sin embargo, a 20 °C la concentración de potasio en los juveniles expuestos a 5 g/L fue un 50 % superior y significativo ($p < 0,05$) respecto a los niveles determinados en las langostas en agua dulce o 10 g/L. Cuando comparamos entre temperaturas, los niveles de potasio de las diferentes salinidades a 20 °C fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores a sus pares a 27 °C (**Fig. 12B**).

Además de determinar la concentración de los iones sodio y potasio como parámetro de la capacidad osmo-ionorreguladora de las langostas bajo estrés, también nos propusimos analizar la posible variación de metabolitos implicados en mantener la osmolaridad de la hemolinfa. En tal sentido, se midieron los niveles de aminoácidos libres (FAA) en hemolinfa y músculo abdominal. Los niveles de FAA en hemolinfa fueron similares entre las salinidades (agua dulce, 5 y 10 g/L), tanto en los animales expuestos a 27 °C como los que se encontraban a 20°C; sólo se observó un leve incremento en la concentración de FAA en el grupo en agua dulce a 27 °C, pero que no fue significativamente ($p > 0,05$) diferente (**Fig. 13A**). En músculo abdominal, a 20 °C se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de FAA en los animales expuestos a 5 y 10g/L, con respecto al grupo control; por otro lado, al comparar entre temperaturas sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos a 5 g/L (**Fig. 13B**).

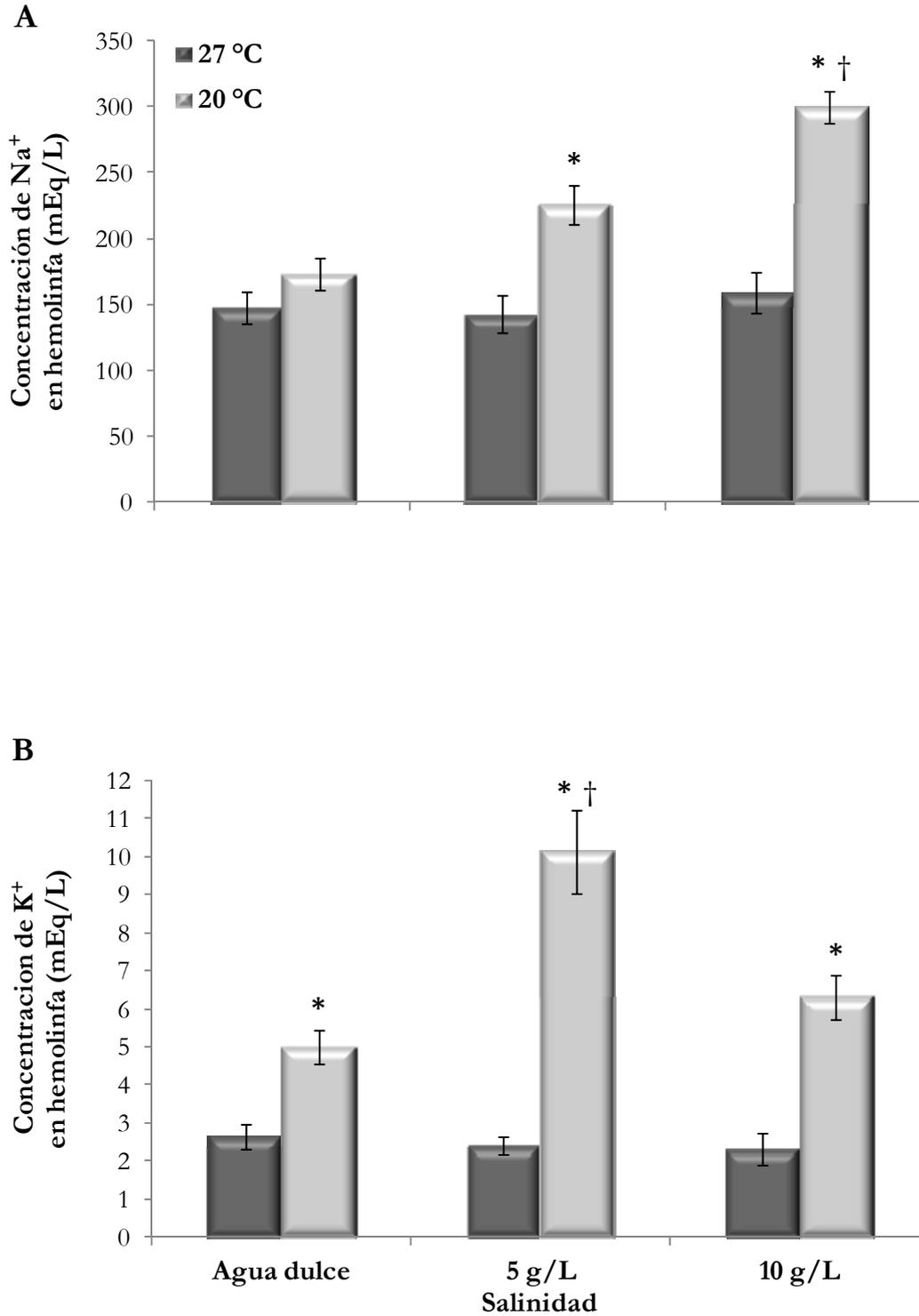


Figura 12. Concentración de iones en hemolinfa de juveniles *C. quadricarinatus* bajo condiciones crónicas de estrés térmico y salino. **A)** sodio (Na^+), **B)** potasio (K^+). Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas, para cada salinidad. Las cruces corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control, para cada temperatura.

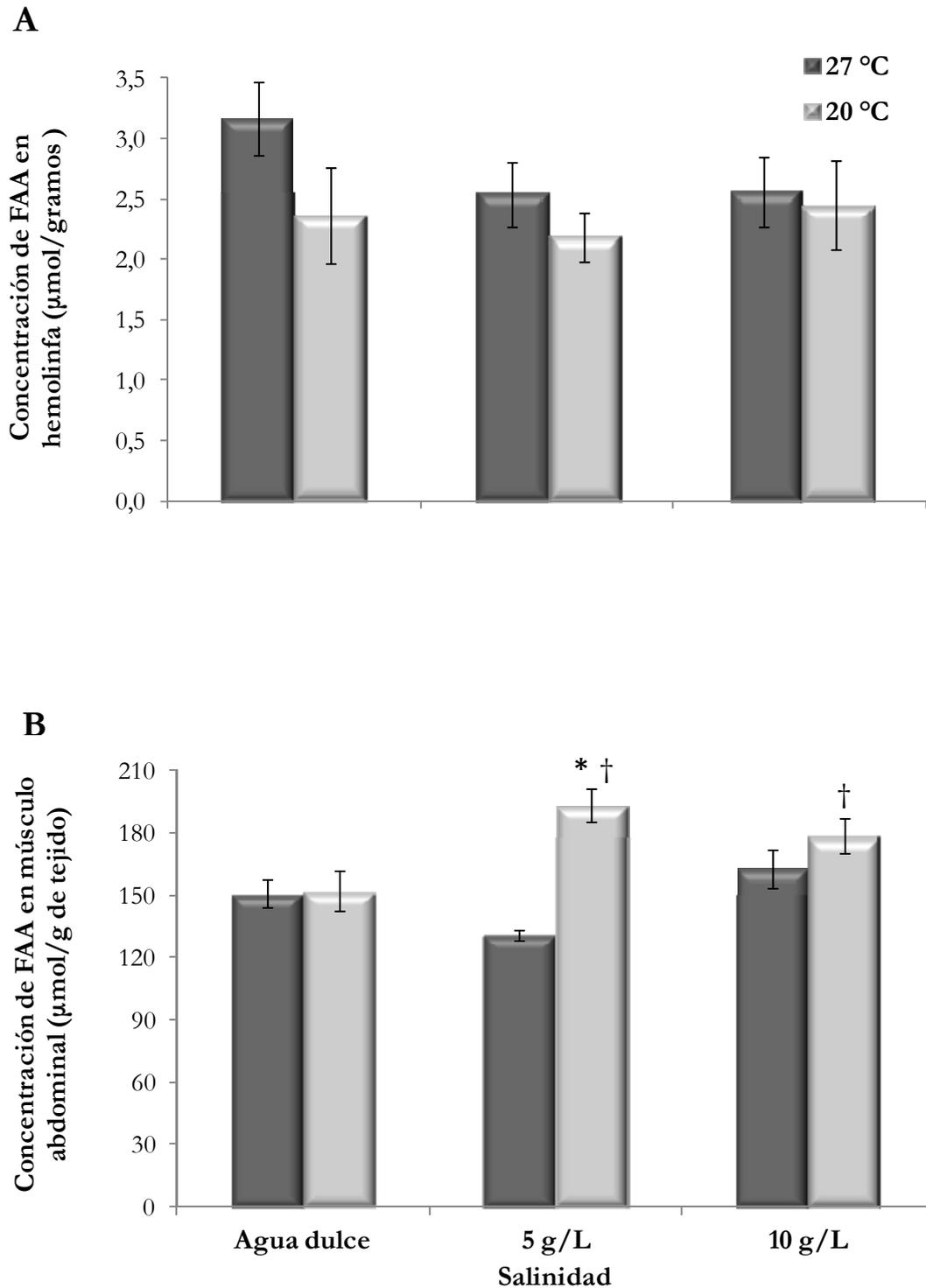


Figura 13. Niveles de aminoácidos libres (FAA) de juveniles de *C. quadricarinatus* bajo condiciones crónicas de estrés térmico y salino. **A)** Hemolinfa, **B)** Músculo abdominal. Los valores se expresan como media \pm error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas, para cada salinidad. Las cruces corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control, para cada temperatura.

Con el objetivo de estudiar la participación de CHH en la respuesta al estrés térmico y salino, se utilizó la técnica RT-PCR para semicuantificar el ARN mensajero de CHH como una medida de su expresión en las distintas condiciones de temperatura y salinidad ensayadas. Interesantemente, observamos que a 27 °C los niveles de ARNm de CHH aumentaron acorde se incrementaba la salinidad (**Fig. 14**, barras 2 y 3 vs. 1, y barras 5 y 6 vs. 4). Al comparar las distintas salinidades a 27 °C, se observó que los aumentos de ARNm de CHH respecto del grupo en agua dulce fueron de un 200 y un 250 % para 5 y 10 g/L, respectivamente (barras 2 y 3 vs. 1). En cuanto a los grupos expuestos a 20 °C, se observa que las langostas en agua dulce y las expuestas a 5 g/L poseen niveles de expresión de CHH similares, que fueron levemente más bajos que los niveles estimados para el grupo expuesto a 10 g/L (**Fig. 14**, barras 5 y 6 vs. 4). Al comparar entre temperaturas, la expresión relativa de la hormona en los juveniles en agua dulce fue tres veces superior a 20 °C que a 27 °C (barra 4 vs. 1). Por otro lado, no se observaron diferencias marcadas entre los niveles de ARNm de los grupos expuestos a 5 g/L (barra 5 vs. 2); de manera similar, entre los juveniles aclimatados a 10 g/L aquellos expuestos a una temperatura de 20 °C presentaron una expresión de CHH levemente superior a la de los juveniles expuestos a una temperatura de 27 °C (barra 6 vs. 3).

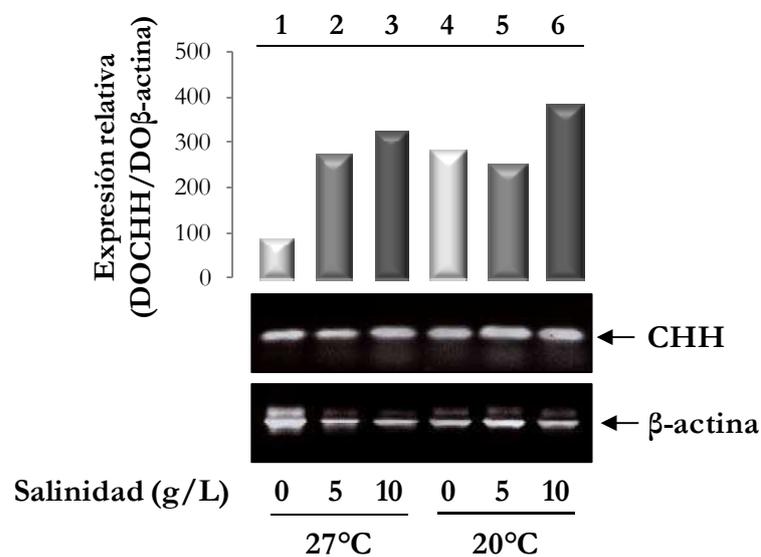


Figura 14. Niveles de ARNm de CHH bajo condiciones de estrés como medida de su nivel de expresión en esas condiciones. Panel inferior: RT-PCR para detectar la expresión endógena de CHH en pedúnculo ocular luego de 30 días de exposición a condiciones de estrés, salinidad (0, 5 y 10 g/L) y temperatura (27 y 20 °C). Se analizó la expresión del gen de β-actina para normalizar la cantidad de cDNA total utilizado como molde en la amplificación del cDNA de CHH. Las bandas obtenidas en la electroforesis fueron cuantificadas (se determinó la densidad óptica (DO)) y se calculó la relación DOCHH/DOβ-actina que se muestra en el panel superior

(barras). Los resultados mostrados representan cuatro réplicas experimentales independientes del análisis de RT-PCR.

Con el objetivo de evaluar si ante situaciones de estrés las langostas utilizan otros precursores no carbohidratos para la producción de glucosa, se analizó la expresión de la enzima PEPCK en músculo abdominal. Esta enzima cataliza uno de los pasos limitantes de la gluconeogénesis, y de esta manera, su expresión es crítica y medida directa de dicho proceso. A diferencia de lo que ocurre con los niveles de mensajero de CHH en pedúnculo ocular, al estimar los niveles de expresión de PEPCK en músculo abdominal, se observó que en ambas temperaturas los niveles de ARNm descendieron acorde se incrementaba la salinidad (**Fig. 15**, barras 2 y 3 vs. 1, barras 5 y 6 vs. 4), siendo más relevante el descenso a la mayor salinidad ensayada. A la temperatura de 27 °C, en los grupos expuestos a 5 y 10 g/L la expresión de la enzima disminuyó un 12 y un 70 % respectivamente, respecto del grupo control (en agua dulce) (barras 2 y 3 vs. 1); mientras que al analizar los grupos aclimatados a 20 °C, la expresión descendió un 30 y un 70 % respecto al control respectivo (barras 5 y 6 vs. 4). Al comparar entre temperaturas, se pudo estimar una disminución del 50 % en la expresión relativa de PEPCK de los tres grupos a 20 °C.

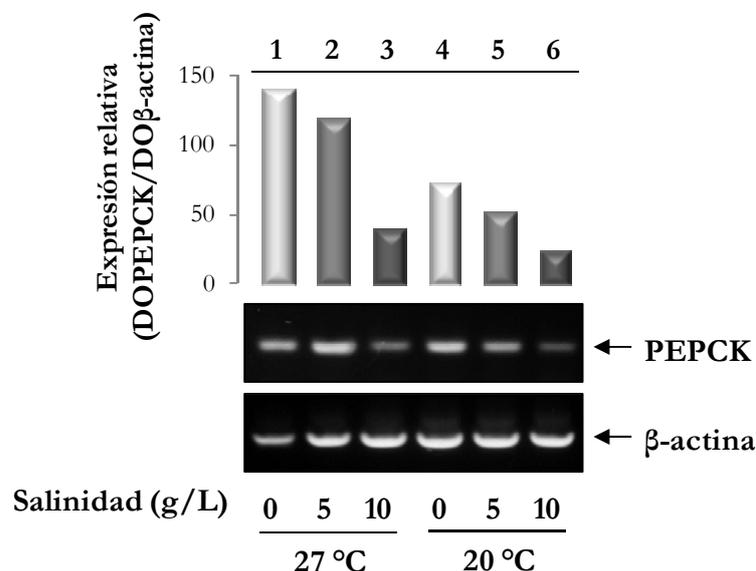


Figura 15. Niveles de ARNm de la enzima PEPCK bajo condiciones de estrés como medida de su nivel de expresión en esas condiciones. Panel inferior: RT-PCR para detectar la expresión endógena de PEPCK en el músculo abdominal luego de 30 días de exposición a condiciones de estrés, salinidad (0, 5 y 10 g/L) y temperatura (27 y 20°C). Se analizó la expresión del gen de β -actina para normalizar la cantidad de cDNA total utilizado como molde en la amplificación del

cDNA de PEPCK. Las bandas obtenidas en la electroforesis fueron cuantificadas (se determinó la densidad óptica (DO)) y se calculó la relación $DO_{PEPCK}/DO_{\beta\text{-actina}}$ que se muestra en el panel superior (barras). Los resultados mostrados representan la expresión relativa de cuatro réplicas independientes del análisis de RT-PCR.

2.I.B. Efecto del cambio repentino (estrés agudo) en las condiciones óptimas de temperatura y salinidad en juveniles de *C. quadricarinatus*

El objetivo de este ensayo consiste en analizar el efecto que provoca la exposición brusca a bajas temperaturas (20 °C), altas salinidades (10 g/L) o la combinación de ambas variables, sobre ciertos parámetros fisiológicos de juveniles de *C. quadricarinatus*. Para tal fin se analizaron los niveles de glucosa, ya que su variación ante situaciones de estrés es una conocida respuesta entre los crustáceos. Por otro lado, se evaluó el grado de participación de la hormona CHH así como las variaciones en la expresión de PEPCK.

2.I.B.a. MATERIALES y MÉTODOS

2.I.B.a.i. Diseño experimental

En el ensayo se utilizaron 60 juveniles con un peso promedio de $4,75 \pm 0,49$ gramos, pesados antes del inicio del experimento. Estos animales eclosionaron y fueron criados en el laboratorio en condiciones óptimas (estándar) de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (agua dulce) y fotoperíodo (14 horas luz - 10 horas oscuridad). Se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces (Tetra Color®) y Elodea *sp ad libitum* hasta alcanzar la talla deseada. Unos días antes del comienzo del ensayo, los animales se ubicaron individualmente en frascos de vidrio de 1,5 litros de capacidad conteniendo 1 litro de agua dulce a 27 °C.

Dado que el objetivo del ensayo fue analizar el efecto que provoca la exposición brusca a condiciones de estrés (también denominado estrés agudo), el día del ensayo se transfirió a las langostas a frascos bajo alguna de las siguientes condiciones (sin previa aclimatación):

Grupo 1: cambio de salinidad a 10 g/L, manteniendo la temperatura en 27 °C

Grupo 2: agua dulce, cambiando la temperatura a 20 °C

Grupo 3: cambio de salinidad a 10 g/L y cambio de temperatura a 20 °C

El **grupo control** estuvo conformado por langostas expuestas a las condiciones óptimas (agua dulce y 27 °C), que fueron sacrificadas al inicio del ensayo para establecer los niveles basales e iniciales de las variables a medir.

Para cada tipo de estrés, una vez finalizado el ensayo se extrajo hemolinfa de cada animal, y posteriormente se los anestesió en frío y se les disecaron los pedúnculos oculares y el músculo abdominal. Se realizaron dos réplicas del ensayo, en cada una de las cuales se sacrificaron a tres langostas de cada grupo experimental a cada tiempo de exposición (0, 2, 4 y 6 horas).

A partir de la hemolinfa extraída se determinó la concentración de glucosa. Los pedúnculos oculares y las muestras de músculo abdominal se utilizaron para la extracción de ARN. Con estas muestras y utilizando la técnica RT-PCR, se determinó el nivel de ARNm de CHH (en los pedúnculos oculares) y de la enzima PEPCK (en músculo abdominal). En la sección anterior se detalló la forma en que fue determinada la glucemia, así como el protocolo para la extracción de ARN y para la realización de la RT-PCR; de igual manera se procedió en esta sección.

2.I.B.a.ii. Análisis estadístico de datos

Los grupos experimentales se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (Tratamiento y Tiempo) utilizándose el programa Statistica (StatSoft, Inc., versión 8.0). Se comprobaron los supuestos del ANOVA utilizando los test de Levene (homocedacia) y Kolmogorov-Smirnov (normalidad). Cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó un test paramétrico de comparaciones múltiples (Test de Tuckey). El nivel de significancia del análisis fue del 5 % (Sokal y Rohlf, 1981).

2.I.B.b. RESULTADOS

El objetivo general de esta sección fue evaluar la respuesta adaptativa de langostas de *C. quadricarinatus* frente al cambio brusco de temperatura y salinidad, también llamado estrés agudo. De esta manera, los hallazgos obtenidos con estos experimentos nos permitieron finalmente comparar la respuesta de la especie en estudio frente a estrés crónico y estrés agudo. Análogamente a la sección anterior, ciertos parámetros fisiológicos como así también la expresión de CHH y PECK fueron estudiados en animales expuestos a condiciones de temperatura y salinidad, pero esta vez por periodos cortos (por ej. 2, 4 y 6 horas).

En la **Figura 16** se grafica la dinámica en el tiempo de los niveles de glucosa en hemolinfa para las diferentes condiciones ensayadas. Observamos que inicialmente (esto es a las dos horas de tratamiento), en todas las condiciones ensayadas hay un incremento de la concentración de glucosa respecto de los niveles basales. Este aumento inicial fue significativo ($p < 0,05$) tanto en los juveniles a los cuales sólo se les aumentó la salinidad del agua como en aquellos a los que además de variar la salinidad se les disminuyó la temperatura; en estos animales el incremento fue de un 50 y un 85%, respectivamente, en relación al nivel basal. A las cuatro horas de iniciado el ensayo, los niveles de glucosa en los tres grupos experimentales disminuyeron aproximadamente un 30% (**Tabla 2, Fig. 16**); sin embargo, pese a este descenso, el nivel de glucosa medido en el grupo 3 continúa siendo significativamente superior ($p < 0,05$) al nivel basal inicial. Se realizó una nueva medición de glucosa en los tres grupos a las seis horas de exposición, y se observó un nuevo incremento en todos con respecto a las cuatro horas; en los grupos 1 y 2 (sólo cambio de salinidad o sólo cambio de temperatura, respectivamente) se restablecieron los niveles de glucosa observados a las dos horas, mientras que el grupo 3 (combinación de baja temperatura y alta salinidad) alcanza un nivel algo menor. Igualmente, el incremento observado en los grupos 1 y 3 a las seis horas es significativamente diferente del nivel de glucosa a tiempo cero ($p < 0,05$). Al analizar posibles diferencias entre tratamientos a cada tiempo, se observó que los grupos 2 y 3 difieren significativamente ($p < 0,05$) entre sí en los tiempos dos y cuatro horas de exposición, siendo siempre mayor el nivel de glucosa en las langostas a las que se les varió tanto la salinidad como la temperatura (**Tabla 2, Fig. 16**).

En la **Tabla 2**, se muestran las concentraciones de glucosa en hemolinfa de los tres grupos a los diferentes tiempos del ensayo. A tiempo cero hay un solo valor, ya que corresponde a los niveles

basales de hemolinfa de este bioensayo, determinados a partir de muestras de hemolinfa de langostas que se encontraban en condiciones óptimas de temperatura y salinidad (27 °C y agua dulce).

Grupo	Tiempo (horas)			
	0	2	4	6
1 (10 g/L)		5,47 ± 0,44	4,45 ± 0,34	5,75 ± 0,33
2 (20 °C)	3,60 ± 0,19	4,95 ± 0,50	3,52 ± 0,20	4,72 ± 0,13
3 (10 g/L, 20 °C)		6,64 ± 0,26	5,71 ± 0,28	6,04 ± 0,30

Tabla 2. Niveles de glucosa en juveniles de *C. quadricarinatus* expuestos a condiciones de estrés agudo, a lo largo del ensayo. Los valores se expresan como la media ± el error estándar. Entre paréntesis se indica bajo qué condición se encontraban los juveniles de cada grupo.

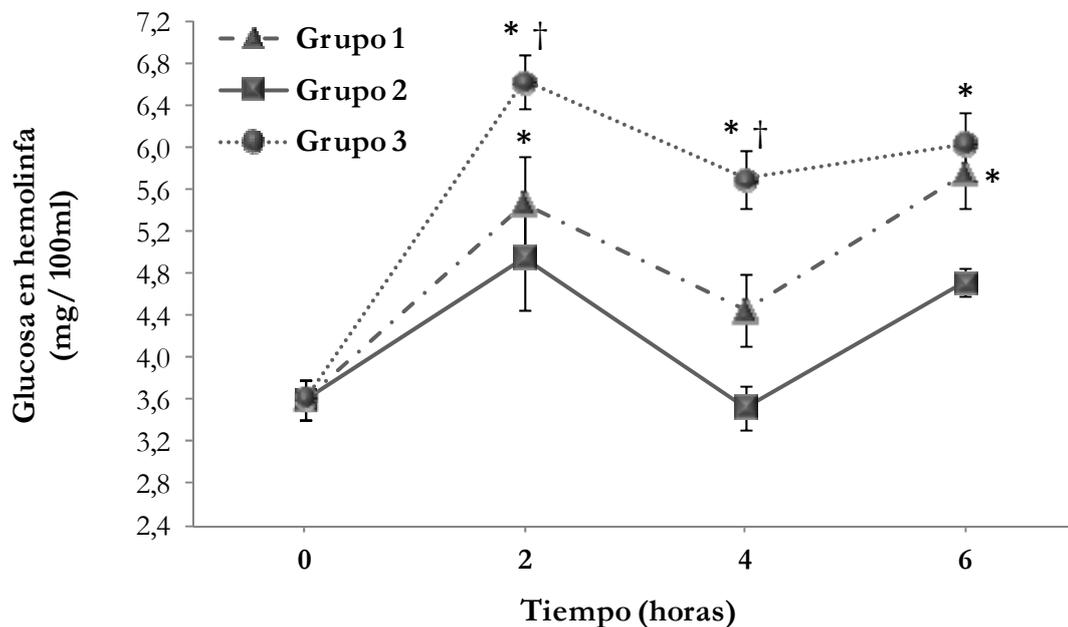


Figura 16. Variación de los niveles de glucosa, en el tiempo, de juveniles de *C. quadricarinatus* bajo condiciones de estrés agudo. Los valores se expresan como la media ± el error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del tiempo 0 (nivel basal de glucosa). Las cruces corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos 2 y 3. El eje Y no está en escala (no inicia en 0) para una mejor observación de los resultados.

Al semicuantificar con la técnica RT-PCR el ARN mensajero de CHH en pedúnculo ocular, se observó que la expresión de la hormona variaba en función del tipo de estrés aplicado (**Fig. 17**). El nivel de expresión en los tres grupos experimentales a los tres tiempos de exposición se incrementó, en comparación con el detectado en el tiempo cero (barras 2 a 10 vs. barra 1). En los juveniles a los que se les modificó la salinidad del agua, tanto como a los que se expusieron a una combinación de baja temperatura y alta salinidad (grupos 1 y 3, respectivamente), la expresión de CHH aumentó acorde el tiempo de exposición era mayor (barras 2-4 y 8-10 vs. 1). Sorprendentemente, en el grupo a 10 g/L y 20 °C se observó un efecto sinérgico en la respuesta a dicha combinación que generó niveles de expresión notablemente superiores a la suma de los niveles de expresión de cada factor por separado; de esta manera, los niveles de expresión de CHH se incrementaron un 100, 500 y 700 % respecto del grupo control, a las dos, cuatro y seis horas, respectivamente (**Fig. 17**). Por el contrario, en las langostas expuestas a una disminución brusca de la temperatura (grupo 2), el nivel de expresión se mantuvo elevado y relativamente estable durante todo el ensayo (barras 5, 6 y 7).

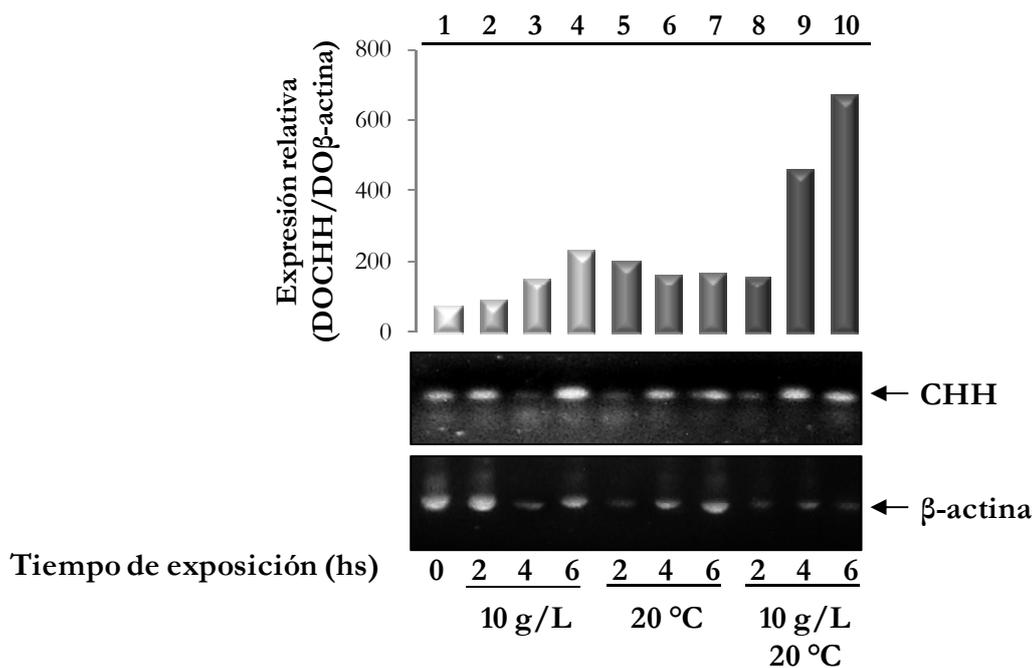


Figura 17. Niveles de ARNm de CHH en pedúnculo ocular de animales expuestos a condiciones de estrés agudo como medida de su nivel de expresión en esas condiciones. Panel inferior: RT-PCR para detectar la expresión endógena de CHH en pedúnculo ocular bajo distintas condiciones de estrés, a diferentes tiempos de exposición. Los tratamientos a los que se expusieron las langostas se indican en el panel. El tiempo cero corresponde a los niveles de expresión de animales en condiciones estándar de salinidad y temperatura (agua dulce y 27 °C). Se analizó la expresión del gen de β -actina para normalizar la cantidad de cDNA total utilizado

como molde en la amplificación del cDNA de CHH. Las bandas obtenidas en la electroforesis fueron cuantificadas (se determinó la densidad óptica (DO)) y se calculó la relación DOCHH/DO β -actina que se muestra en el panel superior en forma de barras. Los resultados mostrados representan la expresión relativa de cuatro réplicas independientes del análisis de RT-PCR.

Al igual que para CHH, utilizando la técnica RT-PCR se evaluó el nivel de ARNm de la enzima PEPCK en músculo abdominal de animales expuestos a las distintas condiciones ensayadas (Fig. 18).

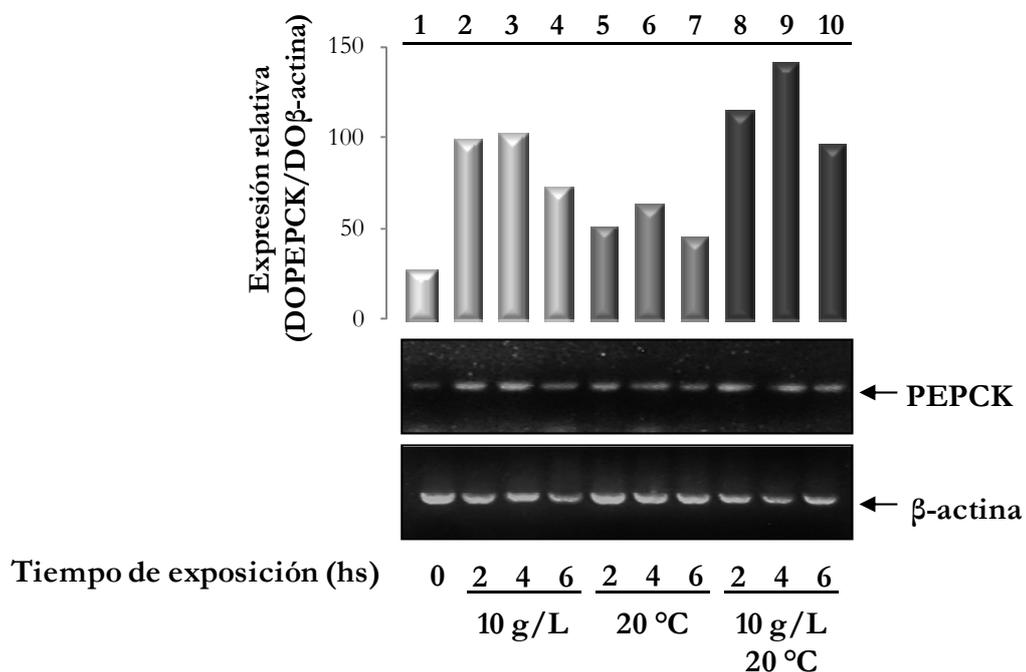


Figura 18. Niveles de ARNm de PEPCK de músculo abdominal de animales expuestos a condiciones de estrés agudo como medida de su nivel de expresión en esas condiciones. Panel inferior: RT-PCR para detectar la expresión endógena de PEPCK en músculo abdominal bajo distintas condiciones de estrés, a diferentes tiempos de exposición. Los tratamientos a los que se expusieron las langostas se indican en el panel. El tiempo cero corresponde a los niveles de expresión de animales en condiciones estándar de salinidad y temperatura (agua dulce y 27 °C). Se analizó la expresión del gen de β -actina para normalizar la cantidad de cDNA total utilizado como molde en la amplificación del cDNA de PEPCK. Las bandas obtenidas en la electroforesis fueron cuantificadas (se determinó la densidad óptica (DO)) y se calculó la relación DOPEPCK/DO β -actina que se muestra en el panel superior (barras 1 a 10). Los resultados mostrados representan la expresión relativa de cuatro réplicas independientes del análisis de RT-PCR.

Se observó que la expresión del ARNm de la enzima PEPCK aumentó bajo los tres tipos de estrés ensayados. A pesar del notable incremento generado tanto por el aumento de la salinidad, la disminución de la temperatura o ambos efectos combinados, no se observaron diferencias marcadas entre los tiempos de exposición dentro de cada tratamiento. Por otro lado, también es común para los tres grupos el descenso en la expresión del ARNm a las seis horas de exposición. En particular, el nivel de expresión a las dos y cuatro horas de exposición para los grupos 1 y 3 se incrementó entre un 250 y un 300 %, comparando con la expresión determinada a tiempo cero (barras 2, 3, 8 y 9 vs. 1). El efecto de la disminución de temperatura (grupo 2) también provocó alteraciones en la expresión, pero los incrementos fueron de alrededor del 100 % a las dos y cuatro horas de exposición (barras 5 y 6 vs. 1, **Fig. 18**). A diferencia de lo observado con los niveles de ARNm de CHH, en los niveles de la enzima PEPCK del grupo bajo la combinación de 10 g/L y 20 °C no se observaron efectos aditivos o sinérgicos.

2.II. DISCUSION

2.II.A. Efecto de la aclimatación gradual y sostenida (estrés crónico) a bajas temperaturas y diferentes salinidades en juveniles de *C. quadricarinatus*

El proceso de aclimatación en un organismo implica respuestas tanto fisiológicas y bioquímicas, como conductuales y de otros tipos. Todas ellas, en su conjunto, están destinadas a lograr que el animal compense y sobreviva a los cambios que se producen en su hábitat natural. Estos cambios pueden ser procesos a muy corto o a largo plazo, e inclusive se pueden extender durante gran parte de la vida del animal (McMahon, 2002). En la actualidad existen numerosos trabajos que estudian como se ven afectados ciertos parámetros fisiológicos frente a alteraciones de ciertas variables ambientales, sin embargo, en la gran mayoría de ellos, se estudia la respuesta de un solo sistema fisiológico. Los cambios medioambientales implican cambios en diversas variables fisiológicas, y las respuestas de los animales son componentes de una compleja integración de varios sistemas. Para llevar a cabo diferentes procesos que semejan ser simples, un gran número de mecanismos de control fisiológico deben ser regulados de manera consecuente con las demandas del organismo. La integración de los procesos fisiológicos debe ser lo suficientemente sofisticada y plástica para responder a un amplio rango de cambios comportamentales y ambientales. La integración de las funciones fisiológicas es esencial para la vida de los organismos y la pérdida de regulación, usualmente por una falla en parte de una respuesta integrada, bajo condiciones de estrés conlleva un incremento de las alteraciones fisiológicas y en última instancia provoca la muerte (Morris, 1999).

En la actualidad, muy poco se sabe sobre los mecanismos de compensación fisiológica ante cambios en diferentes variables ambientales. En *C. quadricarinatus*, y en crustáceos en general, este tipo de conocimiento es escaso, por lo que en el presente trabajo nos propusimos estudiar las respuestas fisiológicas de la especie frente a la variación de la temperatura y la salinidad del agua. De esta forma, nuestro objetivo se centró en incrementar el conocimiento sobre los procesos fisiológicos que se desencadenan en langostas de agua dulce expuestas a dichas condiciones estresantes.

En primer lugar, se evaluó la respuesta de juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* expuestos durante 30 días al aumento de la salinidad, la disminución de la temperatura o una combinación de ambos factores. Los resultados de este primer ensayo indicaron que, cuando las

langostas se encontraban en agua dulce, ni la sobrevida ni la ganancia en peso de los juveniles fue afectada por las bajas temperaturas. Sin embargo, es importante mencionar que cuando los animales fueron expuestos a 20 °C, una tendencia a una menor ganancia en peso fue evidente. Además, observamos que la salinidad por sí misma no afectó la ganancia en peso de los animales. Una condición experimental, que arrojó resultados sorprendentes fue la combinación de baja temperatura y salinidad de 10 g/L, ya que sólo en este tratamiento sí se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando la ganancia en peso fue analizada. Meade y colaboradores (2002) observaron, en langostas de esta misma especie con un peso aproximado de 10 miligramos, que a temperaturas menores a 28 °C la ganancia en peso en agua dulce disminuía significativamente. Otros trabajos, también realizados en *C. quadricarinatus*, hallaron resultados similares en juveniles tempranos con un peso aproximado de 20 miligramos (Austin, 1995) y en juveniles intermedios con un peso aproximado de 1 gramo (Jones, 1997). Al comparar estos datos con nuestros resultados, obtenidos en juveniles avanzados (de peso aproximado de 5 gramos al inicio del ensayo), observamos una alta tolerancia de los mismos ya que no presentaron una pérdida significativa de peso en la mayoría de las condiciones ensayadas. Estos hallazgos indican, que individuos de una talla superior soportan las condiciones ambientales adversas con mayor facilidad, lo cual esta en línea con previas observaciones en otras especies de crustáceos (Lagadic et al., 1994) y con la idea de que ciertos sistemas fisiológicos críticos en los procesos de adaptación no están completamente desarrollados en individuos de estadios tempranos del desarrollo. La alta tolerancia al estrés térmico y salino observada en juveniles avanzados, permite sugerir que los individuos utilizados en esta tesis serían mas aptos para el cultivo con fines comerciales a temperaturas bajas o salinidades elevadas, en comparación con juveniles de menor peso los cuales deberían ser criados en condiciones controladas y estables de temperatura y salinidad para que su ganancia en peso no se vea negativamente afectada por variaciones ambientales. También es importante remarcar los límites de nuestras observaciones; en nuestros ensayos, la combinación de ambos factores afectó negativamente la ganancia en peso de los individuos utilizados, indicando una falta de respuesta adaptativa eficiente por parte de estos animales.

La tasa metabólica es el parámetro biológico que representa la tasa de consumo, transformación y distribución de la energía (Brown *et al.*, 2004). El conocimiento de la tasa metabólica de un organismo expuesto a diferentes temperaturas/salinidades, es importante ya que nos indica cuáles son sus requerimientos energéticos en diferentes ambientes o condiciones. En el presente trabajo se observó que la tasa metabólica de los juveniles aclimatados por períodos prolongados a 20 °C no se diferenció significativamente de la determinada en animales aclimatados

a 27 °C. Aunque al disminuir la temperatura, como al aumentar la salinidad en ambas temperaturas, se observó una tendencia hacia el aumento de la tasa metabólica que no fue significativa. Estos resultados estarían indicando que los animales compensarían metabólicamente luego de la aclimatación prolongada a bajas temperaturas, un comportamiento ampliamente descrito para varias especies de ectotermos (Randall *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, la tasa metabólica de juveniles avanzados no se vio afectada por la salinidad de aclimatación. Estas observaciones están en línea con trabajos previos en los cuales dicho comportamiento también se observó en juveniles tempranos expuestos a altas salinidades, e incluso superiores a 10 g/L; sin embargo, en estos juveniles tempranos la energía metabólica disponible para el crecimiento disminuyó, lo que sugiere un aumento de la energía necesaria para mantener la homeostasis (Meade *et al.*, 2002). Estas observaciones podrían ser explicadas por la existencia de mecanismos de adaptación fisiológica propia de *C. quadricarinatus*, dado que en su hábitat natural se encuentra sometida a fluctuaciones estacionales de la salinidad del agua, principalmente debido al efecto de la evaporación del agua (Bayly y Williams, 1973). Por otro lado, estudios realizados con el camarón eurihalino *Litopenaeus vannamei* tampoco mostraron cambios en la tasa metabólica cuando fue expuesto a diferentes salinidades; observándose en ese caso una reducción en la tasa de crecimiento (Walker *et al.*, 2009).

En crustáceos, ha sido ampliamente reportado que para la adaptación a las fluctuaciones del ambiente, la disponibilidad de energía suministrada a través del metabolismo tanto aeróbico como anaeróbico cumple roles esenciales (Ho *et al.*, 2002). En general, el incremento de energía requerida para la compensación fisiológica ante situaciones de estrés, conduce a cambios en los niveles de sustratos de varias vías metabólicas, tales como los niveles de glucosa en hemolinfa, de lactato y de triglicéridos. En crustáceos, el incremento en los niveles de glucosa en hemolinfa ante situaciones de estrés (anoxia, hipoxia, variaciones en la temperatura o en la salinidad) ha sido ampliamente estudiado (Santos y Keller, 1993; Kuo y Yang, 1999; Chang *et al.*, 1998; Webster, 1996; Lorenzon *et al.*, 2004). En nuestro estudio, utilizando juveniles de *C. quadricarinatus*, observamos que la concentración de glucosa en hemolinfa fue significativamente afectada por exposición prolongada a bajas temperaturas. En todas las salinidades ensayadas, la disminución de la temperatura generó un incremento en los niveles de glucosa superiores al 100 % respecto de los determinados en los juveniles a 27 °C; al mismo tiempo se observó que dicho aumento era progresivo a medida que la salinidad se incrementaba, de modo tal que las langostas aclimatadas a 5 y 10 g/L alcanzaron niveles de glucosa significativamente diferentes a los determinados en los animales en agua dulce. En trabajos previos, ha sido demostrado que la disminución de la temperatura provoca un efecto similar en los niveles de glucosa en hemolinfa en el camarón *L. vannamei* (Zhou *et al.*, 2011). Al analizar la

salinidad de manera individual, se observaron incrementos leves en la concentración de glucosa, encontrando diferencias significativas entre los juveniles aclimatados a 10 g/L y aquellos en agua dulce, para ambas temperaturas. Resultados similares fueron observados en el cangrejo *Neohelice granulata*, viendo que tanto en un medio hipo-osmótico como en uno hiper-osmótico, los niveles de glucosa variaban en respuesta a la utilización de la glucosa por parte de los procesos osmorreguladores (Santos y Nery, 1987; Da Silva y Kucharski, 1992). En nuestro estudio, el aumento de glucosa en hemolinfa en los juveniles expuestos a una temperatura de 20 °C fue acompañado de una disminución en las reservas de glucógeno, tanto en hepatopáncreas como en músculo abdominal; dichos resultados sugieren que la aclimatación de juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* a una temperatura de 20 °C demandaría una marcada movilización de reservas energéticas para activar mecanismos de adaptación al estrés. Además de eso, la concentración de glucógeno en hepatopáncreas aumentó según se incrementaba la salinidad de manera similar a lo observado en animales expuestos a 27 °C. Esto estaría indicando que el glucógeno de hepatopáncreas no sería utilizado para satisfacer las demandas energéticas asociadas a los mecanismos adaptativos frente al estrés salino. Por el contrario, en músculo abdominal, los niveles de glucógeno descendieron abruptamente cuando los animales fueron expuestos a bajas temperaturas; a su vez, a 20 °C la concentración de glucógeno de los juveniles a 5 y 10 g/L fue significativamente superior a la determinada en langostas en agua dulce. En síntesis, nuestros hallazgos indican que el principal factor que afecta los niveles de glucógeno en hepatopáncreas y en musculo abdominal es la temperatura y no así la salinidad.

Para cualquier especie de crustáceos, el vivir en un medio dulceacuícola está asociado con la capacidad para absorber iones en contra de gradiente, aún cuando la osmolaridad hemolinfática de los crustáceos de agua dulce se encuentra altamente reducida, en comparación con los crustáceos marinos. A nivel branquial se produce la principal reposición de los iones monovalentes, que junto a una permeabilidad extremadamente baja y la capacidad de producir una orina diluida permiten mantener los gradientes iónicos (Kirschner, 1991, 2004; Pequeux, 1995; Rasmussen y Andersen, 1996; Freire *et al.*, 2008a). Al estudiar el proceso de osmorregulación en juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* se determinó que, en agua dulce, la concentración hemolinfática de los iones Na⁺ y K⁺ fue de 147,78 y 2,65 meq/L, respectivamente. Los niveles medidos se asemejaron a los informados para otras especies de crustáceos de agua dulce (Wheatly y Gannon, 1995; Wheatly *et al.*, 1996). Los resultados de este trabajo nos permitieron concluir que la temperatura afecta la capacidad osmorreguladora de la langosta en estudio. La concentración de Na⁺, el principal catión que determina la osmolaridad hemolinfática, no varió con la salinidad cuando la temperatura fue de 27

°C, pero cuando los juveniles se expusieron a 20 °C se observó un incremento en los niveles de este ión, siendo significativo a la mayor salinidad ensayada. Este tipo de aumento en los niveles de sodio hemolinfático, a una temperatura subóptima para la especie, también fue observado en *Procambarus zonanangulus* y *Macrobrachium olfersii* (Newsom and Davis, 1994; McNamara *et al.*, 2004). En todos los casos el aumento de sodio fue acompañado por un respectivo aumento en iones potasio. Interesantemente, condiciones de alta salinidad no modificaron los niveles de ambos iones en hemolinfa. Estas observaciones podrían parecer paradójicas: al variar la osmolaridad del medio ambiental ni el sodio ni el potasio hemolinfático se ven modificados, al mismo tiempo que se observa un abrupto aumento en los niveles de estos iones cuando los animales son expuestos a bajas temperaturas. Lejos de ser sujeto de controversias, estos resultados coinciden con observaciones previas realizadas en diferentes especies de langostas de agua dulce, en las cuales se ha demostrado que son capaces de hiper-osmorregular en agua dulce y a bajas salinidades (aproximadamente hasta 15 g/L) (Wheatly y Gannon, 1995; Holdich *et al.*, 1997; Yavuzcan Yildiz *et al.*, 2005; Prymaczok *et al.*, 2008) pero, al aumentar o disminuir la temperatura preferida del animal, la concentración de sodio y consecuentemente la osmolaridad aumenta (Newsom y Davis, 1994). *C. quadricarinatus* estaría capacitada fisiológicamente para vivir en salinidades de hasta 10 g/L, pero el cambio de la salinidad del agua en conjunto con la variación de la temperatura se convertiría en una condición estresante para el animal; un hecho que avala esta suposición son los elevados niveles de glucosa en hemolinfa que nos indicarían que los animales no pueden aclimatarse a la salinidad del agua cuando la temperatura es de 20 °C.

En línea con lo mencionado anteriormente, el aumento en los niveles de iones en la hemolinfa de las langostas expuestas a bajas temperaturas estuvo acompañado por un incremento significativo en los niveles de aminoácidos libres (FAA) en músculo abdominal; este es un conocido mecanismo compensatorio involucrado en la regulación isosmótica, el cual permite mantener el medio intracelular isosmótico respecto al medio extracelular, y de este modo evitar la generación de gradientes osmóticos y flujos de agua (Gilles, 1997; Parmegiani Jahn *et al.*, 2006; Faria *et al.*, 2011). *C. quadricarinatus* es un decápodo típico de agua dulce en lo que respecta al control de la presión osmótica de la hemolinfa. La presencia de proteínas, glucosa, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ y productos nitrogenados no proteicos en hemolinfa, entre los que se encuentran los aminoácidos libres y los compuestos de excreción (Vogt, 2002), hace que la presión osmótica en la mayoría de los crustáceos de agua dulce sea mayor a 350 mOsm (Mantel y Farmer, 1983). En los juveniles avanzados utilizados en el presente trabajo, la combinación de baja temperatura y alta salinidad produjo un incremento en la concentración hemolinfática de sodio y potasio junto con un aumento en los

niveles de FAA en músculo abdominal. Para la langosta de agua dulce *Cherax destructor*, se informó una concentración de aminoácidos en hemolinfa de 2,67 $\mu\text{mol/g}$, que representa menos del 1 % del total de solutos osmóticamente activos (Dooley *et al.*, 2000). El valor promedio estimado por nosotros, para juveniles avanzados de *C. quadricarinatus*, fue muy cercano, de 3,16 $\mu\text{mol/g}$. Al igual que lo observado en esta tesis empleando juveniles de *C. quadricarinatus*, Dooley también observó que no existe tendencia alguna entre el nivel de aminoácidos totales en hemolinfa y las variaciones en la presión osmótica ambiente; en nuestro caso, los niveles de FAA en hemolinfa se mantienen prácticamente constantes a ambas temperaturas.

En crustáceos, la Hormona Hiperglucemiante (CHH) es fundamental en la regulación de los niveles de glucosa en hemolinfa. La liberación de la hormona ocurre en respuesta a factores internos, que incluye un ritmo circadiano endógeno entrenado a un ciclo de luz /oscuridad (Kallen *et al.*, 1988, 1990), como así también en la respuesta a diversos factores externos que, en general, producen un cuadro de estrés en los animales, entre los que se encuentran la hipoxia inducida por emersión (Chang *et al.*, 1998; Webster, 1996; Chung y Webster, 2005; Chung y Zmora, 2008), el shock térmico (Santos *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Kuo and Yang, 1999; Chung and Webster, 2005), la regulación del balance hidromineral (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003) y los contaminantes ambientales (Reddy *et al.*, 1996; Lorenzon *et al.*, 2000, 2004), entre otros. En el presente trabajo, evaluamos el grado de participación de CHH en el mantenimiento de la homeostasis asociado a la respuesta adaptativa frente a condiciones de estrés térmico y salino. Para tal fin, determinamos los niveles de ARN mensajero de la hormona en pedúnculo ocular, tejido en el cual la hormona es sintetizada, como medida de su expresión en las distintas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos nos indican que, a 27 °C, los niveles de ARNm de CHH aumentaron acorde se incrementaba la salinidad. Además de la regulación por salinidad, CHH aumentó su expresión notablemente cuando los animales fueron expuestos a bajas temperaturas, y el efecto combinado de ambos tratamientos produjo aun un mayor nivel de expresión hormonal. A partir de los primeros trabajos realizados por Scudamore (1947), numerosos experimentos han establecido la existencia de un control neuroendócrino sobre el balance hidromineral en los crustáceos decápodos, aunque principalmente en especies marinas (Kamemoto, 1976, 1991; Kleinholz, 1976; Mantel, 1985; Muramoto, 1988; Morris, 2001). En general, la ablación de los pedúnculos oculares (una metodología ampliamente utilizada para eliminar la CHH endógena del animal) en crustáceos aclimatados a un medio hipo-osmótico produce una disminución de la osmolaridad hemolinfática, del contenido e influjo de iones y un incremento en el contenido de agua (Charmantier *et al.*, 1984; Mantel, 1985; Muramoto, 1988; Serrano *et al.*, 2003). En correspondencia

con estas observaciones, nuestros resultados nos permitirían sugerir que, en juveniles avanzados de *C. quadricarinatus*, la hormona CHH estaría involucrada en la respuesta al estrés salino; esta hormona no sólo regularía los niveles de glucosa, sino que además colaboraría a mantener la osmolaridad hemolinfática. Como fue mencionado previamente, en los juveniles expuestos a 27 °C, los niveles de glucosa se incrementaron a medida que aumentaba la salinidad, mientras que los niveles de sodio en hemolinfa se mantuvieron constantes en todas las salinidades ensayadas. Poniendo en contexto la acción de la hormona, CHH aumentaría la concentración de glucosa en hemolinfa para afrontar la mayor demanda de requerimientos energéticos relacionados con el mantenimiento del equilibrio hidromineral; pero además, estaría controlando directamente el proceso de osmorregulación, probablemente controlando el flujo de Na⁺ y de Cl⁻, o afectando a la enzima Na⁺/K⁺ ATPasa, efecto observado en trabajos previos en otra especie de crustáceos (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003). Por otro lado, la exposición de los animales a bajas temperaturas produjo un aumento superior al 100 % en los niveles de expresión del ARNm de CHH en los juveniles aclimatados en agua dulce. Interesantemente, los mayores niveles de CHH se observaron cuando los animales fueron expuestos a la combinación de baja temperatura y 10 g/L. En línea con nuestras observaciones, Lago-Lestón y colaboradores (2007) observaron en camarones (*Litopenaeus vannamei*) una mayor expresión del gen de CHH ante variaciones en la salinidad sólo cuando los camarones eran expuestos a una temperatura alejada de la reconocida como óptima para el crecimiento de la especie.

CHH es una hormona pleiotrópica y actúa sobre varios tejidos blanco, aunque su acción ha sido demostrada principalmente en músculo y hepatopáncreas (Chung *et al.*, 2010). Numerosos estudios han informado que el efecto hiperglucémico de CHH está correlacionado con la glucogenólisis en esos tejidos; además, tanto la síntesis como la degradación de glucógeno están regulados por CHH (Santos y Keller, 1993). Reddy y Kishori (2001) y Sedlmeier (1982) informaron que la ablación de los pedúnculos oculares causaba activación de la enzima glucógeno fosforilasa (GP) en músculo y hepatopáncreas, y la inactivación simultánea de la enzima glucógeno sintetasa (GS) en hepatopáncreas. Además, diferentes factores estresantes indujeron cambios en la concentración de glucógeno y carbohidratos totales, tanto en hepatopáncreas como en músculo (Basu *et al.*, 2003; Reddy y Kishori, 2001), lo cual fue acompañado por un incremento en la secreción de CHH (Kegel *et al.*, 1989; Lorenzon *et al.*, 2004, 2005). Por otro lado, la incubación de hepatopáncreas con CHH redujo la tasa de incorporación de glucosa en glucógeno, evidenciando que CHH suprime la actividad de GS (Sedlmeier, 1987). A su vez, fue demostrado que la inyección de CHH disminuye la actividad de GS a niveles normales en músculo de langostas de agua dulce

con los pedúnculos oculares ablacionados (Sedlmeier, 1982). Ha sido propuesto que estas acciones de CHH están mediadas por un receptor de membrana no identificado y por nucleótidos cíclicos (Chung *et al.*, 2010; Fanjul-Moles, 2006). Se sabe que la glucosa es producida por dos vías, la glucogenólisis y la gluconeogénesis; si bien muchos estudios han demostrado que la activación de GP y la inactivación de GS contribuyen a la producción de glucosa inducida por CHH, sugiriendo la activación de la glucogenólisis por parte de la hormona, esta regulación no fue investigada a nivel genómico ni proteico. Asimismo, tampoco se estudió si CHH induce la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis.

Con la intención de obtener mayor información acerca del metabolismo del glucógeno en situaciones de estrés térmico y salino, determinamos los niveles de ARNm de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxiquinasa (PEPCK), como medida de su expresión. Esta enzima cataliza el primer paso de la gluconeogénesis, esto es, la síntesis *de novo* de glucosa a partir de precursores no carbohidratos, como son lactato, piruvato, glicerol y aminoácidos (Yang *et al.*, 2009a), al catalizar la reacción reversible de conversión de oxalato a fosfoenolpiruvato en diferentes organismos, desde bacterias hasta los seres humanos. Por otro lado, está involucrada en la gliceroneogénesis, la síntesis de serina y la conversión de la cadena carbonada de ciertos aminoácidos a fosfoenolpiruvato, para la subsiguiente oxidación en el ciclo del ácido cítrico (Yang *et al.*, 2009a). En vertebrados, está ampliamente establecido que PEPCK tiene dos isoformas, una forma citosólica y otra mitocondrial, de las cuales la primera está regulada hormonalmente y la mitocondrial se expresa constitutivamente (Yang *et al.*, 2009b). En invertebrados, dado la evidencia existente, la regulación de la expresión de PEPCK no se realizaría de la misma forma que en vertebrados; los crustáceos poseen la mayor actividad de la enzima en la fracción mitocondrial, como lo demostraron Schein y colaboradores (2004) quienes además determinaron que el nivel de ARNm de PEPCK en *N. granulata* se incrementaba después de someter a los cangrejos a un estrés hiper-osmótico, lo que indicaría que dicha isoforma no se expresaría constitutivamente en crustáceos. Es importante mencionar que, en crustáceos, existe una gran controversia acerca de la gluconeogénesis, y en especial sobre la actividad de la enzima PEPCK; la variedad de métodos analíticos utilizados por los diferentes autores, sumado a múltiples factores asociados a las particularidades biológicas y ecológicas de las diferentes especies, probablemente contribuyen a la falta de un criterio común. Por ejemplo, Phillips (1977) detectó muy bajos niveles de PEPCK en dos especies de crustáceos y desestimó la presencia de gluconeogénesis en hepatopáncreas. Por otro lado, Henry (1994) no detectó actividad PEPCK ni en la fracción mitocondrial ni en la citosólica de ninguno de los tejidos de tres especies de cangrejos. Sin embargo, en *Callinectes sapidus* pudo medirse la actividad de ciertas enzimas de la gluconeogénesis

en músculo, hepatopáncreas y branquias (Lallier y Walsh, 1992); mientras tanto, en *Litopenaeus vannamei* se observó que la capacidad gluconeogénica en el hepatopáncreas podía ser modulada por la dieta, evidenciando una alta actividad enzimática en estos camarones al ser alimentados con una baja concentración de carbohidratos (Rosas *et al.*, 2001).

Con el objetivo de aportar nuevos conocimientos acerca de la regulación de la enzima PEPCK en crustáceos, en el presente trabajo se estudió su expresión en músculo abdominal de juveniles de *C. quadricarinatus* expuestos a condiciones de estrés térmico y salino. Es importante mencionar que esta tesis constituye el primer trabajo en el cual la regulación de PEPCK ha sido estudiada en *C. quadricarinatus*. Encontramos que, independientemente de la temperatura, la expresión de la enzima en músculo abdominal disminuyó al incrementarse la salinidad. A su vez, los niveles de ARNm de PEPCK en los grupos expuestos a 20 °C descendieron en un 50 % con respecto a los niveles medidos a 27 °C. Además de la dependencia por la temperatura, observamos una marcada inhibición en la expresión de PEPCK cuando los animales fueron expuestos a altas salinidades. Considerando que ha sido demostrado que la actividad de esta enzima es modificada hormonalmente a nivel transcripcional, nuestros resultados nos permiten sugerir un mecanismo general en el cual la hormona CHH tendría algún tipo de control sobre la expresión del gen de PEPCK. Mientras los niveles de PEPCK disminuyeron al variar la salinidad, los niveles de CHH aumentaron cuando la salinidad del medio se incrementó. Debido a la correlación negativa entre los niveles de expresión de la enzima y de la hormona, nuestros hallazgos permiten sugerir la existencia de algún tipo de mecanismo de regulación antagónica entre CHH y PEPCK cuando los animales se enfrentan a condiciones de estrés salino. En *Marsupenaeus japonicus* (Nagai *et al.*, 2011) se observó que al ablacionar sus pedúnculos oculares se alteraban los niveles de expresión de PEPCK en el hepatopáncreas de animales hambreados. En dicho trabajo, luego de siete días de inanición, los niveles de la enzima aumentaban en animales intactos, mientras que en los camarones hambreados y ablacionados los niveles enzimáticos se mantenían estables y la exposición del hepatopáncreas a CHH no generaba cambios significativos. Como se observó en camarones y se estableció en mamíferos (Nagai *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009), la actividad enzimática de PEPCK está estrechamente relacionada a la variación de los niveles de ARNm en respuesta al estado metabólico del animal. Al mismo tiempo, y en base a nuestros resultados, podemos sugerir que en el músculo abdominal de juveniles de *C. quadricarinatus* existe algún tipo de regulación por parte de CHH de los niveles de ARNm de PEPCK, aunque no podemos descartar la existencia de algún otro factor que junto a la hormona modulen la expresión de la enzima. En mamíferos se ha observado que los

niveles de glucosa disminuyen los niveles de ARNm de PEPCK al disminuir la expresión del gen y al incrementarse la degradación del propio ARNm (Meyer *et al.*, 1991).

2.II.B. Efecto del cambio repentino (estrés agudo) en las condiciones óptimas de temperatura y salinidad en juveniles de *C. quadricarinatus*

En un segundo ensayo, nos propusimos estudiar la respuesta de *C. quadricarinatus* frente a condiciones agudas de estrés térmico y salino. Para ello, los animales fueron expuestos a dichas condiciones por periodos de 2, 4 y 6 horas, y los niveles de glucosa en hemolinfa como así también la expresión de CHH y PEPCK fueron estudiados con el objetivo de caracterizar parte de los mecanismos de compensación fisiológica que ocurren ante cambios bruscos de variables ambientales, sin mediar un proceso de aclimatación previo. Los mayores incrementos en la concentración de glucosa hemolinfática ocurrieron en respuesta a la combinación de baja temperatura y alta salinidad del agua; a su vez, la salinidad por si sola también generó aumentos significativos en los niveles de glucosa, algo que no se observó en los animales expuestos a bajas temperaturas. También es importante mencionar que el incremento en los niveles de glucosa no fue constante en el tiempo ya que a las 4 horas de tratamiento observamos un evidente descenso en esta variable. Como conclusión general podemos mencionar que los niveles de glucosa en hemolinfa aumentaron cuando los animales fueron expuestos a condiciones de estrés agudo de temperatura y salinidad, sin embargo, la magnitud de ese aumento depende fuertemente de los tiempos utilizados en el ensayo. Con estas conclusiones en mente, nos propusimos analizar la expresión de CHH en pedúnculo ocular de animales expuestos a estrés agudo.

En correspondencia con los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de glucosa, observamos un aumento en la expresión de CHH tanto en los animales expuestos a bajas temperaturas como así también a alta salinidad, e interesantemente, la combinación de ambos tratamientos produjo un abrupto aumento en la expresión de este gen, observando un efecto sinérgico entre los dos factores estresantes. Además, el aumento de expresión de CHH fue relativamente constante o aumentó gradualmente (según el tratamiento) en todos los tiempos ensayados, sin registrarse una disminución a las 4 horas, como ocurrió con los niveles de glucosa.

A diferencia de lo observado en otros crustáceos (Kuo y Yang, 1999; Hsieh *et al.*, 2006), en los cuales ante una disminución en la temperatura del agua se observó un incremento significativo

en los niveles de glucosa en hemolinfa, los juveniles de *C. quadricarinatus* luego de haber sido afectados por un descenso de 7 °C en la temperatura del agua, sólo mostraron un leve aumento en los niveles de glucosa que no llegaron a ser significativos. En base a estos resultados y recordando que los juveniles expuestos, de manera crónica, a 20 °C presentaron niveles de glucosa que superaban en un 100 % a la de sus pares a 27 °C, podemos sugerir la existencia de algún tipo de adaptación de la especie a los cambios de temperatura a corto plazo, pero la variación de la temperatura se torna un factor estresante cuando se prolonga en el tiempo. En concordancia con nuestros resultados, en el cangrejo *Callinectes sapidus* se observó que, luego de 2 horas de estrés hiposmótico, los niveles de glucosa se elevaban levemente como así también los niveles de ARNm de CHH en pedúnculo ocular (Chung y Zmora, 2007). A su vez, Chang y colaboradores (1998), utilizando la técnica inmunoenzimática ELISA determinaron que ante un cuadro de estrés salino, los niveles de CHH en hemolinfa de *Homarus americanus* se incrementaban; y lo mismo ocurría cuando la temperatura del agua se elevaba más de 10 °C, aunque estos dos factores eran menos potentes que el estrés generado por emersión.

Al estudiar la participación de la gluconeogénesis en el aumento de los niveles de glucosa en hemolinfa, analizamos los niveles de ARNm de PEPCK a lo largo del ensayo para los diferentes tratamientos. En línea con los resultados obtenidos al cuantificar los niveles de glucosa hemolinfática, los niveles de expresión de PEPCK fueron superiores al tiempo cero (niveles basales) en las tres condiciones experimentales utilizadas, manteniéndose elevados durante todo el ensayo. Al igual que lo observado para CHH, los mayores niveles de PEPCK se observaron en los juveniles expuestos a la combinación de baja temperatura y aumento de salinidad; sin embargo, no observamos efectos sinérgicos en la expresión de este gen en esta condición. La existencia de un aumento en la expresión de la enzima PEPCK ante distintas condiciones estresantes, nos estaría indicando que el animal es capaz de distribuir la principal fuente de energía (glucosa) entre los diferentes procesos fisiológicos clave; en definitiva, y en correspondencia con la hipótesis planteada, los niveles de este carbohidrato en hemolinfa se incrementó significativamente luego de exponer a los animales a diferentes condiciones de estrés. De esa manera, esta primera respuesta del organismo serviría para solventar los requerimientos energéticos necesarios para mantener la homeostasis en los animales, por lo menos durante las primeras 6 horas de exposición a cambios en las condiciones óptimas del agua.

Otra explicación plausible acerca del aumento en los niveles de expresión de la enzima PEPCK en los grupos expuestos a salinidades crecientes podría ser, en parte, consecuencia del metabolismo de aminoácidos en el músculo. Como se mencionó anteriormente, ante un estrés hiper-osmótico, tanto la captación de aminoácidos como la proteólisis se incrementan para igualar la osmolaridad intracelular con la hemolinfática (Gilles y Delpire, 1997); esta modificación, junto con los cambios en el volumen celular, induciría la expresión de la enzima y favorecerían la gluconeogénesis a partir de aminoácidos. Al mismo tiempo, como se sugiere en mamíferos, la enzima PEPCK tendría un papel relevante en la integración de múltiples vías del metabolismo energético (She *et al.*, 2000). A diferencia de nuestras observaciones, se ha informado que cangrejos de la especie *N. granulata* capturados durante la época invernal y sometidos a un estrés hiper-osmótico presentaron una tasa de conversión del aminoácido alanina a glucosa en músculo (una medida de la gluconeogénesis) que se incrementaba 24 horas después de aplicado el estrés y que luego disminuía (Schein *et al.*, 2005). Al determinar la expresión de PEPCK en músculo luego de 24 horas, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, encontraron un aumento significativo de la expresión respecto al grupo control; los autores atribuyeron esa brecha temporal entre actividad y expresión de la enzima a la formación necesaria de factores de transcripción. La diferencia encontrada entre los niveles de ARNm de PEPCK en los ensayos crónico y agudo puede deberse a que el conjunto de aminoácidos libres (FAA) en músculo abdominal se incrementa rápidamente luego del aumento de la salinidad del agua, alcanzando un nivel máximo a las 24 horas del cambio de condiciones, y continuando luego con un paulatino descenso en la concentración dentro de las 48 a 72 horas de ocurrido el estrés hiper-osmótico (McCoid *et al.*, 1984).

En su conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo pretenden contribuir a un mayor conocimiento sobre la capacidad fisiológica que posee la especie en estudio para enfrentar variaciones de temperatura y salinidad en el medio ambiente. Estos descubrimientos podrían ser una herramienta invaluable para la acuicultura de crustáceos, ya que es una industria multimillonaria a nivel mundial (FAO, 2011) que necesita asegurarse una producción óptima y rentable, y para ello el seguimiento y control de la mayor cantidad de variables en el cultivo, es crítico. En este sentido, entre las principales variables ambientales, la salinidad del agua y la temperatura ambiente son dos de los factores más importantes que afectan el crecimiento y la sobrevivencia de los crustáceos, junto con la alimentación y la calidad de agua (Jones, 1997). La temperatura es uno de los factores limitantes más importantes a la hora de desarrollar el cultivo de animales en estanques externos, principalmente en regiones de clima templado como en nuestro país, ya que las bajas temperaturas arrestan el crecimiento y disminuyen la sobrevivencia de los animales. Por otro lado, conocer la salinidad del agua

de una determinada región a la cual pueden estar expuestos los cultivos animales, así como la capacidad osmorreguladora de las especies de crustáceos cultivables, son consideraciones importantes y relevantes a tener en cuenta al momento de definir el establecimiento de una granja acuícola, así como para la optimización de la productividad. Dado que el rango óptimo de salinidad de los crustáceos es especie-específico (Charmantier *et al.*, 2009), el conocimiento de la capacidad osmorreguladora permite una mejor selección del sitio y planificación en el uso del agua en el momento inicial de instalación de un criadero (Bray *et al.*, 1994; Kumlu y Jones, 1995; Kumlu *et al.*, 2001; Romano y Zeng, 2006; Rouse y Kartamulia, 1992; Ruscoe *et al.*, 2004; Sang y Fotedar, 2004; Soyel y Kumulu, 2003). Asimismo, conocer como es el crecimiento de las especies cultivables a ciertas salinidades es útil por dos motivos, primero porque permitiría ampliar el establecimiento de criaderos en zonas donde el clima es el apropiado pero el agua es salobre, y segundo, porque ayudaría a mejorar la palatabilidad de la carne, dado que el aumento en la osmolaridad del agua genera un incremento de aminoácidos en las células, lo cual realza el sabor de la carne (Jones, 1969; Konosu y Yamaguchi, 1982; McCoid *et al.*, 1984; Papadopoulos y Finne, 1986).

3. CAPITULO II

PARTICIPACIÓN DE LA HORMONA HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTÁCEOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO Y SALINO DE JUVENILES DE *Cherax quadricarinatus*

3.I. OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i. Producir la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) recombinante y su anticuerpo específico.
- ii. Detectar la presencia de CHH en hemolinfa y pedúnculo ocular.
- iii. Determinar el efecto de la administración exógena de CHH sobre la aclimatación de las langostas de la especie *C. quadricarinatus*, a distintas combinaciones de estrés térmico y osmótico.
- iv. Evaluar el tipo de efecto (directo o indirecto) de CHH sobre ciertos órganos blanco, como el hepatopáncreas y el músculo abdominal.

3.I.A. Obtención de CHH recombinante de *C. quadricarinatus* y generación de anticuerpos anti-rCqCHH

3.I.A.a. MATERIALES Y METODOS

Con el objetivo de producir la Hormona Hiperglucemiante de Crústaceos (CHH) recombinante en bacterias, se clonó su ADN copia (cDNA) en diferentes vectores de expresión procariota utilizando la metodología que se explica a continuación.

3.I.A.a.i. Clonado de rCqCHH en vectores de expresión procariota

Para poner a prueba diferentes hipótesis sobre la función de la Hormona Hiperglucemiante de Crústaceos (CHH) en la respuesta al estrés térmico y salino en *C. quadricarinatus*, se produjo la hormona recombinante (rCqCHH). En esta instancia se contó con la colaboración del Dr. Amir Sagi de la Universidad de Ben Gurion de Israel, quien previamente había clonado y secuenciado el cDNA de CHH de 200 pb, obtenido a partir de pedúnculos oculares de la langosta *Cherax quadricarinatus* (GenBank: DQ095778.1, **Fig. 19**); dado que dicho cDNA fue insertado en el vector de clonado pGEM-T Easy (Promega), llamamos a la construcción obtenida del Dr Sagi pGEM-Cq-CHH. En esta tesis se subclonó cDNA de CHH en un vector de expresión procariota llamado pGEX4-T3 (GE Healthcare); de esta forma, se produjo la proteína recombinante GST-CHH en bacterias (**Fig. 20**). Además, se realizó otro subclonado del mismo cDNA en el vector de expresión procariota pQE-30 (Quiagen) (**Fig. 21**) para generar la proteína recombinante 6XHis-CHH; de esta forma, se comparó la actividad biológica de la hormona recombinante fusionada a diferentes polipéptidos o tags (GST o 6XHis)

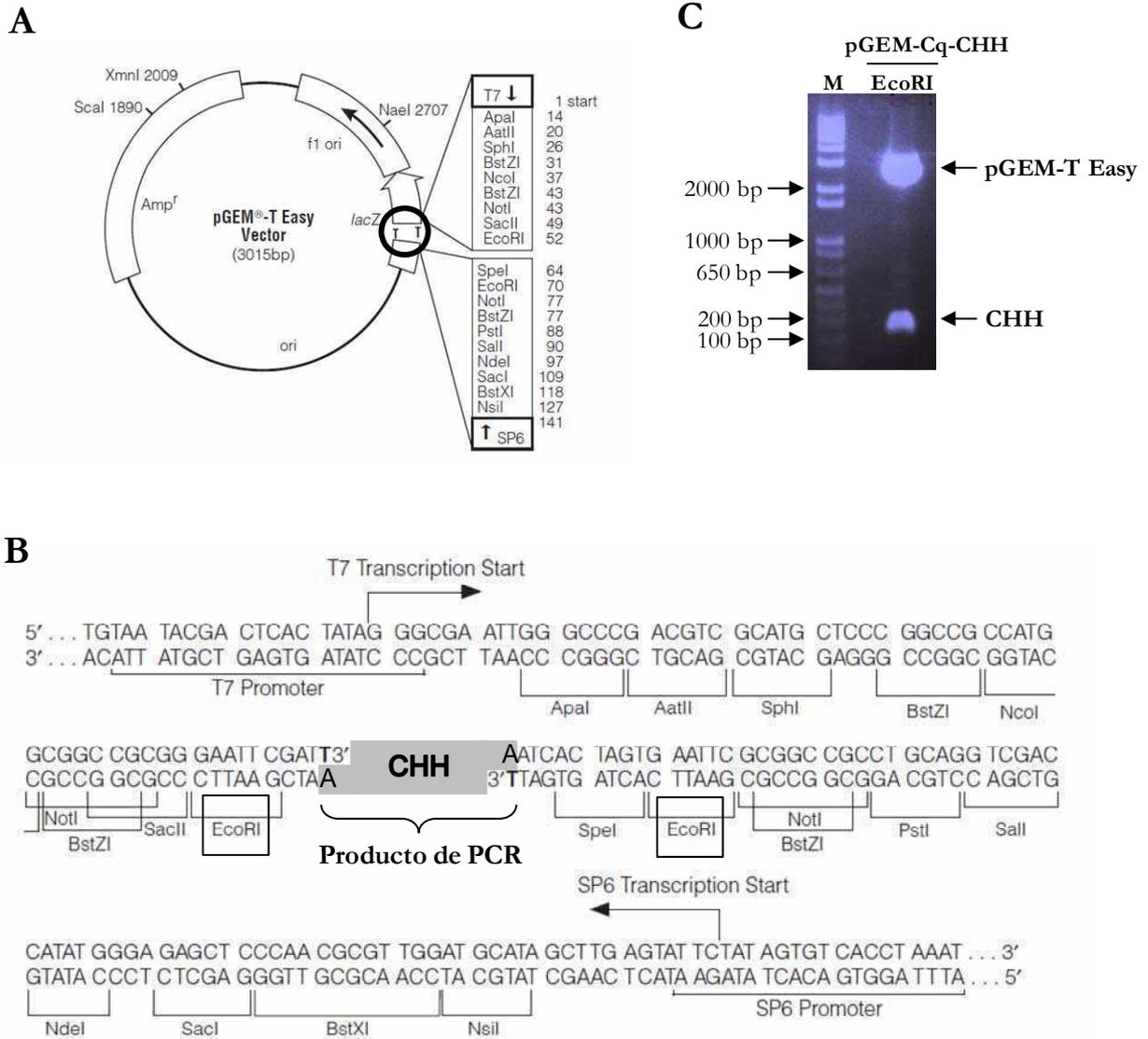


Figura 19. Clonado del cDNA de CHH de *C. quadricarinatus* por el laboratorio del Dr. Sagi en el vector pGEM T-Easy. **A.** Mapa del vector pGEM-T Easy (Promega) usado para el clonado de CHH. **B.** Detalle del sitio de clonado múltiple del vector pGEM-Cq-CHH: El vector pGEM-T Easy constituye un sistema conveniente para el clonado de productos de PCR debido a que originalmente se comercializa linealizado (no circular), presentando en ambos extremos 3' una Timidina (T) no apareada (señalizadas en la figura del vector, panel **A**). Estas Timidinas constituyen el sitio de inserción de los productos de PCR, ya que muchas de las enzimas ADN polimerasas generan productos de PCR que poseen en ambos extremos Desoxiadenosina (A) desapareada. De esta manera, las Timidinas se aparean con las Desoxiadenosinas permitiendo la inserción del producto de PCR en el vector (y consecuentemente su circularización) de manera muy eficiente y fácil. Siguiendo estos principios, en colaboración con el grupo del Dr. Sagi de la Universidad Ben Gurion, Israel, el cDNA de CHH de *C. quadricarinatus* fue amplificado por PCR (representada en recuadro gris, panel **B**) e insertado en el vector pGEM-T Easy, para generar pGEM-Cq-CHH. Este vector fue amplificado en bacterias y utilizado como fuente de cDNA de CHH para subclonados

subsiguientes utilizando el sitio de restricción para la enzima EcoRI (recuadros negros). **C.** pGEM-Cq-CHH fue digerido con la enzima de restricción EcoRI para liberar la banda correspondiente al cDNA de CHH (ver **B**). Luego de la reacción de restricción, los productos fueron corridos en un gel de agarosa 1,8 % y revelados con SYBR® Safe DNA (Invitrogen); finalmente, la banda correspondiente al cDNA de CHH fue aislada y purificada del gel. Se indican el cDNA de CHH (200 pb aproximadamente) y el vector pGEM-T Easy linealizado (3015 pb aproximadamente). M: Marcador de pares de bases, 1 Kb plus (Invitrogen).

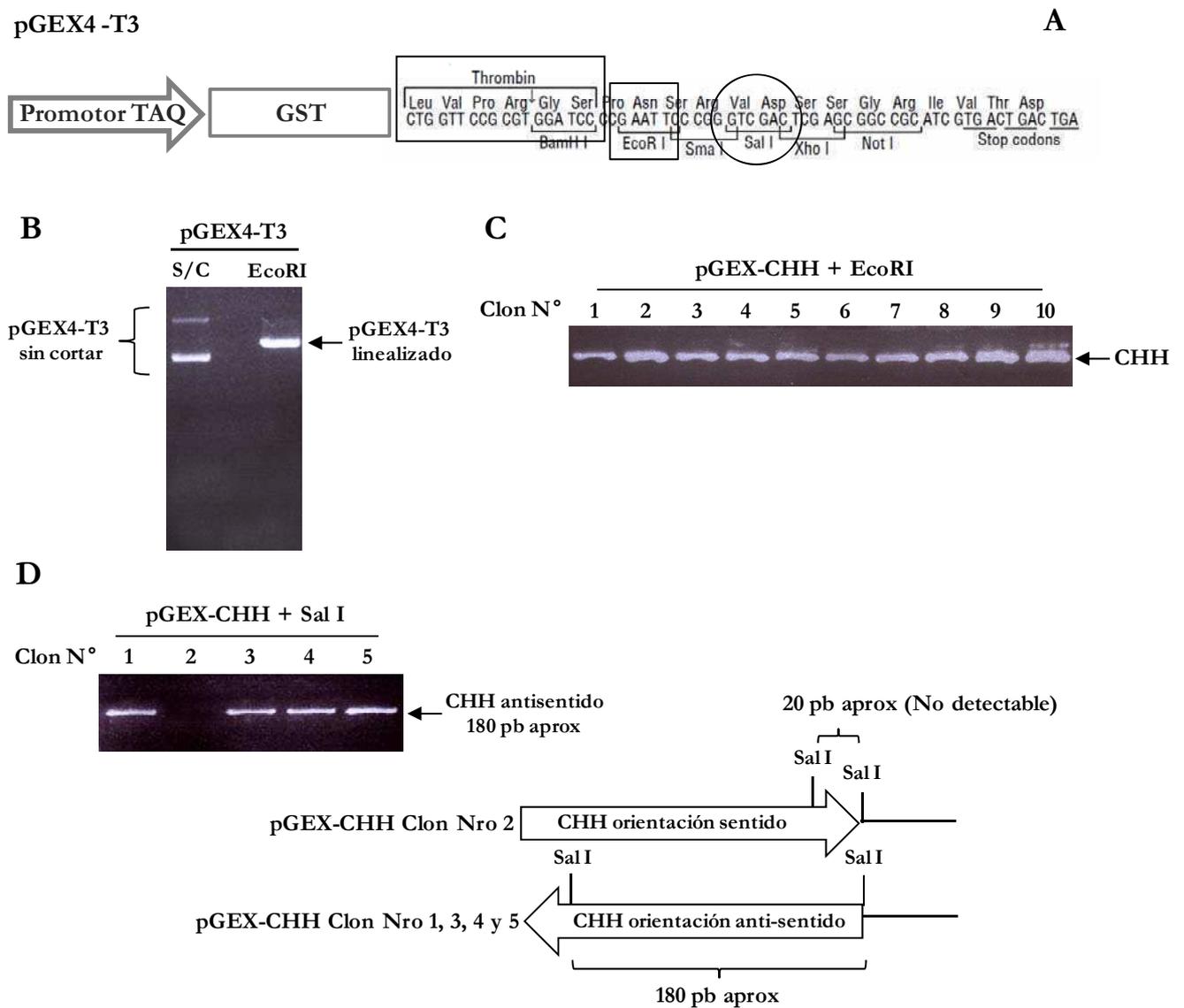


Figura 20. Subclonado de CHH en pGEX4-T3 para producir GST-CHH. **A.** Representación y secuencia del sitio de clonado múltiple del vector pGEX4-T3 usado para producir GST-CHH. Se muestra en recuadro la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI utilizada para la inserción del cDNA de CHH obtenido tras digerir pGEM-Cq-CHH. También en recuadro se muestra el sitio de reconocimiento para la proteasa Trombina, utilizada para clivar específicamente GST de CHH. Notar que esta estrategia de

clonado genera una proteína de fusión entre la proteína Glutathion S-transferasa (GST) y CHH. **B.** Restricción de pGEX4-T3 con EcoRI para linealizar el vector y así insertar el cDNA de CHH. Luego de la reacción de restricción los productos fueron corridos en un gel de agarosa 0,8 % y revelados con SYBR® Safe DNA (Invitrogen). Finalmente, la banda correspondiente a pGEX4-T3 linealizado fue aislada y purificada del gel. Por último, el cDNA de CHH y el vector pGEX4-T3 linealizado fueron incubados en una reacción de ligación, y a continuación con el producto de esta ligación fueron transformadas bacterias. **C.** Determinación de clones positivos para el cDNA de CHH: Se obtuvieron distintas colonias de bacterias (llamados clones), luego se purificó DNA plasmídico de estos clones (idealmente pGEX-CHH) y ese DNA plasmídico fue digerido con la enzima EcoRI para verificar la presencia del inserto de CHH (se muestran solo 10 resultados de DNA plasmídico obtenido de 10 clones distintos, todos ellos conteniendo el cDNA de CHH). **D.** Comprobación de la direccionalidad del cDNA de CHH. Debido a que en la estrategia de clonado utilizada el cDNA de CHH fue insertado no direccionalmente (es decir, su inserción puede haber ocurrido en sentido o antisentido), el DNA plasmídico obtenido de los distintos clones fue digerido con la enzima de restricción Sal I según se representa en el panel **A**. Se muestra el resultado de 5 clones, de los cuales sólo en el clon 2 la CHH está en orientación sentido. La secuencia del DNA plasmídico obtenido de los clones positivos con inserción del cDNA de CHH en dirección sentido fue secuenciada mediante protocolos estándar.

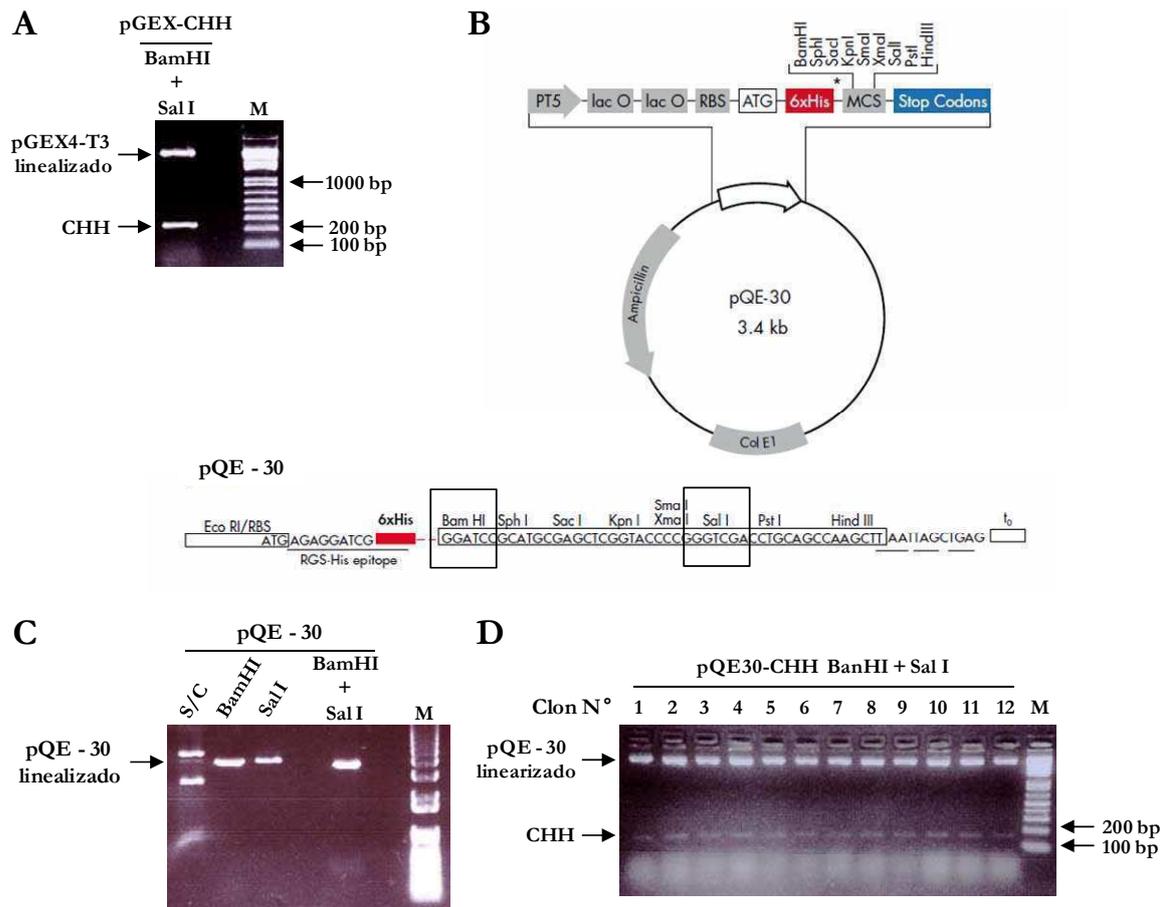


Figura 21. Subclonado de CHH en pQE-30 para producir 6XHis-CHH. **A.** El vector pGEX-CHH fue utilizado como fuente de CHH y digerido con las enzimas de restricción BamHI y Sal I; los productos de dicha reacción fueron corridos en un gel de agarosa 1,5 %. Finalmente, la banda correspondiente al cDNA de CHH (200 pb aproximadamente) fue aislada y purificada del gel y utilizada en la reacción de ligación (ver más adelante). **B.** Representación esquemática del vector de destino pQE-30. Parte superior: mapa del vector circular. Parte inferior: sitio de clonado múltiple indicando en recuadros las enzimas a utilizar en esta estrategia de clonado: BamHI y Sal I. Obsérvese que esta estrategia de clonado genera una proteína de fusión entre CHH y un péptido de 6 Histidinas consecutivas (6XHis). **C.** Restricción de pQE-30 con BamHI, Sal I o ambas enzimas para linealizar el vector y así poder insertar el cDNA de CHH. Luego de la reacción de restricción, los productos fueron corridos en un gel de agarosa 0,8 % y revelados con SYBR® Safe DNA (Invitrogen). La banda correspondiente a pQE-30, digerido con ambas enzimas, fue aislada y purificada del gel. Finalmente, este vector linealizado se incubó con el cDNA de CHH en una reacción de ligación, y a posteriori el producto de esta reacción se utilizó para transformar bacterias competentes. **D.** Se obtuvieron distintas colonias de bacterias (llamadas clones), se purificó DNA plasmídico de esos clones (idealmente pQE-30-CHH) y se lo digirió con las enzimas BamHI y Sal I para verificar la presencia del inserto de CHH en el DNA plasmídico resultante (se muestran 12 resultados de DNA plasmídico obtenidos de 12 clones distintos, todos ellos conteniendo el cDNA de CHH). La secuencia del DNA plasmídico, obtenido de los clones positivos, fue secuenciada mediante protocolos estándar.

3.I.A.a.ii. **Obtención de proteínas recombinantes nativas**

Las bacterias *E. Coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformadas con las construcciones GST-CHH (basado en pGEX-4T3) y 6XHis-CHH (basado en pQE-30) correspondientes fueron crecidas durante toda una noche a 37 °C en 15 ml de medio rico LB con Ampicilina 100 µg/ml y Cloranfenicol 34 µg/ml. A la mañana siguiente se utilizaron esos 15 ml para inocular 250 ml de medio LB con Ampicilina 100 µg/ml y Cloranfenicol 34 µg/ml y se crecieron las bacterias a 37 °C en agitación durante 1 hora. Luego, se estimuló la síntesis de la proteína recombinante con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se realizó una incubación de 4 horas, luego de la cual las bacterias se cosecharon centrifugando 15 minutos a 4000 x g y se congeló el pellet a -20 °C. A continuación, se descongeló el pellet de bacterias en hielo y las células fueron resuspendidas en 5 ml de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; MgCl₂ 5 mM; Imidazol 20 mM; glicerol 10 %; NP-40 1 %; β-mercaptoetanol 1 mM; PMSF 1 mM; mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) 5 %; pH 8,0 para 6XHis-CHH. , o PBS pH 7,5; glicerol 10 %; NP-40 1%; β-mercaptoetanol 1 mM; PMSF 1 mM; mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) 5% para GST-CHH) a 4 °C. Se agregó 1 ml de lisozima 10 mg/ml y se incubó 30 minutos en hielo para romper la pared celular. Se lisaron las células sonicando con microtip 4 veces de 10 segundos a 50 % de potencia en un sonicador (Sonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific) en hielo y enfriando el microtip en hielo-etanol entre cada tanda, para evitar el calentamiento de las muestras. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Luego, se agregaron 0,2 ml de resina Glutation sefarosa 4B 80 % (Amersham) para el lisado con GST-CHH o 1 ml de resina de agarosa Ni-NTA 50 % (Quiagen) para el lisado con 6XHis-CHH; se agitó durante 1 hora a 4 °C y se cargó esta suspensión cuidadosamente en una columna. La columna se lavó 4 veces con buffer de lisis y se eluyeron las proteínas recombinantes en 4 fracciones con buffer de elusión (Tris-Cl 10 mM; NaCl 100 mM; Imidazol 250 mM; glicerol 10 %; DTT 0,1 mM; PMSF 1 mM; pH 7,5 para 6XHis-CHH o PBS pH 8,0, 25mM Glutation reducido, glicerol 10 %; NP-40 1%; β-mercaptoetanol 1 mM; PMSF 1 mM; mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) 5 % para GST-CHH).

3.I.A.a.iii. **Confirmación de la producción de proteínas recombinantes en geles SDS-PAGE**

Una vez producidas y purificadas las distintas CHH recombinantes, se evaluó la integridad y pureza de éstas luego de cada una de las fracciones de elución. Para ello, se corrieron alícuotas de cada fracción en geles de SDS-PAGE y posteriormente se realizó una tinción de proteínas con Coomassie Brilliant Blue. Además, se incluyeron en estos geles marcadores de masa de proteínas

conocidos mediante los cuales fue posible estimar la concentración de la hormona en cada uno de los procesos de purificación (**Fig. 22**).

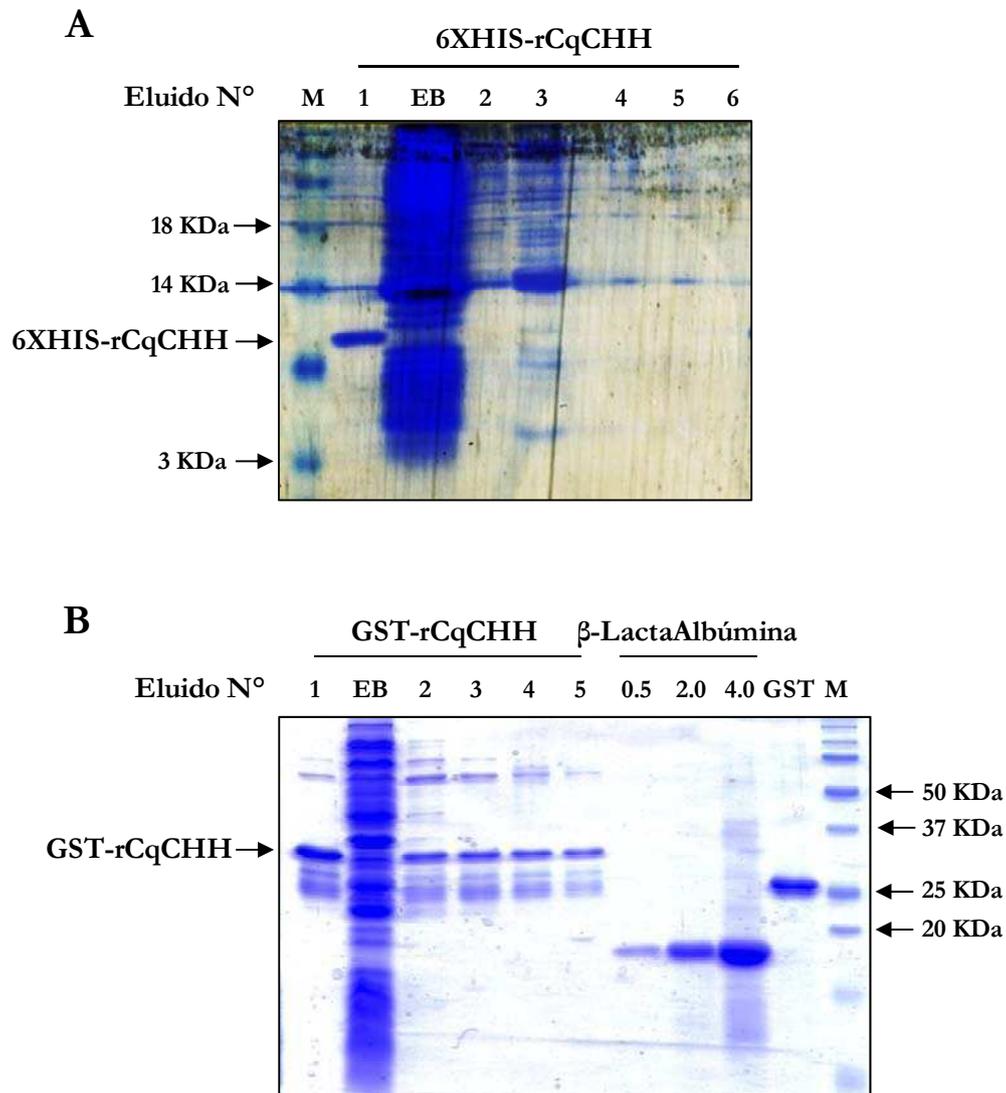


Figura 22. Purificación de CHH recombinante en condiciones nativas. Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue para detectar todas las proteínas presentes. Se muestran distintos eluidos resultantes del proceso de purificación de CHH de extractos de bacterias. **A.** Purificación de 6XHIS-CHH (7 kDa aproximadamente) por resinas de NiNTA2⁺. Obsérvese que 6XHIS-rCqCHH eluye en su totalidad en el eluido número 1. Dada la eficiente purificación y ausencia de contaminantes, el eluido número 1 fue utilizado para la generación de anticuerpos, para los ensayos *in vitro*, y para el ensayo de administración de CHH a los juveniles de *C. quadricarinatus*. EB: Extractos de bacterias sin purificar. M: marker de proteínas (SeeBlue®, Invitrogen). **B.** Purificación de GST-rCqCHH (34 kDa aproximadamente) por resinas de sepharosa-GSH. La mayor parte de la proteína recombinante de interés (GST-CHH) eluye en la fracción 1, exhibiendo pocas proteínas co-purificantes. Esta fracción fue utilizada para probar los anticuerpos generados por inyección de 6XHIS-rCqCHH (prueba cruzada). En este gel también se corrieron distintas masas de β-LactaAlbúmina (14

kDa) la cual fue utilizada para cuantificar GST-rCqCHH. GST sola (26 kDa) fue utilizada como control del retraso en la corrida debido a la fusión con CHH. EB: Extractos de bacterias sin purificar. M: marker de proteínas (BioRad prestained, Broad Range).

3.I.A.a.iv. **Generación de anticuerpos anti-rCqCHH**

Una vez que se comprobó la pureza de las hormonas recombinantes, se procedió a la producción de anticuerpos policlonales anti-rCqCHH. Los anticuerpos obtenidos se utilizaron para la identificación de la hormona endógena de *C. quadricarinatus* en hemolinfa y en extracto de pedúnculo ocular, a través de la técnica Western Blot; por otro lado, mediante inmunohistoquímica se llevó adelante la localización de la hormona endógena en cortes de pedúnculo ocular. Por último, los anticuerpos también fueron utilizados para la cuantificación de la CHH endógena en hemolinfa mediante la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay); sin embargo, no fue posible obtener un protocolo exitoso para lograr la detección y cuantificación de CHH por esta técnica.

Se utilizaron 10 ratones hembra de la cepa CF1 de entre 8 y 9 semanas de vida. Los animales fueron inyectados con jeringa hipodérmica 30G intramuscularmente (4 ratones) e intraperitonealmente (4 ratones) con 10 µg de proteína recombinante 6XHis-CHH o PBS estéril (2 ratones) en los días 0, 15, 30 y 45. En los días 15, 30 y 45 se extrajo sangre por sangrado retro-orbital para monitorear la presencia de anticuerpos por Western Blot. Durante todo el período de inmunización los animales fueron mantenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA bajo condiciones estériles, libre de patógenos.

A los 60 días de la primera inmunización los animales fueron sangrados a blanco por punción cardíaca. En todos los casos la sangre se recuperó en tubos tipo eppendorf de 1,5 ml, colocados en hielo, conteniendo un volumen (1:20 v/v) de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) para evitar la degradación de los anticuerpos; posteriormente, todas las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1.000 x g a 4 °C, recolectando el suero en tubos tipo eppendorf que se mantuvieron en freezer a -80 °C hasta su utilización.

3.I.A.a.v. Técnica de Western Blot

La técnica de Western Blot se utilizó para el control de los anticuerpos anti-rCqCHH producidos y para la identificación de la CHH endógena en hemolinfa y en extracto de pedúnculo ocular. El protocolo seguido fue el siguiente: las distintas muestras se mezclaron con buffer de siembra Laemmli 2X (1:1 v/v) (Tris 100 mM pH 6,8; Ditiotreitól 200 mM; SDS 4 %, azul de bromofenol 0,2 %, glicerol 20 %) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100 °C. Como control positivo se utilizó rCqCHH, sembrándose 5 µl de la hormona recombinante en 10 µl de buffer de siembra Laemmli 2X. Las muestras de proteínas fueron separadas por SDS-PAGE utilizando un gel 16 % de poliacrilamida según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). En el gel empleado para el control de los anticuerpos anti-rCqCHH se utilizó como buffer de corrida TRIS/Glicina-SDS 1X (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1 %). El gel empleado para la identificación de la CHH endógena en hemolinfa y en extracto de pedúnculo ocular fue un gel TRIS-TRICINE, utilizando como buffer de corrida TRIS/Glicina-SDS 1X (cátodo) y TRIS/GLICINA-SDS 1X (ánodo). El marcador de peso molecular utilizado fue SeeBlue® (Invitrogen). A continuación, las muestras fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Se realizó el bloqueo de proteínas inespecíficas con leche descremada al 5 % en TBS-Tween (0,05 %) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. El antisuero anti-rCqCHH obtenido como se indicó en la sección 3.I.A.a.iv., fue diluido 1:1.000 en la misma solución de bloqueo e incubado con la membrana por 16 hs a 4 °C en agitación constante. Luego, la membrana fue lavada tres veces con TBS-Tween y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-ratón) biotinilado diluido 1:4.000. Una vez finalizada la incubación, la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween y durante 45 minutos se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa (dilución 1:5.000). Finalmente, la membrana se reveló con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) (Dako Cytomation), utilizando un detector de bioluminiscencia digital (FUJI) para la adquisición de imágenes.

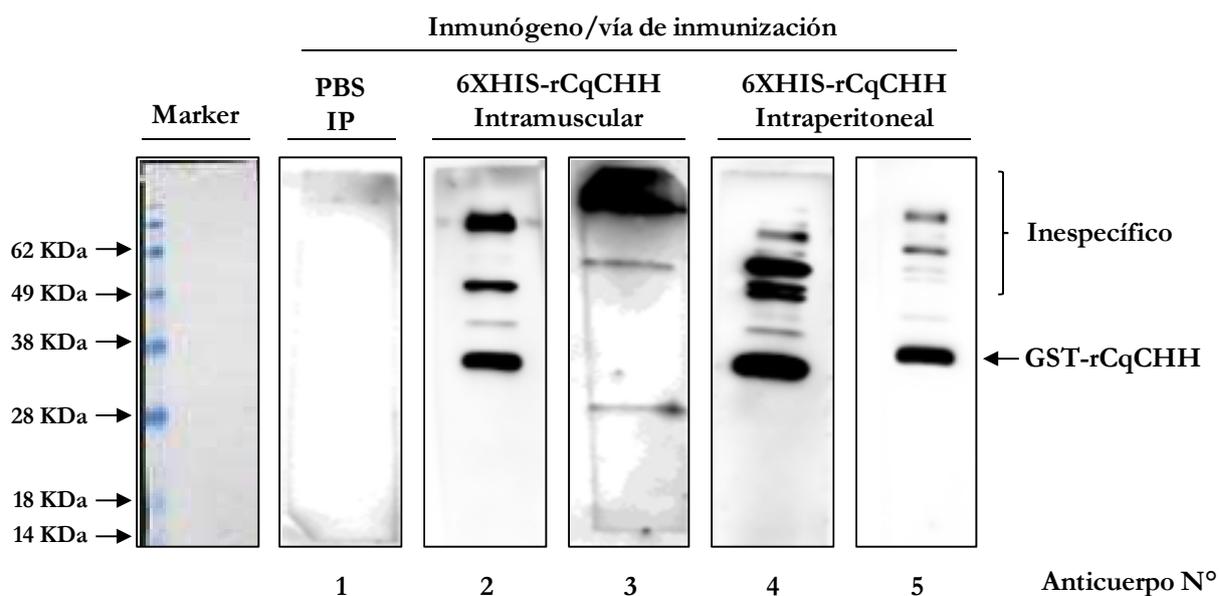


Figura 23. Confirmación de los antiseros anti-rCqCHH por Western Blot. Los antiseros obtenidos de ratones inmunizados con 6XHIS-rCqCHH fueron analizados por SDS-PAGE seguido de Western blot, utilizando para la siembra GST-rCqCHH (determinación cruzada). De esta manera, la inmunoreactividad obtenida de los antiseros corresponde sólo a CHH y no al péptido 6XHIS de la proteína de fusión 6XHIS-rCqCHH. Se muestra la determinación de dos antiseros distintos generados por inmunización intramuscular y otros dos por inmunización intraperitoneal, como así también el antisuero generado por inmunización intraperitoneal con PBS (PBS IP). La muestra de anticuerpo N° 5 fue seleccionada para ensayos posteriores debido a la alta relación “Inmunoreactividad hacia CHH versus marca inespecífica”. Marker: marcadores de peso molecular (SeeBlue®, Invitrogen).

3.I.A.a.vi. Detección de CHH en hemolinfa y en pedúnculo ocular

Como se explicó anteriormente (sección 3.I.A.a.iv.), se produjeron exitosamente anticuerpos específicos para CHH, por lo que nos propusimos, a través de la técnica de Western Blot (WB), detectar la presencia de la hormona endógena CHH en hemolinfa y en pedúnculo ocular (PO) de *C. quadricarinatus*. Para la detección de la hormona en hemolinfa, se extrajeron 500 μ l de hemolinfa de un ejemplar adulto utilizando jeringa hipodérmica con aguja 25G y rápidamente se colocó en un tubo tipo eppendorf que contenía 20 μ l de una solución de oxalato de potasio y PMSF (inhibidor de proteasas) en una relación 3:1. Posteriormente, el animal fue anestesiado colocándolo en un baño de hielo y se procedió a extirpar ambos pedúnculos oculares a partir de los cuales se preparó un extracto de pedúnculo ocular (EPO). Para obtener ese extracto, primero se colocaron los PO en una placa de petri con solución salina sobre hielo y se procedió a extraer la cutícula y las omatidias. El tejido nervioso expuesto de esta manera se colocó en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem y se

le adicionaron 100 µl de buffer de lisis (NaCl 100 mM; Tris pH 7; EDTA 1 mM; NP 40 0,5 %; TRITON 0,5 %) junto con PMSF 1mM en una relación 1:200; se homogenizó manualmente en frío con émbolo de teflón hasta la disgregación total del tejido. El homogenato resultante se trasvasó a un tubo tipo eppendorf y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C; el pellet se descartó y el sobrenadante fue guardado hasta su utilización. Tanto de la muestra de hemolinfa como del EPO se tomó una alícuota de 20 µl para realizar la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay); el volumen restante se guardó a – 80 °C hasta su posterior utilización. Una vez determinada la cantidad de proteínas en cada tipo de muestra, se tomó una alícuota de hemolinfa y una de EPO y se mezclaron en una relación 1:1 v/v con buffer de siembra Laemmli 2X, siguiendo a continuación con el protocolo ya descrito para la realización de un WB.

3.I.A.a.vii. Inmuhistoquímica

Se disecaron ambos pedúnculos oculares de ejemplares de la especie en estudio e inmediatamente se procedió a extraerles la cutícula y las omatidias. Una vez expuesto el tejido nervioso, fue fijado durante 24 horas en una solución de Bouin (75 % solución saturada de ácido pícrico, 25 % de formaldehído 36 %), en un volumen 10 veces superior al del tejido. Para que la fijación ocurra gradualmente se realizó a 4 °C. Transcurridas las 24 horas, el tejido sufrió una deshidratación por pasajes sucesivos (15 minutos cada uno) en una serie ascendente de alcoholes (70°, 90°, 95°, 100°). Posteriormente, se realizaron pasajes sucesivos de 15 minutos a alcohol / xilol (50:50), xilol y xilol / parafina (50:50). El tejido se incluyó en una mezcla de Histoplast: parafina 50:50 (Biopack®). Se realizaron cortes seriados de 7 µm de espesor (Leica) que fueron recogidos en portaobjetos HiFix NH (InProt); para la completa adhesión del corte los portaobjetos se colocaron en estufa a 50 °C durante una hora. Los cortes fueron desparafinados en xilol, hidratados por pasajes sucesivos a una serie descendente de alcoholes (100°, 95°, 90°, 70°) y se lavaron con PBS. Se bloquearon las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 0,3 % durante 15 minutos. Luego, se procedió al bloqueo inespecífico de proteínas para lo cual se utilizó una solución de leche descremada 5 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados overnight a 4 °C con el anticuerpo primario; debido a que no se conocía la dilución apropiada del anticuerpo, se probaron tres diluciones diferentes de 1:100, 1:500, 1:1.000 en PBS. Finalizada esta incubación, se realizó un lavado durante 15 minutos con PBS y los cortes fueron incubados con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón biotilado (Dako)) diluido 1:300 en PBS. Transcurrida una hora de esta segunda incubación, a temperatura ambiente, se procedió a lavar los cortes con PBS y a incubarlos con estreptoavidina-HRP diluida 1:500 en PBS, 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los

cortes fueron revelados por exposición a 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) (Dako Cytomation). Las secciones fueron deshidratadas, montadas y observadas en un microscopio óptico.

3.I.A.a.viii. **Determinación de la actividad biológica de rCqCHH**

La actividad biológica de la hormona recombinante 6XHis-CHH se determinó midiendo los niveles de glucosa en hemolinfa tras la administración de ésta, como medida indirecta de la acción de la hormona a nivel fisiológico en langostas de la especie *C. quadricarinatus*. Se utilizaron 30 langostas con un peso promedio de $24,33 \pm 1,27$ gramos. Estos animales eclosionaron y se criaron en el laboratorio bajo condiciones óptimas (estándar) de temperatura (27 ± 1 °C), salinidad (agua dulce) y fotoperíodo (14 horas luz - 10 horas oscuridad). Se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces (Tetra Color®) y *Elodea sp ad libitum*. En el ensayo sólo se utilizaron individuos que se encontraban en el estadio de intermuda.

Cinco días antes de realizar el ensayo, los animales fueron anestesiados en agua con hielo (0 °C) para la ablación de un PO, utilizando pinza y tijera de disección; transcurridas 24 horas, se procedió a la ablación del otro PO. El sitio de ablación fue cauterizado con calor, utilizando un soldador eléctrico. Al realizar la primera ablación, cada animal fue separado en un frasco de vidrio de 1,5 litros de capacidad, conteniendo 1 litro de agua dulce, recipiente en el cual se mantuvieron durante toda la fase experimental, la cual comenzó 72 horas después de la segunda ablación. El tiempo esperado permitió que los animales se recuperaran completamente de la cirugía, y además, fue un plazo suficiente que nos aseguró la ausencia de CHH peduncular en hemolinfa al momento de realizar el ensayo. Los pedúnculos oculares extraídos fueron guardados a -20 °C hasta su utilización.

El diseño experimental consistió en tres grupos de langostas sin pedúnculos (n=5 por grupo), hambreadas por 24 horas e inyectadas con:

- 50 µl de PBS estéril (vehículo de la hormona) (control negativo)
- 50 µl de extracto de pedúnculo ocular (EPO) de *C. quadricarinatus* (este volumen representa el contenido de 2 pedúnculos/animal) (control positivo)

- 50 μ l de 6XHis-CHH a tres concentraciones diferentes, de forma tal que se inyectó a cada animal una dosis de 10, 50 o 100 pmol de hormona.

Las sustancias fueron inyectadas en el seno venoso de la base del tercer par de pereiópodos, con jeringa hipodérmica y aguja 30G. Los niveles de glucosa se evaluaron a los 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección de cada tratamiento, para lo cual se extrajo de cada animal 100 μ l de hemolinfa, de la base del cuarto o quinto par de pereiópodos, con jeringa hipodérmica y aguja 27G. Adicionalmente, a un grupo de 5 langostas ablacionadas que no fueron previamente inyectadas, se les extrajo hemolinfa de forma tal de conocer los niveles basales de glucosa en condiciones estándar de temperatura y salinidad. La concentración de glucosa de cada muestra de hemolinfa se determinó a partir de alícuotas de 20 μ l utilizando un kit enzimático-colorimétrico (Wiener Lab., Argentina). La absorbancia de cada muestra se midió en espectrofotómetro a 505 nm.

El extracto de pedúnculo ocular (EPO) inyectado se preparó a partir de 20 pedúnculos que fueron extirpados de los animales que luego formaron parte de este ensayo. A cada pedúnculo se le extrajo la cutícula y las omatidias sobre una placa de petri que se mantuvo sobre una superficie con hielo. El tejido nervioso resultante de la disección se colocó en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem, se adicionaron 500 μ l de PBS y se homogenizó en frío utilizando manualmente un émbolo de teflón hasta que el tejido se disgregó por completo. El homogenato obtenido se trasvasó a un tubo tipo eppendorf y se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. A continuación, se descartó el pellet y el sobrenadante (EPO) se transfirió a otro tubo tipo eppendorf que se mantuvo en frío hasta su inyección.

3.I.A.a.xi. **Análisis estadístico de datos**

Los niveles de glucosa medidos en los diferentes grupos experimentales fueron comparados por medio de un análisis de varianzas (ANOVA) de medidas repetidas en el tiempo, utilizándose el programa Statistica (StatSoft, Inc., versión 8.0). Se comprobaron los supuestos del análisis utilizando el test de Box M (homocedacia) y el test de Mauchley (esfericidad). Debido a que la interacción entre los tratamientos y el tiempo post-inyección resultó significativa, se analizaron los efectos simples. En todos los casos, cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó un test paramétrico de comparaciones múltiples (test de Tuckey). El nivel de significación utilizado para el análisis fue del 5 % (Sokal y Rohlf, 1981).

3.I.A.b. RESULTADOS

3.I.A.b.i. Detección de CHH en hemolinfa y pedúnculo ocular por la técnica Western Blot

Con el objetivo de confirmar los resultados de RT-PCR, que indicaron una la mayor expresión de CHH en las condiciones de estrés ensayadas, nos propusimos generar herramientas para cuantificar a CHH a nivel de proteína. Para ello, se generaron anticuerpos específicos anti-CHH con el objetivo de poner a punto diferentes técnicas que nos permitan cuantificar los niveles circulantes de esta hormona en hemolinfa (ELISA) y además de ello, nos permitan la identificación y cuantificación de la hormona en distintas muestras biológicas de la especie en estudio, utilizando técnicas inmunohistoquímicas o de Western Blot (WB). Los anticuerpos se generaron mediante la inyección de la proteína recombinante 6XHis-CHH en ratones y posterior recolección del antisuero. La especificidad del anticuerpo producido fue validada con el análisis de WB que se muestra en la **Figura 23** de la sección 3.I.A.a.v., en el cual se observa que los sueros obtenidos poseen una alta especificidad contra CHH; a su vez, presentan inmunoreactividad contra proteínas inespecíficas que es algo que ocurre cuando se utilizan anticuerpos policlonales como el generado en este trabajo. Dado su alta especificidad contra CHH y sus bajos niveles de inespecificidad, el suero N° 5 fue utilizado en todos los ensayos de esta tesis que lo requirieron. Esta herramienta nos permitió detectar la hormona endógena en muestras de hemolinfa y pedúnculo ocular de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* por la técnica de WB (**Fig. 24**). En línea con el peso molecular reportado para las CHHs endógenas, el anticuerpo anti-CHH reconoce una banda de alrededor de 7 kDa, tanto en la calle donde se sembró una alícuota de hemolinfa con la mayor cantidad de proteínas, como en aquellas donde se sembraron las dos concentraciones de extracto de pedúnculo ocular (**Fig. 24**, calles 3, 4 y 5). Por otro lado, como control positivo de la técnica se sembró la proteína de fusión GST-CHH tratada con cantidades subóptimas de la enzima Trombina; esta enzima proteoliza GST-CHH en la zona de fusión de ambas proteínas (región linker), liberando CHH de GST. De esta manera, cuando se utilizan condiciones subóptimas de reacción, se obtienen como productos de reacción todas las variantes proteicas, esto es, la proteína de fusión GST-CHH, CHH sola y GST sola. Como puede observarse en la **Figura 24**, el anticuerpo generado reconoce a CHH como también a GST-CHH (calles 6 y 7) (peso molecular aparente de rCqCHH: 8 kDa, peso molecular aparente de GST-CHH: 34 kDa).

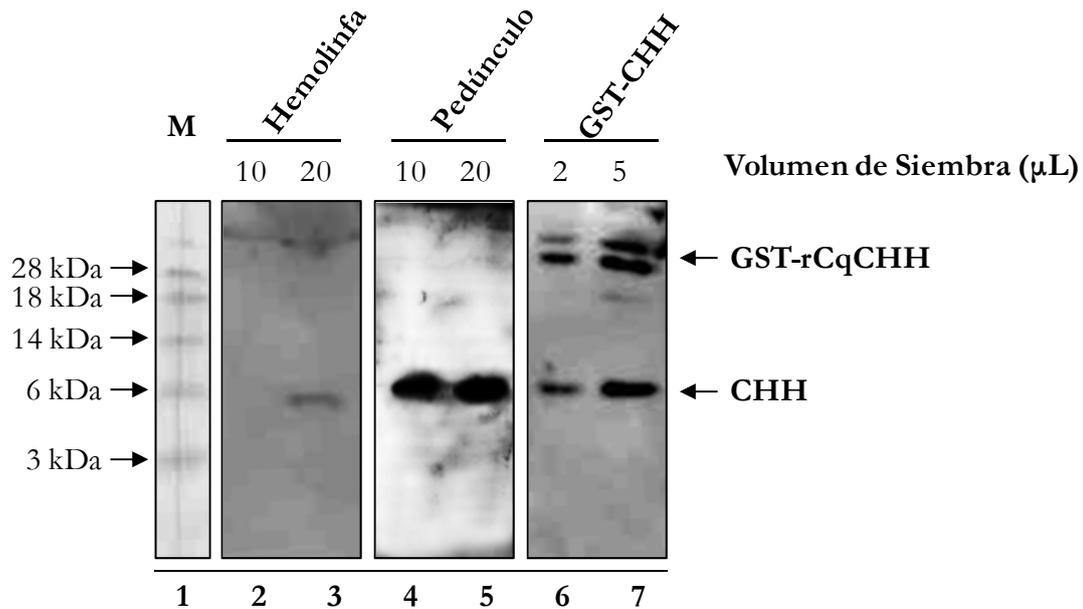


Figura 24. Análisis de Western Blot para detectar la presencia de CHH en muestras de proteínas obtenidas a partir de hemolinfa (calles 2 y 3) y extracto de pedúnculo ocular (calles 4 y 5) de *C. quadricarinatus*, utilizando anticuerpos anti-CHH. El gel empleado en este caso fue un gel TRIS-TRICINA. Como control positivo de la técnica se sembraron dos concentraciones de la proteína de fusión GST-rCqCHH tratada subóptimamente con trombina (calles 6 y 7). La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular (M) (SeeBlue®, Invitrogen).

3.I.A.b.ii. Detección inmunohistoquímica de CHH en pedúnculo ocular

Con el objetivo de detectar a CHH a nivel de proteína, neuroendocrinos de *C. quadricarinatus*, nos propusimos desarrollar un protocolo para visualizar la hormona *in situ* por medio de inmunohistoquímica. Para ello nos valimos del anticuerpo generado en ratones y utilizando secciones longitudinales de pedúnculo ocular de *C. quadricarinatus*, pudimos observar las características histológicas de este órgano (**Fig. 25A**). Anatómicamente, las neuronas del órgano X (OX) forman un cluster sobre la cara interna de la médula terminal; dichas células proyectan un nervio que, pasando a través del neuropilo de la médula terminal, finaliza en el lado opuesto en la glándula del seno (GS), a nivel de la médula interna (**Fig. 25A**). Mediante la inmunotinción con el anticuerpo anti-CHH, observamos neuronas inmunoreactivas a CHH tanto en el OX como en la GS. Por otro lado, al realizar una magnificación de la región del OX, se pudo observar la marca en la pericaria de las neuronas (**Fig. 25B**). Finalmente, en el citoplasma de las células que presentaron inmunoreactividad positiva para CHH, se pudieron observar pequeñas vesículas distribuidas sin un patrón determinado (datos no mostrados).

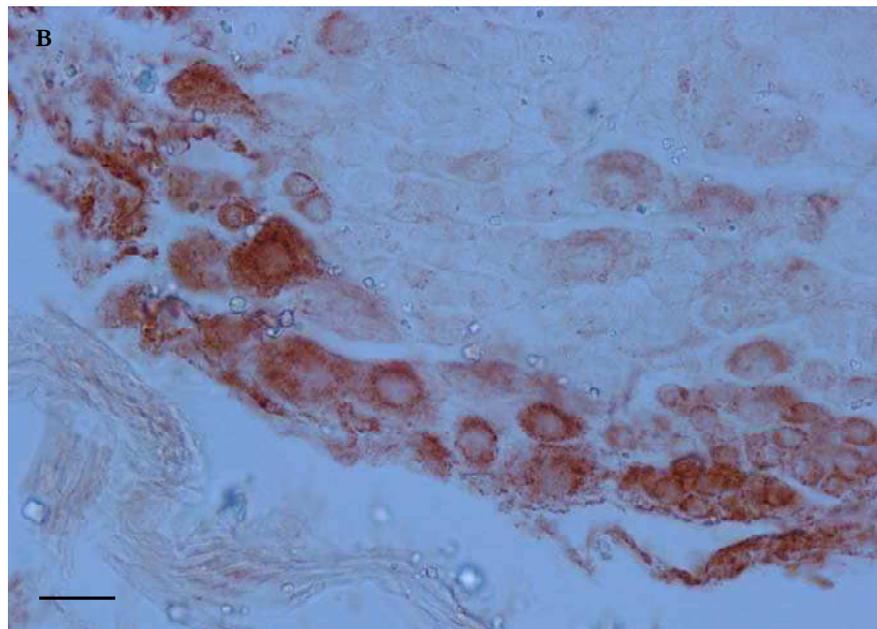
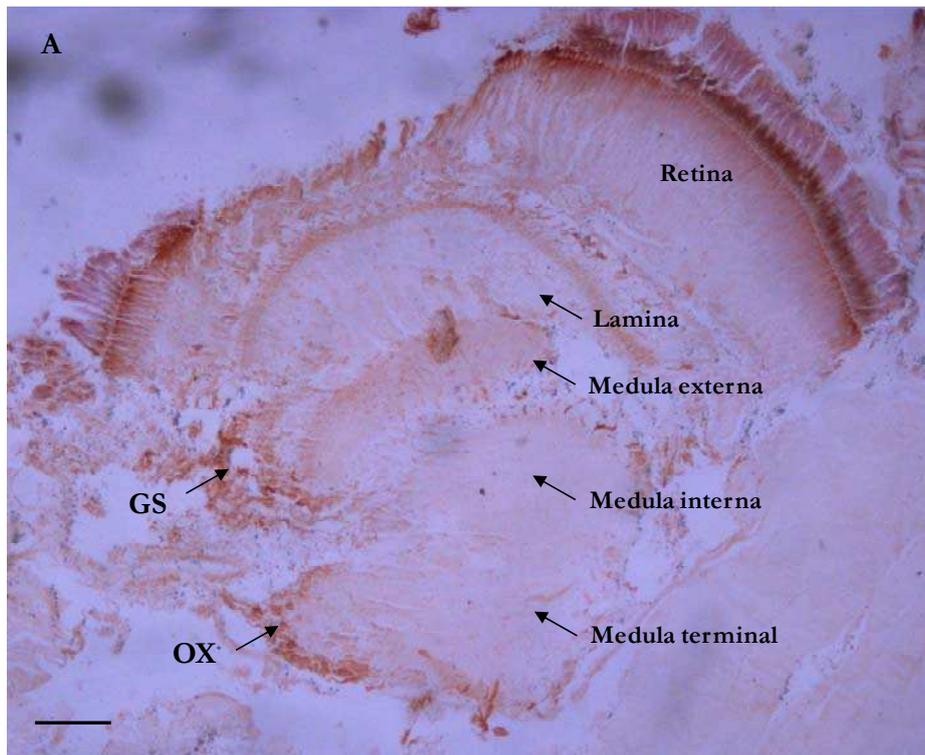


Figura 25. Corte longitudinal de pedúnculo ocular de *C. quadricarinatus*. **A.** Vista topográfica de un corte en el cual se puede observar la retina y las diferentes médulas que componen el tejido nervioso en el pedúnculo ocular, como así también las células inmunoreactivas al anticuerpo anti-CHH del complejo órgano X (OX) – glándula del seno (GS). **B.** Amplificación de la región correspondiente al OX, dónde puede observarse la pericaria inmunopositiva. Barra de escala: **A.** 280 μm ; **B.** 30 μm .

3.I.A.b.iii. Ensayo de actividad biológica de rCqCHH

El objetivo principal de este ensayo fue estudiar si la hormona recombinante de *C. quadricarinatus* rCqCHH, la cual fue producida en el laboratorio por medio de bacterias, posee la misma actividad biológica reportada (o similar) para la hormona endógena. Para ello, se realizó un ensayo dosis respuesta, que permitió evaluar cómo las diferentes dosis de la hormona recombinante afectaban los niveles de glucosa en hemolinfa (**Fig. 26**). A partir de animales juveniles ablacionados, que no recibieron ninguno de los tratamientos, se determinó el nivel basal de glucosa en hemolinfa, el cual fue de $6,67 \pm 0,44$ mg/100ml. La administración de rCqCHH generó un incremento significativo ($p < 0,05$) respecto del grupo control inyectado con PBS; a su vez, los niveles de glucosa alcanzados a la media hora post-inyección se mantuvieron relativamente constantes hasta las dos horas. El incremento de la glucemia hemolinfática fue aproximadamente del 100 %, alcanzando valores de $15 \pm 0,36$ mg/100ml. Al comparar entre las diferentes dosis de hormona recombinante inyectada (10, 50 y 100 pmol), observamos que todas evocaron una respuesta similar, no encontrando diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las dosis (**Fig. 26**), lo cual estaría indicando ausencia de un efecto dependiente de la dosis inyectada. Sin embargo, se observó que los animales inyectados con la dosis de 50 pmol alcanzaron un mayor nivel de glucosa en hemolinfa a las 2 horas post-inyección, que fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del alcanzado por los mismos animales en los otros dos tiempos de medición. Es decir, para esta dosis hay un efecto del tiempo de inyección, algo que no ocurrió para las otras dosis probadas. Por otro lado, la inyección de las langostas con dos equivalentes de extracto de pedúnculo ocular (EPO), indujo un incremento significativo ($p < 0,05$) de glucosa que alcanzó un máximo de $37,89 \pm 1,09$ mg/100ml a las dos horas de ser inyectados. A diferencia del efecto de la hormona recombinante, el aumento en la glucemia por inyección de EPO fue gradual acorde aumento el tiempo post-administración; además, los niveles de glucosa alcanzados fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) en cada tiempo post-inyección, tanto respecto al grupo control como a los tres grupos de animales inyectados con la hormona recombinante. Por último, también se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos post-inyección, siendo mayor la glucemia una hora y dos horas después de inyectado el EPO que la medida a los 30 minutos. El hecho que la hormona producida en bacterias produzca los mismos efectos que la administración de extractos de pedúnculo ocular nos permite concluir que rCqCHH posee una actividad biológica similar, aunque un tanto menor a la CHH endógena.

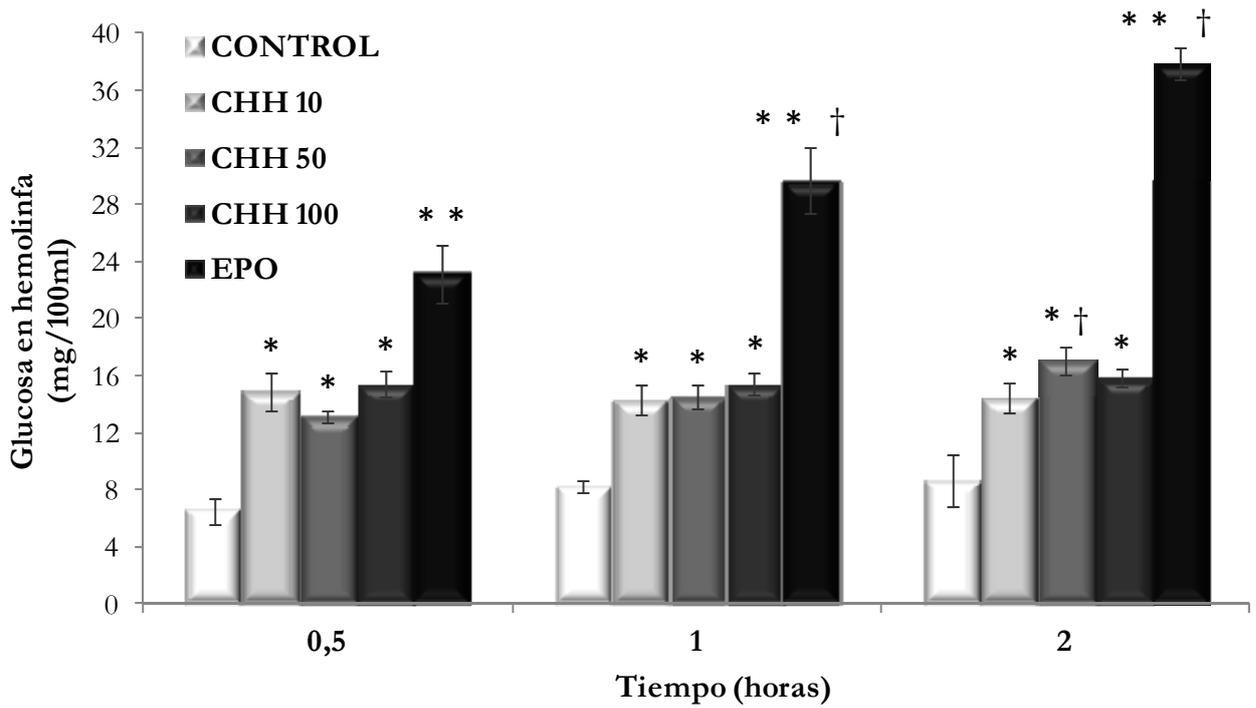


Figura 26. Dinámica temporal de los niveles de glucosa en hemolinfa de juveniles ablacionados de *C. quadricarinatus* inyectados con CHH recombinante (rCqCHH) o extracto de pedúnculo ocular. Comparación de la concentración de glucosa en hemolinfa luego de la inyección de 10, 50 ó 100 pmol de CHH recombinante o de 2 equivalentes de pedúnculo ocular (EPO, control positivo). El control negativo corresponde al grupo inyectado con PBS. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El * representa las diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control para un mismo tiempo. Los ** corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) del grupo EPO con los otros tratamientos, incluyendo el control, para un determinado tiempo post-inyección. La † representa las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos post-inyección, para un mismo tratamiento.

3.I.B. Administración de rCqCHH a animales aclimatados a distintas combinaciones de temperatura y salinidad

3.I.B.a. MATERIALES y MÉTODOS

Se utilizaron juveniles con un peso promedio de $5,45 \pm 0,15$ gramos. Estos animales eclosionaron en el laboratorio y fueron criados bajo condiciones óptimas (estándar) de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (agua dulce) y fotoperíodo (14 horas luz - 10 horas oscuridad). Se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces (Tetra Color®) y Elodea *sp ad libitum* hasta alcanzar la talla deseada. Al comienzo del ensayo, cada animal se colocó individualmente en un frasco de vidrio de 1,5 litros de capacidad con 1 litro de agua corriente de red de clorada (dureza: 80 mg/L, como equivalentes de CaCO_3) y filtrada a través de filtros de resina de intercambio iónico, de carbón activado y de fibra sintética (Hidroquil). Se asignaron al azar un total de 8 animales a cada uno de los siguientes grupos experimentales:

Temperatura de aclimatación 20 °C

Grupo 1: inyección de vehículo para rCqCHH, agua dulce de red

Grupo 2: inyección de vehículo para rCqCHH, agua salina a 10 g/L

Grupo 3: inyección de rCqCHH, agua dulce de red

Grupo 4: inyección de rCqCHH, agua salina a 10 g/L

Como se puede observar, el ensayo consistió en la exposición de los animales a una temperatura de 20 °C y a dos tratamientos: vehículo (inyección de PBS) y rCqCHH (inyección de la hormona recombinante 6XHis-CHH); a su vez, dentro de cada tratamiento se ensayaron dos salinidades diferentes, agua dulce y 10 g/L. La temperatura y salinidades ensayadas fueron determinadas en base a los resultados del ensayo de aclimatación a condiciones de estrés térmico y salino, desarrollado en el capítulo I, quedando definidos los grupos experimentales mencionados arriba.

Las langostas se expusieron gradualmente a las condiciones ensayadas, de forma de lograr una adecuada aclimatación a estas. Para lograr la aclimatación a baja temperatura se colocaron los animales en una incubadora y se fue disminuyendo la temperatura a una tasa de $0,5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{día}$,

mientras que el pasaje de agua dulce a la salinidad correspondiente (10 g/L) se realizó a una tasa de 1 g/L/día. Para obtener la salinidad deseada, se adicionó sal artificial para agua de mar (Marine Mix HW, Alemania) al agua corriente de red. Una vez alcanzados los niveles deseados de aclimatación térmica y salina (20 °C y 10 g/L, respectivamente), los animales se mantuvieron expuestos a tales condiciones durante un período mínimo de 30 días. Durante este período, los animales se alimentaron tres veces por semana con alimento balanceado para peces (Tetra Color®) y *Elodea* *sp ad libitum*, siendo recambiada el agua de los frascos una vez a la semana. Diariamente, se controló la salinidad (Sper Scientific, $\pm 0,5$ g/L), el pH (Tracer pocketester, $\pm 0,01$ unidades) y la temperatura (± 1 °C) del agua en todos los frascos. En caso de ser necesario, el pH se corrigió adicionando NaCl 1N o HCl 1N de forma de mantener el valor en 7,5 unidades. Además, diariamente también se registraron la mortalidad para poder estimar la sobrevida y los eventos de muda.

Las inyecciones consistieron en la administración de un volumen de 50 μ l, ya sea del vehículo (PBS) como de la hormona recombinante, en el tercer par de pereiópodos. La dosis de hormona inyectada se determinó en base a los resultados obtenidos en el ensayo de actividad biológica de la hormona recombinante rCqCHH, utilizando en consecuencia como dosis más adecuada la de 50 pmol.

Los animales fueron inyectados dos veces por semana. La franja horaria en la que se inyectó a los animales (9–10 am) se encuentra alejada del pico diario de la hormona endógena, el cual se presenta naturalmente en las langostas al comienzo de la ecotofase (Kallen *et al.*, 1990; Georgels-Kallen y Vooter, 1985).

Al término del ensayo, al igual que se explicó en el Capítulo I, a cada animal se le midió el consumo de oxígeno, su peso fresco, se le extrajo hemolinfa y posteriormente, previa anestesia en agua con hielo (0 °C) se lo sacrificó y se disecaron hepatopáncreas y músculo abdominal. Las variables determinadas a partir de las diferentes muestras obtenidas fueron: *Concentración de sodio y de potasio hemolinfáticos, niveles de aminoácidos libres en hemolinfa y en músculo abdominal, niveles de glucógeno en hepatopáncreas y músculo abdominal, niveles de glucosa en hemolinfa*. Los protocolos utilizados para las determinaciones de las variables mencionadas se detallaron oportunamente en el Capítulo I.

3.I.B.a.i. **Análisis estadístico de datos**

Se analizó la sobrevida utilizando el Test de Fisher, mientras que para el resto de las variables mencionadas, los grupos experimentales se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (salinidad y tratamiento) utilizando el programa Statistica (StatSoft, Inc., versión 8.0). Se comprobaron los supuestos del ANOVA utilizando los test de Levene (homocedacia) y Kolmogorov-Smirnov (normalidad). Cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó un test paramétrico de comparaciones múltiples (Test de Tuckey). El nivel de significancia del análisis fue del 5 % (Sokal y Rohlf, 1981).

3.I.B.b. RESULTADOS

Habiendo demostrado actividad biológica por parte de rCqCHH, nos propusimos estudiar la participación directa de CHH en la respuesta al estrés térmico y salino. Para ello, langostas juveniles de *C. quadricarinatus*, las cuales previamente habían sido aclimatadas a condiciones estresantes de temperatura y salinidad, fueron inyectadas con rCqCHH para determinar, a posteriori, una serie de parámetros fisiológicos asociados con la respuesta adaptativa de los animales al estrés.

Considerando que la disminución de la temperatura provocó alteraciones en la mayoría de los parámetros fisiológicos analizados en el Capítulo I, decidimos realizar los ensayos aclimatando los animales sólo a 20 °C; siguiendo el mismo criterio, decidimos utilizar sólo la mayor salinidad ensayada previamente. Al finalizar el ensayo, se analizó la sobrevida en los diferentes grupos experimentales, no encontrando diferencias significativas ($p > 0,05$) en este parámetro al comparar entre tratamientos (inyectados con vehículo vs. inyectados con rCqCHH) o entre salinidades (agua dulce vs. 10 g/L) para un mismo tratamiento. En los dos grupos expuestos a 10 g/L no se registraron animales muertos, mientras que en los grupos mantenidos en agua dulce, sobrevivieron 7 juveniles inyectados con rCqCHH y 6 juveniles inyectados con PBS. Estos resultados indican que la administración de la hormona recombinante producida en el laboratorio, no es tóxica para la especie en estudio, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.

En lo que se refiere a la ganancia en peso de los animales, al finalizar el ensayo obtuvimos resultados muy interesantes; los dos grupos inyectados con la hormona recombinante tuvieron una ganancia en peso sensiblemente superior (cerca al 200 %) a la registrada en los grupos inyectados con vehículo. Además, en ambas series experimentales, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre salinidades; por otro lado, al comparar entre tratamientos (vehículo y rCqCHH) se observaron diferencias significativas sólo entre los grupos expuestos a una salinidad de 10 g/L (**Fig. 27**).

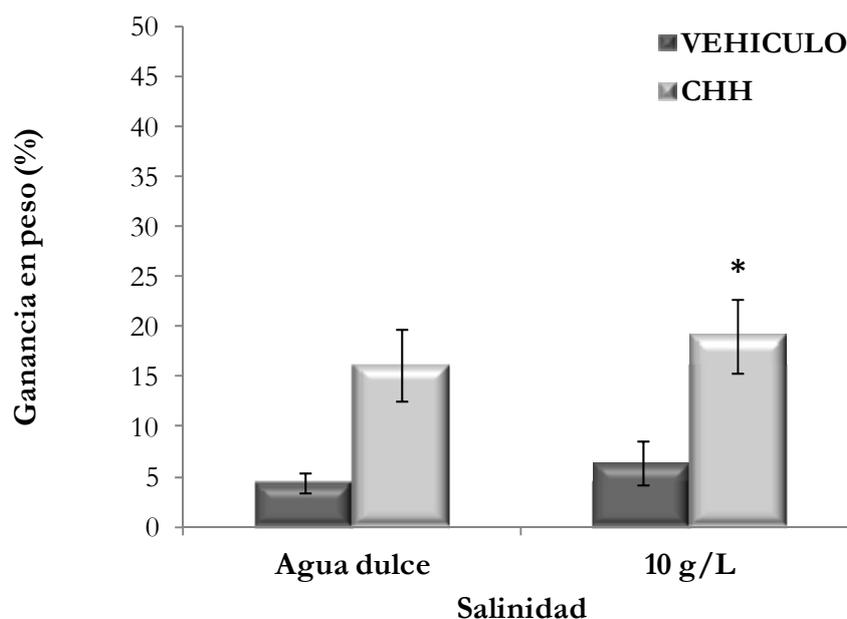


Figura 27. Efecto de la administración de CHH recombinante, a diferentes salinidades, sobre la ganancia en peso de juveniles de *C. quadricarinatus* al final del ensayo. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar. El asterisco representa las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos (vehículo y rCqCHH), para cada salinidad.

Para analizar si la administración de CHH recombinante afecta los requerimientos energéticos de la especie bajo condiciones de estrés térmico y salino, se midió el consumo de oxígeno por gramo de animal como método indirecto de estimación de la tasa metabólica específica. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los animales inyectados con vehículo y rCqCHH, en ninguna de las salinidades ensayadas, indicando una ausencia de efecto de la hormona recombinante sobre la variable analizada. Solo pudo observarse una leve tendencia al aumento del consumo de oxígeno en ambos grupos inyectados y expuestos a la salinidad de 10 g/L, en comparación con los grupos en agua dulce (**Tabla 3**), es decir, independientemente de lo inyectado, la exposición a una elevada salinidad parece modificar el consumo de oxígeno expresado por gramo de animal.

Tratamiento	Salinidad (g/L)	Peso Inicial	Peso Final	TM ($\mu\text{gO}_2/\text{min/g}$)	N final
VEHICULO	0	5,54 \pm 0,28	5,78 \pm 0,53	1,91 \pm 0,16	6
VEHICULO	10	5,56 \pm 0,30	5,91 \pm 0,40	2,44 \pm 0,23	8
rCqCHH	0	5,38 \pm 0,32	6,25 \pm 0,26	1,57 \pm 0,11	7
rCqCHH	10	5,34 \pm 0,33	6,35 \pm 0,39	2,27 \pm 0,18	8

Tabla 3. Tasa metabólica específica (TM) estimada por el consumo de oxígeno de juveniles de *C. quadricarinatus* al final del ensayo de administración de rCqCHH. También se indican los pesos inicial y final en cada grupo experimental, así como el número de ejemplares que completaron el ensayo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

Sabiendo que uno de los efectos que produce la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos es el aumento de la glucemia hemolinfática, se decidió estudiar si la inyección de rCqCHH era capaz de alterar los niveles de glucosa en hemolinfa de animales expuestos a estrés térmico y/o salino. Como se puede observar en la **Figura 28**, los juveniles inyectados con rCqCHH mostraron mayores niveles de glucosa en hemolinfa que sus pares inyectados con vehículo en ambas salinidades ensayadas; en el caso de los grupos en agua dulce, la glucemia se incrementó un 80 %, en tanto que en los expuestos a 10 g/L ese incremento fue sólo del 40 %; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las salinidades ensayadas ($p > 0,05$, **Fig. 28**). Al comparar entre salinidades, los juveniles expuestos a 10 g/L poseían concentraciones de glucosa en hemolinfa significativamente superiores ($p < 0,05$) que los juveniles mantenidos en agua dulce, hayan sido inyectados con vehículo como con la hormona recombinante (**Fig. 28**).

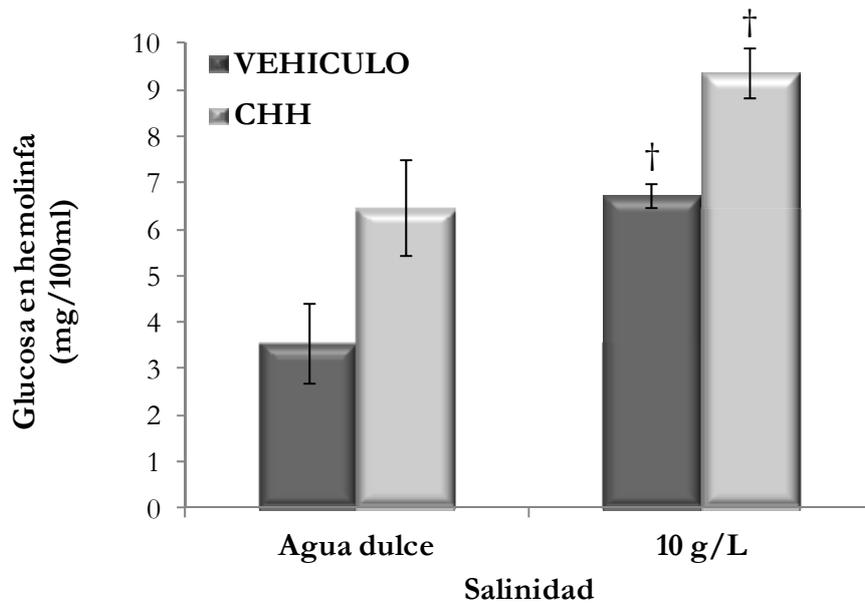


Figura 28. Nivel de glucosa en hemolinfa de juveniles de *C. quadricarinatus* luego de la administración de CHH recombinante bajo condiciones de estrés térmico y salino. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Las cruces indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre salinidades, para cada tratamiento.

Por otro lado, para establecer si existe alguna relación entre los niveles de glucosa en hemolinfa y el metabolismo del glucógeno, se analizaron los niveles de glucógeno tanto en hepatopáncreas como en músculo abdominal. En hepatopáncreas, al comparar los niveles de glucógeno entre los tratamientos, se encontró que los grupos inyectados con rCqCHH alcanzaron concentraciones más bajas que los grupos que recibieron inyección de vehículo, aunque dicha diferencia sólo fue significativa a 10 g/L ($p < 0,05$, **Fig. 29A**). Al comparar entre salinidades para cada tratamiento, sólo se observó que las langostas inyectadas con vehículo y expuestas a 10 g/L poseían niveles de glucógeno significativamente ($p < 0,05$) superiores a las mantenidas en agua dulce; los animales inyectados con rCqCHH alcanzaron niveles más bajos de glucógeno que no se diferenciaron significativamente ($p > 0,05$) entre las salinidades ensayadas.

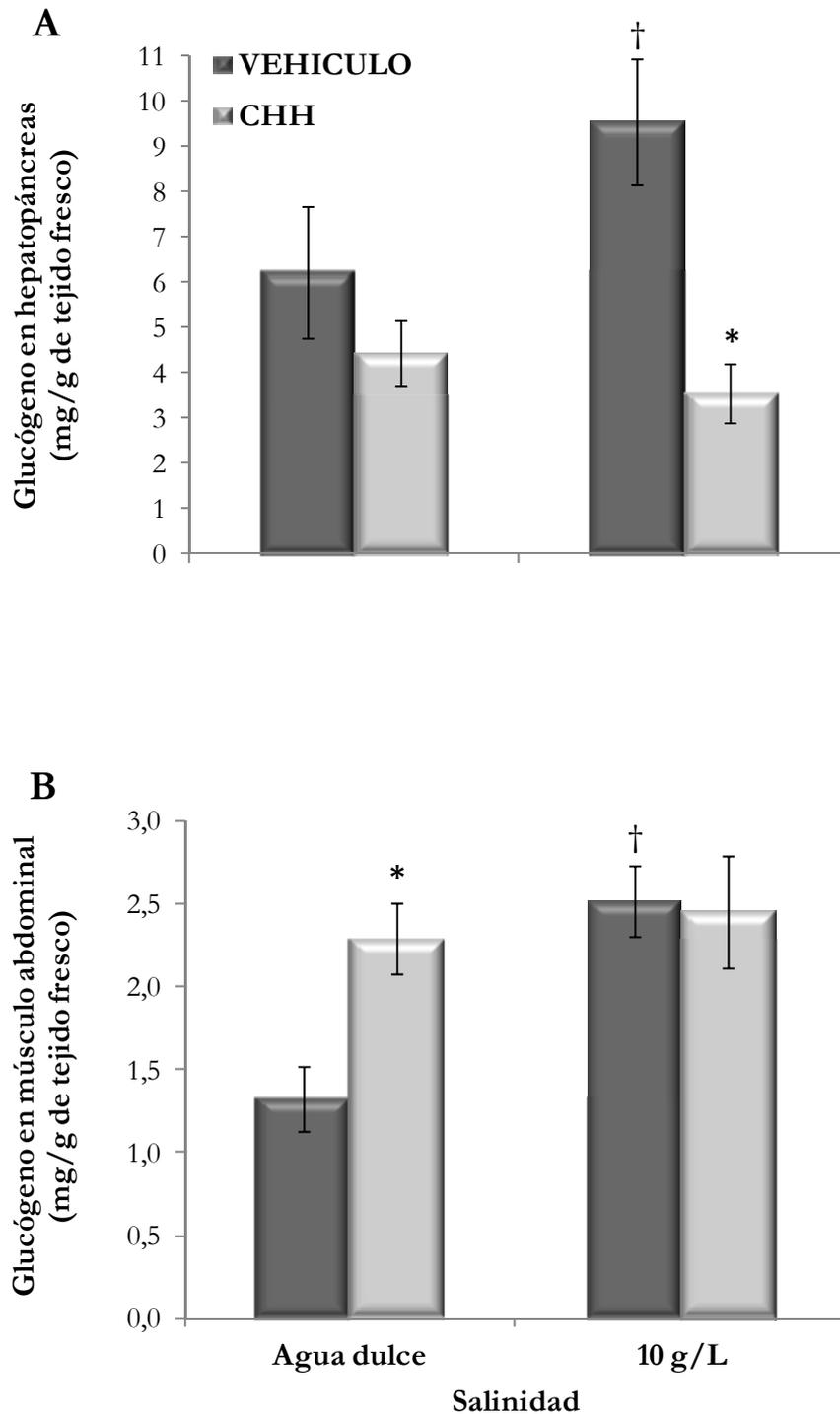


Figura 29. Niveles de glucógeno en juveniles de *C. quadricarinatus* luego de la administración de rCqCHH bajo condiciones de estrés térmico y salino. **A)** Hepatopáncreas, **B)** Músculo abdominal. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco representa las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las series experimentales (inyección), para cada salinidad. La cruz corresponde a las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre salinidades, para cada serie experimental.

Al determinar los valores de las reservas de glucógeno en músculo abdominal, se encontraron diferencias entre los tratamientos para los grupos aclimatados a agua dulce; las langostas inyectadas con la hormona recombinante alcanzaron concentraciones de glucógeno significativamente ($p < 0,05$) más altas que las langostas que recibieron vehículo. El nivel de glucógeno fue un 70 % mayor en estos animales. Al comparar entre salinidades, se observó que entre los juveniles inyectados con vehículo, los aclimatados a 10 g/L llegaron a niveles de glucógeno un 90 % más altos que aquellos aclimatados en agua dulce, siendo este incremento significativo ($p < 0,05$, **Fig 29B**). Por otro lado, es interesante destacar que en todos los grupos los niveles de glucógeno determinados en músculo abdominal fueron inferiores a los medidos en hepatopáncreas.

Con el fin de evaluar el efecto de CHH sobre el proceso de osmorregulación, se determinaron los niveles de sodio y potasio en hemolinfa luego de transcurridos los 30 días del ensayo. Al determinar los niveles del ión sodio, encontramos que las langostas expuestas a 10 g/L presentaron mayores niveles que las aclimatadas en agua dulce, tanto las inyectadas con PBS como las inyectadas con rCqCHH. En los animales inyectados con la hormona, el incremento en el nivel de sodio fue de un 30 %, mientras que en los inyectados con vehículo fue del 50 %; en este último caso encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$, **Fig. 30A**). Por otro lado, se pudo observar que los grupos inyectados con rCqCHH alcanzaron siempre niveles de sodio menores que los juveniles inyectados con PBS, pero sólo se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aquellos grupos expuestos a 10 g/L. Con respecto a la concentración de potasio en hemolinfa, se observó un comportamiento similar al descrito arriba para el sodio. Las langostas inyectadas con la hormona recombinante mostraron bajos niveles de potasio en comparación con las inyectadas con PBS, siendo significativa esta diferencia entre los grupos aclimatados a 10 g/L ($p < 0,05$, **Fig. 30B**). Nuevamente, si comparamos el nivel de potasio entre ambas salinidades ensayadas, encontramos que los animales expuestos a la mayor salinidad poseían niveles de potasio superiores a los animales en agua dulce, pero solo surgieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos inyectados con vehículo.

Finalmente, se determinaron los niveles de aminoácidos libres (FAA) en hemolinfa y en músculo abdominal, para evaluar su posible participación en la regulación osmótica intracelular. En hemolinfa, se observó que la concentración de FAA se mantuvo relativamente constante en los diferentes grupos, no encontrando diferencias significativas entre tratamientos (vehículo o CHH) ni entre las salinidades de un mismo tratamiento ($p > 0,05$, **Fig. 31A**). El nivel de FAA medido en la

hemolinfa de juveniles de *C. quadricarinatus* fue de 1,70 a 2,15 μ moles/g de tejido. Por el contrario, al determinar los FAA en músculo abdominal encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las salinidades ensayadas, para ambos tratamientos; los animales expuestos a 10 g/L poseían concentraciones de aminoácidos libres superiores a las determinadas en los animales en agua dulce. Y a su vez, las langostas inyectadas con CHH recombinante alcanzaron valores de FAA mayores que las inyectadas con vehículo, detectando diferencias significativas solamente entre los grupos expuestos a 10 g/L ($p < 0,05$, **Fig. 31B**).

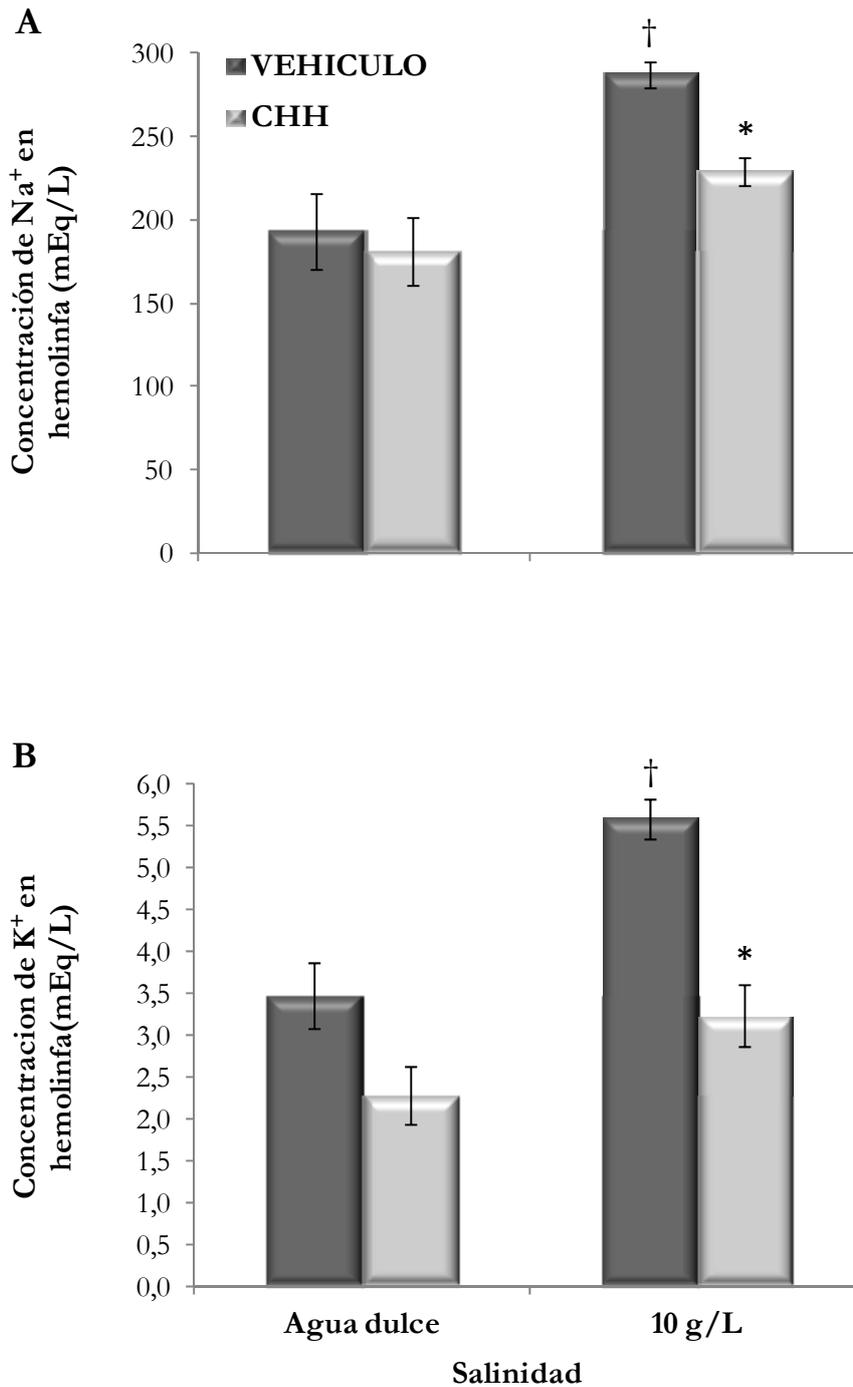


Figura 30. Concentración de iones en hemolinfa de juveniles de *C. quadricarinatus* luego de la administración de CHH recombinante, bajo condiciones de estrés térmico y salino. **A)** sodio (Na⁺), **B)** potasio (K⁺). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco representa las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre series experimentales (inyección), para cada salinidad. La cruz corresponde a las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre salinidades, para cada serie experimental.

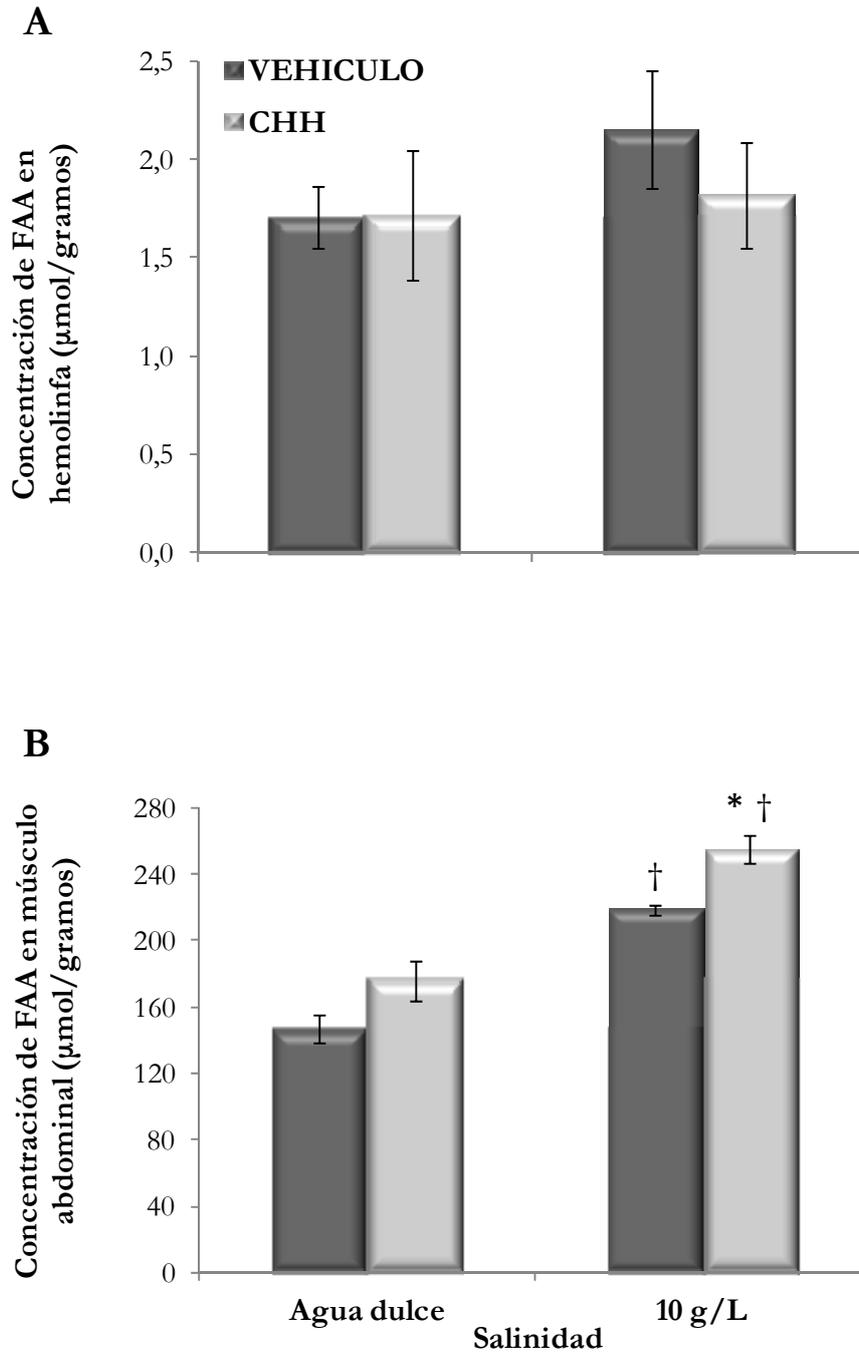


Figura 31. Niveles de aminoácidos libres (FAA) en juveniles de *C. quadricarinatus* luego de la administración de CHH recombinante bajo condiciones de estrés térmico y salino. **A)** hemolinfa, **B)** músculo abdominal. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco representa las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las series experimentales (inyección), para cada una de las salinidades ensayadas. La cruz indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre salinidades, para cada serie experimental.

3.I.C. Evaluación del tipo de efecto de rCqCHH sobre órganos blanco, ensayos *in vitro*

3.I.C.a. MATERIALES y MÉTODOS

En este ensayo se evaluó, indirectamente a través de la incorporación de leucina ^3H , el posible efecto de la CHH recombinante sobre el metabolismo del hepatopáncreas y del músculo abdominal.

Se utilizaron 10 juveniles con un peso promedio de $4,68 \pm 0,06$ gramos. Se trataron de animales eclosionados y criados en el laboratorio, bajo condiciones óptimas (estándar) de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (agua dulce) y fotoperíodo (14 horas luz - 10 horas oscuridad). Se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces (Tetra Color®) y *Elodea sp ad libitum* hasta alcanzar la talla deseada. Una vez que adquirieron el peso requerido para el ensayo, las langostas fueron colocadas en un baño de hielo durante cinco minutos para ser anestesiadas. Posteriormente, se procedió a la disección de los pedúnculos oculares, el hepatopáncreas y el músculo abdominal. Los pedúnculos se guardaron a -20°C hasta su utilización, en tanto que el hepatopáncreas y el músculo abdominal se dividieron en seis trozos de peso semejante, colocando cada uno de los trozos en un pocillo de una placa well constituida por 12 pocillos. En cada pocillo se agregó previamente un volumen de 2 ml de medio de incubación M199 (Sigma), suficiente para cubrir el explanto. De esta forma, en una placa well se colocaron los 6 trozos de hepatopáncreas y 6 de músculo abdominal disecados de un animal.

El ensayo *in vitro* consistió en dos series experimentales: una a cuyo medio de incubación se adicionó **D-glucosa** (se agregó una alícuota de 150 μl de forma tal que la concentración en el pocillo fuera 40 mg/100 ml, concentración similar a la determinada en situaciones de estrés en el Capítulo I) y otra **control**, en cuyo medio de incubación se adicionaron 150 μl de PBS. A su vez, en cada serie se evaluó el efecto de CHH recombinante, ya sea adicionando una alícuota de la hormona o una alícuota de EPO; el control en cada serie recibió una alícuota similar de PBS (ver el diseño experimental en la **Fig. 32**). El volumen de rCqCHH en cada pocillo fue de 50 μl , siendo la concentración final a la que se expusieron los tejidos de 16 pmol/ml. La concentración de hormona utilizada se estimó en base a los niveles de CHH endógena determinados en hemolinfa, bajo situaciones de estrés, en trabajos previos. En cuanto al extracto de pedúnculo (EPO), los pocillos

correspondientes, según el diseño experimental, recibieron 25 μ l de EPO (dosis equivalente al contenido de medio pedúnculo ocular). El extracto se obtuvo a partir del procesamiento de los pedúnculos oculares extirpados a juveniles, aplicando la misma técnica descrita en el presente capítulo.

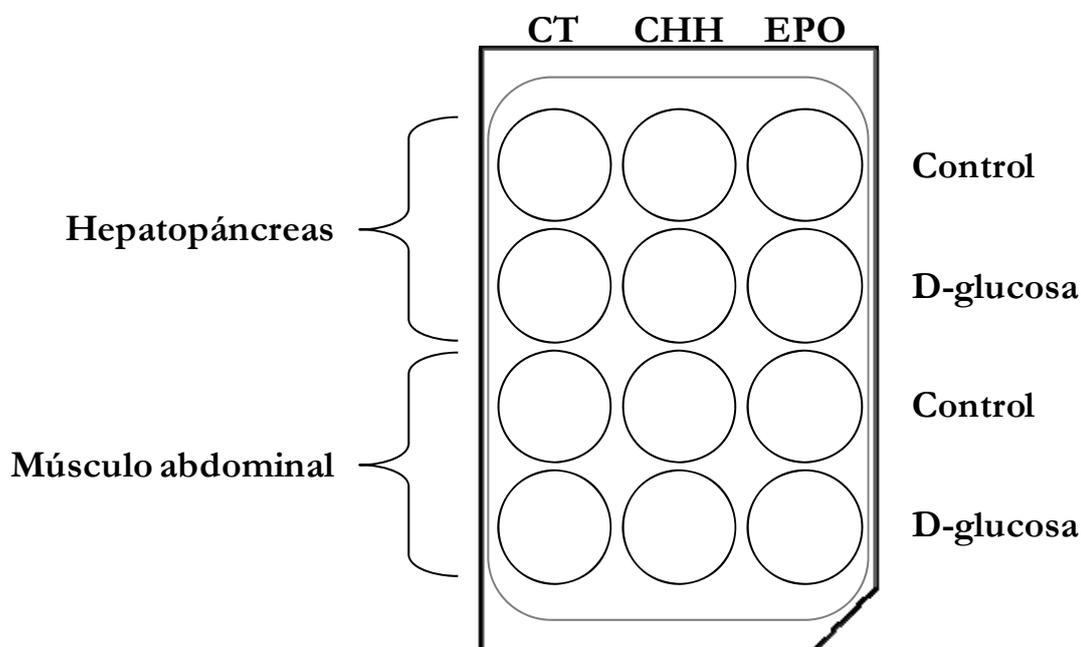


Figura 32. Esquema del diseño experimental del ensayo *in vitro*, ejemplificando la distribución, en los 12 pocillos de la placa well, de las diferentes condiciones ensayadas. CT: control hormonal, incorporación de una alícuota de PBS; CHH: incorporación de una alícuota de hormona recombinante; EPO: incorporación de una alícuota de extracto de pedúnculo ocular.

Una vez preparadas todas las placas well, con los trozos de ambos órganos y la alícuota del tratamiento correspondiente, se adicionaron 30 μ l de leucina tritiada en cada pocillo (la actividad resultante en el pocillo fue de 3 μ Ci/ml). A continuación, las placas se mantuvieron durante seis horas en una estufa de cultivo con atmósfera controlada de CO₂ al 5 % a 28 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, los trozos de cada tejido se homogenizaron individualmente en un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón, tipo Potter-Elvehjem, en 2 ml de TCA (ácido tricloroacético) 10 % frío, en baño de hielo. El homogenato obtenido se colocó

en tubos tipo eppendorf que fueron centrifugados a 5.000 x g durante 10 minutos a 4 °C; el sobrenadante resultante se descartó y el pellet se resuspendió en 2 ml de TCA 10 % frío, repitiéndose el lavado una vez más. Posteriormente, el contenido de cada tubo tipo eppendorf se vertió en un portafiltro conectado a una trompa de vacío, conteniendo una membrana de nitrocelulosa (filtro tipo millipore) de 0,22 µm de porosidad y 25 mm de diámetro, en la cual quedan retenidas las proteínas precipitables por ácido. A continuación, cada filtro se colocó en un tubo tipo vial donde se dejó reposar durante 30 minutos hasta secado; luego, se agregaron en cada vial 2 ml de solución centelladora, permaneciendo en esas condiciones durante 16 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se midió en un contador de centelleo el tritio incorporado a las proteínas sintetizadas *de novo*, como cuentas por minuto (CPM) en cada vial. Los datos se expresaron como CPM/gramo de tejido.

3.I.C.a.i Análisis estadístico de datos

La incorporación de leucina ³H (CPM/gramo de tejido), en los diferentes grupos experimentales, se compararon mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de medidas repetidas (en el espacio), utilizándose el programa Statistica (StatSoft Inc., versión 8.0). Se comprobaron los supuestos del análisis utilizando el test de Box M (homocedacia) y el test de Mauchly (esfericidad). En todos los casos, cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó un test paramétrico de comparaciones múltiples (test de Tuckey). El nivel de significancia utilizado en el análisis fue del 5 % (Sokal y Rohlf, 1981).

3.I.C.b. RESULTADOS

La realización del ensayo *in vitro* tuvo como propósito analizar, al menos de manera indirecta, como afecta CHH el metabolismo celular en el hepatopáncreas y en el músculo abdominal. Para ello, determinamos la incorporación de leucina ^3H a las proteínas sintetizadas *de novo* en esos tejidos. En el hepatopáncreas se pudo observar que, entre tratamientos (PBS, rCqCHH y EPO), los explantos incubados con rCqCHH mostraron una menor incorporación de leucina tritiada con respecto a los incubados con PBS y EPO; esta diferencia se observó en ambas series experimentales (medio de incubación con o sin D-glucosa). Sin embargo, la disminución observada en los explantos incubados con rCqCHH sólo fue significativa ($p < 0,05$) en la serie experimental donde se incorporó D-glucosa. Por otro lado, entre series experimentales no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$; **Fig. 33A**). Al analizar la incorporación de leucina ^3H en músculo abdominal, se encontró que en todos los tratamientos la incorporación fue mayor en la serie control (sin D-glucosa), aunque no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Al comparar entre tratamientos dentro de una misma serie experimental, se observó que en la serie control el grupo incubado con PBS incorporó un 15 % más de leucina ^3H que los grupos incubados con rCqCHH y EPO; sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$). Y con respecto a la serie experimental con D-glucosa, los niveles de incorporación de leucina ^3H fueron similares en los tres tratamientos (**Fig. 33B**).

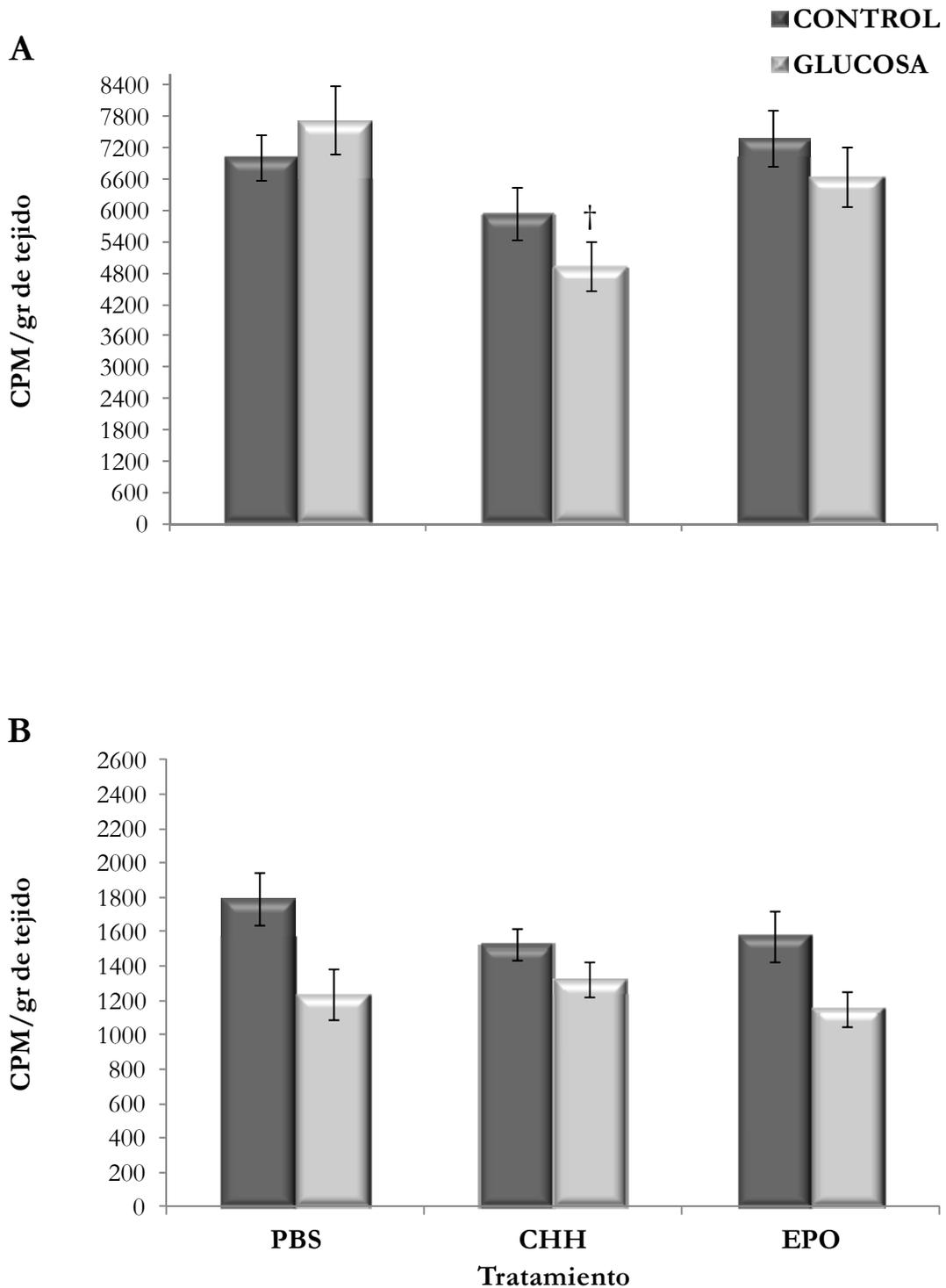


Figura 33. Incorporación de leucina ^3H (en CPM/gramo de tejido) como medida indirecta del metabolismo celular en explantos de **A.** Hepatopáncreas, **B.** Músculo abdominal. El ensayo consistió en dos series experimentales (CONTROL y GLUCOSA), evaluándose en cada serie el efecto de diferentes tratamientos (PBS como control, rCqCHH y extracto de pedúnculo ocular (EPO)). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. La cruz indica las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, dentro de una serie experimental.

3.II. DISCUSION

3.II.A. Obtención de CHH recombinante de *C. quadricarinatus* y generación de anticuerpos anti-rCqCHH

La Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) es una hormona que cumple roles importantes tanto a lo largo del desarrollo como durante todo el ciclo de vida del animal. Su función principal está relacionada con el metabolismo de carbohidratos, pero también se ha demostrado que cumple un papel muy relevante en la regulación de otros procesos biológicos como la muda, la reproducción y la osmo-ionorregulación (Fanjul-Moles, 2006).

En crustáceos, se han descrito varias isoformas de CHH dentro de una misma especie, y aunque se especula que distintas variantes de CHH cumplirían roles específicos (Webster *et al.*, 2012), aún no se comprenden completamente los mecanismos subyacentes a dicho nivel de selectividad y especificidad. Uno de los factores limitantes para la caracterización funcional de las distintas isoformas de CHH es la carencia de metodologías adecuadas para el aislamiento y la purificación de los distintos péptidos en cantidades suficientes para llevar adelante dicha caracterización. Durante los últimos años se han producido avances tecnológicos de envergadura que permitieron estudiar en mayor detalle el papel de las distintas isoformas de CHH en crustáceos. Básicamente, estas nuevas tecnologías están basadas en tres estrategias a saber: extracción de la hormona endógena desde el tejido productor en el animal (Webster y Keller, 1986; Soyez *et al.*, 1987; Kegel *et al.*, 1989), producción por tecnología del ADN recombinante (Ohira *et al.*, 1999; Edomi *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008) y síntesis química de la proteína (Sonobe *et al.*, 2001). Como suele ocurrir, cada estrategia tiene sus ventajas y desventajas, las cuales deben ser consideradas antes de planear cualquier abordaje experimental.

La purificación de los neuropéptidos nativos por Cromatografía Líquida de Alta Performance en Fase Reversa, o RP-HPLC, aplicada en *Carcinus maenas* (Chung y Webster, 2003), tuvo un bajo rendimiento, de alrededor de 2 a 4 µg (entre 270-489 pmol) por glándula del seno, y además, requirió de equipamiento sofisticado y de una intensa puesta a punto de la técnica, la cual es específica para cada neuropéptido en cuestión. Algo a favor, esta estrategia posee la invaluable ventaja de obtener péptidos con la conformación natural y potencialmente con todas las modificaciones post-transcripcionales que ocurren *in vivo*. La tecnología del ADN recombinante demostró ser una herramienta útil para la obtención de grandes cantidades de péptidos, permitiendo

la investigación de sus funciones biológicas. El clonado y la caracterización molecular de los péptidos de la familia de la hormona CHH se ha realizado en diferentes especies de langostas marinas, cangrejos, langostas de agua dulce y camarones (Huberman *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Davey *et al.*, 2000). En la langosta marina *H. americanus*, se determinaron al menos dos isoformas de CHH: CHH-I y II (Chen *et al.*, 2004; Davey *et al.*, 2000). En el camarón *Metapenaeus ensis* se han identificado más de seis cDNA tipo CHH y se dividieron en dos grupos CHH-A y CHH-B (Gu *et al.*, 2000). En los cangrejos *Cancer pagurus*, *C. maenas* y *Libinia emarginata*, y en las langostas de agua dulce *Procambarus clarkii* y *Orconectes limosus*, se reconocieron diferentes subtipos de la hormona CHH (Chung *et al.*, 1998; De Kleijn *et al.*, 1994; Huberman *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 1995; Yasuda *et al.*, 1994; ver revisión Fanjul-Moles, 2006). Por otro lado, se ha demostrado que las hormonas expresadas en un vector de expresión procariota poseen actividad biológica y son apropiadas para la producción de anticuerpos específicos (Gu *et al.* 2000, 2001). Sin embargo, hasta el momento en *C. quadricarinatus* no se ha realizado ningún tipo de estudio sobre la función de CHH, siendo este el primer trabajo en llevarlo a cabo. Con el objetivo de lograr un primer acercamiento en el estudio de las funciones de esta hormona en la fisiología de juveniles avanzados de *C. quadricarinatus*, expuestos a condiciones de estrés, utilizamos técnicas de biología molecular para la producción de la hormona CHH recombinante (rCqCHH). Una vez obtenida la hormona recombinante, se pudieron poner a prueba diferentes hipótesis sobre la función de CHH en situaciones de estrés térmico y salino, y también pudimos desarrollar anticuerpos específicos que permitieron poner a punto diferentes técnicas para la identificación de la hormona en los posibles órganos blanco, como por ejemplo, hepatopáncreas y músculo abdominal.

Para la realización de este proyecto se contó con la colaboración del Dr. Amir Sagi de la Universidad de Ben Gurion de Israel, quien previamente aisló, clonó y secuenció el cDNA de CHH de 200 pb, obtenido a partir de pedúnculos oculares de la langosta *C. quadricarinatus* (GenBank: DQ095778.1). La secuencia aminoacídica de CHH de *C. quadricarinatus* se comparó con secuencias de la misma hormona informadas para otras langostas de agua dulce (**Fig. 16**). Con este análisis quedó demostrada una alta identidad entre las secuencias aminoacídicas de las CHHs de *C. destructor*, *O. limosus* y *P. clarkii*. Dicha homología fue la siguiente: 95 y 80 % con las isoformas CHH-B y CHH-A de *C. destructor*, respectivamente; 82 % con una isoforma de *O. limosus* y 63 % con una isoforma de *P. clarkii*.

```

C.quadricarinatus  QVFDQACKGVYDRALFKKLDKRVCDCCYNLYRKPYPVAASCRENCYSNLVFRQCLDDLLLVLD 60
C.destructorB      QVFDQACKGVYDRAIFKKLDKRVCDCCYNLYRKPYPVATSCRQNCYSNLVFRQCLDDLLLVLD 60
C.destructorA      QVFDQACKGVYDRAIFKKLDKRVCDCCYNLYRKPYPVAVSCRGNCSNNLVFRQCLEELFLGN 60
O.limosus          EVFDQACKGIYDRAIFKKLDKRVCEDCYNLYRKPYPVATTCRQNCYANSVFRQCLDDLLLVLD 60
P.clarkii          ----QACKGIYDRAIFRKLKLVCDCCYNLYRKPYPVATTCRDNCFHSTFKYCVVNLGLDL 56
                   *****:*****:*.**: **.***** **.:** **: : .*: *: :* *
C.quadricarinatus  VVDEYV----- 66
C.destructorB      VVDEYVSGVQIV 72
C.destructorA      GFNEYISGVQTV 72
O.limosus          VLDEYISGVQTV 72
P.clarkii          ELFTYLSDMIRG 68
                   . *:

```

Figura 34. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH) de *C. quadricarinatus* con: CHHA y CHHB de *Cherax destructor* (Bulau *et al.*, 2003), CHH de *Orconectes limosus* (Kegel *et al.*, 1991) y CHH de *Procambarus clarkii* (Gruenefeld y Jaros, 2003). El alineamiento fue construido con el programa ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007). Las bases conservadas se indican con asteriscos, los dos puntos indican las sustituciones conservadas (grupo del mismo color), un punto corresponde a sustituciones semi-conservadas (forma similar) y los huecos indican mutaciones de inserción o deleción.

A partir de la construcción cedida por el Dr. Sagi, se subclonó el cDNA de CHH en un vector de expresión procariota para la posterior producción de la proteína de fusión 6XHis-CHH (a la cual denominamos rCqCHH). Es importante mencionar que el tag o péptido (6XHis) que posee la hormona recombinante es necesario para el posterior proceso de purificación de la proteína por cromatografía de afinidad, y es ampliamente aceptado que este péptido no afecta la función ni las condiciones nativas de las proteínas que lo contienen. Una vez confirmada la pureza de la proteína recombinante obtenida por SDS-PAGE, se procedió a analizar la actividad biológica de la hormona recombinante rCqCHH.

Afortunadamente, el efecto evocado por la inyección de rCqCHH fue similar (aunque no tan pronunciado) al propio producido por la inyección de extracto de pedúnculos oculares; esto se evaluó al cuantificar los niveles de glucosa en la hemolinfa de animales estresados. Esto indicaría que la hormona producida en bacterias posee actividad biológica, y al mismo tiempo validaría la estrategia de utilizarla como herramienta molecular para evaluar la participación directa de CHH en el estrés térmico y salino. Es importante destacar también que el incremento hiperglucémico observado es atribuible a la inyección de rCqCHH debido a que a los animales utilizados en el ensayo se les había ablacionado los pedúnculos oculares tres días antes de realizar la experiencia, asegurándonos de esa forma que no quedaría CHH endógena circulando en hemolinfa. Notablemente, la concentración de glucosa determinada luego de la inyección de rCqCHH se

mantuvo constante, y esto ocurrió durante las dos horas que duró el ensayo para las tres dosis empleadas. Dado que la administración de cualquiera de las dosis de rCqCHH inyectadas generaron un incremento similar y significativo en los niveles de glucosa en la hemolinfa de las langostas, podemos concluir que la menor dosis empleada fue suficiente para desencadenar la respuesta máxima de la hormona recombinante. Esto es consistente, ya que la concentración de rCqCHH inyectada fue superior a la concentración de CHH (10^{-10} - 10^{-11} M) determinada en situaciones de estrés *in vivo* (Webster, 1996; Stentiford *et al.*, 2001). Además, a diferencia de otros trabajos en los cuales alrededor de 100 pmol de hormona fue la dosis efectiva que generó la respuesta hiperglucémica (Katayama *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2000), en el presente trabajo demostramos que rCqCHH produce el mismo efecto a una dosis 10 veces menor (10 pmol). Como fue mencionado previamente, la hormona recombinante utilizada provocó un incremento de glucosa en hemolinfa no tan pronunciado como los extractos de pedúnculo ocular. Esta diferencia puede deberse a la degradación parcial de la hormona recombinante tras la inyección, la cual afectaría negativamente su función sobre órganos blanco, y/o a un plegamiento de rCqCHH que no coincide completamente con el de la proteína endógena. Otras posibilidades a considerar podrían ser la presencia de modificaciones post-traduccionales de CHH por el tejido productor de la hormona que serían importantes para su función y/o estabilidad frente a la degradación. En línea con estas especulaciones, se ha propuesto que un factor importante en la estabilización de la conformación de CHH es, probablemente, la existencia de seis cisteínas presentes en todos los neuropéptidos de la familia CHH/MIH/GIH (Kegel *et al.*, 1989; Kawasami *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 2002). Estas cisteínas forman tres puentes disulfuro y la simple sustitución de tres o cuatro cisteínas genera la pérdida de la actividad hiperglucémica de la hormona recombinante (Mettulio *et al.*, 2004). Es posible que la correcta formación de los puentes disulfuro se vea facilitada por el ambiente oxidativo de la hemolinfa. Al mismo tiempo, las diferentes CHHs maduras, poseen el extremo C-terminal amidado y, en muchos casos, un grupo piroglutamato que bloquea el extremo N-terminal (Fanjul-Moles, 2006; Giulianini y Edomi, 2006). La amidación del extremo C-terminal es el proceso post-traduccionales más importante a causa de su influencia sobre la actividad de CHH, y la baja funcionalidad presentada por péptidos no amidados puede ser explicada por la baja afinidad de unión al receptor de CHH debido a su carga negativa en el extremo C-terminal (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008). Otra modificación post-traduccionales es la relacionada a la ciclización del aminoácido glutamato en el extremo N-terminal, el cual se encuentra en CHHs de diferentes especies de cangrejos braquiuros y langostas de agua dulce, pero no en camarones (Huberman *et al.*, 2000). La secuencia aminoacídica del extremo N-terminal bloqueado como el libre son casi idénticas, mientras que el residuo N-terminal puede ser glutamina o piroglutamato. Se probó que ambas isoformas en *C. maenas* poseían similar actividad biológica y la misma tasa de clearance

hemolinfática; por lo tanto, la ciclización del extremo N-terminal no tendría una clara función biológica (Chung y Webster, 1996; Chung *et al.*, 1998), pero el bloqueo de dicho extremo parecería proteger a CHH de las proteasas, extendiendo su vida media, como ocurre en otros péptidos (Rink *et al.*, 2010). La ausencia de estas modificaciones post-traduccionales en un sistema de expresión bacteriano, como el utilizado en nuestro estudio, podrían explicar las diferencias que observamos entre los efectos de la hormona recombinante y del EPO.

Un punto a considerar al momento de la producción de CHH recombinante, es la elección del tag o péptido a utilizar para la posterior purificación por cromatografía de afinidad. Posteriormente a la producción de 6XHis-CHH, nos propusimos obtener la proteína de fusión GST-CHH y evaluar la actividad biológica de ambas hormonas recombinantes. GST (Glutathione S-transferase) es una proteína de 26 kDa que se fusiona al extremo C o N-terminal de las proteínas de fusión recombinantes. Al determinar los niveles de glucosa en la hemolinfa de langostas ablacionadas inyectadas con GST-CHH, se observó que esta hormona recombinante producía un aumento significativo en la concentración de glucosa respecto de los animales control (resultados no mostrados). Sin embargo, el efecto hiperglucémico de GST-CHH era considerablemente menor que el observado para 6XHis-CHH. Debido a que ambas variantes de CHH fueron producidas en bacterias y de manera similar, podemos atribuir estas diferencias al hecho de que GST tiene un peso molecular tres veces superior al de CHH, lo cual estaría afectando la conformación de la hormona, o bien la interacción de la hormona con su receptor específico. En línea con estas observaciones, estudios estructurales postularon que el sitio funcional de CHH estaría localizado en alguno de los extremos de la misma, probablemente en la región C-terminal de la hormona (Katayama *et al.*, 2003).

El uso de anticuerpos específicos para la detección y cuantificación de proteínas ha marcado una revolución tecnológica no solo en el campo de la biología molecular y bioquímica de proteínas, sino también en diversos campos de estudio como son la microbiología, la medicina y la fisiología, entre otros. En esta tesis nos propusimos generar anticuerpos específicos anti-CHH con el objetivo final de comprobar los resultados obtenidos por RT-PCR; por medio de esta técnica, cuantificamos los niveles de ARNm de CHH y demostramos que esta hormona aumenta su expresión en condiciones de estrés térmico y salino. Como fue mencionado previamente, es importante remarcar que en la mayoría de los casos los niveles de ARNm son una medida directa de los niveles de una proteína en particular. Sin embargo, existen excepciones en las cuales esto no se cumple debido principalmente a mecanismos fisiológicos de degradación del ARNm, a la inhibición de la

traducción y/o a la degradación de proteínas (Nikinmaa y Rytönen, 2012). Es importante notar que, hasta el día de la fecha, no se ha informado sobre la generación de anticuerpos anti-CHH en *C. quadricarinatus*. Los anticuerpos anti-CHH generados por otros investigadores han sido exitosamente utilizados para estudiar la expresión de CHH, ya sea a nivel morfológico como fisiológico, como es el caso de su empleo en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la cuantificación de CHH en hemolinfa (de Kleijn *et al.*, 1998; Lorenzon *et al.* 1997, 2000; Chang *et al.*, 1998; Bergmann *et al.*, 2001); o en las técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de tipos neuronales encargados de la síntesis de los diferentes neuropéptidos de la familia CHH; o para la eliminación de CHH de la hemolinfa por inmunoprecipitación, de forma de bloquear *in vivo* la actividad de la hormona, etc. En el presente trabajo, los anticuerpos anti-CHH obtenidos se utilizaron para la identificación de la hormona endógena de *C. quadricarinatus* en hemolinfa y en extracto de pedúnculo ocular, a través de la técnica Western Blot, y sorprendentemente, deetectamos en ambos tejidos la banda de CHH migrando alrededor de los 8 kDa, la cual se corresponde con el peso molecular aproximado de la hormona CHH. A su vez, utilizando una técnica inmunohistoquímica, se logró identificar *in situ* la localización de la hormona en cortes de pedúnculo ocular. Con respecto a esto último es importante considerar que el sistema neuroendocrino donde se sintetiza CHH está constituido por un grupo de células neurosecretoras localizadas distalmente en la cara latero-ventral de la médula terminalis, donde se encuentra el órgano X (OX). Los gránulos de secreción son transportados vía un tracto axonal al órgano neurohemal, la glándula del seno (GS). En nuestros cortes pudimos observar neuronas inmunoreactivas al anticuerpo anti-CHH, tanto en células neurosecretoras del OX como en células de la GS. El material inmunoreactivo en la pericaria se pudo observar como agregados en el citoplasma. A nivel ultraestructural, ciertos autores han observado que estos agregados corresponden a zonas del aparato de Golgi rodeadas por gránulos de secreción inmunoreactivos (Van Herp y Van Buggenum, 1979; Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981). Una sorprendente característica es la diferencia en la intensidad de la tinción entre las células inmunoreactivas, lo cual se corresponde con una cantidad diferencial de gránulos inmunopositivos en el citoplasma de cada una de las células (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981).

Por último, los anticuerpos generados en este trabajo también fueron producidos con el objetivo de cuantificar la hormona en hemolinfa mediante la técnica ELISA; de esta forma, nos propusimos determinar los niveles circulantes de CHH en *C. quadricarinatus*, ya sea en condiciones normales como en situaciones de estrés; sin embargo, una serie de inconvenientes metodológicos

nos impidieron poner a punto la técnica. En una etapa posterior se repetirán las pruebas realizadas hasta el momento, con la intención de obtener un protocolo exitoso.

Los resultados obtenidos tras la determinación de los niveles de glucosa detectados en la hemolinfa de animales inyectados con la hormona recombinante, fueron consistentes con una exitosa actividad biológica de rCqCHH. Estos resultados nos permitieron diseñar un protocolo experimental dirigido al estudio del papel directo de la CHH en el estrés térmico y salino. Para ello, administramos exógenamente rCqCHH a juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* bajo condiciones de estrés. Hipotetizamos que si CHH cumple una función ventajosa sobre el estrés aplicado, deberíamos observar signos de adaptación al estrés en aquellos animales inyectados con la hormona. El hecho de que CHH aumente su expresión en condiciones de estrés térmico y salino (como fue demostrado por RT-PCR) apoya fuertemente esta hipótesis. Es importante mencionar que éste es el primer trabajo en el cual el efecto de la administración de CHH es estudiado en detalle y a nivel fisiológico. Además, no existen estudios acerca del efecto de la inyección de esta hormona en animales expuestos a situaciones de estrés por un período prolongado de tiempo (más de 24 horas). De esta manera, este estudio aporta las primeras evidencias sobre la acción directa de CHH sobre el estrés térmico y salino.

3.II.B. Administración de rCqCHH a animales aclimatados a distintas combinaciones de temperatura y salinidad

Como fue descrito en el Capítulo I, la disminución de la temperatura a 20 °C causó una disminución en la ganancia de peso de las langostas juveniles; ese descenso fue más pronunciado y significativo cuando los animales se expusieron a una salinidad del agua de 10g/L. Por ese motivo, nos preguntamos si la administración exógena de CHH podría revertir el efecto generado por el estrés térmico y salino en la ganancia de peso. En línea con nuestra hipótesis de trabajo, observamos que los juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* inyectados con la hormona recombinante tuvieron una ganancia de peso entre un 200 y un 300 % superior a la registrada en los animales control (inyectados con vehículo), en ambos medios (agua dulce y 10 g/L). Para este ensayo, los animales inyectados recibieron 50 pmol de la hormona recombinante; esta concentración fue determinada en base al ensayo de actividad biológica discutido previamente. En ese experimento, si bien las tres dosis administradas generaron incrementos similares en los niveles de glucosa en hemolinfa durante todo el ensayo (2 horas), se decidió no utilizar la menor dosis (10 pmol) en base a los posibles procesos de degradación y plegamiento erróneo que fueron descriptos anteriormente, cuando se

analizó la acción de la hormona recombinante. Es importante remarcar que las diferencias encontradas en el peso de los animales no se deben a un aumento en el número de mudas de los juveniles durante la duración del ensayo; como se ha establecido en estudios previos, CHH potencia la acción de la hormona inhibidora de la muda (MIH), la cual inhibe la síntesis de ecdiesteroides por parte del órgano Y, con la consecuente inhibición de la muda (Webster, 1998). Teniendo en consideración el mecanismo de regulación mencionado, podemos sugerir que la mayor ganancia de peso en los animales tratados con la hormona recombinante se debería a un efecto, directo o indirecto de CHH, sobre el proceso de ecdisis y/o sobre el metabolismo tisular. El mecanismo de crecimiento somático de los crustáceos acuáticos es dependiente del influjo masivo de agua, principalmente a través de la ingesta de agua, que equivale al 60-80 % del volumen corporal que luego representará el incremento total posterior a la muda. Los primeros estudios sobre este fenómeno lo relacionaron con la acción de una sustancia hasta ese momento desconocida, la cual regularía dicho proceso (Baumberger y Olmsted, 1928). Trabajos mas recientes, en *C. maenas*, demostraron la presencia de una sustancia estructuralmente idéntica a CHH en el eje ganglio cerebroide-intestino que sería la responsable de regular este proceso; específicamente, un conjunto de células endocrinas localizadas en la parte anterior y posterior del intestino, durante la muda, sintetizarían y liberarían esta sustancia (Chung *et al.*, 1999; Webster *et al.*, 2000), supuestamente inducidas por el aumento de ecdiesteroides en hemolinfa. Otros estudios analizaron el efecto directo de CHH sobre el proceso de muda, inyectando CHH en animales que se encontraban en el comienzo de la ecdisis, intentando determinar si el pico de CHH causaba la incorporación de agua y la turgencia del cuerpo. Los animales que recibieron un exceso de CHH experimentaron un rápido incremento del volumen corporal, pero no lograban retraer los apéndices dentro de la vieja cutícula, por lo que no completaban el proceso correctamente (Chung *et al.*, 2010). Estos resultados permitieron establecer un papel importante de CHH en el proceso de ecdisis de los animales. Si bien en langostas de agua dulce, animales ablacionados (sin CHH) pudieron realizar exitosamente el proceso de muda (Serrano *et al.*, 2003), no podemos descartar que en los juveniles de *C. quadricarinatus* la hormona recombinante rCqCHH este relacionada con el proceso de captación de agua que ocurre durante la ecdisis y con el consecuente incremento en peso de los animales. Por otro lado, como se demostró en varios trabajos, la disminución de la osmolaridad que precede a la ecdisis es restaurada por CHH (Serrano *et al.*, 2003; Charmantier-Daures *et al.*, 1994). Si bien hemos mencionado que la hormona tiene un efecto directo en este proceso, se debe tener en cuenta que CHH podría estar actuando indirectamente incrementando la energía disponible al estimular la glucogenolisis, y de esta forma mantener activas las bombas intercambiadoras de iones.

A diferencia de lo observado en nuestro trabajo, en donde utilizamos una hormona propia de crustáceos, los diferentes trabajos realizados con el objetivo de mejorar la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo larval de los crustáceos han utilizado hormonas de crecimiento o factores de regulación del metabolismo celular de vertebrados (Charmantier *et al.*, 1989; Toullec *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2000; Santiesteban *et al.*, 2010; Chaulet *et al.*, 2012 resultados no publicados). En un estudio realizado en nuestro laboratorio, utilizando juveniles recién eclosionados de la especie *C. quadricarinatus*, se observó que el factor de crecimiento insulínico tipo I humano (insulin like growth factor-I o IGF-I) administrado a través del alimento, solo o en combinación con ecdiesteroides, generó un incremento significativo en la ganancia de peso en los animales (Chaulet *et al.*, resultados no publicados). De forma similar, en post-larvas del camarón *L. vannamei* cuyo alimento poseía hormona de crecimiento humana (GH), se observó que la talla de los animales era un 12 % superior a la de los individuos control (Toullec *et al.*, 1991); en otro trabajo, en la misma especie y utilizando el mismo estadio larval, el tratamiento con GH de Tilapia produjo un incremento de un 42,4 % del peso y 5,2 % del largo de los animales respecto del grupo control (Santiesteban *et al.*, 2010). Dicha hormona al ser inyectada en langostas juveniles de *H. americanus* también fue capaz de incrementar 2-4 % el largo y 10-20 % el peso respecto de los animales controles (Charmantier *et al.*, 1989). A su vez, juveniles del camarón *Fenneropenaus chinensis* alimentados con una dieta que contenía GH recombinante de salmón presentaron un incremento en el peso de 81-132 % (Xu *et al.*, 2000). En lo que respecta a nuestro trabajo, la ganancia de peso final en los juveniles tratados con rCqCHH fue significativamente superior a la de los individuos control, aunque estos animales se encontraban bajo condiciones de estrés, a diferencia de las otras especies de crustáceos arriba mencionados, los que se encontraban bajo condiciones óptimas.

Otro punto a destacar es que, en ambos tratamientos, los grupos a una salinidad de 10 g/L presentaron una mayor ganancia de peso que sus pares en agua dulce y no se registró mortalidad alguna, aunque estas diferencias no fueron significativas; dichas observaciones son consistentes con ciertas prácticas acuícolas donde los crustáceos son mantenidos a una salinidad levemente superior al agua dulce, ya que de esta manera se obtiene un mayor crecimiento de los animales. La explicación a este tipo de respuesta puede ser una reducción en los gastos energéticos relacionados con el mantenimiento del balance hidromineral (Viosca, 1961; Hill y Cancienne, 1963; Loyacano, 1967; Deaver, 1980). En peces también se observó una clara influencia de la salinidad sobre el crecimiento; trabajos realizados en peces dulceacuícolas demostraron que a salinidades de 2 g/L se incrementaba la tasa de crecimiento (Konstantinov y Martyniva, 1993). Diferentes trabajos avalan la hipótesis de que el costo energético de la osmorregulación es más bajo en un medio isosmótico,

donde los gradientes entre la sangre y el agua son mínimos, y esa energía que se ahorra es suficiente para incrementar el crecimiento (Canagaratman, 1959; Otto, 1971).

En relación con esto, al determinar el gasto energético en los juveniles avanzados, observamos que en ambos tratamientos (control e inyectados con rCqCHH) los grupos expuestos a 10 g/L presentaban una tasa metabólica levemente superior a sus respectivos controles, aunque tal diferencia no fue significativa; tampoco se observaron diferencias entre las tasas metabólicas de los tratamientos. El hecho de que no se observe una variación en el consumo de oxígeno (utilizado como estimador de la tasa metabólica) entre los tratamientos y que exista una mayor ganancia de peso en los animales inyectados con rCqCHH, nos estaría indicando que la distribución de la energía es diferente en cada tratamiento, hecho previamente informado en juveniles tempranos de *C. quadricarinatus* (Meade *et al.*, 2002). En dicho trabajo, la máxima eficiencia de crecimiento se observó en juveniles a 20 °C, lo que no se correspondía con la temperatura a la que se obtuvo la mayor ganancia de peso (28 °C); los autores atribuyeron este resultado a una menor tasa de consumo de oxígeno y menor cantidad de alimento ingerido, que se traduce en un menor costo metabólico relacionado con la digestión, hechos que en conjunto resultaron en una mayor eficiencia de crecimiento de los animales a 20 °C. En nuestro trabajo, si bien no se encontraron diferencias significativas entre las tasas metabólicas de los diferentes tratamientos, los grupos tratados con la hormona presentaron una reducción de entre un 8 y un 12 % en el consumo de oxígeno respecto de los grupos control, observación que también fue informada en otros trabajos que utilizaron extracto de pedúnculo ocular como fuente hormonal. Reddy y Ramamurthi (1986) y Scheer y colaboradores (1986), al determinar el consumo de oxígeno de crustáceos o de explantos de hepatopáncreas y músculo, han sugerido que algún factor secretado por el pedúnculo ocular disminuiría el metabolismo. A su vez, Souza (1989) observó una depresión en la captación de oxígeno por parte de fragmentos de músculo.

Otra vía que permite verificar cambios del metabolismo energético en los animales es el análisis de las modificaciones en los sustratos energéticos. En los crustáceos, la principal fuente de energía para los procesos metabólicos es la glucosa, por lo que variaciones en el nivel circulante de esta sustancia estarían reflejando los esfuerzos realizados para mantener la homeostasis. En tal sentido, en nuestro estudio observamos que en ambos tratamientos los grupos aclimatados a 10 g/L poseían niveles de glucosa significativamente superiores a sus respectivos grupos control. Tal fenómeno produciría un aumento de la energía disponible para ser utilizada por el organismo. A su

vez, y como era de esperar según los resultados obtenidos en ganancia en peso, los niveles de glucosa de los animales inyectados con rCqCHH fueron superiores a los de los animales control, en ambas salinidades; sin embargo, las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas. Al comparar la utilización de las reservas de glucógeno entre los tratamientos, se observó que los niveles en hepatopáncreas de los animales inyectados con la hormona recombinante eran menores que en los grupos control; por otro lado, la concentración de glucógeno en músculo abdominal se mantuvo estable entre salinidades luego de la administración de la hormona, mientras que, entre tratamientos sólo hubo diferencias significativas entre los grupos en agua dulce. Analizando en conjunto estos resultados, se puede postular que CHH podría estar estimulando el metabolismo del glucógeno (glucogenolisis) en hepatopáncreas, lo cual es consistente con la disminución de esta reserva y el aumento de los niveles de glucosa en hemolinfa observados en animales inyectados con rCqCHH. Observaciones similares fueron informadas por Sedlmeier (1986), quien encontró mediante ensayos *in vitro* que luego de incubar explantos de hepatopáncreas en un medio libre de glucosa y en presencia de extracto de pedúnculo ocular, la concentración de glucógeno disminuía. Por otro lado, en músculo abdominal la hormona podría estar actuando sobre la enzima PEPCK, como se observó en el Capítulo I, disminuyendo su expresión y por lo tanto su actividad. Al disminuir PEPCK en músculo abdominal, disminuye la gluconeogénesis, y esto explicaría el aumento en los niveles de aminoácidos en los grupos inyectados con rCqCHH; los aminoácidos, junto con otras fuentes de carbono no carbohidratos, se utilizan como sustrato para la síntesis de glucosa.

Como se mencionó anteriormente, en los grupos inyectados con rCqCHH los niveles de aminoácidos son mayores a los de sus pares inyectados con vehículo; en tanto que al comparar entre salinidades se observó, como era de esperar, que en los dos grupos a 10 g/L la concentración de aminoácidos libres fue significativamente superior a la de los grupos en agua dulce. El hecho de que la concentración fuera mayor en los animales inyectados con la hormona puede deberse, muy probablemente, a la disminución en la gluconeogénesis; por otro lado, la diferencia entre salinidades puede ser atribuida a la función que cumplen los aminoácidos como osmolitos en la regulación isosmótica (Okuma y Abe, 1994; Abe *et al.*, 1999a, b; Fujimori y Abe, 2002; Wang *et al.*, 2004). Se encuentra ampliamente demostrado en crustáceos que, ante condiciones hipo-osmóticas, el conjunto de aminoácidos decrece por un incremento en la tasa de deaminación de aminoácidos no esenciales, mientras que en ambientes hiper-osmóticos ocurre lo opuesto. De esta forma, la langosta utilizaría los aminoácidos como solutos compensatorios, que durante el proceso de aclimatación reemplazarían a los iones (Gilles, 1997).

Diferentes trabajos discuten el rol de los aminoácidos ante un cambio en la osmolaridad ambiente, y todos coinciden en que los principales aminoácidos que varían su concentración (tanto en músculo como en hemolinfa) son los aminoácidos no-esenciales alanina, arginina, glutamina, glicina y prolina. En músculo, tales aminoácidos representan un 93% del total (McCoid *et al.*, 1984) y serían los responsables junto con nucleótidos, azúcares e iones, de conferirle sabor a la carne (Jones, 1969; Konosu y Yamaguchi, 1982; Papadopoulos y Finne, 1986). Cada aminoácido, a una dada concentración y en una combinación particular con otros compuestos, le provee a la carne una característica determinada, como por ejemplo el sabor dulce con el que contribuye la glicina. Estos datos son una herramienta muy importante para los productores a la hora de mejorar la palatabilidad de la carne. Papadopoulos y Finne (1986) sugieren que la intensidad del sabor se relaciona directamente con la concentración de aminoácidos; en este sentido, podemos sugerir para los juveniles avanzados de *Cherax sp.* su exposición a una salinidad de 10 g/L, dado que en esas condiciones se observó un aumento significativo de los aminoácidos libres en el músculo abdominal.

Como hemos sugerido en el Capítulo I, y se ha demostrado en otros trabajos, CHH tendría un papel importante en la osmorregulación. En el capítulo anterior se observó que los niveles de ARNm de la hormona aumentaban acorde se incrementaba la salinidad; en este capítulo, en el ensayo de administración de rCqCHH, encontramos que tanto los niveles de sodio como de potasio del grupo a 10 g/L inyectado con la hormona, fueron significativamente más bajos que los de los grupos que recibieron vehículo. Al mismo tiempo, en ambos tratamientos no se encontraron diferencias entre salinidades. En línea con lo discutido en párrafos anteriores, estos resultados estarían sugiriendo que CHH cumple un rol importante para mantener la homeostasis iónica. De esta manera, la energía que antes se destinaba al proceso de osmorregulación podría ser utilizada en otros procesos, como ser el crecimiento, lo cual se encuentra avalado por los resultados obtenidos en la ganancia de peso de ambos tratamientos.

Un aspecto importante que surge de este trabajo es la posibilidad de controlar ciertos aspectos fisiológicos de los crustáceos como herramienta para la acuicultura. Este primer acercamiento permite la producción de grandes cantidades de neuropéptidos recombinantes, los cuales pueden ser utilizados para modular *in vivo* el crecimiento, la reproducción y la muda, aunque hay que tener presente que otros tipos de ensayos deben realizarse antes de la aplicación de esta estrategia en el cultivo de crustáceos. En primer lugar, habría que estudiar el efecto que produce la

incorporación de la hormona en el alimento, ya que sería impracticable para un criadero la administración de la hormona vía inyección; varios trabajos en crustáceos han utilizado la incorporación de diferentes hormonas al alimento balanceado, con el objetivo de estimular el crecimiento somático en los animales (Chaulet *et al.*, 2012 datos no publicados; Xu *et al.*, 2000; Toullec *et al.*, 1991) o promover la reproducción/muda (Laufer *et al.*, 1998; Yano, 2000; Zapata *et al.*, 2003; Cahansky *et al.*, 2008) de manera exitosa. Una vez que se establezca que el alimento suplementado, en este caso, con rCqCHH ejerce el efecto deseado sobre el crecimiento de los animales, se debería trasladar esta herramienta desarrollada en el laboratorio al criadero. Siguiendo esta línea, se debe analizar además cual es el mejor protocolo para la administración del alimento suplementado con la hormona, es decir, se debe establecer la cantidad de alimento a suministrar, la frecuencia de alimentación y la forma de distribución del alimento en los estanques. Otro punto que requiere ser estudiado es la posible utilización de rCqCHH en otras especies, debido al alto grado de homología de secuencia aminoacídica y por consiguiente, alta similitud estructural que existe entre los neuropéptidos de la familia CHH/MIH/GIH (Bocking *et al.*, 2001; Mettullo *et al.*, 2004).

3.II.C. Evaluación del tipo de efecto de rCqCHH sobre órganos blanco, ensayos *in vitro*

Para evaluar el efecto de CHH sobre sus posibles órganos blanco, hepatopáncreas y músculo abdominal, realizamos ensayos *in vitro* en los cuales, como medida indirecta del metabolismo celular en estos órganos, se determinó la incorporación de leucina ^3H . En el ensayo se estudió la acción de la hormona rCqCHH y de un extracto de pedúnculo ocular sobre explantos de ambos órganos; al mismo tiempo, se determinó si la concentración de D-glucosa en el medio generaba algún cambio en la incorporación de leucina tritiada. En explantos de hepatopáncreas se observó que, cuando son sometidos a un medio enriquecido con glucosa y expuestos a rCqCHH, ocurre una menor incorporación de leucina ^3H , en comparación con explantos en el mismo medio de incubación, pero expuestos a EPO o vehículo. Por otro lado, en el músculo abdominal no se encontraron diferencias entre tratamientos, en ninguna de las series experimentales; al comparar entre series se observó que, los tres tratamientos a cuyo medio se adicionó D-glucosa tuvieron una menor incorporación de leucina tritiada, sin llegar a ser significativo el descenso. Como podemos observar, en el ensayo *in vitro* no se detectaron los efectos esperados en base a los resultados obtenidos en el Capítulo I y en el ensayo de administración de rCqCHH. La hipótesis planteada y que se trató de poner a prueba con este ensayo fue que CHH actúa sobre sus órganos blanco modificando su metabolismo; en línea con esta propuesta, esperábamos observar una mayor incorporación de leucina tritiada en ambos órganos expuestos a la hormona y al EPO, como consecuencia de un aumento en la glucólisis, en la glucogenólisis o en ambas vías metabólicas. A su vez, también podría haberse observado una

depresión del metabolismo inducido indirectamente por la hormona; el incremento de la glucólisis inducido por CHH conllevaría a una disminución de la fosforilación oxidativa, y consecuentemente, a un menor consumo de oxígeno. Si bien los explantos de hepatopáncreas tratados con CHH e incubados en un medio rico en D-glucosa, presentaron una disminución significativa en la incorporación de glucosa, no podemos atribuir esta observación a la acción de la hormona sobre el órgano, porque una respuesta similar debería haberse observado en los explantos incubados con EPO. La ausencia de resultados claros se puede deber a una falla en el protocolo ensayado, principalmente si se tiene en cuenta la falta de respuesta al incubar con extracto de pedúnculo ocular. Debemos aclarar igualmente que se trató de un ensayo preliminar, y que no contamos con el tiempo suficiente para optimizar y controlar ciertas variables propias del ensayo, como ser los tiempos de incubación y las dosis efectivas de la hormona rCqCHH, entre otros.

A modo de conclusión, los resultados obtenidos tras la administración de CHH recombinante son realmente muy importantes en términos fisiológicos, y a su vez alentadores para la acuicultura de crustáceos. Si bien hacen falta ensayos adicionales para respaldar aún más nuestra hipótesis de trabajo, nuestros hallazgos generan grandes expectativas a la hora de pensar en estrategias destinadas a mejorar el crecimiento de crustáceos en condiciones subóptimas de temperatura y salinidad. Hemos demostrado no solo que la producción de la hormona recombinante es eficiente utilizando protocolos tradicionales, sino también que dichas proteínas poseen actividad biológica similar a las hormonas endógenas. Hace algunos años, pensar en una posible administración de CHH hubiera parecido imposible ya que, como se mencionó anteriormente, la única manera de obtener la hormona sin contaminantes era a través de su purificación por RP-HPLC, técnica muy costosa y poco eficiente en este caso, con la cual se pueden obtener sólo unos pocos microgramos de CHH. A su vez, la purificación de CHH por HPLC requiere de enormes cantidades de material biológico. Actualmente, con las técnicas de biología molecular del ADN recombinante, es posible obtener grandes cantidades de hormona recombinante y, tras su minucioso estudio en sistemas modelos como los utilizados en este trabajo, esto es la respuesta fisiológica al estrés térmico y salino, pensar en su utilización para incrementar la producción acuícola en cuestión.

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES FINALES

En la presente tesis se estudió la respuesta al estrés térmico y salino de juveniles de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, con el objetivo de incrementar el conocimiento, hasta el momento escaso, sobre la fisiología de la especie en condiciones desfavorables de temperatura y salinidad.

Por medio de técnicas empleadas en fisiología animal y de biología molecular, demostramos que diferentes procesos biológicos en juveniles avanzados de la especie en estudio fueron afectados por la disminución de la temperatura ambiente y por el aumento de la salinidad del agua.

La exposición crónica (30 días) a bajas temperaturas generó una disminución en la ganancia de peso de las langostas juveniles, siendo significativo el descenso sólo cuando la disminución de la temperatura se combinaba con un aumento de la salinidad a 10 g/L. Si bien los animales lograron sobrevivir a la disminución de la temperatura, al aumento de la salinidad, o incluso a la combinación de ambas variables, estas condiciones afectaron negativamente a los animales; se observaron modificaciones en distintos parámetros fisiológicos y se generó una evidente redistribución de la energía disponible en el organismo, viéndose reflejado de esta manera el alto grado de estrés provocado en los animales por las condiciones ensayadas. En línea con estas observaciones, las variaciones en la temperatura y la salinidad del agua, tanto de forma crónica como aguda, desencadenaron la típica respuesta de los crustáceos ante situaciones de estrés, es decir, la hiperglucemia. Sin embargo, la variación en los niveles de glucosa varió en función de la duración del estrés, crónico o agudo, y también según el factor estresante (temperatura y salinidad). Así, la exposición prolongada a bajas temperaturas provocó un aumento de más del 100 % en los niveles de glucosa, mientras que la exposición aguda a esta condición lo hizo moderadamente; a su vez, una elevada salinidad del agua afectó sustancialmente la glucemia en las primeras horas de exposición. Sin embargo, cuando las langostas fueron expuestas a una combinación de baja temperatura y alta salinidad, tanto de manera crónica como aguda, se encontró una potenciación entre ambos factores al evocar la respuesta hiperglucemiante.

A partir de estas observaciones, proponemos lo siguiente como un modelo de respuesta a condiciones estresantes de juveniles avanzados de *C. quadricarinatus*: ante un cambio en la osmolaridad ambiental, el animal rápidamente reacciona aumentando los sustratos energéticos, para

de esta forma compensar (en términos fisiológicos) dicha perturbación; mientras que una respuesta similar se desencadena, pero al disminuir de manera prolongada la temperatura del agua.

La tasa metabólica de las langostas expuestas a condiciones crónicas de estrés térmico y salino aumentó levemente acorde se elevó la salinidad y disminuyó la temperatura. La constancia observada en la tasa metabólica, junto con las variaciones en los niveles de glucosa en hemolinfa y el aumento de los requerimientos energéticos para llevar a cabo los diferentes mecanismos de compensación metabólica (entre los cuales se encuentran los procesos iónico- y osmorreguladores), condujo finalmente a una notable disminución en la ganancia de peso de los animales expuestos a ambas condiciones estresantes.

En este trabajo hemos demostrado, por primera vez, la participación directa de la hormona CHH en la respuesta al estrés térmico y salino en condiciones de exposición crónica y aguda. Para ello, evaluamos el efecto de la administración exógena de CHH en juveniles avanzados bajo las condiciones de estrés ensayadas. Los animales inyectados con la hormona mostraron niveles de glucosa en hemolinfa superiores y una mayor degradación en las reservas de glucógeno en el hepatopáncreas. Interesantemente, no observamos el mismo fenómeno en el músculo abdominal. En su conjunto, estos resultados sugieren que la acción de la hormona generaría un aumento en el metabolismo de glucógeno del hepatopáncreas y una disminución de la glucogenólisis en el músculo abdominal en animales condicionados por ambientes de alta salinidad y bajas temperaturas. Al mismo tiempo, la disminución en los niveles de sodio en hemolinfa luego de la administración de la hormona recombinante, nos permitiría suponer que CHH participa en los procesos de osmorregulación, ya sea actuando en forma directa sobre los sistemas encargados de la iónico- y osmorregulación, como indirectamente aumentando los sustratos energéticos necesarios para la regulación de estos procesos.

Además, hemos determinado que ocurre una marcada disminución en la expresión de la enzima PEPCK bajo condiciones prolongadas de estrés térmico y salino; y que, por el contrario, la exposición aguda a baja temperatura y alta salinidad generó altos niveles de expresión de PEPCK. Por lo tanto, es muy probable que esta enzima participe en la respuesta inicial de los juveniles ante los cambios en las variables ambientales ensayadas en el presente trabajo.

En conjunto, los resultados obtenidos indicarían que CHH actúa sobre diferentes procesos de compensación, permitiendo mantener la homeostasis de los juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* ante situaciones de estrés. De esta manera, CHH participaría activamente en los mecanismos involucrados en preservar la energía destinada para el crecimiento. Por ello es importante destacar que, en este trabajo, al administrar CHH recombinante los animales incrementan significativamente su ganancia de peso, estimada entre un 200 y un 300 %.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo hacen un aporte significativo al conocimiento actual sobre las respuestas fisiológicas de *C. quadricarinatus* en situaciones de estrés térmico y salino; en particular, con nuestro estudio hemos demostrado que la hormona CHH cumple un papel importante en este tipo de estrés, estimulando el mantenimiento de la homeostasis general, lo cual se traduce en una mayor ganancia de peso del animal; considerando los atributos económicos asociados a la especie en estudio, los conocimientos generados en esta tesis contribuyen potencialmente al desarrollo de nuevas estrategias de cultivo a ser utilizadas en la producción acuícola.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Okuma, E., Amano, H., Noda, H. y K. Watanabe, 1999a. Role of free D- and L-alanine in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* to intracellular osmoregulation during downstream spawning migration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 123: 55-59.
- Abe, H., Okuma, E., Amano, H., Noda, H. y K. Watanabe, 1999b. Effects of seawater acclimation on the levels of free D- and L-alanine and other osmolytes in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus*. *Fisheries Science* 65: 949-954.
- Aguilar, M.B., Soyez, D., Falchetto, R., Arnott, D. y J. Shabanowitz, 1995. Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bowieri* (Ortmann): presence of a D-amino acid. *Peptides* 16: 1375–1383.
- Ahern, M.D. y S. Morris, 1999. Respiratory, acid-base and metabolic responses of the freshwater crayfish *Cherax destructor* to lead contamination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 124:105-111.
- Austin, C.M., 1995. Effect of temperature and salinity on the survival and growth of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*). *Freshwater Crayfish* 10: 419-426.
- Basu, A.C. y E.A. Kravitz, 2003. Morphology and monoaminergic modulation of crustacean hyperglycemic hormone-like immunoreactive neurons in the lobster nervous system, *J. Neurocytol.* 32:253–263.
- Barton, B.A. y C.B. Schreck, 1987. Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Transactions of the American Fisheries Society* 116: 257–263.
- Baumberger, J.P. y J.M.D. Olmsted, 1928. Changes in the osmotic pressure and water content of crabs during the molt cycle. *Physiological Zoology* 1: 531–544.
- Bayly, I.A.E. y W.D. Williams, 1973. *Inland Waters and Their Ecology*. Logman, Australia.
- Bergmann M, Taylor AC y M.P. Geoffrey, 2001. Physiological stress in decapod crustaceans (*Munida rugosa* and *Liocarcinus depurator*) discarded in the Clyde Nephrops fishery. *J Exp Mar Biol Ecol* 259:215–229

Bocking, D., Dirksen, H. y R. Keller, 2001. The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. In: Wiese K., editor. The crustacean nervous system. Berlin, Springer, pp. 84–97.

Bray, W.A., Lawrence, A.L. y J.R. Leung-Trujillo, 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaens vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 122:133–146.

Brett, J. R., 1979. Environmental factors and growth. Pages 599–675 en W. S. Hoar, D. J. Randall, and J. R. Brett, editors. *Fish physiology*, vol. 8. Bioenergetics and growth. Academic Press, New York, New York, USA.

Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Van Savage, M. y G.B. West, 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85: 1771-1789.

Bulau, P., Meisen, I., Reichwein-Roderburg, B., Peter-Katalinic, J. y R. Keller, 2003. Two genetic variants of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the Australian crayfish, *Cherax destructor*: detection of chiral isoforms due to posttranslational modification. *Peptides* 24: 1871–1879.

Cahansky, A., Medesani, D. y E.M. Rodríguez, 2008. Induction of ovarian growth in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, by the enkephalinergic antagonist naloxone: *in vivo* and *in vitro* studies. *Invertebrate Reproduction and Development* 51:61–67.

Canagaratman, P., 1959. Growth rates of fishes in different salinities. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 16: 121-130.

Chang, E.S., Keller, R. y S.A. Chang, 1998. Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *General and Comparative Endocrinology* 111: 359-366.

Chang, E.S. y J.D. O'Connor, 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: *The Biology of Crustacea*. Mantel, L.H. editor, Academic Press, New York, New York, Vol. 5, pp. 263-287.

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y D. E. Aiken, 1984. Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the American lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards, 1837 (Crustacea, Decapoda). 1-Juveniles. *General and Comparative Endocrinology* 54:8-19.

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y D.E. Aiken, 1989. Human somatotropin stimulates the growth of young American lobsters, *Homarus americanus* (Crustacea, Decapoda). *C. R. Acad. Sci. III* 308:21–26.

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y D. Towle, 2009. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. En: Evans, D.H. editor, *Osmotic and Ionic Regulation. Cells and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, New York, NY, Oxford, UK, pp. 165–230.

Charmantier-Daurers, M., Charmantier, G., Janssen, K.P.C., Aiken, D.E. y F. Van Herp, 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster, *Homarus americanus*. *General and Comparative Endocrinology* 94: 281–293.

Chaulet, A.; Medesani, D.A.; Freitas, J.; Cervino, A.; Cervino, N. y E.M. Rodríguez, 2012. Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), by ecdysone and insuline growth factor. Enviado a *Aquaculture*.

Chen SH, Lin CY y C.M. Kuo, 2004. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Mar Biotechnol (NY)* 6:83–94.

Chen SH, Lin CY y C.M. Kuo, 2005. In silico analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Mar Biotechnol (NY)* 7: 193–206.

Chomczynski, P. y N. Sacchi, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.

Chung, J.S., Dircksen, H. y S.G. Webster, 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13103–13107.

Chung, J.S. y S.G. Webster, 2003. Molt cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. From target to transcript. *European Journal of Biochemistry* 270: 3280–3288.

Chung, J.S. y S.G. Webster, 2005. Dynamics of in vivo release of molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology* 146: 5545–5551.

Chung, J.S. y S.G. Webster, 2006. Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its second messengers on gills and hindgut of the green shore crab, *Carcinus maenas*: a possible osmoregulatory role. *General and Comparative Endocrinology* 147: 206–213.

Chung, J.S. y N. Zmora, 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* – the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. *FEBS Journal* 275: 693–704.

Chung, J.S., Zmora, N., Katayama, H. y N. Tsutsui, 2010. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology* 166: 447-454.

Chung, J.S., 2010. Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 73: 1–13.

Cooke, I.M. y R.E. Sullivan, 1982. Hormones and neurosecretion. En: *The Biology of Crustaceans*, Bliss, D.E. editor, Academic Press, New York, New York, Vol. 3, pp. 205–290.

Dahlhoff, E., 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for Marine Ecological Studies. *Annual Review of Physiology* 66: 183-207.

Da Silva, R.S.M. y L.C. Kucharski, 1992. Effect of hypoosmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 101: 631-634.

Davey ML, Hall MR, Willis RH, Oliver RW, Thurn MJ y K.J. Wilson 2000. Five Crustacean Hyperglycemic Family Hormones of *Penaeus monodon*: Complementary DNA Sequence and Identification in Single Sinus Glands by Electrospray Ionization-Fourier Transform Mass Spectrometry. *Mar Biotechnol* (NY) 2:80-91.

Deaver, E., 1980. The Effects of Salinity on the Growth and Survival of the Crayfish, *Procambarus Acutus Acutus*. Old Dominion University theses. Oceanography. 130pp.

de Kleijn, D.P.V., Sleutels, F.J., Martens, G.J. y F. Van Herp, 1994. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Letters* 353: 255–258.

de Kleijn, D.P.V., Janssen, K.P., Martens, G.J. y F. Van Herp, 1994. Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *European Journal of Biochemistry* 224: 623– 9

de Kleijn, D.P.V., Janssen, K.P., Waddy, S.L., Hegeman, R. y W.Y. Lai, 1998. Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *Journal of Endocrinology* 156: 291–298.

de Kleijn, D.P.V. y F. Van Herp, 1998. Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 1998 33: 263– 72.

Dirksen, H. y U. Heyn, 1998. Crustacean hyperglycemic hormone-like peptides in crab and locust peripheral intrinsic neurosecretory cells. *Annual New York Academic Sciences* 839: 392–394.

Dirksen, H., Böcking, D., Heyn, U., Daufeldt, S., Baggerman, G., Verhaert, P., Chung, J.S., Soye, D., Plösch, T., Jaros, P.P. y S.G. Webster, 2000. Crustacean hyperglycaemic hormone-like peptides in similar peripheral and central neurosecretory cells of crustaceans and insects as spliced products of multiple genes. *Zoology* 103 (suppl. III) 81 pp.

Dirksen, H., Böcking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J.S., Baggerman, G., Verhaert, P., Daufeldt, S., Plosch, T., Jaros, P.P., Waelkens, E., Keller, R. y S.G. Webster, 2001. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial

organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochemistry Journal* 356: 159–70.

Dirección de Acuicultura, 2004. Algo más sobre el cultivo de la red claw (*Cherax quadricarinatus*), Argentina, 12 pp.

Dooley, P.C., Long, B.M. y J.M. West, 2000. Amino acids in haemolymph, single fibres and whole muscle from the claw of freshwater crayfish acclimated to different osmotic environments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 127:155-165.

Eckhardt, E., Pierrot, C., Thuet, P., Van Herp, F., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P. y G. Charmantier, 1995. Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *General and Comparative Endocrinology* 99: 169–177.

Edomi, P., Azzoni, E., Mettulio, R., Pandolfelli, N. y E.A. Ferrero, 2002. Gonad inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. *Gene* 284: 93–102.

Ellis, B.A. y S. Morris, 1995a. Effects of extreme pH on physiology of the Australian ‘Yabby’ *Cherax destructor*: acute and chronic changes in haemolymph carbon dioxide, acid-base and ionic status. *Journal of Experimental Biology* 198: 395-407.

Ellis, B.A. y S. Morris, 1995b. Effects of extreme pH on physiology of the Australian ‘Yabby’ *Cherax destructor*: acute and chronic changes in haemolymph oxygen levels, oxygen consumption and metabolite levels. *Journal of Experimental Biology* 198: 409-418.

Escamilla-Chimal, E.G., Van Herp, F. y M.L. Fanjul-Moles, 2001. Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish. *Journal of Experimental Biology* 204: 1073–1081.

Fanjul-Moles, M.L., 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology* 142: 390–400.

FAO, 2005. Veintidós documentos NASO (Visión General del Sector Acuícola Nacional) y Veintidós PAFAD (Análisis Prospectivo del Desarrollo futuro de la Acuicultura) para Veintidós países de América Latina y el Caribe (Argentina, Belize, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Chile, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Rep. Dominicana, Uruguay y Venezuela). Roma

FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma, 219 pp.

FAO, 2011. Aquaculture topics and activities. Trends in aquaculture production. Text by Alan Lowther y Stefania Vannuccini. FAO Fisheries and Aquaculture Department.

Faria, S.C., Augusto, A.S. y J.C. Mc Namara, 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *Journal of Comparative Physiology PartB* 181: 175–186.

Fisher, G.H., Arias, L., Quesada, L., D'Aniello, S., Errico, F., Di Fiore, M.M. y A. D'Aniello, 2001. A fast and sensitive method for measuring picomole levels of total free amino acids in very small amounts of biological tissues. *Amino Acids* 20: 163–173.

Freire, C.A., Amado, E.M., Souza, L.R., Veiga, M.P.T., Vitule, J.R.S., Souza, M.M. y V. Prodocimo, 2008a. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology PartA* 149: 435–446.

Freire, C.A., Onken, H. y J.C. Mc Namara, 2008b. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology PartA* 151: 272–304.

Fujimori, T. y H. Abe, 2002. Physiological roles of free D- and L-alanine in the crayfish *Procambarus clarkii* with special reference to osmotic and anoxic stress responses. *Comparative Biochemistry and Physiology PartA* 131: 893-900.

García-Guerrero, M., Villarreal, H. y I.S. Racotta, 2003. Effect of temperature on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology PartA* 135: 147-154.

Geary, N., Langhans, W. y E. Scharrer, 1981. Metabolic concomitants of glucagons induced suppression of feeding in the rat. *American Journal of Physiology* 241: R330–R335.

Gilles, R., 1997. “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and Perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 117: 279-290.

Gilles, R. y E. Delpire, 1997. En: *Handbook of Comparative Physiology* (Dantzler, W.H., Ed.), Oxford University Press, New York. Vol. 2, pp. 1523-1586.

Giulianini, P.G. y P. Edomi, 2006. Neuropeptides controlling reproduction and growth in Crustacea: a molecular approach. In: *Invertebrate neuropeptides and hormones: basic knowledge and recent advances*. Satake, H. editor. Trivandrum Kerala: Transworld Research Network, pp 225–252.

Giulianini, P.G., Pandolfelli, N., Lorenzon, S., Ferrero, E.A. y P. Edomi, 2002. An antibody to recombinant crustacean hyperglycemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. *Cell Tissue Research* 307: 243–54.

Glowik, R.M., Golowasch, J., Keller, R. y E. Marder, 1997. D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *Journal of Experimental Biology* 200: 1421–1431.

Gorgels-Kallen, J.L. y C.E.M. Voorter, 1985. The secretory dynamics of the CHH- producing cell group in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus*, in the course of the day/night cycle. *Cell Tissue Research* 241: 361–366.

Gorgels-Kallen, J.L. y F. Van Herp, 1981. Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). *Journal of Morphology* 170: 347–355.

Gruenefeld, B. y P.P. Jaros, 2003. *Procambarus clarkii* CHH-like protein mRNA, partial cds. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY256877.1>

Gu, P.L., Yu, K.L. y S.M. Chan, 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Letters* 472: 122–128.

Gu, P.L., Chu, K.H. y S.M. Chan, 2001. Bacterial expression of the shrimp molt inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Research* 303: 129–136.

Gu, P.L., Tobe, S.S., Chow, B.K., Chu, K.H., He, J.G. y S.M. Chan, 2002. Characterization of an additional molt inhibiting hormone-like neuropeptide from the shrimp *Metapenaeus ensis*. *Peptides* 23: 1875–1883.

Henry, R.P., Booth, C.E., Lallier, F.H. y P.J. Walsh, 1994. Variations in salinity, osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates. *Journal of Experimental Biology* 186:215-234.

Herreid, C.F. y R.J. Full, 1988. Energetics and locomotion. In: *Biology of the land crabs*. Burggren, W.W. y B.R. McMahon editores. Cambridge University Press, Cambridge pp. 333-377.

Hill, L. y E.A. Cancienne, 1963. *Grow Crawfish in Rice Fields*. En Louisiana State University Agricultural and Mechanical College. Agricultural extension division. Publication. Vol.1346. 11pp.

Ho, P.Y., Kuo, C.H., Kuo, C.M. y Y.N. Chen, 2002. Physiological responses of spotted grouper juveniles, *Epinephelus coioides* under acute thermal shock. *Journal of Fisheries Society Taiwan* 29: 275–285.

Holdich, D.M., Harlioglu M.M. y I. Firkins, 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44: 147–54.

Hsieh, S.L., Chen, S.M., Yang, Y.H. y C.M. Kuo, 2006. Involvement of norepinephrine in the hyperglycemic responses of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, under cold shock. *Comparative Biochemistry and Physiology, PartA* 143: 254–263.

Huberman A, Aguilar MB, Brew K, Shabanowitz J. y D.F Hunt, 1993. Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bowieri* (Ortmann): interspecies comparison. *Peptides* 14:7-16.

Huberman, A., Aguilar, M.B., Navarro-Quiroga, I., Ramos, L. y I. Fernández, 2000. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus) schmitti*. *Peptides* 21: 331–338.

Jones, C.M., 1995. Production of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae) II. Juvenile nutrition and habitat. *Aquaculture* 138: 239-245.

Jones, C.M., 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Queensland Department of Primary Industries. Australia. 109 p.

Jones, N.R., 1969. Meat and fish flavours. Significance of ribomononucleotides and their metabolites. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 17: 712-716.

Kallen, J.L. y S.L. Abrahamse, 1989. Functional aspects of the hyperglycemic hormone producing system of the crayfish *Orconectes limosus* in relation to its day/night rhythm. *General and Comparative Endocrinology* 74: 262

Kallen, J.L., Rigiani, N. y H.J.A.J. Trompenaars, 1988. Aspects of entrainment of CHH cell activity and hemolymph glucose levels in crayfish. *Biological Bulletin* 175: 137–143.

Kallen, J.L., S.L. Abrahamse y F. Van Herp, 1990. Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the hemolymph of crayfish. *Biological Bulletin* 179: 351–357.

Kamemoto, F. I., 1976. Neuroendocrinology of osmoregulation in decapods crustacea. *Am. Zool.* 16:141-150.

Kamemoto, F. I., 1991. Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. *Zool. Sci.* 8: 827-833.

Karplus, I., Zoran, M., Milstein, A., Harpaz, S., Eran, Y., Joseph, D. y A. Sagi, 1998. Culture of the Australian red-claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures. *Aquaculture* 166, 259–267.

Katayama, H., Ohira, T., Aida, K. y H. Nagasawa, 2002. Significance of a carboxylterminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides* 23: 1537–1546.

Katayama H, Nagata K, Ohira T, Yumoto F, Tanokura M. y H. Nagasawa, 2003. The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.* 278: 9620-9623.

Kawakami T, Toda C, Akaji K, Nishimura T, Nakatsuji T. y K. Ueno , 2000. Synthesis of a molt-inhibiting hormone of the American crayfish, *Procambarus clarkii*, and determination of the location of its disulfide linkages. *J Biochem* 128:455– 461.

Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G. y J. Peter-Katalinic, 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Letters* 255: 10–14.

Kegel G, Reichwein B, Tensen CP. y R. Keller, 1991. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family. *Peptides* 12:909-913.

Keller, R., 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48: 439–48.

Keller, R., Jaros, P.P. y G. Kegel, 1985. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *American Zoologist* 25: 207–221.

Keller, R. y H.P. Orth, 1990. Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: *Progress in Comparative Endocrinology*, A. Eppler, C.G. Stanes, M.H. Stetson editores, Wiley-Liss Inc., New York, Vol. 342, pp. 265–271.

Kirschner, L.B., 1991. Water and ions. In: Environmental and metabolic animal physiology. Comparative animal physiology. Prosser, C.L. editor, Wiley-Liss Inc., New York, pp. 13–107.

Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology* 207:1439-1452.

Klein, J.M., Mangerich, S., de Kleijn, D.P., Keller, R. y W.M. Weidemann, 1993. Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. *FEBS Letters* 334: 139–142.

Kleinholz, L. H., 1976. Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *Am. Zool.* 16: 151-166.

Konosu, S. y K. Yamaguchi, 1982. The flavor components in Fish and Shellfish. In: Chemistry and biochemistry of marine food products. The Avi Publishing Company, INC. Westport, Connecticut, pp. 367-404.

Konstantinov, A.S. y V.V. Martynova, 1993. Effect of salinity fluctuations on energetics of juvenile fish. *Journal of Ichthyology* 33: 161-166.

Kummer, G. y R. Keller, 1993. High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* 14: 103–108.

Kumlu, M. y D.A. Jones, 1995. Salinity tolerance of hatchery-reared postlarvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards originating from India. *Aquaculture* 130:287–296.

Kumlu, M., Eroldogan, O.T. y B. Saglamtimur, 2001. The effect of salinity and added substrates on growth and survival of *Metapenaeus monoceros* post-larvae (Decapoda: Penaeidae). *Aquaculture* 196:177–188.

Kuo, C.M. y Y.H. Yang, 1999. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Comparative Physiology PartB*, 169: 49–54.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lagadic, L., Caquet, T. y F. Ramade, 1994. The role of biomarkers in environmental assessment: 5. Invertebrate population and communities. *Ecotoxicology* 3: 193–208.

Lago-Lestón, A., Ponce, E. y M.A. Muñoz, 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture* 270: 343–357.

Lallier, F.H. y P.J. Walsh, 1992. Metabolism of isolated hepatopancreas cells from the blue-crab (*Callinectes sapidus*) under simulated postexercise and hypoxic conditions. *Physiol. Zool.* 65:712-723.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ y DG Higgins, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

Laufer, H., Biggers, W.J. y J.S.B. Ahl, 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *General and Comparative Endocrinology* 111:113–118.

Leuven, R.S.E.W., Jaros, P.P., Van Herí, F. y R. Keller, 1982. Species or group specificity in biological and immunological studies of crustacean hyperglycemic hormone. *General and Comparative Endocrinology* 46: 288–296.

Lorenzon S, Francese M y E.A. Ferrero, 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 167-176.

Lorenzon S, Giulianini PG. y EA. Ferrero, 1997. Lipopolysaccharide-induced hyperglycemia is mediated by CHH release in crustaceans. *General and Comparative Endocrinology.* 108:395-405.

Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettullo, R. y E.A Ferrero, 2004. Variation of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *Journal of Experimental Biology* 207:4205–4213.

Lorenzon, S., P. Edomi, P.G. Giulianini, Mettullo, R. y E.A. Ferrero, 2005. Role of biogenic amines and cHH in the crustacean hyperglycemic stress response, *Journal of Experimental Biology* 208: 3341–3347.

Loyacano, H., 1967. Some effects of salinity on two populations of red swamp crawfish, *Procambarus clarkii*. *Proceedings of the 21st Annual Conference, Southeastern Association of Game and Fish Commissioners* 21:423–434.

Lucas, A. 1996. *Bioenergetics of Aquatic Animals*, Taylor and Francis Ltd, London.

McCoid, V., R. Miget y G. Finne. 1984. Effect of environmental salinity on the free amino acid composition and concentration in Penaeid shrimp. *Journal of Food Science* 49: 327-330.

McMahon, B. R. Y S. A. Stuart. 1999. Haemolymph gas exchange and ionic and acid-base regulation during long-term air exposure and aquatic recovery in *Procambarus clarkii*. *Freshwater Crayfish* 12: 134-153.

McMahon, B. R. 2002. *Physiological Adaptation to Environment*. En: Holdrich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, New York, pp. 327–376.

McNamara, J.C., 1987. The time course of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 107:245–251.

McNamara J.C., Rosa J.C., Greene L.J., Augusto A. 2004. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. *Mar Freshwat Behav Physiol* 37:193–208.

Mantel, L. H., 1985. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Am. Zool.* 25:253-263.

Mantel, L. y L. L. Farmer. 1983. Osmotic and ionic regulation. En: D. E. Bliss, *The Biology of Crustacea*. L. H. Mantel, ed., Vol. 5, páginas 53-161. Academic Press, New York.

Marco HG, 2004. Unity and diversity in chemical signals of arthropods: the role of neuropeptides in crustaceans and insects. International Congress Series 1275:126–133.

Martínez-Pérez, F., S. Zinker, G. Aguilar, J. Valdés y H. Aréchiga. 2005. Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Peptides 26:2434-2444.

Masser, M.P. y D.B. Rouse, 1997. Australian red claw crayfish. SRAC Publication, USA, n° 244, pp. 8.

Mayer, F. L., D. J. Versteeg, M. J. McKee, L. C. Folmar, R. L. Graney, D. C. McCume, y B. A. Rattner. 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. En: Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress, editado por R.J Huggett, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr. y H.L. Bergman. SETAC Special Publications Series. Ed. Lewis Publishers, 347 pp. 5-85.

Meade, M. E., J. E. Doeller, D. W. Kraus, y S. A. Watts, 2002. Effects of temperature and salinity on weight gain, oxygen consumption rate, and growth efficiency in juvenile red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Journal of the World Aquaculture Society 33:188-198.

Mettulio R, Edomi P, Ferrero EA, Lorenzon S y PG Giulianini, 2004. The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the prohormone but not in the mature peptide. Peptides 25: 1899–1907.

Meyer, S., Hoppner W. y H. J. Seitz, 1991. Transcriptional and post-transcriptional effects of glucose on liver phosphoenolpyruvate-carboxykinase gene expression. Eur. J. Biochem. 202:985-991.

Mills BJ (1978). Yabby aquaculture studies. SAFIC 2: 10-11.

Mills BJ (1989). Australian crayfish handbook of aquaculture. Freshwater crayfish Aquac. Res. Manag Lymington, Tasmania, pp. 116.

Morales, Q.V.V y R.R. Morales, 2006. Síntesis regional del desarrollo de la acuicultura. 1. América Latina y el Caribe – 2005/Regional review on aquaculture development. 1. Latin America and the Caribbean – 2005. FAO Circular de Pesca No. 1017/1. Roma, FAO. 177 pp.

Morris, S. 1999. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. South African Journal of Zoology 33(2).

Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. Journal of Experimental Biology 204: 979-989.

Morrissy, N.M., Evans, L.E., Huner J.V. 1990. Australian freshwater crayfish: aquaculture species. World aquaculture 21: 113-122.

Morrissy NM, Bird C y G. Cassells, 1995. Density-dependent growth of cultured marron *Cherax tenuimanus* (Smith 1912). Freshwater Crayfish 10:560.

Mosco A, Edomi P, Guarnaccia C, Lorenzon S, Pongor S, Ferrero, E.A. y P.G. Giulianini, 2008. Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. Regulatory Peptides 147:88–95.

Muramoto, A. 1988. Endocrine control of water balance in decapod crustaceans. Páginas 341-356 en Laufer, H. y R. G. H. Downer (eds). Endocrinology of selected invertebrate types, volumen 2. A. R. Liss, New York.

NACA/FAO. 2001. Aquaculture in the Third Millennium. En: R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds). Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. Bangkok/Rome. 471 pp.

Nagai, C., N. Shinji y H. Nagasawa, 2011. Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas*. General and Comparative Endocrinology 172:293–304.

Nery, L. E. M. y E. A. Santos. 1993. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology PartB*, 106: 747-753.

Newsom, J. E. y K. B. Davis, 1994. Osmotic responses of haemolymph in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. zonangulus*) to changes in temperature and salinity. *Aquaculture* 126: 373-381.

Nikinmaa, M. y K.T. Rytönen, 2012. From genomes to functions in aquatic biology. *Mar. Genomics* 5:1-6.

Nyström, P., 2002. Ecology. En: Holdrich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, New York, pp. 192–235.

Ohira, T., Nishimura, T., Sonobe, H., Okuno, A., Watanabe, T., Nagasawa, H., Kawazoe I. y K. Aida, 1999. Expression of a recombinant Molt-Inhibiting Hormone of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 1576–1581.

Okuma, E. y H. Abe, 1994. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology PartA*, 109: 191-197.

Onken, H., K. Graszynski y W. Zeiske, 1991. Na⁺ independent, electrogenic Cl⁻ uptake across the posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*): Voltage-clamp and microelectrode studies. *J. Comp. Physiol. PartB*, 161:293-301.

Onken, H. y M. Putzenlechner, 1995. A V-ATPase drives active, electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology* 198:767-774.

Otto, R.G., 1971. Effects of salinity on the survival and growth of pre-smolt cho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 28: 343-349.

Papadopoulos, L. S. y G. Finne, 1986. Effect of environmental salinity on sensory characteristics of Penaeid shrimp. *Journal of Food Science* 51: 812-814.

Parmegiani Jahn, M., Cavagni, G.M., Kaiser, D., Kucharski, L.C., 2006. Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334, 1–9.

Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15: 1-60.

Phillips, J.W., McKinney, R.J.W., Hird, F.J.R. y D.L. MacMillan, 1977. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 56:427-433.

Pierrot, C., E. Eckhardt, F. Van Herp, M. Charmantier-Daures, G. Charmantier y J.-P. Trilles, P. Thuet. 1994. Effet d'extraits de glandes du sinus sur la physiologie osmorégulatrice de branchies perfusées du crabe *Pachygrapsus marmoratus*, *C.R. Acad. Sci.* 317: 411–418.

Ponce, P.J., Arredondo, F.J., Romero, X. 1999. Análisis del cultivo comercial de la langosta de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*): y su posible impacto en América Latina. *Contactos*, UAM, México, DF.

Prymaczok, N.C., Medesani, D.A. y E.M. Rodríguez, 2008. Levels of ions and organic metabolites in the adult freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, exposed to different salinities. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* 48:121–130

Randall, D.J., Burggren, W. y K. French, 2002. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Company, New York.

Rasmussen, A.D. y O. Andersen, 1996. Apparent water permeability as a physiological parameter in crustaceans. *Journal of Experimental Biology* 199: 2555–2564.

Reddy, P.S. y B. Kishori, 2001. Methionine–enkephalin induces hyperglycemia through eyestalk hormones in the estuarine crab *Scylla serrate*. *Biological Bulletin* 201:17–25.

Reddy, P.S. y R. Ramamurthi, 1986. Influence of eyestalk hormone(s) on the whole animal and tissue respiration of freshwater field crab *Oziotelphusa senex senex* (Fabricius). *J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol.* 1:69-74.

Reddy PS, Katayayani RV y M. Fingerman, 1996. Cadmium and Naphthalene induced hyperglycemia in the fiddler crab *Uca pugilator*. Differential modes of action on the neuroendocrine system. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 425-431.

Riestenpatt, S., W. Zeiske y H. Onken, 1994. Cyclic AMP stimulation of electrogenic uptake of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. Journal of Experimental Biology 188:159-174.

Rink R, Arkema-Meter A, Baudoin I, Post E, Kuipers A, Nelemans SA, Akanbi MH y G.N. Moll, 2010. To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. J Pharmacol Toxicol Methods 61:210–218.

Rowe, C. L., W. A. Hopkins, C. Zehnder, y J. D. Congdon, 2001. Metabolic cost incurred by crayfish (*Procambarus acutus*) in a trace element-polluted habitat: further evidence of similar responses among diverse taxonomic groups. Comparative Biochemistry and Physiology PartC, 129: 275-283.

Romano, N. y C. Zeng, 2006. The effects of salinity on the survival, growth and haemolymph osmolality of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. Aquaculture 260:151–162.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A. y A. Van Wormhoudt, 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrates levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259:1-22.

Rouse, D.B. y I. Kartamulia, 1992. Influence of salinity and temperature on molting and survival of the Australian freshwater crayfish (*Cherax tenunimanus*). Aquaculture 105:47–52.

Ruscoe, I.M., Shelley, C.C. y G.R Williams, 2004. The combined effects of temperature and salinity on growth and survival of juvenile mud crabs (*Scylla serrata*). Aquaculture 238:239–247.

Rutledge, P.R., 1981. Circulation and oxygen transport during activity in the crayfish. *Pacifastacus leniusculus*. American Journal of Physiology 240: 99–105.

Rutledge, P.R. y A.W. Pritchard, 1981. Scope for activity in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. American Journal of Physiology 240 R9: 87–92.

Sang, H.M. y R. Fotedar, 2004. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (*Penaeus latisculcatus* Kishinouye, 1896) reared at different salinities. *Aquaculture* 234:601-614.

Santiesteban, D., Amilcar Arenal, L.M., Franco, R. y J. Sotolongo, 2010. Tilapia growth hormone binds to a receptor in brush border membrane vesicles from the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 306:338–342.

Santos, E. A. y R. Keller, 1993a. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 106: 343–347.

Santos, E. A. y R. Keller, 1993b. Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system, *Journal of Comparative Physiology Part A*, 163:374–379.

Santos, E. A. y L. E. Nery, 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 87: 1033-1035.

Santos, E.A., Keller, R., Rodríguez, E. y L. López, 2001. Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34:75–80.

Santos EA, L.E. Nery, R. Keller y A.A. Goncalves, 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol Zool* 70: 415–420.

Scheer, B.T., Reddy, P.S. y R. Ramamurthi, 1986. Neuroendocrine control of oxidative metabolism in the Indian field crab, *Oziotelphusa senex senex* Fabricius. 2. Tissue respiration and enzyme activity. *Comparative Biochemistry Physiology Part A*, 84:1-6.

Scudamore, H. H., 1947. The influence of sinus gland upon molting and associated changes in the crayfish. *Physiol. Zool.* 20: 187-208.

Sedlmeier, D., 1982. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II. Involvement of glycogen synthase, *General and Comparative Endocrinology*. 47:426–432.

Sedlmeier, D., 1985. Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone, *Am. Zool.* 25: 223–232.

Sedlmeier, D., 1987. The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Physiol.* 87:423–425.

Sedlmeier, D., 1988. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory Peptides* 20: 91–98.

Sedlmeier, D. y G. Dieberg. 1982. Action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on adenylate-cyclase and phosphodiesterase in crayfish abdominal muscle, *General and Comparative Endocrinology* 46:384–385.

Sedlmeier, D. y R. Keller, 1981. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *General and Comparative Endocrinology* 45:82–90.

Serrano, L., G. Blanvillain, D. Soye, G. Charmantier, E. Grousset, F. Aujoulat, y C. Spanings-Pierrot, 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Biology* 206:979-988.

Schein, V., Y. Wache, R. Etges, L.C. Kucharski, A. van Wormhoudt y R.S. Da Silva, 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle, *FEBS Lett.* 561:202–206.

Schein, V., Fernandes Chitto, A.L., Etges, R., Kucharski, L.C., van Wormhoudt, A. y R.S.M. Da Silva, 2005. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 316:203–212.

She, P., Shiota, M., Shelton, K.D., Chalkley, R., Postic, C. y M.A. Magnuson, 2000. PEPCK is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20:6508-6517.

Shetlar, R.E. y D.W. Towle. 1989. Electrogenic sodium-proton exchange in membrane vesicles from crab (*Carcinus maenas*) gill. *American Journal of Physiology* 257:924-31.

Sonobe H, Nishimura T, Sonobe M, Nakatsuji T, Yanagihara R, Kawakami T. y S. Aimoto, 2001. The molt-inhibiting hormone in the American crayfish *Procambarus clarkii*: its chemical synthesis and biological activity. *General and Comparative Endocrinology* 121:196-204.

Sook Chung, J., Zmora, N., Katyama, H., Tsutsui, N., 2010. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology* 166, 447-454.

Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. *Biometry*, second ed. Freeman, New York, 832 pp.

Souza, S.C.R. 1989. Influencia de neurofactores no consumo de oxigenio e nas concentracoes osmotica e ionica da hemolinfa em *Macrobrachium potiuna* (Muller, 1980) (Crustacea, Palaemonidae). Tesis doctoral, Universidad de San Pablo, San Pablo, Brasil.

Soyel, I.H. y M. Kumulu, 2003. The effects of salinity on postlarval growth and survival of *Penaeus semisulcatus*. *Turkish Journal of Zoology* 27:221-225.

Soyez, D., 1997. Occurrence and diversity of neuropeptides from the crustacean hyperglycemic hormone family in arthropods. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 814, 319-323.

Soyez, D., Van Deijnen J.E. y M. Martin, 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology* 244: 479-484.

Soyez, D., Van Herp, F., Rossier, J., Le Caer, J.P., Tensen, C.P. y R. Lafont, 1994. Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. D-amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides. *J. Biol. Chem.* 269:18295-18298.

Spanings-Pierrot, C., D. Soyez, F. Van Herp, M. Gompel, G. Skaret, E. Grousset, y G. Charmantier, 2000. Involvement of crustacean hyperglucemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology* 119: 340-350.

Stentiford GD, Chang ES, Chang SA y D.M. Neil, 2001. Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). *General and Comparative Endocrinology* 12:13 – 22.

Straus, O. y Grasinski, K., 1992. Isolation of plasma membrane vesicles from the gill epithelium of the crayfish, *Orconectes limosus*, Rafinesque and the properties of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Comparative Biochemistry Physiology* 102:519–26.

Toullec, J.Y., Le Moullac, G.L., Gérard, C. y A. Van Wormhoudt, 1991. Immunoreactive human growth hormone like peptides in tropical Penaeids and the effect of dietary hGH on *Penaeus vannamei* larval development. *Aquat. Living Resour.* 4:125–132.

Towle, D.W., 1990. Sodium transport systems in gills. En: *Comparative Aspects of Sodium Co-transport Systems*, Vol. 7, (eds R.K.H. Kinne & S. Farmington), pp. 241–63. Karger, Basle.

Tsutsui N, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H, Wilder MN, et al. (2005) The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen Comp Endocrinol* 144: 232–239.

Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount of tissue. *Analytical Biochemistry* 11:256–265.

Van Herí, F. y H.J.M. Van Buggenum, 1979. Immunocytochemical localization of hyperglycemic hormone (HGH) in the neurosecretory system of the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Experientia* 35:1527-1528

Vijayan, M.M., Mommsen, T.P., Glemet, H.C., Moon, T.W., 1996. Metabolic effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *Journal of Experimental Biology* 199:1509–1514.

Vijayan, M.M., Pereira, C., Graul, E.G., Lwama, G.K., 1997. Metabolic responses to confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology PartC*, 116:89–95.

Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdrich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, New York, pp. 64–87.

Walker, S.J., Neill, W.H., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M., 2009. Effect of salinity and body weight on ecophysiological performance of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 380, 119–124.

Wang, W.-N., A.-L. Wang, L. Bao, J.-P. Wang, Y. Liu y R.-Y. Sun, 2004. Changes of protein-bound and free amino acids in the muscle of the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* in different salinities. *Aquaculture* 233: 561-571.

Webster, S.G., 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *Journal of Experimental Biology* 199:1579–1585.

Webster, S.G., 1998. Neuropeptides inhibiting growth and reproduction in crustaceans. En: Coast GM, Webster, SG, eds. *Recent advances in arthropod endocrinology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 33-52.

Webster, S.G. y R. Keller, 1986. Purification, characterisation and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J Comp Physiol PartB*, 156: 617–624.

Webster SG, H. Dircksen y J.S. Chung, 2000. Endocrine cells in the gut of the shore crab *Carcinus maenas* immunoreactive to crustacean hyperglycemic hormone and its precursor-related peptide. *Cell Tissue Res* 300:193–205.

Webster, S.G., Keller, R. y H. Dircksen, 2012. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 175:217-233.

Weidemann, W., J. Gromoll y R. Keller, 1989. Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Lett* 257: 31–34.

Wheatly, M. G., S. C. R. de Souza, y M. K. Hart, 1996. Related changes in haemolymph acid-base status, electrolytes, and ecdysone in intermoult crayfish (*Procambarus clarkii*) at 23°C during extracellular acidosis induced by exposure to air, hyperoxia, or acid. *Journal of Crustacean Biology* 16: 216-277.

Wheatly, M. G. y A. Gannon, 1995. Ion regulation in crayfish: Freshwater adaptation and the problem of molting. *American Zoologist* 35: 49-59.

Wheatly, M.G. y B.R. McMahon, 1982a. Responses to hypersaline exposure in the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. I. The interaction between ionic and acid–base regulation. *Journal of Experimental Biology* 99: 425–445.

Wheatly, M.G. y B.R. McMahon, 1982b. Responses to hypersaline exposure in the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. II. Modulation of haemocyanin oxygen-binding in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Biology* 99:447–467.

Wingfield, M., 1998. Queensland Department of Primary Industries. Australia.

Withnall, F., 2000. Biology of Yabbies (*Cherax destructor*). *Aquaculture Notes*.

Wolvekamp, H. P. y T. H. Waterman, 1960. Respiration. Páginas 35-100 en Waterman, T. H. ed. *The Physiology of Crustacea*, volumen 1. Academic Press, INC, New York, New York.

Xu, B., Zhang, P.J., Mai, Y.L. y H.Z. Miao, 2000. Studies of the effects of recombinant fish growth hormone on survival and growth enhancement of Chinese prawn *Penaeus chinensis*. *Mar. Sci.* 24:54–56.

Yang, J., Satish C. Kalhan y R. W. Hanson, 2009a. What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? *The journal of biological chemistry* 284:27025–27029.

Yang, J., L. Reshef, H. Cassuto, G. Aleman y R.W. Hanson, 2009b. Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* 284: 27031–27035.

Yano, I., 2000. Endocrine control of reproductive maturation in economically important crustacea for aquaculture. En: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. X. Wiley, New York, pp. 161–194.

Yasuda A, Yasuda Y, Fujita T. y Y. Naya, 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *General and Comparative Endocrinology* 95:387-398.

Yavuzcan Yildiz, H., Köksal, G. y A. Caglan Karasu Benli, 2005. Physiological response of the crayfish, *Astacus leptodactylus* to saline water. *Crustaceana* 77:1271-1276.

Zapata, V., López Greco, L.S., Medesani, D.A. y E.M. Rodríguez, 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata*, induced by hormones and neuroregulators throughout the year. *In vivo* and *in vitro* studies. *Aquaculture* 22:339–352.

Zare, S. y P. Greenaway, 1998. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na⁺K⁺-ATPase and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 119: 739-745.

Zhou, M., Wang, A., J. Xian, 2011. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Effects of continuous cold stress. *Aquaculture* 317:182–186.