

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-CONICET

**FISIOLOGÍA BIOQUÍMICA DIGESTIVA DE
CRUSTÁCEOS DECÁPODOS: ESTUDIO INTEGRATIVO
SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS EN
CANGREJOS EURIHALINOS**

Autora: María Soledad Michiels

Directora: Dra. Alejandra A. López Mañanes

Co-Directora: Dra. Juana Cristina del Valle

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS

ÁREA BIOLOGÍA

Año 2015

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad
y la energía atómica: la voluntad.”*

Albert Einstein

Parte de los resultados de la presente Tesis han sido publicados. Como reconocimiento y agradecimiento a los co-autores de estos trabajos se detallan a continuación las citas correspondientes.

- Michiels, M.S; del Valle, J.C.; López Mañanes, A.A. “Effect of environmental salinity and dopamine injections on key digestive enzymes in hepatopancreas of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda: Brachyura: Varunidae” *Scientia Marina*, 77(1), 129-136, (2013) doi: 10.3989/scimar.03687.09D ISSN 0214-8358

Resúmenes publicados en revistas con referato indexadas (En inglés)

- Michiels, M.S., del Valle, J.C.; López Mañanes, A.A. “Digestive flexibility at the biochemical level in the euryhaline crab *Neohelice granulata* from Mar Chiquita coastal lagoon: effect of an abrupt change of salinity on lipase and proteolytic activity in the hepatopancreas” Abstracts XIII Congress- XXXI Annual Meeting Rosario Biology Society, Rosario, Argentina *Biocell* 36(1), 33, 2012, ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).

“Fisiología Bioquímica Digestiva De Crustáceos Decápodos: Estudio Integrativo

Sobre La Actividad De Enzimas Digestivas En Cangrejos Eurihalinos”

Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue realizar un estudio integrativo de caracterización y modulación de la actividad de enzimas digestivas en cangrejos eurihalinos. En este contexto, se realizaron estudios en los cangrejos eurihalinos *Neohelice granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires) con el fin de determinar la existencia y características bioquímicas de actividad de enzimas digestivas clave; posibles vías de regulación y mensajeros químicos primarios e intracelulares involucrados; la posible modulación diferencial de enzimas digestivas en relación a diferentes condiciones de salinidad (que impliquen estados osmorregulatorios diferenciales) para determinar la existencia de respuestas y de modulación integrales de la actividad de enzimas digestivas y reservas de energía específicas. Para cumplir con el objetivo se llevaron a cabo estudios de caracterización parcial de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1); de determinación de la existencia, caracterización parcial y modulación por dopamina de la actividad de aminopeptidasa-N (APN) en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 2), de modulación de la actividad de lipasa por dopamina, AMPc y glucagón y del contenido de triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 3); del efecto de alta y baja salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas y contenidos de reservas de energía a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* (capítulo 4); del efecto de un cambio abrupto de alta a baja salinidad sobre la actividad de

enzimas digestivas y contenidos de reservas de energía en individuos de *N. granulata* (Capítulo 5); de caracterización parcial y de modulación por salinidad ambiental y aminos biogénicas de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de *C. angulatus* (Capítulo 6). Los resultados de la presente tesis representan un enfoque original que permite ampliar el escaso conocimiento actual sobre diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva de cangrejos eurihalinos en general. Así mismo esta investigación brinda datos sobre ajustes a nivel bioquímico-fisiológico y mecanismos de regulación en cangrejos hiper/hiporreguladores en particular.

Palabras clave: Enzimas digestivas, hepatopáncreas, flexibilidad fenotípica, mensajeros químicos, reservas de energía, cangrejos eurihalinos.

Abstract

The general aim was to conduct integrative studies of characterization and modulation of the activity of digestive enzymes in euryhaline crabs. In this context, studies were conducted in the euryhaline crabs *Neohelice granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* of Mar Chiquita coastal lagoon (Prov. de Buenos Aires) in order to determine the occurrence and biochemical characteristics of the activity of key digestive enzymes; potential regulatory pathways and primary chemical messengers and intracellular messengers involved; the possible differential modulation of digestive enzymes in relation to different salinity conditions implying differential osmoregulatory states in order to establish the occurrence of integrative responses and modulation of the activity of digestive enzymes and specific energy reserves. To achieve this aim, different studies were carried out: studies of partial characterization of trypsin activity in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 1); characterization and modulation of dopamine of the activity of aminopeptidase- N (APN) in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 2), modulation of lipase activity by dopamine, AMPc and glucagon and triglycerides content in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 3); the effect of high and low salinity on responses of digestive enzyme activity and content of energy reserves at different times after food intake in individuals of *N. granulata* (chapter 4); effect of an abrupt change from high to low salinity on digestive enzyme activity and content of energy reserves in individuals of *N. granulata* (Chapter 5); characterization and modulation by environmental salinity and biogenic amines of the activity of digestive enzymes in the hepatopancreas of *C. angulatus* (Chapter 6). The results represent an original approach that can extend the limited knowledge on various aspects of biochemistry digestive physiology of euryhaline crabs in general and adjustments at the biochemical-

physiological level and mechanisms of regulation in hyper / hypo-regulating crabs covering an area of vacancy in biochemical, ecological and adaptive physiology.

Key words: digestive enzymes, hepatopancreas, phenotypic flexibility, chemical messengers, energy reserves, euryhaline crabs.

Agradecimientos

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial, a la Dra. Alejandra López Mañanes y a la Dra. Cristina del Valle, directora y co-directora de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeras del Laboratorio de Fisiología Bioquímica Adaptativa e Integrativa, Dra. Silvina Pinoni, Lic. Antonela Asaro y Lic. Eugenia Mendez, por el respaldo y la amistad que me han brindado.

A la Lic. Ana Panzeri y a Patricia Strazza, por escucharme en momentos difíciles de esta etapa.

Agradecer a mis amigos de siempre: Irene, Vero, Lu, Anita, Diego, Andres y Kari. Quienes durante años han sido mi gran apoyo en todo momento.

A mi familia, a mis padres, mi hermana, mi abuela, mi tío y prima, infinitas gracias por estar siempre.

A mi sobrino/ahijado, Valentino que tantas veces no he podido cumplirle, espero que cuando seas más grande y leas la tesis de la tía entiendas el porque de tantas ausencias.

A mi pareja, mi compañero y amigo, por la comprensión, paciencia y el ánimo que me diste en todo momento.

Finalmente, agradezco a quienes no están presentes, pero que guían cada uno de mis logros, para mi abuelo querido y mi tía Angie, este trabajo es para ustedes.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud

Contenidos

<u>Introducción General</u>	1
<u>CAPÍTULO 1:</u>	7
<u>Actividad de tripsina en hepatopáncreas de Neohelice granulata: caracterización parcial</u>	7
<u>Introducción</u>	8
<u>Materiales y Métodos</u>	10
<u>Productos químicos</u>	10
<u>Captura y mantenimiento de los animales</u>	10
<u>Preparación de extractos enzimáticos</u>	11
<u>Determinación de la actividad de tripsina</u>	11
<u>Determinación de la concentración de proteínas</u>	12
<u>Análisis estadístico</u>	12
<u>Resultados</u>	13
<u>Actividad de tripsina en hepatopáncreas de N. granulata</u>	13
<u>DISCUSIÓN</u>	16
<u>CAPÍTULO 2</u>	19
<u>Actividad de N-aminopeptidasa en hepatopáncreas de Neohelice granulata: Caracterización parcial y modulación por dopamina</u>	19
<u>Introducción</u>	20
<u>Materiales Y Métodos</u>	23
<u>Productos químicos</u>	23
<u>Captura y mantenimiento de los animales</u>	23
<u>Preparación de extractos enzimáticos de hepatopáncreas de N. granulata</u>	23

<u>Determinación de la actividad de APN</u>	24
<u>Determinación de la concentración de proteínas</u>	25
<u>Análisis estadístico</u>	25
<u>Resultados</u>	25
<u>Actividades de APN en hepatopáncreas de Neohelice granulata: efecto del pH, temperatura, L-Ala y bestatina</u>	25
<u>Actividade de APN en hepatopáncreas de Neohelice granulata: efecto dopamina 10⁻⁴M</u>	30
<u>Discusión</u>	31
CAPÍTULO 3	35
<u>Actividad de lipasa sensible a dopamina, glucagón y AMPc en hepatopáncreas de Neohelice granulata</u>	35
<u>Introducción</u>	36
<u>Materiales y Métodos</u>	38
<u>Productos químicos</u>	38
<u>Sitios de estudio y recolección de animales</u>	39
<u>Efecto de dopamina DA, AMPc y glucagón sobre la actividad de la lipasas y concentración de triglicéridos en hepatopáncreas</u>	39
<u>Determinación de la actividad de lipasa</u>	39
<u>Determinación de la concentración de proteínas</u>	40
<u>Determinación de la concentración de triglicéridos</u>	40
<u>Análisis estadístico</u>	40
<u>Resultados</u>	41
<u>Efecto in vitro de dopamina, glucagón y AMPc sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de Neohelice granulata</u>	41
<u>Concentración de triglicéridos hepatopáncreas de Neohelice granulata</u>	43

<i>Discusión</i>	47
CAPÍTULO 4	52
<i><u>Flexibilidad fenotípica en respuesta a baja y alta salinidad en Neohelice granulata: enzimas digestivas y reservas de energía</u></i>	52
<i>Introducción</i>	53
<i>Materiales y Métodos</i>	57
<i>Captura y mantenimiento de los animales</i>	57
<i>Preparación de muestras</i>	58
<i>Osmolalidad de la hemolinfa</i>	59
<i>Determinación de actividades enzimáticas</i>	60
<i>Determinación de la concentración de triglicéridos</i>	60
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	60
<i>Análisis estadísticos</i>	61
<i>Resultados</i>	61
<i><u>Osmolalidad de la hemolinfa y capacidad osmorregulatoria en alta y baja salinidad a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento</u></i>	61
<i><u>Actividades de enzimas digestivas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad</u></i>	63
<i><u>Actividad de lipasa</u></i>	63
<i><u>Actividad proteolítica total</u></i>	65
<i><u>Actividad de Aminopeptidasa-N</u></i>	67
<i><u>Contenido de sustratos de energía en hepatopancreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad</u></i>	69
<i><u>Triglicéridos (TG)</u></i>	69
<i><u>Contenido de sustratos de energía en músculo de la quela luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad</u></i>	72

<u>Triglicéridos (TG)</u>	72
<u>Proteínas</u>	74
<u>Contenido de sustratos de energía en branquias anteriores y posteriores luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad</u>	76
<u>Triglicéridos (TG)</u>	76
<u>Proteínas</u>	77
<i>Discusión</i>	79
CAPÍTULO 5:	90
<i>Flexibilidad fenotípica en respuesta a un cambio abrupto de salinidad: actividad de enzimas digestivas y reservas de energía en</i>	90
<i>Neohelice granulata</i>	90
<i>Introducción</i>	91
<i>Materiales y Métodos</i>	93
<i>Productos químicos</i>	93
<i>Sitios de estudio y recolección de animales</i>	93
<i>Preparación de muestras</i>	94
<i>Osmolalidad de la hemolinfa</i>	94
<i>Determinación de las actividades enzimáticas</i>	94
<i>Análisis estadísticos</i>	94
<i>Resultados</i>	95
<u>Efecto de un cambio abrupto de alta a baja salinidad en individuos alimentados</u> ..	95
<u>Osmolalidad de la hemolinfa y capacidad osmorregulatoria</u>	95
<u>Actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas</u>	97
<u>Concentración de reservas de energía en hepatopáncreas</u>	101
<u>Concentración de reservas de energía en músculo de la quela y branquias</u>	103

<u>DISCUSIÓN</u>	104
<u>Capítulo 6</u>	108
<u>Estudios de caracterización parcial y modulación de actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de <i>Cyrtograpsus angulatus</i></u>	108
<u>Introducción</u>	109
<u>Materiales y Métodos</u>	112
<u>Productos químicos</u>	112
<u>Captura y mantenimiento de los animales</u>	112
<u>Efecto in vivo de aminas biogénicas sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas</u>	113
<u>Efecto in vitro de aminas biogénicas sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas</u>	113
<u>Preparación de extractos enzimáticos</u>	113
<u>Determinación de la concentración de proteínas</u>	113
<u>Análisis estadístico</u>	114
<u>Resultados</u>	115
<u>Actividad de lipasa en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i></u>	115
<u>Caracterización de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i></u>	118
<u>Caracterización de la actividad de APN en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i></u>	120
<u>Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i></u>	123
<u>Efecto in vivo de aminas biogénicas sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i></u>	128
<u>Actividad de lipasa</u>	128
<u>Actividad proteolítica total</u>	130
<u>Actividad de APN</u>	131
<u>Efecto in vitro de aminas biogénicas sobre la actividad de enzimas digestivas en</u>	

<u>hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i></u>	131
<u>Actividad de lipasa</u>	131
<u>Actividad proteolítica total</u>	132
<u>Actividad de tripsina</u>	133
<u>Discusión</u>	134
<u>Discusión General y Consideraciones finales</u>	142
<u>Bibliografía</u>	147

Introducción General

Los estudios sobre diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva constituyen un área de fundamental importancia para el conocimiento integrado de estrategias digestivas a nivel bioquímico-fisiológico. Conocer las características de los parámetros digestivos y metabólicos a nivel bioquímico y los ajustes en los mismos en relación a variaciones en el ambiente constituye una herramienta fundamental para evaluar la performance de los individuos, particularmente, en ambientes altamente heterogéneos (del Valle y López Mañanes, 2012). Sin embargo, estudios en grupos de importancia ecológica tales como cangrejos eurihalinos intermareales son escasos o ausentes. Además, a pesar de la importancia del conocimiento de las características bioquímicas y la modulación de la actividad de enzimas digestivas clave, existe una gran falta de información sobre las mismas en cangrejos eurihalinos así como sobre la fisiología bioquímica digestiva en general de estos organismos.

La flexibilidad fenotípica, una categoría de plasticidad fenotípica, implica variaciones reversibles a distintos niveles (desde molecular a comportamental), dentro de un individuo, las cuales pueden incrementar las chances de supervivencia de los animales que enfrentan cambios espacio-temporales en las condiciones ambientales. Estos cambios reversibles les permiten a los individuos adaptarse favorablemente al régimen ambiental prevalente (Piersman y Drent 2003; Pfenning et al., 2010; Kelly et al., 2012). Los ajustes en respuesta a variaciones en el ambiente implican, frecuentemente, una reorganización metabólica. En este contexto, la performance fisiológica del sistema digestivo tiene obvias implicancias para todos los procesos fisiológicos (Secor, 2001; Piersma y Drent, 2003). La flexibilidad fenotípica a distintos niveles (ej: bioquímico) del sistema digestivo puede conducir a ajustes en la capacidad digestiva permitiendo, de esta manera, un adecuado

balance energético y una reorganización metabólica en respuesta a condiciones cambiantes del ambiente (Bozinovic y Canals, 2008; del Valle et al., 2004; 2006; del Valle y López Mañanes, 2008; 2009; 2011; 2012; Naya et al., 2007, 2008, 2009). En varios vertebrados, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas clave constituye un mecanismo de ajuste a nivel bioquímico en respuesta a condiciones fisiológicas y/o ambientales (Balslev-Clausen et al., 2003; del Valle et al., 2004; 2006; del Valle y López Mañanes, 2008; 2009; 2011; 2012; Naya et al., 2008, 2009; Iglesias et al 2009; Brezk et al., 2013; Liu et al., 2013; McWilliams et al., 2014). Las enzimas digestivas cumplen un rol fisiológico esencial ya que constituyen el vínculo entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013).

Diversos mensajeros químicos primarios (entre ellos aminas biogénicas y varias hormonas peptídicas) están involucrados en la compleja regulación de diferentes procesos digestivos, secretorios y absorptivos a nivel bioquímico (Dufresne et al., 2006; Murphy et al., 2008; Williams et al., 2009; Goodman, 2010; Williams, 2010; Stengel y Taché, 2011; de Araujo et al., 2012; Wang et al., 2012; Dockray, 2014; Trowers y Tischler, 2014). En comparación con vertebrados la información en invertebrados es escasa y fragmentaria.

El hepatopáncreas de los crustáceos desempeña un rol central en la digestión y absorción de nutrientes (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazan y Garcia-Carreño, 2003; Zeng et al., 2010, Mc Gaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014; Wang et al., 2014; Riveiro et al., 2014). Se ha sugerido que enzimas digestivas específicas podrían ser reguladas intracelularmente en respuesta a estados fisiológicos diferenciales (Muhlia-Almazán y Garcia Carreño 2003; Sánchez Paz et al., 2006). Sin embargo, los procesos y mecanismos de regulación de la actividad de enzimas digestivas están muy poco comprendidos y no se han dilucidado aún las vías y/o mensajeros químicos posiblemente involucrados. El

hepatopáncreas de crustáceos parece ser también un importante órgano endócrino habiéndose detectado varias aminas biogénicas y hormonas peptídicas (Fingerman et al., 1993; Huang et al., 2005).

En crustáceos decápodos, las aminas biogénicas (ej: dopamina, serotonina, histamina) circulantes están involucradas en la regulación de diversos procesos fisiológicos y en respuestas frente a diferentes tipos de estrés (Fingerman et al., 1994; Schleich et al., 1999; Cheng et al., 2005; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005; Chiu et al., 2006; Genovese et al., 2006; Hsieh et al., 2006; Yeh et al., 2006; Chang et al., 2007; Liu et al., 2008; Avramov et al., 2013; Pan et al., 2014). Sin embargo, faltan estudios sobre su posible rol en la regulación de funciones digestivas (ej: modulación de enzimas digestivas).

Los cangrejos eurihalinos hiper/hiporreguladores son capaces de mantener la concentración osmótica de la hemolinfa dentro de un rango estable, por encima o debajo de la del medio externo en baja y alta salinidad, respectivamente (Lucu y Towle, 2003; Freire et al., 2008; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Larsen et al., 2014). Los cambios moleculares y bioquímicos (ej: actividad de enzimas y sistemas de transporte en branquias) implicados en las respuestas osmorregulatorias han sido intensivamente estudiados en varias especies de cangrejos, sin embargo, algunos de los mecanismos involucrados a nivel bioquímico no están aún totalmente comprendidos, particularmente desde una perspectiva metabólica (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012). Las respuestas a nivel bioquímico a la salinidad ambiental constituyen un proceso complejo que implica también la participación de diferentes enzimas y sistemas de transporte en varios tejidos tales como hepatopáncreas y músculo (Jahn et al., 2006; Pinoni y López Mañanes 2004, 2008, 2009; Athamena et al., 2011; Martins et al., 2011; Pinoni et al., 2013). En este contexto, los estudios sobre diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva en cangrejos eurihalinos constituyen un área de fundamental

importancia para el conocimiento integrado de estrategias digestivas a nivel bioquímico-fisiológico. Sin embargo, faltan estudios sobre caracterización y modulación (ej: mensajeros químicos; factores ambientales y fisiológicos) de la actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas (sitio principal de producción de enzimas digestivas en crustáceos decápodos) y sobre los posibles ajustes integrales de enzimas digestivas y reservas de energía específicas en relación a condiciones fisiológicas y/o ambientales diferenciales.

Neohelice (Chasmagnathus) granulata y *Cyrtograpsus angulatus* son cangrejos eurihalinos de importancia ecológica en áreas costeras y estuariales del Atlántico sudoccidental (Boschi, 1964, Spivak et al., 1994; Iribarne et al., 1997, Spivak, 1997; Bortolus e Iribarne, 1999; Giménez, 2003; Iribarne, 2003). La salinidad afecta varios aspectos de la biología e historia de vida de estos cangrejos y se ha propuesto como uno de los factores principales que afecta su distribución. *N. granulata* constituye un modelo animal emergente para estudios de bioquímica, fisiología y ecología (Spivak, 2010).

En la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. Bs. As.) (37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O) *N. granulata* y *C. angulatus* constituyen las especies de cangrejos dominantes en donde están expuestos a condiciones altamente variables de salinidad (Spivak et al., 1994; Spivak, 1997; Pinoni y López Mañanes, 2011; Luppi et al., 2013). La flexibilidad en el comportamiento osmorregulatorio constituye un proceso fisiológico clave en ambos cangrejos (López Mañanes et al., 2000; 2002; Schleich et al., 2001; Pinoni et al., 2005; Pinoni y López Mañanes, 2004; 2008, 2010; 2013). Como se mencionó anteriormente, los conocimientos sobre fisiología bioquímica digestiva de estas especies son escasos y faltan estudios sobre existencia, características bioquímicas y modulación de actividad de enzimas digestivas clave y sobre la posible modulación concomitante de reservas de energía específicas.

El objetivo general de la presente tesis fue realizar estudios integrativos sobre actividades de enzimas digestivas clave en cangrejos eurihalinos. Dentro del objetivo general se realizaron estudios de caracterización y modulación de la actividad de enzimas digestivas específicas en hepatopáncreas de los cangrejos eurihalinos *N. granulata* y *C. angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires) y de modulación del contenido de reservas de energía en órganos de reserva con el fin de: a) determinar la existencia y características bioquímicas de actividad de enzimas digestivas clave, b) determinar posibles vías de regulación y mensajeros químicos primarios e intracelulares involucrados; c) determinar la posible modulación diferencial de enzimas digestivas en relación a diferentes condiciones de salinidad que impliquen estados osmorregulatorios diferenciales; d) establecer la existencia de respuestas y de modulación integrales de la actividad de enzimas digestivas y reservas de energía específicas; e) establecer aspectos comparativos interespecíficos.

Para cumplir con el objetivo general se llevaron a cabo:

- Estudios de caracterización parcial de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1)
- Estudios de caracterización parcial y de modulación por dopamina de la actividad de aminopeptidasa-N en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 2)
- Estudios de modulación de la actividad de lipasa por dopamina, AMPc y glucagón y del contenido de triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 3)
- Estudios sobre el efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de lipasa, proteolítica total y aminopeptidasa-N en hepatopáncreas y sobre contenido de triglicéridos y proteínas en órganos de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela, branquias anteriores y

posteriores) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en *N. granulata* (Capítulo 4)

- Estudios sobre el efecto de un cambio abrupto de salinidad (alta a baja salinidad) sobre la actividad de lipasa, proteolítica total, de tripsina y de aminopeptidasa-N en hepatopáncreas y contenido de triglicéridos y proteínas en órganos de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela, branquias anteriores y posteriores) de *N. granulata* (Capítulo 5)

- Estudios de localización, caracterización parcial y de modulación de la actividad de lipasa, proteolítica total, de tripsina y de aminopeptidasa-N en hepatopáncreas de *C. angulatus* (Capítulo 6)

CAPÍTULO 1:

Actividad de tripsina en

hepatopáncreas de Neohelice

granulata: caracterización parcial

Introducción

Los procesos de digestión y absorción del alimento limitan la tasa de asimilación de nutrientes (ej: proteínas) y el presupuesto energético total de los organismos (Bozinovic, 1993, 2003, Sabat et al., 1999; Caviedes-Vidal et al., 2000; Balslev-Clausen et al., 2003; del Valle et al., 2004, 2006, del Valle y López Mañanes, 2008, 2011). En este contexto, la presencia, nivel de actividad y modulación de enzimas digestivas específicas (ej: diferentes proteasas) en tracto digestivo se relacionan con la capacidad de los individuos para la digestión de diferentes sustratos de la dieta (Karasov et al 2011, karasov y Douglas, 2013).

Las proteasas (también denominadas proteinasas o peptidasas) son enzimas ancestrales que catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas de proteínas y péptidos (Rawlings, 2013; Mótýán et al., 2013). Las proteasas catalizan reacciones altamente específicas del proceso proteolítico produciendo diferentes productos resultantes de la digestión proteica (López-Otin y Bond, 2008). Diversas proteasas están involucradas en el metabolismo proteico a través de la modificación de proteínas de la dieta, neuropéptidos, hormonas, el procesado de pro-enzimas y movilización de proteínas de tejidos de reserva (Rawlings, 2013).

La tripsina (EC 3.4.21.4), una endopeptidasa del tipo serin-proteasa que hidroliza enlaces peptídicos del lado del sitio carboxílico de residuos de Arg o Lys, es una de las proteasas más importantes en tracto digestivo de mamíferos como así también de varias especies de vertebrados no mamíferos y varias especies de invertebrados (Sainz, 2004; Muhlia-Almazán et al., 2008; Vandermarliere et al., 2013, Perera et al., 2014, Wang et al., 2014). En este contexto, en vertebrados, particularmente en mamíferos y en varias especies de invertebrados, la tripsina ha sido objeto de numerosos estudios debido a su rol

central en la digestión proteica, además de su participación en otros procesos fisiológicos (Díaz-Mendoza et al., 2005; Delcroix et al., 2006; Muhlia-Almazán et al., 2008; Page y Di Cera, 2008; Perera et al., 2012, 2014).

En crustáceos, el hepatopáncreas constituye el principal sitio de producción de enzimas digestivas (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazán y García Carreño, 2003). En varias especies de crustáceos se ha reportado la presencia de actividad de tripsina en el hepatopáncreas (Arnón y Neurath, 1969; Pheiderer et al., 1970; Yang y Davies, 1971; Murphy y Saxena, 1975; Gibson y Barker, 1979; Gates y Travis, 1969; Johnston et al., 1995, Zwilling y Neurath, 1981; Fernandez Gimenez et al., 2001, Buarque et al., 2009, Figueiredo y Anderson, 2009; Perera et al., 2008, 2012; Srocket et al., 2012; Silva Santos et al., 2014; Rotlant et al., 2014).

En varios crustáceos decápodos, se ha relacionado la presencia y el nivel de actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas con la naturaleza de los componentes dietarios que pueden ser potencialmente utilizados para los procesos metabólicos (Pavasovic et al., 2007, Figueiredo y Anderson, 2009, Ramirez-Otarola et al., 2011; Fairwather et al., 2012). *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* de la zona de planicie de marea de la laguna costera de Mar Chiquita se comporta como omnívoro-detritívoro con una dieta con alto contenido de ítems de origen animal (Iribarne et al., 1997; Bortolus y Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Lancia et al., 2013). Trabajos previos de nuestro laboratorio, muestran la presencia de alta actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* lo que sugiere su capacidad para la digestión de ítems proteicos (Pinoni, 2009, Pinoni et al., 2011, 2013). Sin embargo, faltan estudios de identificación y de caracterización de las posibles actividades de proteasas presentes. En este contexto, si bien se ha descrito la presencia de actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Lancia et al., 2013), no se han realizado aún estudios sobre características bioquímicas.

En este capítulo se describen estudios de caracterización parcial de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* realizados en la presente tesis como paso preliminar para posteriores estudios de modulación de la misma (Capítulos 5).

Materiales y Métodos

Productos químicos

La Na-Benzoyl-DL-Arginina-p-Nitroanilida (BAPNA), el tris-(hidroximetilamino-metano)(Tris), el ethyleneglicol N, N', N'-tetraacético (EGTA) y la albúmina de suero bovino fueron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), el Coomasie blue G250 fue de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Se recolectaron machos adultos de *Neohelice granulata* en intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967; Moriyasu y Mallet, 1986), con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, en la zona de planicie de mareas de la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, 37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Los individuos fueron transportados inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección. Los cangrejos se mantuvieron al menos 10 días en acuarios en condiciones controladas de salinidad (35‰), temperatura (22± 2° C) y fotoperíodo (12 h. luz/ 12 h. oscuridad). El agua se aireó y filtró permanentemente. Los acuarios fueron cubiertos con nylon negro para reducir disturbios. Los individuos fueron alimentados tres veces por semana con alimento comercial balanceado Tetra Pond Koi Vibrance (0,07 g por individuo) y fueron

privados de alimento 48hs antes de los experimentos (Méndez, 2010; Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013).

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 20 minutos. Posteriormente, se pesaron y se extrajo el hepatopáncreas. Luego de pesar el tejido, se colocó inmediatamente en buffer de homogeneización (Tris/HCl 0,5 mM, pH 7,4) (4 ml de buffer x g de tejido-1) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min (Sorval, rotor SS34). El sobrenadante se fraccionó y se almacenó a 20 °C con glicerol 1,3 % p/v, posteriormente se determinó actividad de tripsina y concentración de proteínas (Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013)

Determinación de la actividad de tripsina

La actividad de tripsina fue determinada usando benzoílo- Arg-p-nitroanilida (BAPNA) como sustrato (Ezquerro y García Carreño, 1997) con algunas modificaciones (presente tesis). La reacción se inició mediante la adición de sustrato (concentración final 1,23 mM) a una mezcla de reacción que contuvo una alícuota de la muestra correspondiente en 50 mM buffer Tris pH 7,4. Después de la incubación durante 15 min a 45° C, la reacción se detuvo por adición de 250 µl de KOH.

Para los estudios de caracterización de la actividad de tripsina, el procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente, excepto que la actividad se determinó en presencia de distintos pHs (rango de 4,5-11,0) (buffer fosfato 50mM pH 4,5 Tris-HCl 50mM, pH 6,0- 8,0; 50 mM glicina, pH 11,0) y temperaturas (4-70 ° C) de la mezcla de reacción. Para estudiar el efecto de la concentración de BAPNA sobre la actividad de tripsina la actividad se determinó a pH 7,4 a 45°C en presencia de concentraciones crecientes de BAPNA (0,083-0,5 mM) en la mezcla de reacción.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Análisis estadístico

Los resultados del efecto de las diferentes concentraciones de BPNA se analizaron por medio de análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 2.01 software). Las curvas que se muestran son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores K_m (constante de Michaelis -Menten) se estimaron de las mismas (GraphPad Prism 2.01 software). El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas de Levene y un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico (One Way ANOVA). Para identificar diferencias se utilizó un test *a posteriori* ANOVA (Test Holm-Sidak). Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados

Actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*

La actividad de tripsina fue máxima a pH 7,4. A pH 4,0 y 10 la actividad disminuyó aproximadamente un 70 % con respecto al valor de actividad a pH 7,4. A pH 6,0 la disminución de la actividad fue alrededor de un 80% con respecto a la actividad a pH 7,4 (Figura 1.1).

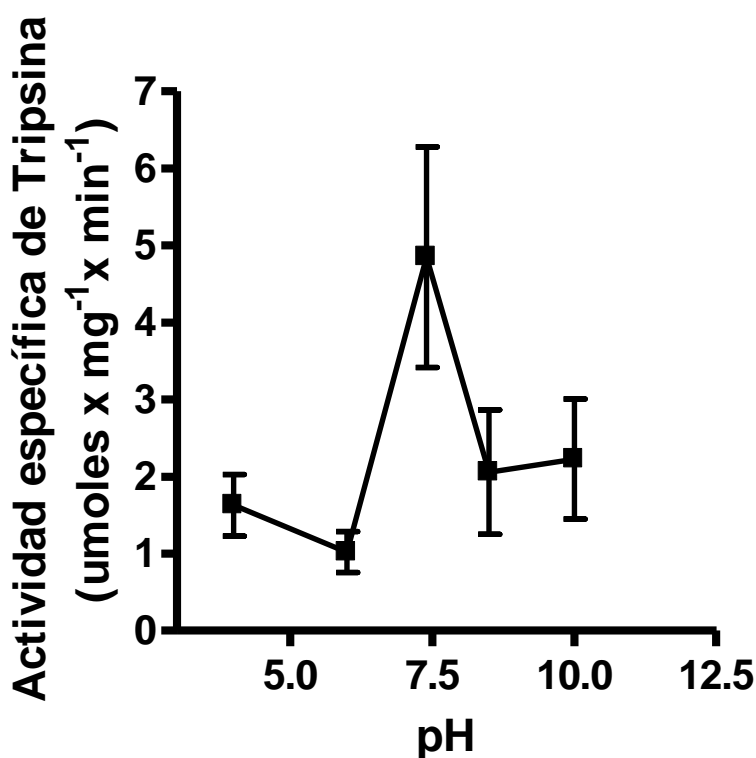


Figura. 1.1.- Efecto del pH (4,0-10,0) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N.granulata*. La actividad se midió a 45 ° C y en presencia de 1,23 mM de BAPNA. Los datos son la media ± E.S para 5 individuos (gl: 17; F: 3,3; p:0.04).

El efecto de la temperatura (4-70 ° C) sobre la actividad de tripsina se muestra en la figura 1.2. La máxima actividad fue encontrada a 45°C. La actividad de tripsina a 20°C fue de, aproximadamente, un 50% de la actividad a 45°C. A baja (4°C) y alta (70°C) temperatura la actividad de tripsina fue, aproximadamente, un 60% menor que la actividad a 45°C.

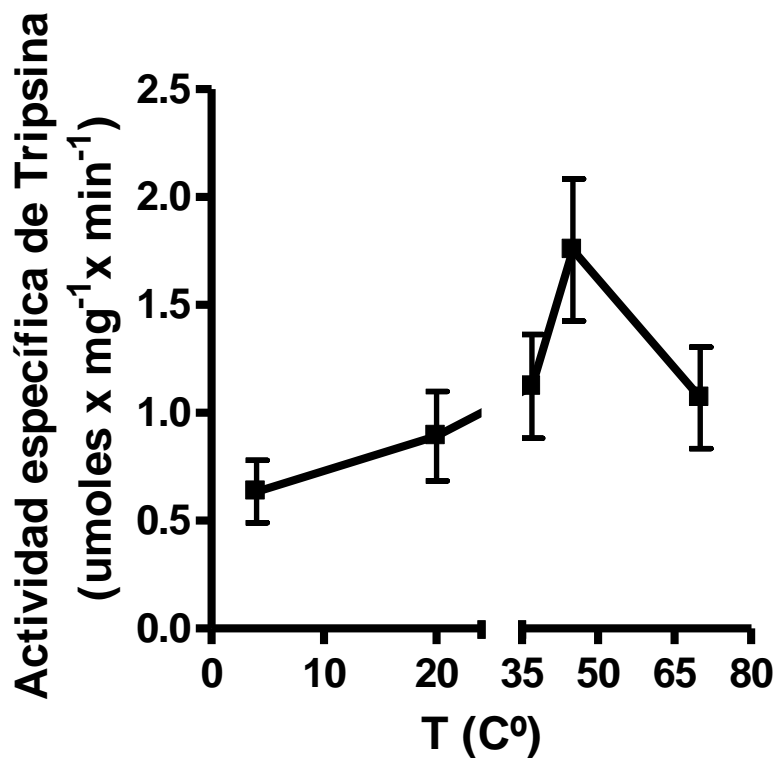


Figura.1.2.- Efecto de la temperatura (4.0-70°C) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N.granulata*. La actividad se midió a pH 7,4 y en presencia de 1,23 mM de BAPNA. Los datos son la media ± E.S para 5 individuos (gl: 18; F: 2,8; P:0,06)

El efecto de concentraciones crecientes de BAPNA (0,12-1,5 mM) sobre la actividad de tripsina se muestra en la figura 1.3 La actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N.granulata* exhibió una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 0,64 mM).

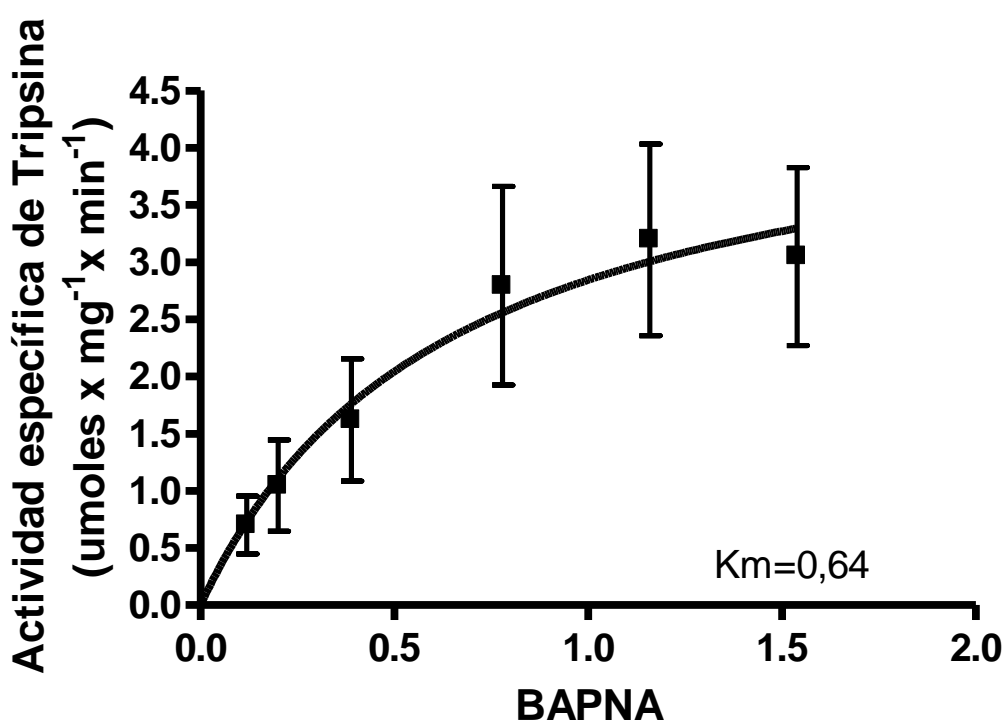


Figura.1.3.- Efecto de concentraciones crecientes de BAPNA (0,12-1,5 mM) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N.granulata*. La actividad se midió a pH 7,4 y 45°C. Los datos son la media \pm E.S para 5 individuos.

DISCUSIÓN

Los estudios de localización y determinación de características bioquímicas de actividades enzimáticas digestivas clave (ej: actividad de tripsina) en tracto digestivo constituyen un paso básico fundamental en el conocimiento de la fisiología bioquímica digestiva. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en la introducción de la presente tesis, la información sobre existencia y características bioquímicas de actividad de tripsina en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos es aún escasa. (Dendinger y Connor, 1990). En este contexto, en la presente tesis realizamos estudios de caracterización parcial de actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N.granulata*.

Los valores de pH óptimo reportados para la actividad de tripsina detectadas en hepatopáncreas de crustáceos decápodos difieren según la especie, habiéndose reportado valores a pH ácidos, neutros y alcalinos dentro de un rango entre 6-8.5 (García-Carreño et al., 1994; Ceccaldi, 1997; Maeda- Martinez et al., 2000; Buarque et al., 2009, 2010 ; Pavasovic et al., 2014; Figueriedo y Anderson, 2009; Perera et al., 2012, Sriket et al., 2012 ; Buarque et al., 2009) . La mayor actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N.granulata* a pH 7,4 y el mantenimiento de actividad a pHs 5,0-6,0 y 10,0 (Fig.1.1) difiere de lo encontrado para la actividad de tripsina en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Callinectes sapidus* (Dendinger y Connor, 1990). En algunos crustáceos decápodos se ha descrito que la tripsina en hepatopáncreas se mantiene activa dentro de un rango de pH entre 5.5 a 9.0 (Garcia-Carreño, 1992; Figueiredo et al., 2001). En varias especies de langostas, se ha descrito que la alta actividad de tripsina en hepatopáncreas se relaciona con la existencia de varias isoformas de la enzima (Celis-Guerrero et al., 2004; Perera et al. 2008, 2014). En la langosta *Panulirus argus*, coincidentemente con lo descrito para

extractos crudos, el pH óptimo para la mayoría de las isoformas varía entre 7,0 a 8,0 (Perera et al., 2012, 2014). Sin embargo, establecer si la mayor actividad de tripsina a pH 7,4 en hepatopáncreas de *N. granulata* corresponde a la presencia de isoformas similares a las descritas para *P. argus* requiere mayor investigación. Por otro lado, en el camarón de río *Macrobrachium rosenbergii* se ha sugerido que la disminución de la actividad de tripsina a pHs ácidos y alcalinos podría estar asociada con cambios conformacionales de la enzima (Sriket et al., 2012). Estudios futuros utilizando enzima purificada permitirán dilucidar si este es el caso para la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*.

La actividad máxima de tripsina a 45°C en hepatopáncreas de *N. granulata* y el mantenimiento de la misma a 70°C (60% de la actividad máxima) (Fig.1.2) es similar para lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas de los camarones *Macrobrachium lamarrei* (Saxena y Murphy, 1979) y *F. paulensis* (Buarque et al., 2009). En hepatopáncreas de varios crustáceos tales como *Penaeus monodon* (Jiang et al., 1991); *P. clarkii* (Guizzani et al., 1992), *Litopenaeus vannamei* (Sainz et al., 2004); *Triops* sp. (Maeda-Martínez et al., 2000) y *M. amazonicum* (Silva Santos et al., 2014) se han descrito valores máximos de actividad de tripsina a altas temperaturas entre 50-65°C.

El comportamiento michaeliano de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* está de acuerdo con lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas de otros crustáceos decápodos tales como *Macrobrachium lamarrei* (Murthy y Saxena, 1979); el cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Guizani et al., 1992) y en el cangrejo real *Paralithodes camtschaticus* (Papilova et al., 2008). Para nuestro conocimiento, no existen reportes sobre el comportamiento cinético de actividad de tripsina en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos.

En conclusión, los resultados del presente capítulo que describen características bioquímicas de la actividad de tripsina en hepatopáncreas *en N. granulata* constituyen un aporte al escaso conocimiento de esta actividad en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos y aportan conocimiento básico para posteriores estudios de modulación de la misma (capítulos 5). La caracterización bioquímica de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* se relaciona con las características dietarias (omnívoro-detritívoro) y ambientales de la zona de planicie de mareas en la laguna costera de Mar Chiquita.

CAPÍTULO 2

Actividad de N-aminopeptidasa en
hepatopáncreas de Neohelice
granulata: Caracterización parcial y
modulación por dopamina

Introducción

Las ectopeptidasas son enzimas proteolíticas unidas a la membrana celular, con el sitio catalítico expuesto a la superficie extracelular, lo que les permite tener una amplia gama de funciones fisiológicas (McGrath, 2006; Bosch et al., 2014).

La N-aminopeptidasa (APN) (CE 3.4.11.2) (también conocida como CD13 o alanina aminopeptidasa) es una ectopeptidasa dependiente de Zn^{+2} de la familia de metaloenzimas M1. La APN cataliza la liberación secuencial de los aminoácidos N-terminales de péptidos, preferentemente de aminoácidos neutros como la alanina (Hooper, 1994; Sanderink et al., 1988; Luciani et al., 1998; Mentlein, 2004; Wong et al., 2012; Chen et al., 2013).

La APN de mamíferos es una proteína dimérica multifuncional que se expresa ampliamente en las superficies celulares de una gran variedad de tejidos (Mina Osorio, 2008; Villaseñor-Cardozo, 2013). En su estructura consta de una cola corta intracelular, un ancla transmembrana, un pequeño tallo extracelular y un gran ectodominio extracelular lo que se ha propuesto podría explicar, en parte, sus roles multifuncionales (Luciani, 1998; Chen et al., 2012). La APN funciona en forma ubicua en las rutas metabólicas de una enorme variedad de péptidos (Chen et al., 2013). Sin embargo, se desconoce aún como la APN es capaz de acceder a tantos diferentes péptidos componentes de varias rutas metabólicas

En tracto digestivo, la APN de epitelio intestinal desempeña un papel principal en las etapas finales de la digestión de proteica produciendo di/-tri-péptidos y aminoácidos individuales que son transportados hacia el intracelular por diversos transportadores de péptidos y aminoácidos para su posterior degradación por proteasas intracelulares (en el caso de péptidos) y/o absorción (Alpers, 1987; Mentlein, 2004; Goodman, 2010;

Fairweather et al., 2012). De esta manera, la actividad de APN en tracto digestivo se utiliza como un indicador de la capacidad digestiva proteica de los organismos (Ramírez-Otárola et al., 2011).

En crustáceos, el hepatopáncreas además de constituir el principal sitio de producción de enzimas digestivas es un órgano multifuncional con un papel central en la digestión y absorción de nutrientes (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazán y García Carreño, 2003, Wang et al., 2014; Riveiro et al., 2014). En membranas vesiculares apicales de hepatopáncreas de varias especies de crustáceos decápodos se ha reportado la presencia de diferentes transportadores de aminoácidos y péptidos lo que sugiere el rol de este órgano en pasos finales de la digestión proteica y en la absorción de metabolitos resultantes (Ahearn et al., 1999; Duka et al., 2013). En este contexto, el nivel y/o modulación de la actividad de APN en hepatopáncreas podría determinar y/o afectar la capacidad para la digestión final de proteínas y/o la absorción de metabolitos proteicos. A pesar de la importancia fisiológica de la APN en estos procesos, es notoria la falta de estudios sobre su existencia, características bioquímicas, mecanismos de modulación y posibles roles fisiológicos en hepatopáncreas de crustáceos decápodos en general y de cangrejos eurihalinos en particular.

En tracto gastrointestinal y páncreas de mamíferos existen diversas vías y mensajeros químicos primarios (ej: aminos biogénicas), involucrados en la compleja regulación de diferentes procesos digestivos, secretorios y absorptivos a nivel bioquímico (Williams, 2010; Stengel et al., 2011; de Araujo et al., 2012; Wang et al., 2012; Burnstock y Novak 2013; Wang y Novak, 2013; Dockray, 2014; Trowers y Tischler, 2014). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la actividad de APN en tracto digestivo no están aún totalmente comprendidos.

Los crustáceos emplean una gran variedad de moléculas como agentes de señalización (Christie, 2011; Christie et al., 2013; Dircksen, 2013; Katayama et al., 2013). Se sabe que las aminas biogénicas circulantes (ej: dopamina, serotonina, octopamina, histamina) juegan un importante rol en la regulación de diferentes procesos fisiológicos. En varias especies, la dopamina (DA) está involucrada en la regulación de diferentes componentes de respuestas osmorregulatorias y de respuestas metabólicas frente a diferentes condiciones ambientales y/o fisiológicas (Fingerman et al., 1994; Schleich et al., 1999; Cheng et al., 2005; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005; Chiu et al., 2006; Genovese et al., 2006; Hsieh et al., 2006; Yeh et al., 2006; Chang et al., 2007; Liu et al., 2008; Avramov et al., 2013; Pan et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, el hepatopáncreas de los crustáceos decápodos es un órgano multifuncional. Así, parece desempeñar un importante rol como órgano endocrino habiéndose detectado varias aminas biogénicas (ej: dopamina) (Marmaras et al., 1971; Fingerman et al., 1994).

Como se describió anteriormente en la presente tesis *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita exhibe alta actividad proteolítica y de tripsina en hepatopáncreas sugiriendo su capacidad para la digestión de ítems proteicos. En este capítulo se describen estudios realizados para determinar la existencia, características bioquímicas y modulación *in vitro* por dopamina de APN en el cangrejo eurihalino *N. granulata* con el fin de establecer el potencial rol del hepatopáncreas en pasos finales de la digestión proteica y posibles mecanismos de regulación de la actividad de APN detectada.

Materiales Y Métodos

Productos químicos

La L-alanina-p-nitroanilida (L-Ala pNA), el tris-(hidroximetilamino-metano), (Tris), el ethyleneglicol N, N', N'-tetraacético (EGTA), la dopamina (3-hydroxytyramina) y la albúmina de suero bovino fueron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.); el Coomassie blue G250 fue de Fluka (Alemania). Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Según lo descrito en el capítulo 1. Los individuos fueron privados de alimento 24-48h antes de los experimentos (Méndez, 2010; Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013).

Preparación de extractos enzimáticos de hepatopáncreas de N. granulata

Se realizó según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Para estudiar el efecto *in vitro* de dopamina (DA) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas, secciones de hepatopáncreas (100 mg) se incubaron en ausencia o en presencia de 10^{-4} M de DA en 2 ml de un medio que contiene (mM): NaCl 400, KCl 13, 10 MgCl₂ 8,8 H₃BO₃, pH 7,6 a 30 ° C. A tiempos 0 y 30 min de incubación, el tejidos se homogeneizó en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (4 ml xg tejido-1) y se determinó actividad de APN como se describe posteriormente (Resh-Sdleimer y Sdleimer, 1999; Pinoni y López Mañanes, 2009).

Determinación de la actividad de APN

La actividad de APN se determinó usando L-alanina-p-nitroanilida (L-Ala pNA) como sustrato (Roncari y Zuber, 1969) con algunas modificaciones (del Valle y López Mañanes, 2008, 2011; Naya et al., 2009, presente tesis). La reacción se inició añadiendo el sustrato (concentración final 0,41 mM) a una mezcla de reacción conteniendo la cantidad adecuada de proteína en 50 mM Buffer Tris-HCl, pH 7,4 a 37°C. Luego de la incubación durante 15 min, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,5 ml de ácido acético frío 2 M y se midió absorbancia en 384 nm.

Para estudiar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de APN, el procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente, excepto que la actividad se determinó a distintos pHs (rango de 6,6 a 10,0) (Tris-HCl 50mM, pH 6,6 a 9,0; 50 mM glicina, pH 10,0) y temperaturas (4-50 ° C) de la mezcla de reacción. Para estudiar el efecto de la concentración de L-Ala-pNA sobre la actividad de APN, el procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente, excepto que la actividad se determinó en presencia de diferentes concentraciones de L-Ala-pNA (0,083 hasta 0,5 mM) en la mezcla de reacción. Para estudiar el efecto de bestatina sobre la actividad de APN, se midió actividad en ausencia y / o presencia de concentraciones crecientes de bestatina. La bestatina, un antibiótico de origen microbiano, es un inhibidor ($I_{50} = 0,001$ a 90 mM) comúnmente utilizado como herramienta para caracterizar la actividad de APN (Umezawa et al., 1976; Bauvois y Dauzonne, 2006; Chen et al., 2013).

Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó según lo descrito en el Capítulo 1.

Análisis estadístico

Los resultados del efecto de las diferentes concentraciones de pNPP se analizaron por medio de análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 2.01 software). Las curvas que se muestran son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) se estimaron con GraphPad Prism 2.01 software. La I_{50} (concentración de bestatina a la que la actividad de APN fue inhibida en un 50%) se calculó a partir de la curva de inhibición (software GraphPad Prism). El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas de Levene y un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico (One Way ANOVA). Para identificar diferencias se utilizó un test a posteriori ANOVA (Test Holm-Sidak). Para estudiar el efecto de dopamina sobre la actividad de APN se realizó un test- t para muestras independientes. Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados

Actividades de APN en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*: efecto del pH, temperatura, L-Ala y bestatina

La actividad de APN fue máxima en el rango 7,6 a 9,0. A pH 6,6 la actividad de APN fue aproximadamente el 75% de la actividad a pH 7,4. A pH 10,0 se produjo una

disminución de la actividad, siendo aproximadamente el 60% de la actividad a pH 7,6 (Fig. 2.1).

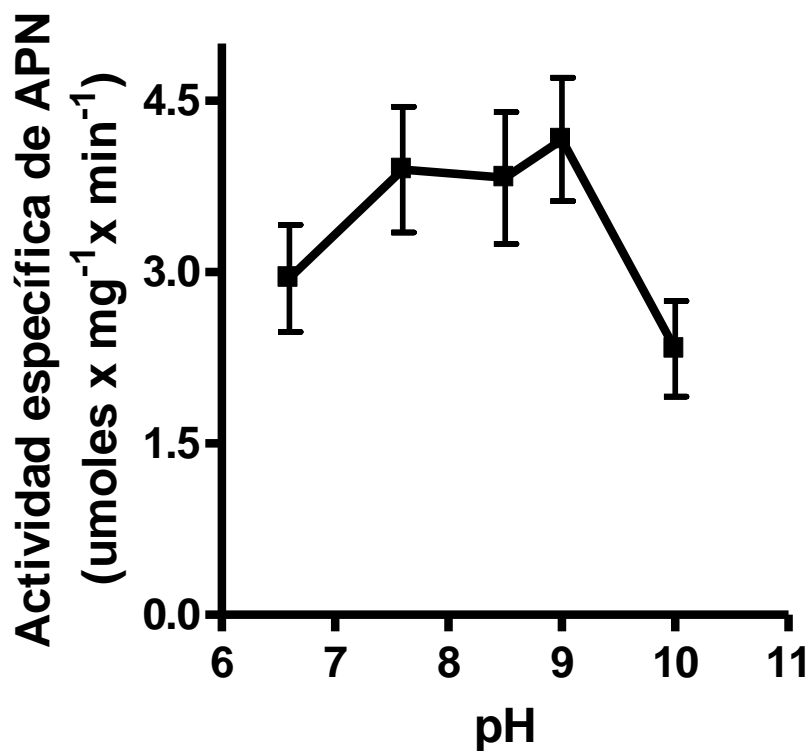


Figura. 2.1- Efecto del pH (6,6 a 10,0) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *N.granulata*. La actividad se midió a 37 ° C y en presencia de 0,41 mM de L-Ala pNA. Los datos son la media ± E.S para 5 individuos. (gl:23; F:2,2; P: 0,107).

En la figura 2. 2 se muestra el efecto de la temperatura (4-50 ° C) sobre la actividad de APN. Entre 4 °C y 37° C se produjo un aumento gradual de la actividad de APN siendo máxima entre 37-45 ° C. A 50 ° C, la actividad disminuyó siendo aproximadamente el 75% de la actividad a 37 ° C.

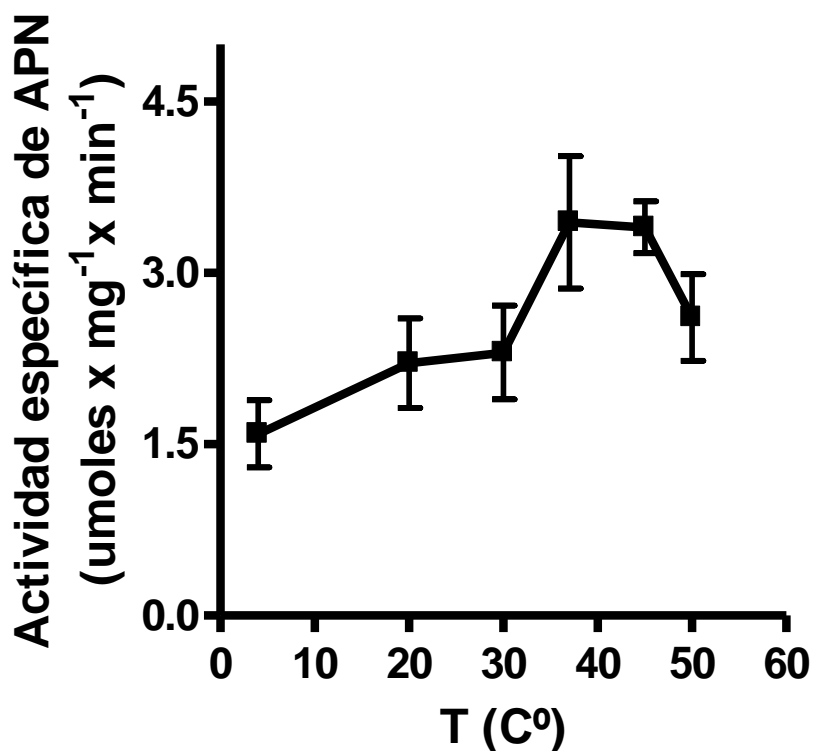


Figura.2.2.-Efecto de la temperatura (4-50 ° C) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad se midió a pH 7,4 y en presencia de 0,41 mM de L-Ala pNA. Los datos son la media \pm E.S para 5 individuos. (gl:28; F: 3.09; P: 0,28).

El efecto de distintas concentraciones de L-Ala pNA (0,08 a 0,5 mM) sobre la actividad de APN se muestra en la figura. 2.3. La actividad APN en hepatopáncreas de *N. granulata* exhibió una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 0,11 mM). El efecto de concentraciones crecientes de bestatina sobre la actividad de APN en hepatopáncreas se muestra en la figura. 2.4.

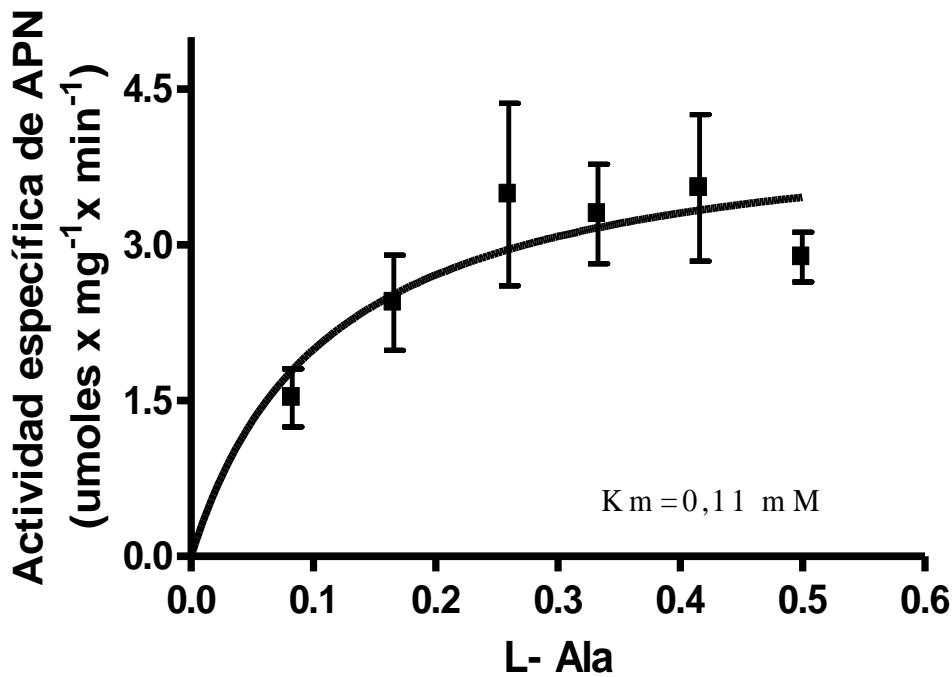


Figura.2.3.- Efecto de la concentración de L-Ala pNA (0,08 a 0,5 mM) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad se midió a 37 ° C y a pH de 7,4. Los datos son la media \pm E.S para 5 individuos.

La actividad APN fue inhibida por bestatina en una manera dependiente de la dosis (I₅₀ = 15 mM). La máxima inhibición (aproximadamente 80%) se alcanzó con 28 mM de bestatina. Concentraciones superiores de bestatina (hasta 56 mM) produjeron un porcentaje similar de inhibición (Fig.2.4).

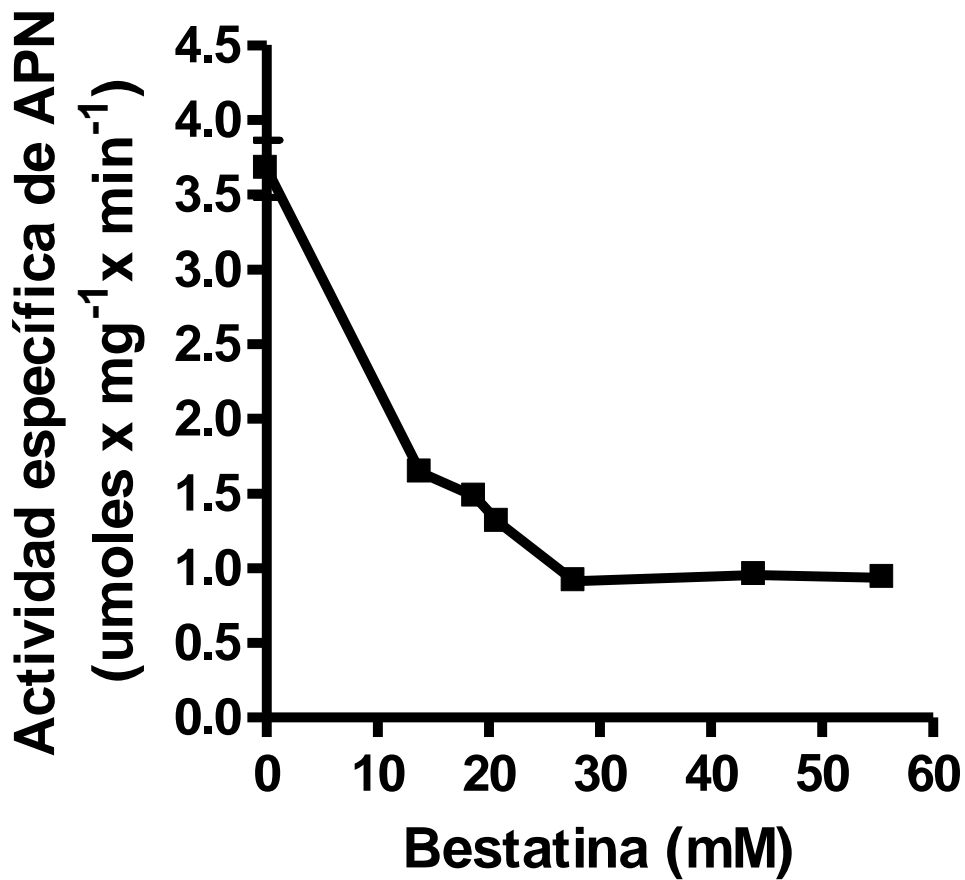


Figura.2.4- Efecto de bestatina sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata*. I₅₀: concentración de bestatina que produce el 50% de inhibición de la actividad de APN, calculada por GraphPad Prism 2.01. Los datos son la media \pm E.S 3 individuos. Las barras de desvío fueron más pequeñas que los símbolos utilizados (gl:20; F:169, P: 0,001)

Actividad de APN en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*: efecto dopamina $10^{-4}M$

DA $10^{-4} M$ aumentó significativamente (107%) la actividad de APN *in vitro* luego de 30 min de incubación en hepatopáncreas de *N. granulata*. (Fig. 2.5).

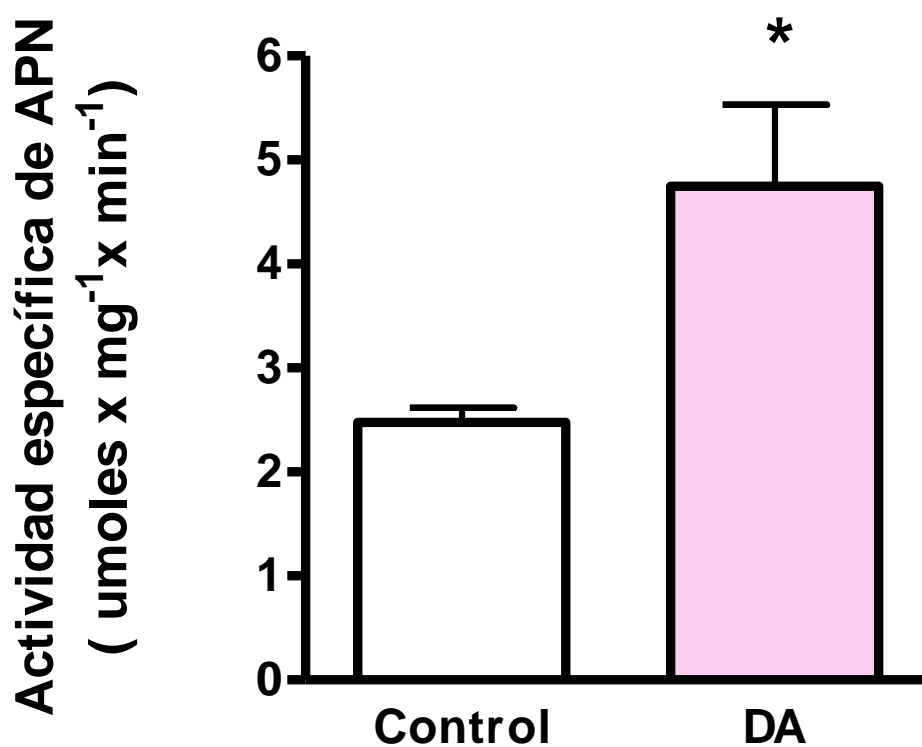


Figura.2.5- Efecto *in vitro* de DA $10^{-4}M$ sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de APN se midió como se describe en la sección Materiales y Métodos en presencia de 0,41 mM de L-Ala pNA a pH 7,4 y 37 ° C. Los datos son la media \pm E.S para 5 individuos. *Indica diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$). (gl:7; T: -2,5; P:0.039).

Discusión

La APN es una ectoenzima multifuncional unida a membrana que desempeña un papel crucial en la digestión final de proteínas y en la absorción de péptidos y aminoácidos en el tracto digestivo de vertebrados (Alpers, 1987; Mentlein, 2004; Ramirez-Otarola et al., 2011; Fairwather et al., 2012; Chen et al., 2013), como se mencionó anteriormente, comparativamente con vertebrados la información en crustáceos decápodos sobre la actividad de APN en hepatopáncreas (sitio principal para la digestión y absorción de nutrientes) es escasa. Así, para nuestro conocimiento sólo se reportado la existencia de actividad de APN en hepatopáncreas del cangrejo *Lithodes santolla* (Saborowski et al., 2006) y en *Munida* (Rossano et al., 2011) sin establecerse las características bioquímicas y mecanismos de modulación.

El valor de pH para la máxima actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* (7,6 a 9,0) (Fig. 2.1) es acorde con lo encontrado para esta actividad enzimática en el intestino de humanos (Sanderink et al., 1988) y en homogenatos de intestino de las aves *Zonotrichia capensis* y *Diuca diuca* (Sabat et al., 1998). La actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* fue levemente afectada por baja (4 ° C) y alta (50 ° C) temperatura de la mezcla de reacción siendo de alrededor de un 50% y 75% de la actividad a 37 ° C, respectivamente (Fig. 2.2). Dado que en la laguna Mar Chiquita *N. granulata* está expuesto a un amplio rango de temperaturas (Spivak et al., 1994, Luppi et al., 2013; Observaciones personales), una actividad de APN activa a bajas y altas temperaturas en el hepatopáncreas podría relacionarse con el mantenimiento de la capacidad para la digestión final de ítems proteicos como se ha sugerido para otras aminopeptidasas en otras especies de crustáceos (Dittrich, 1992). Similarmente a lo descrito para la actividad de APN de intestino humano (Sanderik et al., 1988), glándula digestiva de la vieira

Patinopecten yessoensis (Umetsu et al., 2003) y homogenatos de intestino de aves (Sabat et al., 1998; Mane et al., 2010), la actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* exhibió una cinética de Michaelis-Menten (Fig. 2.3). En mamíferos, la APN sensible a bestatina del ribete en cepillo del intestino juega un papel importante en la digestión y la absorción de péptidos (Scornik y Botbol, 2001). La actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* parece ser sensible a bestatina ($I_{50} = 15 \text{ mM}$), aunque no se alcanzó inhibición del 100% incluso a altas concentraciones (13 mM-55 mM) del inhibidor, (Fig. 2.4). Los estudios realizados para el presente capítulo no nos permiten establecer si la falta de inhibición total por bestatina podría deberse a la co-existencia de una actividad de APN-bestatina insensible y se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

Los mecanismos de regulación (ej: mensajeros químicos primarios) que participan en la modulación de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de crustáceos decápodos están lejos de haber sido dilucidados. Se ha demostrado que la inyección de hormona L- hiperglucemiante de crustáceos induce un aumento de transcritos símil APN en hepatopáncreas del cangrejo *Pontastacus leptodactylus* (Manfrin et al., 2013). Trabajos previos en nuestro laboratorio, demostraron que la inyección de dopamina 10^{-4} M produce un aumento de los niveles de glucosa en hemolinfa e inhibe la actividad de fosfatasa alcalina en músculo de la quela del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus* (López Mañanes, 2004, Pinoni y López Mañanes, 2004; del Valle et al., 2012). En *N. granulata*, la dopamina tiene un papel en el control de componentes branquiales implicados en respuestas osmoregulatorias (Schleich et al., 1999; Halperin et al., 2004, Genovese et al., 2006). El aumento de la actividad de APN *in vitro* inducido por dopamina 10^{-4} M en hepatopáncreas (Fig. 2.5) sugiere que esta amina biogénica tiene un papel en la modulación de las funciones digestivas a nivel bioquímico así como su efecto directo sobre este tejido. La estimulación *in vitro* por dopamina 10^{-4} M de la liberación de

glucosa a partir de hepatopáncreas de *N. granulata* (resultados no publicados de nuestro grupo) apoya la idea de un rol de esta amina biogénica en la regulación de respuestas metabólicas y de su efecto directo sobre el hepatopáncreas. En el cangrejo eurihalino *Callinectes sapidus* se ha demostrado la existencia de receptores de dopamina del tipo D1 (Arnaldo et al., 2014). Se ha sugerido que *N. granulata* exhibe receptores de dopamina D1-y-D2 en branquias posteriores (Genovese et al., 2006) pero, para nuestro conocimiento, no se ha descrito aún la existencia de receptores dopaminérgicos en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos. Recientemente, se ha reportado la presencia de receptores de dopamina en hepatopáncreas del peneido *Penaeus monodon* (Sukthaworn et al., 2013). Se requieren más estudios para determinar si el efecto de dopamina sobre la actividad de APN en hepatopáncreas (presente tesis) implica su unión a receptores específicos. Como la APN es una ectopeptidasa con un sitio activo extracelular y un dominio intracelular (Chen et al., 2013) se necesitan otros experimentos para determinar posibles mecanismos de acción de la dopamina (ej: activación/inhibición de activadores o inhibidores endógenos de APN, retranslocación de APN desde sitios de almacenamiento intracelulares a la membrana). La modulación por dopamina de la actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* (presente tesis) podría conducir a una capacidad incrementada para la digestión final de ítems proteicos y/o absorción de metabolitos resultantes. En la membrana de borde en cepillo de epitelio intestinal de mamíferos, se ha demostrado la existencia de una cercana asociación entre la APN y transportadores de aminoácidos neutros. El principal transportador de aminoácidos B0AT1 forma complejos con la APN lo cual altera parámetros cinéticos del transportador (Fairweather et al., 2012). En membranas vesiculares apicales de hepatopáncreas de crustáceos decápodos se ha demostrado la existencia de transportadores de aminoácidos (Ahearn, 1982; Ahearn y Clay., 1988; Simmons et al., 2012; Duka y Ahearn, 2013). Para nuestro conocimiento no

se ha reportado aún la existencia de dichos transportadores en hepatopáncreas de *N. granulata* de manera de poder establecer la posible relación entre un aumento en la actividad de APN y el flujo de aminoácidos mediado por los mismos.

En conclusión, los resultados del presente capítulo muestran la existencia de actividad de APN sensible a dopamina en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *N. granulata* sugiriendo la capacidad para la degradación final de ítems proteicos y su posterior absorción y su modulación por un mensajeros químico clave en crustáceos decápodos.

CAPÍTULO 3

Actividad de lipasa sensible a dopamina,

glucagón y AMPc en hepatopáncreas de

Neohelice granulata

Introducción

La digestión de ítems lipídicos de la dieta, la posterior absorción de metabolitos lipídicos en tracto digestivo y su almacenamiento y/o utilización como sustratos de reserva constituyen procesos fisiológicos fundamentales a nivel bioquímico que permiten mantener la homeostasis lipídica (Drewnowski, 1992; Abumrad y Davidson, 2012; Hesse et al., 2013; Dashty, 2014; Henessy et al., 2014). En mamíferos, los triglicéridos (TG) son los lípidos dominantes en la dieta contribuyendo con el 90–95% de la energía total derivada de la grasa dietaria (Allen et al., 2000; Muldford y Villena, 2000; García et al., 2002; Sánchez-Paz et al., 2006; Dima et al., 2009; Latyshev et al., 2009; Iqbal y Hussainof, 2009). Por otro lado, el almacenamiento de lípidos en forma de triglicéridos es un proceso que ha sido conservado evolutivamente existiendo en todos los organismos desde procariotas hasta seres humanos (Birsoy et al., 2013). En mamíferos, el almacenamiento de lípidos en forma de triglicéridos se realiza principalmente en células especializadas (adipocitos blancos) localizadas en el tejido adiposo las cuales desempeñan un rol fundamental en el control de la homeostasis lipídica (Gallagher y LeRoith, 2010; Geerling et al., 2014).

Las lipasas (también denominadas triacilglicerol acilhidrolasas) (EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas que naturalmente catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres de tri, di y monoglicéridos rindiendo ácidos grasos libres y glicerol (Casas-Godoy et al., 2012). En este contexto, las lipasas, son de gran importancia fisiológica en todos los animales debido a su papel en la digestión de lípidos dietarios y en la hidrólisis de triglicéridos de almacenamiento (Coleman y Maschek, 2011; Girouse y Landin, 2012; Henessy et al., 2014).

En varias especies de crustáceos, los lípidos constituyen una fuente principal de energía para el mantenimiento de varios procesos fisiológicos (Sánchez Paz et al., 2007;

Buckup et al., 2008). Como se mencionó anteriormente en la presente tesis (capítulos 1 y 2), el hepatopáncreas constituye un órgano multifuncional con un rol central en procesos de digestión y absorción de nutrientes (Ceccaldi, 1989; Verri et al., 2001; Muhlia-Almazan y García-Carreño, 2003; Zeng et al., 2010, Wang et al., 2014; Riveiro et al., 2014). Además, constituye el principal sitio de almacenamiento de triglicéridos en la mayoría de las especies estudiadas (Allen et al., 2000; Muldford y Villena., 2000; García et al., 2002; Sánchez-Paz et al., 2006; Dima et al., 2009; Latyshev et al., 2009). En este contexto, el nivel y/o modulación de actividad de lipasas en hepatopáncreas constituirían un parámetro indicador de la capacidad lipolítica y de potenciales ajustes en la homeostasis lipídica. Si bien se ha descrito la presencia de actividad de lipasa en hepatopáncreas de varios crustáceos decápodos (González-Baró et al., 2000; Figueredo et al., 2001; Gamboa-Delgado et al., 2003; Johnston, 2003; López-López et al., 2003; Ong y Johnston, 2006; Cherif et al., 2007; Li et al., 2008; Perera et al., 2008; Cherif y Gargouri, 2009; Sagar et al., 2009; Sharshan y Haroon, 2009 ; Rivera-Perez et al. 2010, 2011; Linton et al., 2014), falta información sobre la existencia, características bioquímicas y modulación de la actividad de lipasas en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos. Más aún, según nuestro conocimiento, no se han realizado estudios sobre mecanismos de modulación de la actividad de lipasas y la posible modulación concomitante de triglicéridos en hepatopáncreas de crustáceos decápodos. En mamíferos, varios mensajeros químicos primarios tales como catecolaminas y hormonas peptídicas (ej: glucagón) y mensajeros intracelulares (tales como AMPc) están implicados en la modulación de la actividad de lipasas (Birsoy et al., 2013, Dashty, 2014; Bartness et al., 2014; Geerling et al., 2014).

Trabajos previos de nuestro grupo mostraron la existencia de actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo la capacidad para la hidrólisis de ítems

lipídicos (Michiels, 2010). La respuesta diferencial en relación a la baja y alta salinidad ambiental y en el ambiente natural en relación a hábitats contrastantes de la laguna costera de Mar Chiquita (Michiels, 201; Pinoni et al 2011; 2013) sugieren su rol en posibles mecanismos de ajustes a nivel bioquímico-fisiológico (ej: cambios plásticos en la capacidad lipolítica) frente a variaciones en condiciones ambientales clave. Sin embargo, se desconocen los posibles mecanismos de regulación involucrados. Los resultados presentados en el capítulo 1 de la presente tesis muestran el efecto *in vitro* de dopamina sobre la actividad de N-aminopeptidasa en hepatopáncreas de *N.granulata*, sugiriendo la participación de esta amina biogénica en la regulación de procesos digestivos/absortivos. Trabajos de nuestro laboratorio, muestran que glucagón y AMPc estimulan la liberación de glucosa a partir de hepatopáncreas (resultados no publicados) sugiriendo su papel en la modulación de funciones digestivas y metabólicas a nivel bioquímico en este cangrejo.

En este capítulo, se describen estudios realizados para determinar la modulación por dopamina, glucagón y AMPc de la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. Paralelamente a la actividad de lipasa, se determinó la concentración de triglicéridos como paso inicial para establecer la posible relación entre modulación de la actividad de lipasas y el anabolismo/catabolismo de reservas de lípidos.

Material y Métodos

Productos químicos

El pNPpalmitato (p-nitrophenylpalmitato), el Tris-(hydroxymethylamino-methano) (Tris), el ethyleneglicol ácido N,N',N'-tetraacetico (EGTA) y la seroalbúmina bovina fueron de Sigma (St. Louis, MO, USA) la sacarosa fue

obtenida de Merck (Darmstadt, Germany), el Coomassie blue G250 fue obtenido de Fluka (Alemania). Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Sitios de estudio y recolección de animales

Según lo descrito en el capítulo 1. Los individuos fueron privados de alimento 24h antes de los experimentos (Méndez, 2010; Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013).

Efecto de dopamina DA, AMPc y glucagón sobre la actividad de la lipasa y concentración de triglicéridos en hepatopáncreas

Secciones de hepatopáncreas ($2 \text{ ml} \times \text{g}^{-1}$ de tejido) se incubaron en ausencia o en presencia de DA 10^{-4}M , AMPc 10^{-4}M ó glucagón 10^{-3} M en medio conteniendo (mM: 400 NaCl, 13 KCl, MgCl₂ 10 8,8 H₃BO₃, pH 7,6 a 30 ° C). A tiempo 0 y después de 30 min (dopamina y AMPc) o 60 min (glucagón) de incubación, el medio se separó y el tejido se homogeneizó en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (4 ml xg tejido⁻¹) en homogeneizador CAT (tool T10). La actividad de lipasa se determinó en tejido como se describe a continuación. Paralelamente, se determinó la actividad de lipasa en el medio de incubación como indicador de la posible secreción de enzima (Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999; Lwalaba et al, 2010). No se detectó actividad de lipasa en ninguno de los tiempos de experimentación en ausencia o presencia de los agentes estudiados. Paralelamente a la determinación de la actividad de lipasa, se cuantificó la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas (Pinoni y López Mañanes, 2009; López Mañanes, 2004; Resch-Sdleimer y Sdleimer, 1999).

Determinación de la actividad de lipasa

La actividad de lipasa se determinó colorimétricamente por cuantificación del p-nitrofenol (pNP) liberado a partir de p-nitrofenilpalmitato (pNPP) (Markweg et al., 1995,

con modificaciones, Michiels, 2010; Michiels et al., 2013). La reacción se inició con la adición de p-nitrofenilpalmitato (concentración final 0,7 mM) a una mezcla de reacción conteniendo una alícuota adecuada de la correspondiente muestra (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas) en buffer Tris/HCl 50mM pH 8,5. La incubación se realizó a 37° C durante 5 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de 0,5 ml de TCA 0,2 % v/v. La cantidad de p-nitrofenol liberado se cuantificó por lectura de absorbancia en 410 nm. La actividad de lipasa se expresó como $\mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

Determinación de la concentración de proteínas

Según descrito en la sección materiales y Métodos del Capítulo 1.

Determinación de la concentración de triglicéridos

La concentración de triglicéridos (TG) se midió por el método colorimétrico de glicerol fosfato oxidasa (Wiener TG-Lab AA cod. 861110001). La muestra correspondiente se incubó durante 5 min a 37 ° C (Pinoni et al., 2011). La cantidad de glicerol liberado se determinó mediante la lectura de la absorbancia en 505 nm del complejo coloreado de quinona.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para el sistema operativo Windows, que realiza automáticamente el test de Levene para testear la igualdad de varianzas y un test de Kolmogorov-Smirnov para testear normalidad. Para estudiar el efecto de dopamina se realizó un test-t para muestras independientes. Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados

Efecto *in vitro* de dopamina, glucagón y AMPc sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*

La actividad de lipasa en hepatopáncreas aumentó en presencia de dopamina 10^{-4} M, AMPc 10^{-4} M y glucagón $2 \cdot 10^{-3}$ M (aproximadamente, 100%, 150% y 250%, respectivamente) (Figs 3.1 a 3.3).

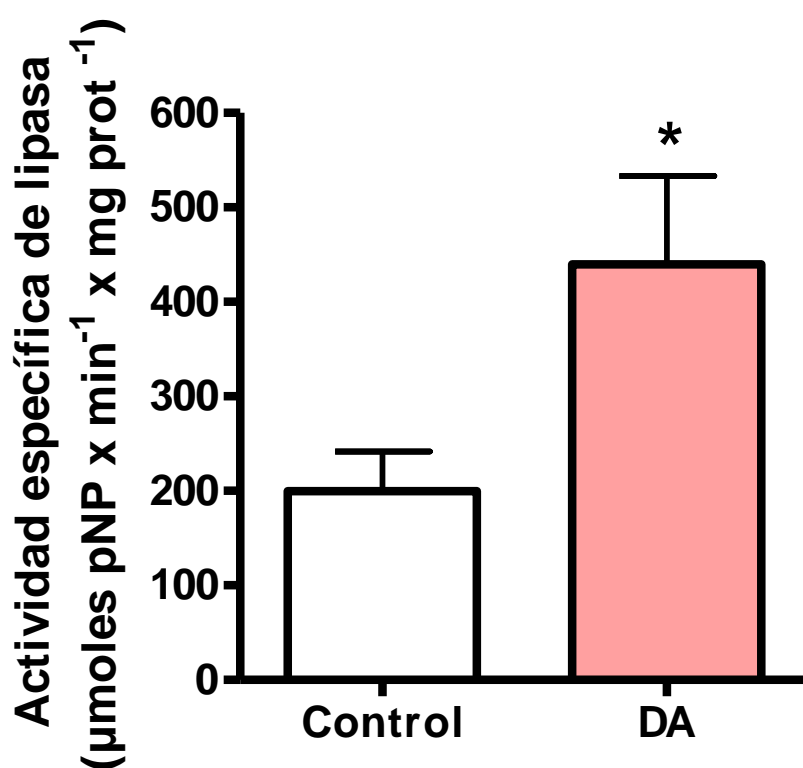


Figura.3.1.- Efecto *in vitro* de dopamina 10^{-4} M sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N.granulata*. Secciones de hepatopáncreas se incubaron con el agente como se describe en la sección Materiales y métodos. Después de la incubación, la actividad de lipasa se determinó en extractos de tejido como se describe en Materiales y métodos. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos.

* Indica diferencias significativas con respecto al control($p < 0,05$).(gl:7;T:2,3;

P:0,048)

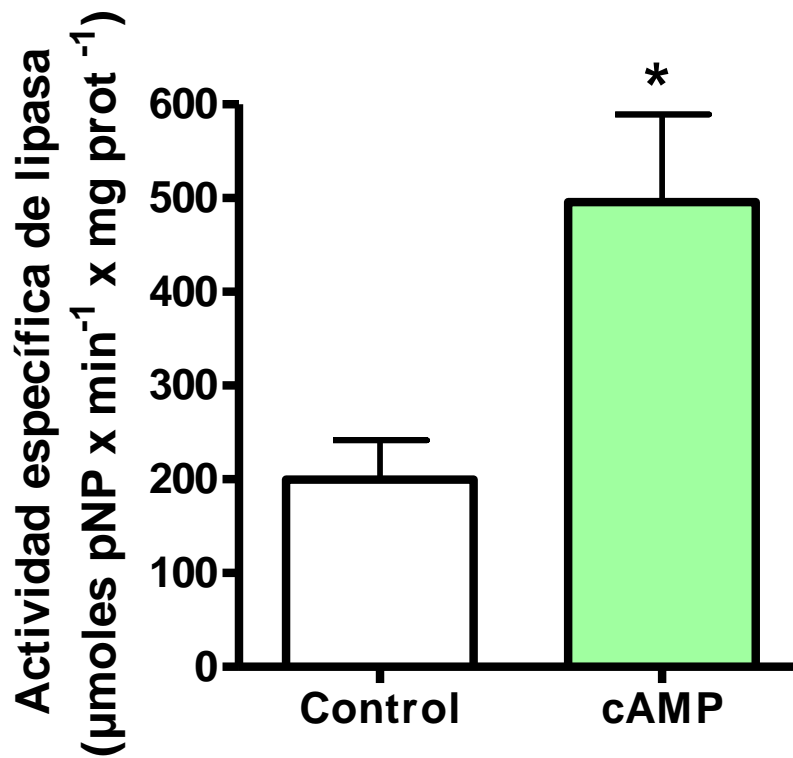


Figura.3.2.- Efecto *in vitro* de AMPc 10^{-4} M sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N.granulata*. Secciones de hepatopáncreas se incubaron con el agente como se describe en la sección Materiales y métodos. Después de la incubación, la actividad de lipasa se determinó en extractos de tejido como se describe en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos. * Indica diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$) (gl: 6; T:2,8; P: 0,028).

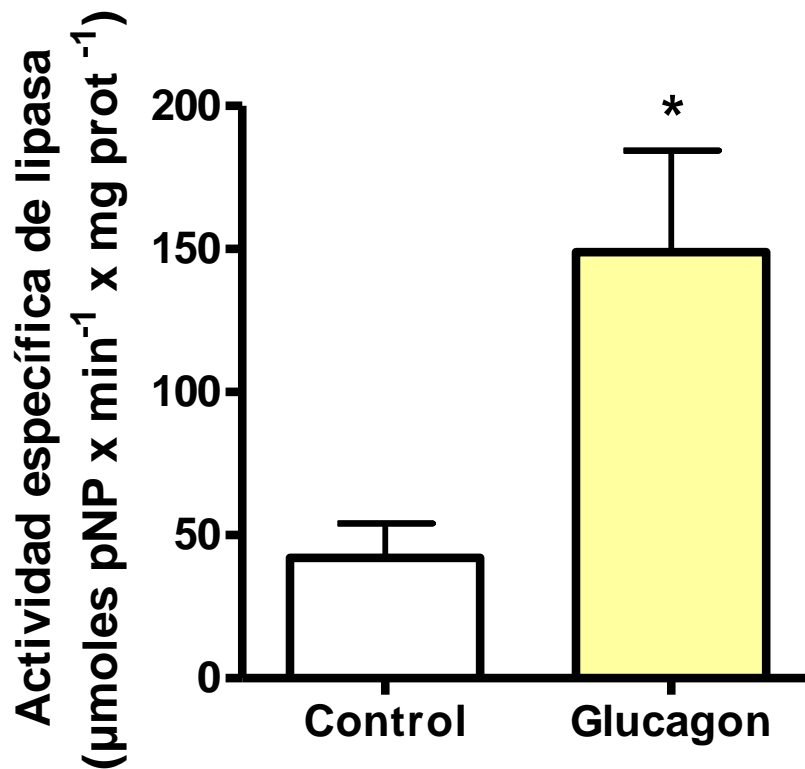


Figura.3.3.- Efecto *in vitro* del glucagón 10^{-3} M sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. Secciones de hepatopáncreas se incubaron con el agente como se describe en la sección Materiales y Métodos. Después de la incubación, se determinó la actividad de lipasa en extractos de tejido como se describe en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos. * Indica diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$). (gl: 8, T:-2,85; P:0,021).

Concentración de triglicéridos hepatopáncreas de *Neohelice granulata*

En presencia de dopamina 10^{-4} M ó AMPc 10^{-4} M, la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas disminuyó (aproximadamente 55 y 70%, respectivamente)

(Fig.3.4 y Fig.3.5). No se produjeron cambios en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas en presencia de glucagón $2 \cdot 10^{-3}$ M (Fig.3.6).

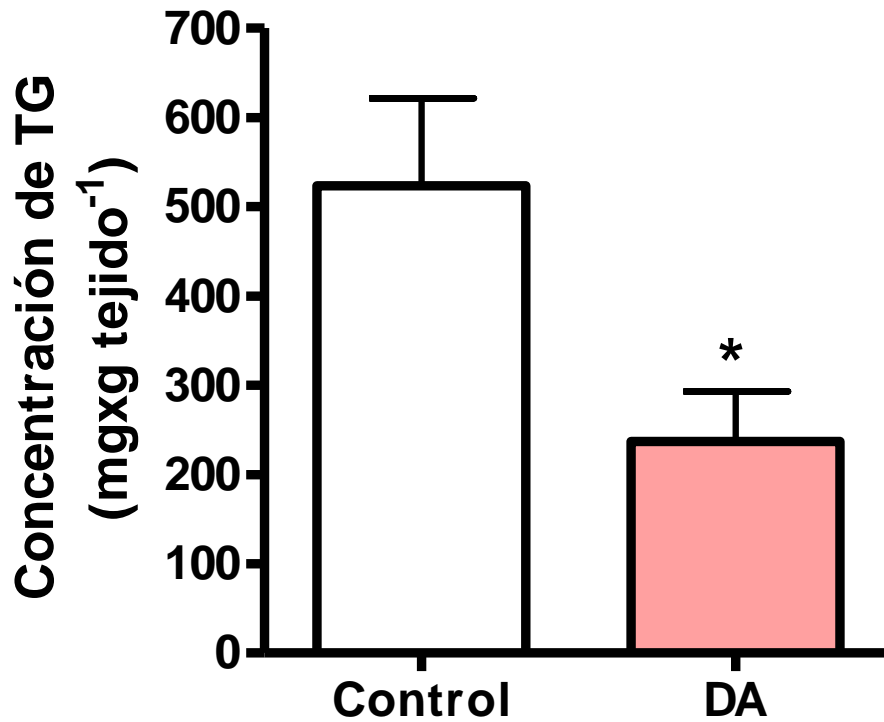


Figura. 3.4.- Efecto *in vitro* de dopamina 10^{-4} M sobre la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata*. Secciones de hepatopáncreas se incubaron con el agente como se describe en la sección Materiales y Métodos. Después de la incubación se midió la concentración de triglicéridos en extractos de tejido como se describe en Materiales y métodos. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos. * Indica diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$). (gl: 9; T: 2,66; P: 0,026).

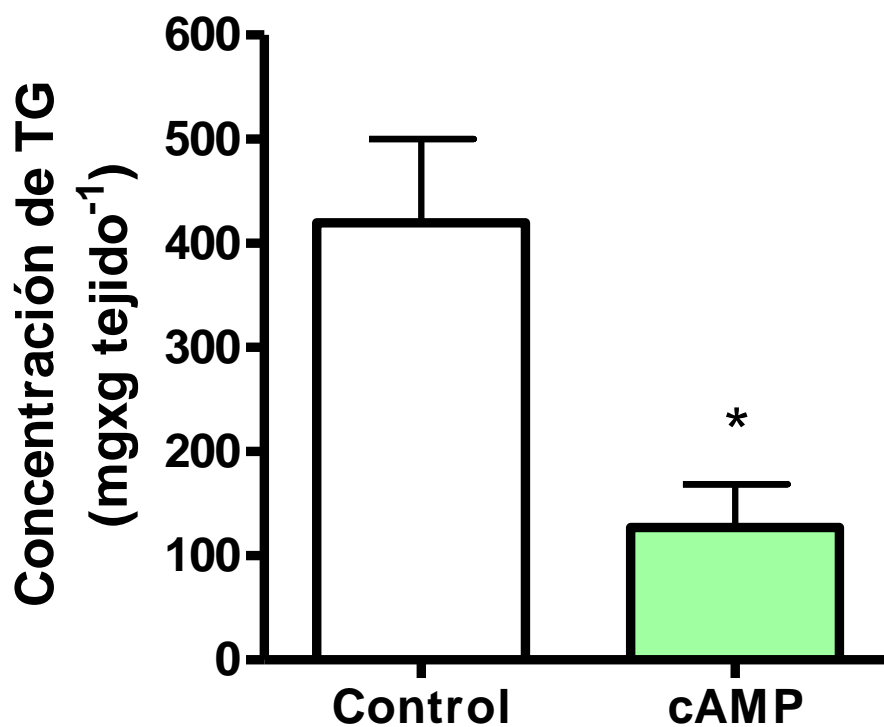


Figura. 3.5.- Efecto *in vitro* de AMPc 10^{-4} M sobre la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata*. Secciones de hepatopáncreas se incubaron con el agente como se describe en la sección Materiales y Métodos. Después de la incubación se midió la concentración de triglicéridos en extractos de tejido como se describe en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos. * Indica diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$). (gl: 7; T: 2,9; P: 0,021).

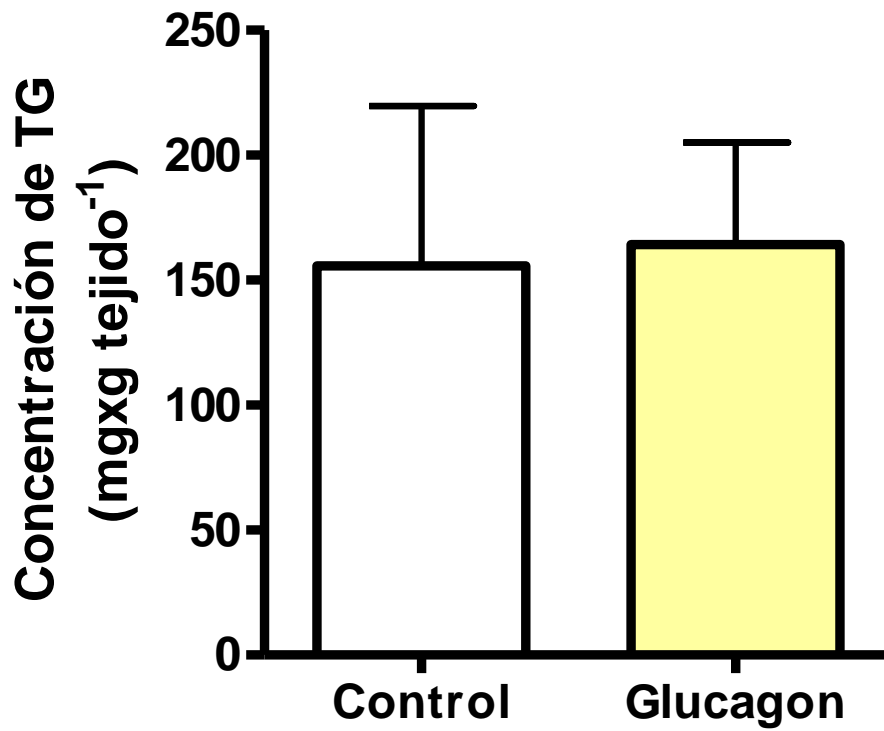


Figura. 3.6.- Efecto *in vitro* del glucagón 10^{-3} M sobre la concentración triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata*. Secciones de hepatopáncreas se incubaron con el agente como se describe en la sección Materiales y Métodos. Después de la incubación se midió la concentración de triglicéridos en extractos de tejido como se describe en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos.

Discusión

En mamíferos, varios mensajeros químicos primarios, como catecolaminas, hormonas peptídicas y mensajeros intracelulares (como AMPc) constituyen importantes moduladores de la actividad de lipasas y de los procesos de lipólisis. Diversos estudios han demostrado que el catabolismo de triglicéridos implica la participación de varias lipasas (triglicerol lipasa, lipasa sensible a hormonas y monoglicerol lipasa) y una compleja modulación de las mismas aún no ha sido totalmente dilucidada (Watt y Spriet, 2010; Birsoy et al., 2013; Dashty, 2014; Bartness et al., 2014; Geerling et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, el hepatopáncreas de crustáceos decápodos juega un rol central en la digestión y absorción de nutrientes, como órgano de reserva y como órgano endocrino (Marmaras et al., 1971; Ceccaldi, 1989; Fingerman et al., 1994; Ahearn et al., 1999; Muhlia-Almazán y García Carreño, 2003; Duka et al., 2013). En la mayoría de especies de crustáceos decápodos estudiadas, los lípidos ingeridos se almacenan principalmente en el hepatopáncreas en forma de triglicéridos (80 a 90%) (Allen et al., 2000; Muldford y Villena, 2000; García et al., 2002; Sánchez-Paz et al., 2006; Dima et al., 2009; Latyshev et al., 2009). El nivel y modulación de la actividad de lipasa en hepatopáncreas tendrían un papel central en la homeostasis lipídica. Se ha propuesto que cuando deben movilizarse las reservas internas, las enzimas digestivas (ej: lipasas) podrían ser activadas y finamente reguladas intracelularmente en el hepatopáncreas (Sánchez Paz et al., 2006). Los resultados de este capítulo muestran que dopamina, AMPc y glucagón inducen un aumento *in vitro* de la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo la existencia de modulación intracelular y la participación de diferentes vías de regulación.

En tracto digestivo de diversos crustáceos decápodos se han identificado aminas biogénicas y la existencia de células epiteliales endócrinas como posibles fuentes de péptidos circulantes originalmente identificados como pertenecientes al sistema nervioso (Christie, 2011; Nagur-Babur et al., 2012; McCoole et al., 2012). Así, se han detectado en hepatopáncreas dopamina y serotonina y diversos péptidos tales como glucagón, insulina, péptidos vasoactivos y gastrina (Gallardo et al., 2003; Fingerman et al., 2004; Huang et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, la dopamina está implicada en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y diferentes componentes a nivel bioquímico en crustáceos decápodos (Fingerman, 1994; Schleich et al., 1999; Cheng et al., 2005; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005; Chiu et al., 2006; Genovese et al., 2006; Hsieh et al., 2006; Yeh et al., 2006; Chang et al., 2007; Liu et al., 2008; Nagur-Babur et al., 2012; Avramov et al., 2013; Pan et al., 2014). En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la inyección de dopamina 10^{-4} M en *C. angulatus* aumenta los niveles de glucosa en la hemolinfa e inhibe la actividad de fosfatasa alcalina en músculo de la quela (López Mañanes, 2004; Pinoni y López Mañanes, 2004; del Valle et al., 2012). En *N. granulata*, la dopamina parece ser un mensajero químico primario con un papel clave en la regulación de componentes involucrados en el proceso osmorregulatorio (Schleich et al., 1999; Halperin et al., 2004; Genovese et al., 2006), homeostasis de glucosa (resultados no publicados de nuestro grupo) y de actividad de APN en hepatopáncreas (capítulo 2, presente tesis). El aumento en la actividad de lipasa en hepatopáncreas en presencia de dopamina (Fig.3.1) sugiere la participación de esta amina biogénica en vías de modulación de esta actividad y además su efecto directo sobre el hepatopáncreas, similarmente a lo sugerido para su acción en la modulación de la actividad de APN (capítulo 2 de la presente tesis). El hecho que no haya ocurrido liberación concomitante

de lipasa desde el hepatopáncreas sugiere la modulación intracelular de esta actividad enzimática por dopamina. Por otro lado, la disminución concomitante en el contenido de triglicéridos en presencia de dopamina 10^{-4} M (Fig. 3.4) sugiere una posible relación entre el aumento de actividad de lipasa y la movilización de esta reserva. Dado que se desconocen las vías implicadas en el catabolismo de lípidos en hepatopáncreas de *N. granulata* y para nuestro conocimiento, en cualquier otro cangrejo eurihalinos, se necesita más investigación para probar esta hipótesis. En mamíferos, se ha descrito que la dopamina induce la movilización de lípidos (Thompson, 1984). Recientemente, se ha descubierto que la dopamina afecta las reservas de lípidos del nemátodo *Caenorhabditis elegans* lo que revela un papel ancestral de la regulación dopaminérgica de las reservas lipídicas (Barros et al., 2014).

En mamíferos, la modulación de la lipasa sensible a hormonas por vías de señalización del AMPc conduce a un aumento en la lipólisis en adipocitos blancos (Dashty, 2014). El aumento *in vitro* de la actividad de lipasa luego de la incubación con AMPc 10^{-4} M (Fig. 3.2) y la disminución en el contenido de triglicéridos (Fig. 3.5) en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiere la modulación del catabolismo de triglicéridos por vías de señalización de AMPc. En insectos, experimentos *in vitro*, demostraron que el efecto de la hormona adipocinética en la lipólisis está mediado en parte por AMPc, lo que sugiere un papel para la PKA en la fosforilación y activación de la TG lipasa (Ogoyi et al, 1998).

En mamíferos, el glucagón está involucrado en la modulación de la actividad de lipasa intracelular (Vaughan et al., 1964.; Slavin et al., 1994, Gravholdt et al., 2001, 2001; Crocker et al., 2014; Tan et al., 2014). El aumento de la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata in vitro* en presencia de glucagón 10^{-3} M (mientras que no se produjo liberación de esta enzima) (Fig. 3.3) sugiere el rol de esta hormona en la

modulación de la actividad de lipasa y apoya la idea de una modulación intracelular. Trabajos experimentales en nuestro laboratorio muestran que el glucagón induce *in vitro* la liberación de glucosa a partir del hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo su participación en la modulación de diferentes procesos metabólicos por efecto directo sobre el tejido (resultados no publicados). Contrariamente a lo esperado, el glucagón no afectó el contenido de triglicéridos en hepatopáncreas (Fig. 3.6). Sin embargo, aún queda por investigar, si esto puede atribuirse a la existencia de mecanismos diferenciales de activación, por ejemplo, diferentes lipasas involucradas y/o vías diferenciales de transducción o dinámica diferencial de la modulación. En humanos, el glucagón parece contribuir poco a la lipólisis *in vivo* y no tuvo efecto *in vitro* sobre la misma en adipocito blanco (Bertin et al., 2001; Gravholt et al., 2001). Recientemente, se han identificado seis genes candidatos para la digestión de lípidos en el hepatopáncreas del cangrejo marino *Portunus trituberculatus*, incluidos entre ellos triacilglicerol lipasa pancreática y la proteína relacionada con la lipasa-2 (Li et al., 2014). En hepatopáncreas de la gamba *Penaeus vannamei*, se ha sugerido la existencia de dos clases de triacilglicerol lipasas, una lipasa expresada exclusivamente en este tejido lo que sugiere su función como una enzima digestiva, y una lipasa intracelular probablemente involucrada en la movilización de las reservas de energía (Rivera-Pérez y García-Carreño, 2011; Li et al., 2014). Se necesitan más estudios para establecer la existencia de actividades diferenciales de lipasas y la posible relación entre dopamina, vías de AMPc, glucagón y el metabolismo de lípidos (ej: catabolismo de triglicéridos) en hepatopáncreas de *N. granulata*.

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran la existencia de actividad de lipasa sensible a dopamina en hepatopáncreas de *N. granulata* y por primera vez, para nuestro conocimiento, en crustáceos decápodos de actividad de lipasa sensible a glucagón y AMPc en hepatopáncreas sugiriendo la participación de estos mensajeros

químicos en la modulación intracelular de la actividad de lipasa en este tejido y la posible relación de la modulación por dopamina y AMPc con el catabolismo de triglicéridos

CAPÍTULO 4

Flexibilidad fenotípica en respuesta a
baja y alta salinidad en Neohelice
granulata: enzimas digestivas y reservas
de energía

Introducción

La zona de planicie de mareas de estuarios y lagunas costeras constituye un ambiente extremadamente desafiante en el cual varios factores abióticos, particularmente la salinidad, pueden variar amplia, abrupta e irregularmente. Esto es particularmente cierto para la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia de Bs. As.) en donde se producen cambios abruptos, amplios, frecuentes y altamente variables en la salinidad (Spivak et al., 1994; Marcovechio et al., 2006; Beltrame et al., 2008; Luppi et al., 2013; observaciones personales). La flexibilidad fenotípica involucra variaciones reversibles, a distintos niveles, dentro de un individuo en respuesta a cambios en condiciones ambientales (Piersma y Drent, 2003; Kelly et al., 2012). Los cangrejos eurihalinos intermareales que habitan zonas de planicie de mareas de lagunas costeras y estuarios están expuestos a cambios abruptos y frecuentes en la salinidad ambiental la cual constituye una de las variables claves que influye en diferentes aspectos de la biología de estos organismos (Kirschner, 1991, 2004; Lucu y Towle; 2003; Bianchini et al., 2008 Freire et al., 2008; Romano y Zeng, 2012; Leignel et al., 2014). Las fluctuaciones en la salinidad ambiental pueden disparar ajustes a distintos niveles (bioquímico, fisiológico, morfológico y/o de comportamiento) para controlar el movimiento de agua e iones entre los individuos y el medio externo (Kirschner, 1991, 2004; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng 2012; Havird et al., 2013; Henry et al., 2013; Larsen et al., 2014).

En baja salinidad, los cangrejos hiperreguladores son capaces de mantener la concentración osmótica de la hemolinfa por encima de la del medio externo mediante la absorción activa de Na^+ y Cl^- desde el medio externo a través de las branquias (Lucu y Towle, 2003; Freire et al., 2008; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Larsen et al., 2014). Por otro lado, en condiciones de alta salinidad, varios

cangrejos eurihalinos son capaces de contrarrestar la entrada de sales mediante la salida activa de iones a través de las branquias manteniendo la concentración osmótica de la hemolinfa por debajo de la del medio externo (hiporregulación). Así, las especies de cangrejos hiper/hiporreguladores son capaces de mantener la concentración osmótica de la hemolinfa dentro de un rango estable, por encima o debajo de la del medio externo en baja y alta salinidad, respectivamente (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Larsen et al 2014; Pinoni et al., 2013). De esta manera, la flexibilidad en el comportamiento osmorregulatorio, constituye una estrategia fisiológica de fundamental importancia para la supervivencia de estos organismos y por ende, para la ocupación y uso del hábitat.

Los cambios moleculares y bioquímicos (ej: actividad de enzimas y sistemas de transporte en branquias) implicados en las respuestas osmorregulatorias (particularmente hiperregulatorias) han sido intensivamente estudiados en varias especies de cangrejos osmoreguladores (López Mañanes et al., 2000, 2002; Schleich et al., 2001; Lucu y Towle, 2003; Bianchini et al., 2008; Freire et al., 2008; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng., 2012; Havird et al., 2013; Henry et al., 2013; Mitchell, 2014, Mitchell y Henry, 2014, Romano et al., 2014). Sin embargo, algunos de los mecanismos involucrados en la adaptación bioquímica a baja y alta salinidad no están aún totalmente comprendidos, particularmente desde una perspectiva metabólica (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012). El concepto de adaptación bioquímica se utiliza comúnmente para definir los cambios a nivel bioquímico que ocurren durante la vida de un organismo en relación a cambios en factores ambientales clave (Hochachka y Somero, 2002; Storey, 2004; Hochchka, 2005). En este contexto, la adaptación bioquímica a la salinidad ambiental es un proceso complejo que implica también la participación de diferentes enzimas y sistemas de transporte en varios tejidos y órganos extrabranquiales tales como

hepatopáncreas y músculo (Jahn et al., 2006; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008, 2009; Athamena et al., 2011; Martins et al., 2011; Pinoni et al., 2013; Romano et al., 2014). Las enzimas digestivas cumplen un rol fisiológico esencial ya que constituyen el vínculo entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013). Varios organismos que habitan en hábitats heterogéneos exhiben flexibilidad digestiva a nivel bioquímico (ej: modulación de la actividad de enzimas digestivas) en respuesta a cambios en condiciones ambientales (del Valle et al., 2004; 2006; Iglesias et al., 2009; Naya et al., 2008, 2009; Karasov et al., 2011; del Valle y López Mañanes., 2012; Brezk et al., 2013; Liu et al., 2013; McWilliams y karasov, 2014). En crustáceos decápodos, el hepatopáncreas tiene un rol central en la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes, siendo el sitio principal sitio de síntesis de enzimas digestivas y donde comienza y se lleva a cabo principalmente la digestión intracelular (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazan y Garcia-Carreño, 2003; Zeng et al., 2010, Wang et al., 2014; Riveiro et al., 2014). Además, el hepatopáncreas es el sitio inicial de síntesis de macromoléculas (ej: lípidos/proteínas) la cual puede continuar en algunas especies hasta 2-3 días luego de la ingesta de alimento (Houlihan et al., 1990; Mente, 2003; Mente et al., 2003; McGaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014). Así, diferentes niveles de actividad de enzimas digestivas específicas en el hepatopáncreas se ha relacionado con la posibilidad de una disponibilidad diferencial de sustratos (ej: lípidos y proteínas) en relación a la baja salinidad (Li et al., 2008; Asaro et al., 2011; Romano y Zeng., 2012; Wang et al., 2013). Por otro lado, la hiper e hiporregulación, en cangrejos parece requerir distintos mecanismos (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng 2012; González et al., 2012). Las diferentes respuestas osmorregulatorias en relación a la salinidad ambiental pueden implicar la movilización de distintas reservas de energía (Luvizotto-Santos et al., 2003; Bianchini et al., 2008; Romano y Zeng, 2012; Romano et

al., 2014). Así, los patrones heterogéneos de salinidad ambiental en el intermareal de estuarios o lagunas costeras que impliquen diferentes respuestas osmorregulatorias (hipo o hiperregulación) en cangrejos osmorreguladores pueden imponer desafíos diferenciales a los individuos que podrían llevar a ajustes en procesos digestivos/absortivos a nivel bioquímico y de distribución/utilización de sustratos energéticos. En este contexto, hemos demostrado previamente, la existencia de respuestas diferenciales de la actividad de diferentes enzimas digestivas en hepatopáncreas y en el contenido de sustratos de energía en diferentes sitios de reserva en individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita expuestos a largo plazo a condiciones de baja y alta salinidad sugiriendo la existencia de ajustes diferenciales digestivos y metabólicos a nivel bioquímico en relación a la hiper e hiporregulación (Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013). Por otro lado, se ha sugerido que más que la habilidad osmorregulatoria sola, la habilidad para enfrentar las demandas concomitantes de la osmorregulación y de los procesos digestivos y absortivos permitiría a cangrejos hiperreguladores explotar o persistir en áreas de baja salinidad (Curtis y McGaw, 2010; Curtis et al., 2013). Sin embargo, faltan estudios sobre los posibles ajustes (ej: actividad de enzimas digestivas y contenido de reservas de energía) luego de la ingesta de alimento en condiciones de baja y alta salinidad en *N. granulata* en particular y en cangrejos hiper/hiporreguladores en general. Nosotros especulamos que el patrón digestivo y metabólico diferencial que exhiben individuos machos adultos de *N. granulata* de la zona de planicie de marea de la laguna costera de Mar Chiquita en relación a la hiper e hiporregulación (Pinoni et al., 2013) podrían involucrar ajustes diferenciales postprandiales en la dinámica y el patrón de modulación de la actividad de enzimas digestivas y/o en el contenido de diferentes reservas de energía en condiciones de baja y alta salinidad. En este contexto, se determinó la respuesta y capacidad osmorregulatoria,

las actividades de lipasa, proteolítica total y aminopeptidasa-N en hepatopáncreas y el contenido de triglicéridos y proteínas en órganos de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela, branquias anteriores y posteriores; Pinoni et al., 2011, 2013) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en condiciones de osmoconformación (35‰ de salinidad) (López Mañanes et al., 2000; Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013) y en condiciones de baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. La capacidad osmorregulatoria, la cual se define como la diferencia entre el valor de la osmolalidad de la hemolinfa y el valor de osmolalidad del correspondiente medio externo, es una herramienta comúnmente utilizada para evaluar la performance osmorregulatoria (Charmantier et al., 1989; Lignot et al., 2000; Charmantier y Anger., 2011). Las actividades de lipasa, APN y proteolítica total en el hepatopáncreas y el contenido de lípidos y proteínas en sitios de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela, branquias anteriores y posteriores (Artillo et al., 2008; Pinoni et al., 2011; 2013) se determinaron como índices de ajustes en componentes del metabolismo lipídico y/o proteico.

Materiales y Métodos

Captura y mantenimiento de los animales

Se recolectaron machos adultos de *Neohelice granulata* en intermuda con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, en la planicie de marea de la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, 37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Los individuos se transportaron inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección. Los cangrejos se aclimataron durante 13 días en acuarios a 35‰ de salinidad (condiciones de osmoconformación) (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013) y a baja (10‰) y alta salinidad (37‰) en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ$ C) y fotoperíodo (12 h. luz/ 12 h. oscuridad). El agua se aireó y filtró permanentemente. Los acuarios se cubrieron con

nylon negro para reducir disturbios. Los individuos fueron alimentados tres veces por semana con alimento comercial balanceado Wardley USA (0,07 g por individuo).

Luego de este período, los individuos fueron alimentados individualmente. El tiempo cero se tomó cuando la cantidad total de alimento ofrecido fue ingerida (lo que tomó como máximo 5 minutos). Los individuos fueron crioanestesiados a tiempo cero o a diferentes tiempos, que se indican en cada experimento, luego de la ingesta de alimento para realizar las correspondientes determinaciones.

Preparación de muestras

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 20 minutos en hielo, luego se pesaron y midieron. Posteriormente se extirpó el hepatopáncreas, músculo de quela, branquias anteriores (1-5) y posteriores (6-8) (López Mañanes et al., 2000) y se pesaron inmediatamente. Después de pesar las branquias anteriores y posteriores, el hepatopáncreas y músculo de la quela, se utilizaron inmediatamente para preparar los correspondientes homogenatos de la siguiente manera. Los hepatopáncreas se homogeneizaron en 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 (4 ml g⁻¹ de tejido) (x120 homogeneizador CAT, herramienta T10) y se centrifugó a 10.000 xg durante 15 min (Sorval, rotor SS34, refrigerado). Antes de la centrifugación, se separó una alícuota del homogenato para la determinación de los triglicéridos y contenido de proteínas. El sobrenadante se separó en alícuotas de 200 µl y se almacenó a -20 ° C. El músculo de la quela se homogeneizó en buffer (0,25 M sacarosa/0.5 mM de EGTA-Tris, pH 7,4) (8 mL g⁻¹ de tejido) en homogeneizador CAT, herramienta T10 en hielo. El homogenato se fraccionó en alícuotas de 400 µl y se almacenó a -20 ° C. Las branquias anteriores y posteriores se colocaron en medio de homogeneización (0,25 M sacarosa/0.5 mM de EGTA-Tris, pH 7,4) (4 mL g⁻¹ de tejido) y se homogeneizaron en hielo con 20 golpes en el

homogenizador manual Potter-Elvehjem, 1700 rpm el homogenato se centrifugó a 2000 g (IEC-Centra 7R refrigerada) durante 5 minutos (Pironi y Lopez Mañanes, 2009). Trabajos previos de nuestro grupo muestran que en individuos de *N. granulata* de planicie de mareas en condiciones de osmoconformación se produce hiperglicemia post-pandrial entre 1-4h luego de la ingesta de alimento y una modulación de la actividad de amilasa y lipasas entre 2-4 h sugiriendo el comienzo de procesos digestivos y absorptivos a corto plazo luego de la ingesta de alimento (Méndez, 2010). Por otro lado, el hecho que la defecación se produce durante un amplio periodo (desde antes de las 8 horas hasta al menos las 72 horas post-ingesta) (Méndez, 2010) sugiere que este cangrejo posee un ciclo digestivo largo en comparación a otros crustáceos (McGaw y Reiber, 2000; Curtis et al., 2010).

Osmolalidad de la hemolinfa

Las muestras de hemolinfa (aproximadamente 500 ul) se tomaron del seno infrabranquial en la base del quelípedo por medio de una jeringa y se transfirió a un tubo de centrifuga frío. El suero fue separado por centrifugación a $10.000 \times g$ (Beckman, Microfuge, B) durante 30 s. La osmolalidad se midió mediante un osmómetro automático (Osmomat 030 D, GONOTEC).

Determinación de actividades enzimáticas

La actividad de lipasas según se describe en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 3 de la presente tesis.

La actividad proteolítica total se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de azocaseína en buffer Tris 100 mM / HCl (pH 7,5) como se describió previamente (Pironi et al 2011, 2013). La reacción se inició por la adición del sustrato azocaseína (concentración final 1 % p/v). La incubación se realizó a 45° C durante 30 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de TCA frío (10 % p/v). Se dejó en frío y luego se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 20 min. (IEC-Centra 7R, refrigerada). La azocaseína degradada se cuantificó en el sobrenadante por medición de la absorbancia en 440 nm. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de extracto de enzima que produce un aumento de 1 en A440. La actividad proteolítica se expresó como U x h-1 x mg proteína -1.

La actividad de APN se determinó según se describió en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 2 de la presente tesis.

Determinación de la concentración de triglicéridos

Los triglicéridos (TG) se midieron como se describió en la sección Materiales y Métodos del capítulo 3 de la presente tesis.

Determinación de la concentración de proteínas

Según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas de Levene y un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico (One Way ANOVA). Para identificar diferencias se utilizó un test a posteriori ANOVA (Test Holm-Sidak). Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados

Osmolalidad de la hemolinfa y capacidad osmorregulatoria en alta y baja salinidad a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento

En individuos expuestos a baja salinidad (10‰) la osmolalidad de la hemolinfa a tiempo cero y a las 24, 48 y 72 h luego de la ingesta de alimento fue mayor (aproximadamente un 100%) que la osmolalidad del medio externo. Los valores de osmolalidad de la hemolinfa a las 24 y 48 h luego de la ingesta de alimento fueron similares al valor a tiempo cero (Fig. 4.1.). La capacidad osmorregulatoria (hiperregulatoria) fue similar a tiempo cero y a 24 y 48h luego de la ingesta de alimento (Recuadro Fig 4.1)

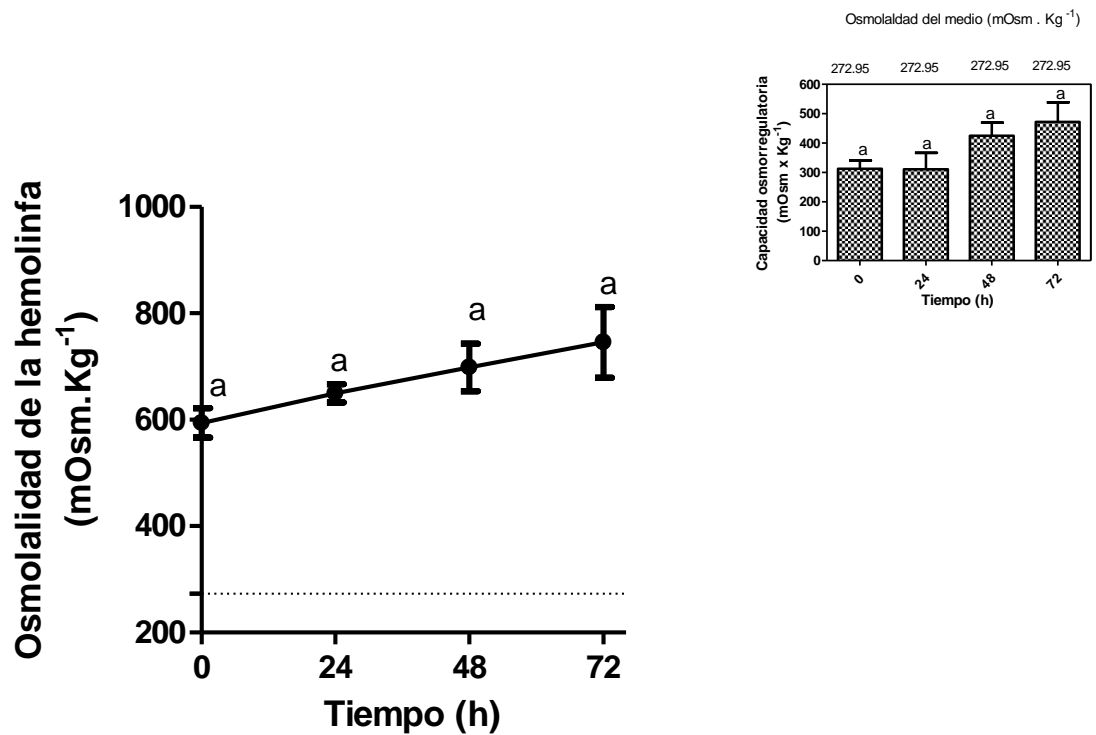


Figura.4.1- Osmolalidad de la hemolinfa a tiempo cero y luego de 24, 48 y 72hs de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 10 % de salinidad. *Indica diferencias significativas con respecto al valor del medio externo. Letras iguales significan valores similares entre sí. Los valores son las medias \pm S.E para 5 individuos. (gl: 39; F:13; P:0,001) **Recuadro:** capacidad osmorregulatoria (diferencias entre la osmolalidad del medio y la osmolalidad de la hemolinfa).

En individuos expuestos a alta salinidad (37%), la osmolalidad de la hemolinfa a tiempo cero y a las 24 y 48 h luego de la ingesta de alimento fue menor (aproximadamente un 15%) que la osmolalidad del medio externo. Los valores de osmolalidad de la hemolinfa a las 24 y 48 h luego de la ingesta de alimento fueron similares al valor a tiempo cero (Fig. 4.2). La capacidad osmorregulatoria (hiporregulatoria) fue similar a tiempo cero y a 24 y 48h luego de la ingesta de alimento (Recuadro Fig 4.2)

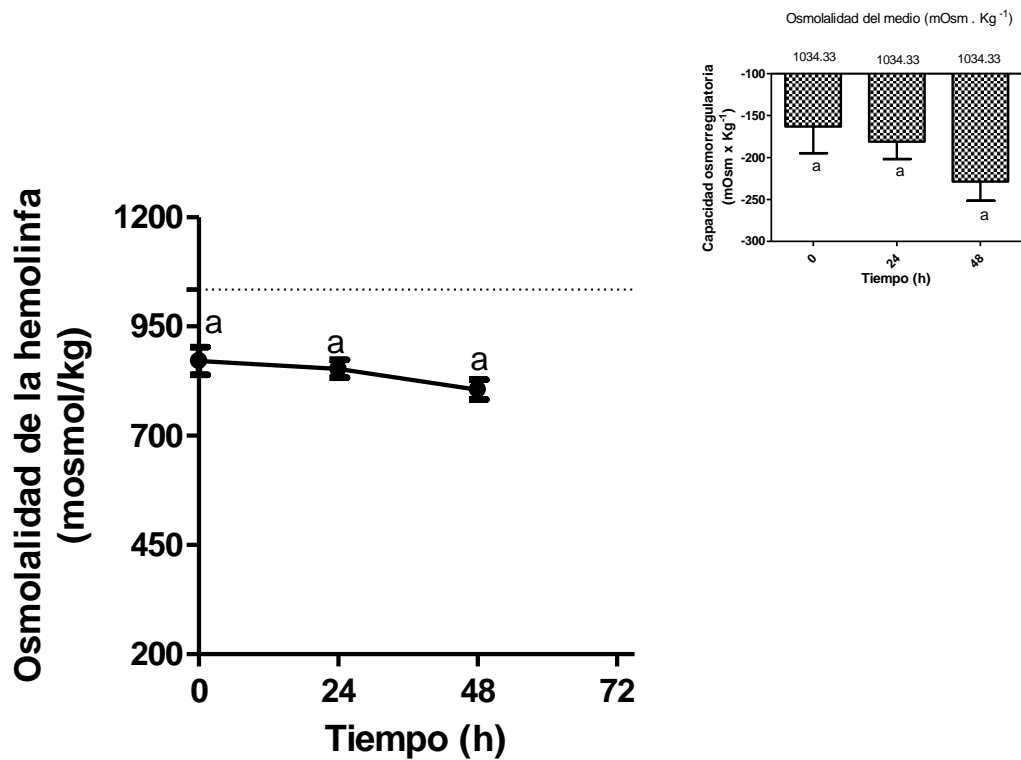


Figura.4.2- Osmolalidad de la hemolinfa a tiempo cero y luego de 24 y 48 h de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 37 ‰ de salinidad *Indica diferencias significativas con respecto al valor del medio externo. Letras iguales significan valores similares entre sí. Los valores son las medias \pm S.E para 5 individuos. (gl: 25; F:6; P:0,004)

Recuadro: capacidad osmorreguladora (diferencias entre la osmolalidad del medio y la osmolalidad de la hemolinfa)

Actividades de enzimas digestivas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Actividad de lipasa

En 35‰ de salinidad (salinidad a la cual *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita osmoconforma (López Mañanes, 2000; Schleich et al., 2001; Pinoni, 2009;

Pinoni y López Mañanes, 2009; Asaro et al., 2011) la actividad de lipasa 24 h luego de la ingesta de alimento fue similar al valor a tiempo cero mientras que fue menor (alrededor de 60%) a las 48 h (Fig. 4.3.A). A las 72h la actividad de lipasa fue similar al valor a tiempo cero (Fig.4.3.A).

En 10‰ de salinidad, la actividad de lipasa a 2, 4, 24, 48 y 72 h luego de la ingesta de alimento fue similar a la correspondiente actividad a tiempo cero (Fig4.3.B).

En 37‰ de salinidad, la actividad de lipasa a las 2, 4 y 24 h luego de la ingesta fue similar al valor a tiempo cero, mientras que fue mayor (alrededor de 335 %) a las 48 h (Fig.4.3.C).

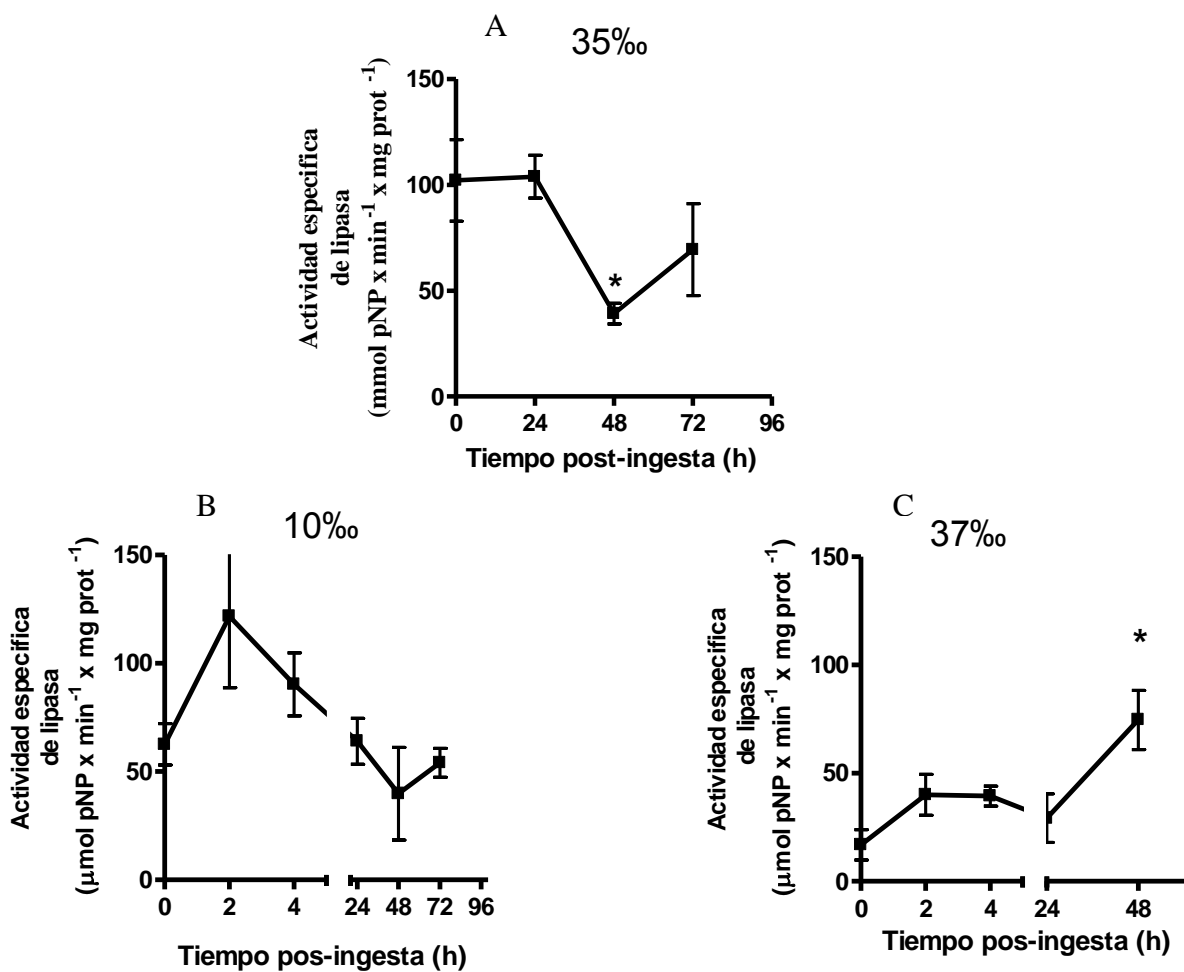


Figura.4.3- Actividad de lipasa en hepatopáncreas a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias ± S.E. para 5 individuos. (gl: 20; F:4,38; P: 0,018)

Actividad proteolítica total

En 35‰ de salinidad, la actividad proteolítica total en hepatopáncreas a las 24 luego de ingesta de alimento fue similar al valor a tiempo cero mientras que fue menor

(alrededor de 60%) a las 48 h (Fig4.4.A). A las 72h la actividad proteolítica total fue similar al valor a tiempo cero (Fig 4.4.A).

En 10‰ y 37‰ de salinidad, no se encontraron diferencias significativas en la actividad proteolítica total en hepatopáncreas a ninguno de los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (Fig.4.4.B y Fig.4.4C).

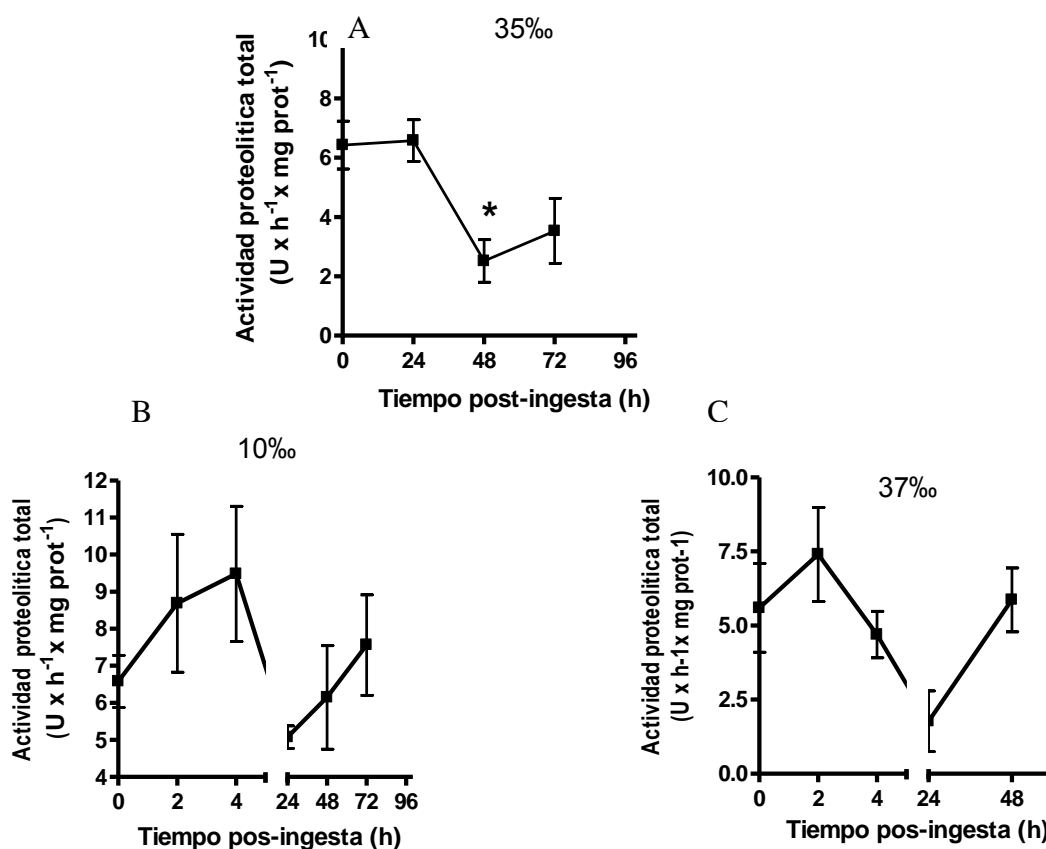


Figura.4.4- Actividad proteolítica en hepatopáncreas a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias ± S.E. para 5 individuos. (gl: 18; F: 5,74; P: 0,008).

Actividad de Aminopeptidasa-N

En 35‰ de salinidad, la actividad de APN en hepatopáncreas a las 24 luego de ingesta de alimento fue mayor (alrededor de un 50%). La actividad de APN disminuyó posteriormente hasta valores similares al de tiempo cero a las 48 h y 72h luego de la ingesta de alimento (Fig.4.5.A).

En 10‰ de salinidad no se observaron diferencias significativas en la actividad de APN a ninguno de los tiempos estudiados (Fig. 4.5.B).

En 37‰ de salinidad, la actividad de APN a las 2, 4 y 24 h luego de la ingesta fue similar al valor a tiempo cero, mientras que fue mayor a las 48 h (alrededor 150%) (Fig.4.5.C).

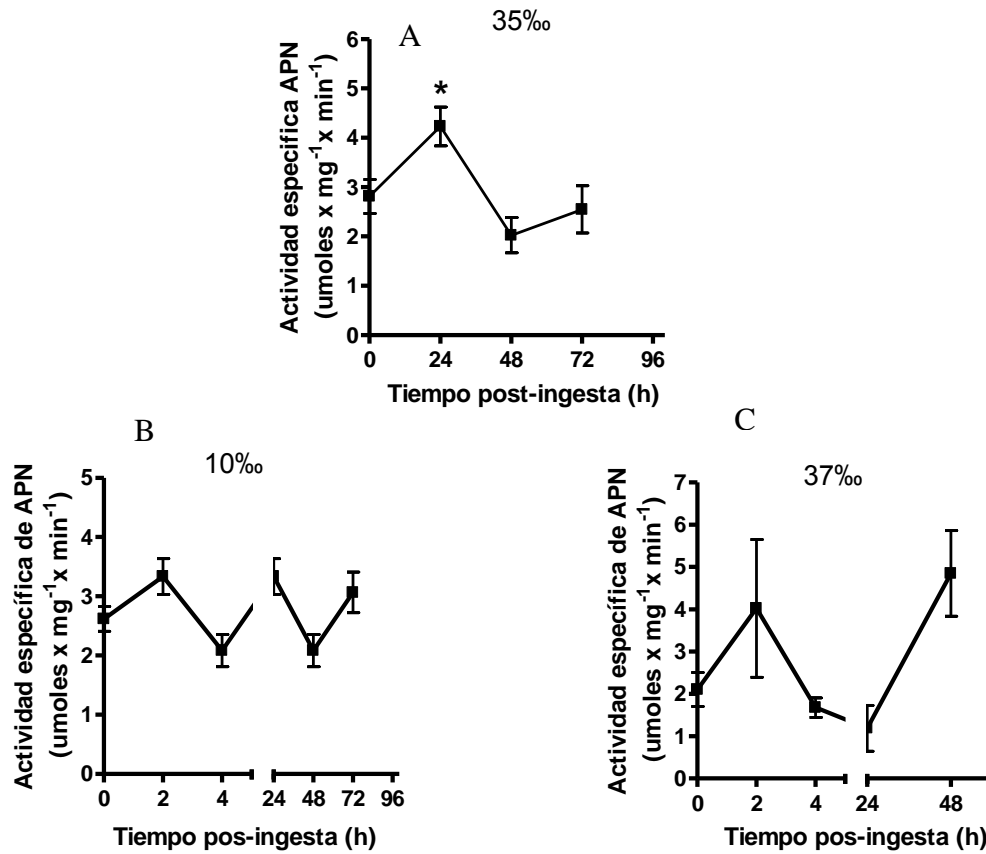


Figura.4.5- Actividad de APN en hepatopáncreas a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias ± S.E. para 5 individuos. (gl:17, F:5,17, P:0,013; gl:16, F:3,96, P:0,0028)

Contenido de sustratos de energía en hepatopaneas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Triglicéridos (TG)

En individuos expuestos a 35‰ la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas fue mayor (alrededor de 420%) 24 h luego de la ingesta de alimento con respecto a tiempo cero y se mantuvo constante a las 48 y 72 h (Fig.4.6.A).

En condiciones de baja salinidad (10‰) se produjo un aumento en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas 4 h luego de la ingesta de alimento (alrededor de 529%) (Fig.4.6.B).

En individuos mantenidos en 37‰ de salinidad, no se observaron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas con respecto a tiempo cero a ninguno de los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento (Fig.4.6.C).

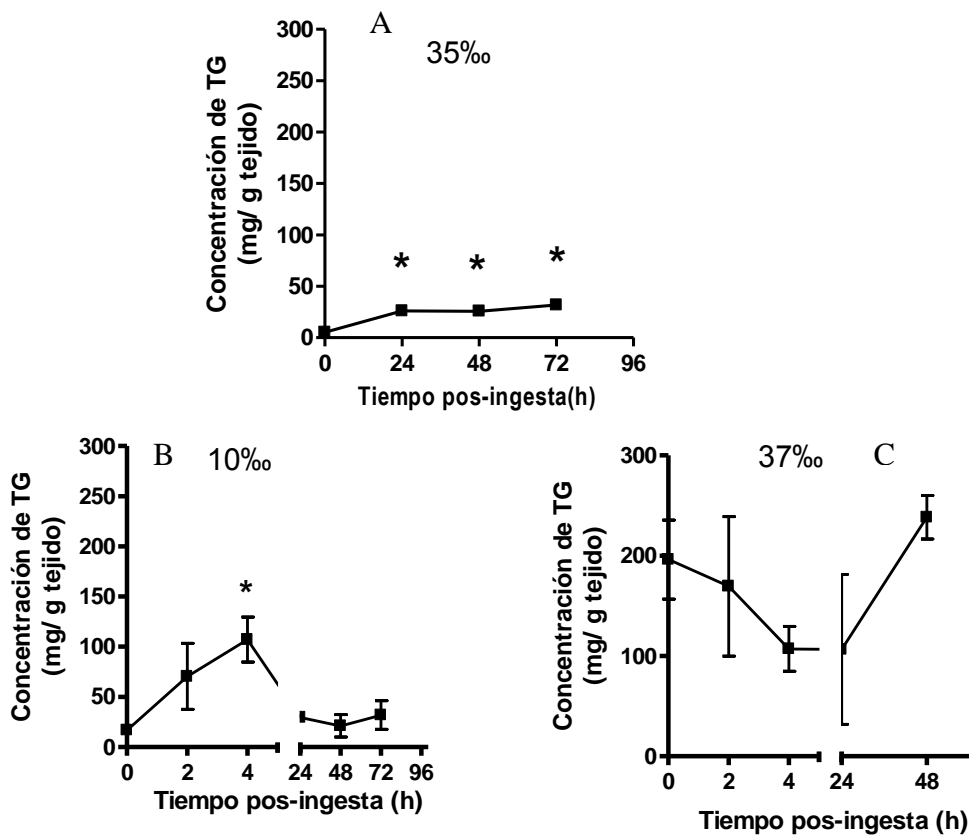


Figura.4.6- Concentración de TG en hepatopáncreas a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$. Los valores son las medias \pm S.E para 5 individuos. (gl: 17, F: 8,69, P:0,002; gl: 27,F: 5,66, P: 0,002)

Proteínas

En condiciones de osmoconformación (35‰ de salinidad) no se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (Fig.4.7.A)

En condiciones de baja salinidad (10‰) la concentración de proteínas en hepatopáncreas a las 2 y 4 h luego de la ingesta de alimento fue menor (alrededor de un 40-60%, respectivamente) que la concentración a tiempo cero (Fig.4.7.B). Posteriormente, se produjo un incremento en la concentración de proteínas en hepatopáncreas alcanzando a las 24-72 h valores similares a tiempo cero (Fig.4.7.B).

En individuos mantenidos a 37‰ no se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento a ninguno de los tiempos estudiados (Fig.4.7.C).

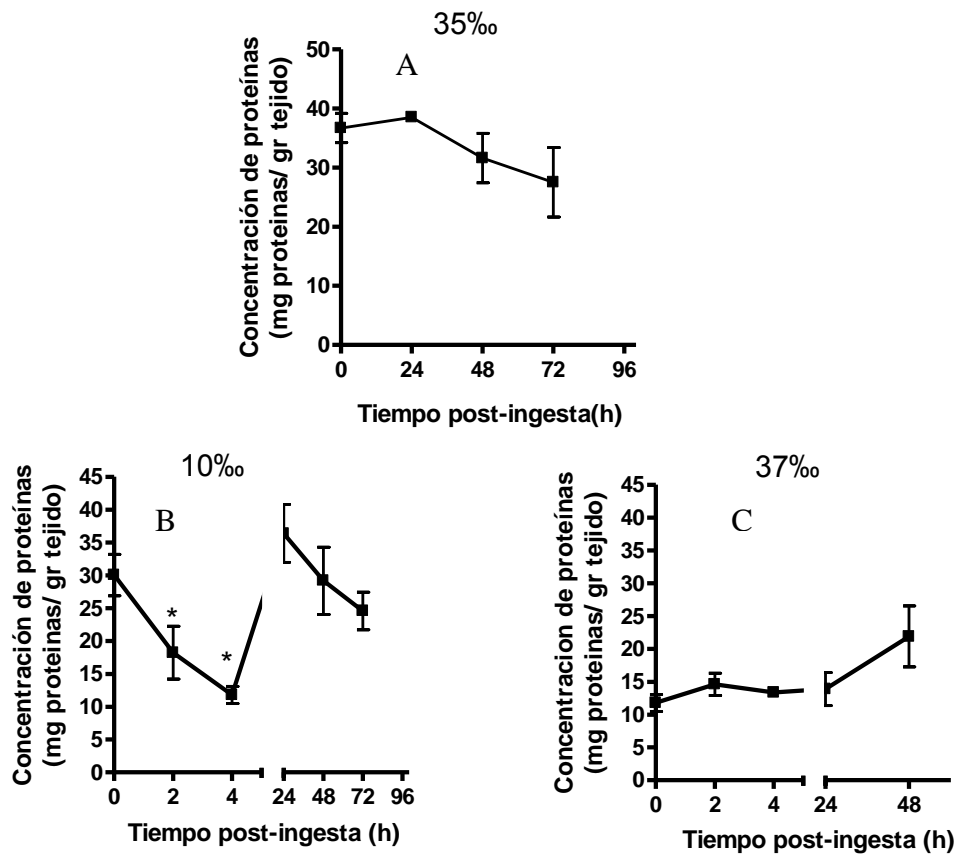


Figura.4.7.- Concentración de proteínas en hepatopáncreas a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 29; F: 5,75; P: 0,001)

Contenido de sustratos de energía en músculo de la quela luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Triglicéridos (TG)

En individuos aclimatados a 35‰ la concentración de triglicéridos en músculo de la quela fue similar al valor a tiempo cero 24 h luego de la ingesta de alimento mientras que fue menor (alrededor de un 85%) con respecto a tiempo cero a las 48 h luego de la

ingesta de alimento (Fig.4.8.A), Posteriormente, la concentración de triglicéridos disminuyó siendo a las 72hs luego de la ingesta de alimento similar al valor a tiempo cero (Fig.4.8.A).

En 10‰ de salinidad, la concentración de triglicéridos en músculo de la quela fue similar al valor a tiempo cero 24 h luego de la ingesta de alimento mientras que fue menor (alrededor de un 90%) a las 48 hs y 72 h luego de la ingesta de alimento (Fig.4.8.B). En individuos mantenidos en alta salinidad (37‰) no se detectó TG en músculo de la quela a tiempo cero ni a ninguno de los tiempos luego de la ingesta de alimentos estudiados.

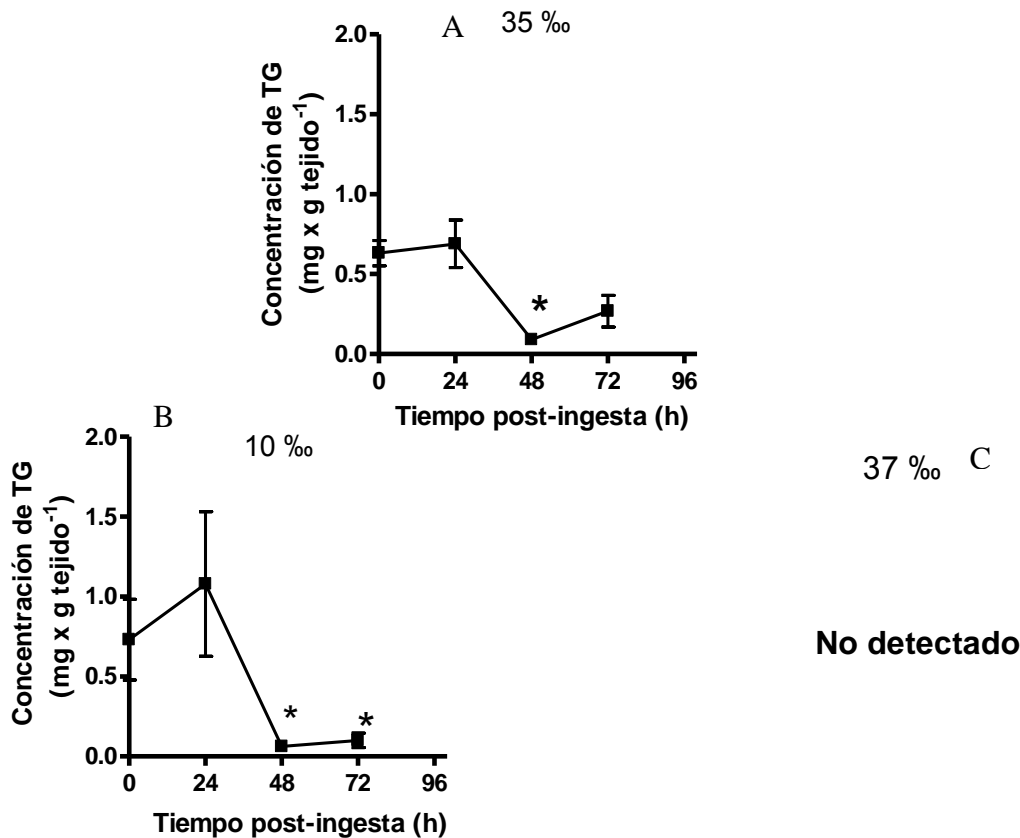


Figura.4.8.- Concentración de triglicéridos (TG) en músculo de la quela a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias \pm S.E para 5 individuos.(gl: 12, F:5,32, P: 0,016; gl: 12, F:5,21, P: 0,019)

Proteínas

En 35‰ de salinidad, la concentración de proteínas en músculo de la quela 24 hs luego de la ingesta de alimento fue mayor (alrededor de un 210%) con respecto a la concentración a tiempo cero (Fig.4.9.A). A las 48 y 72 h luego de la ingesta de alimento, la concentración de proteínas se mantuvo en valores significativamente mayores que el valor a tiempo cero (Fig.4.9.A).

En 10‰ de salinidad, la concentración de proteínas en músculo de la quela fue menor (alrededor de un 70%) a las 2 h y 4 h luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (Fig.4.9.B). Posteriormente, la concentración de proteínas se incrementó siendo los valores a 24-72 h similares a los de tiempo cero (Fig.4.9.B).

En 37‰ de salinidad, no hubo diferencias en la concentración de proteínas de músculo de la quela luego de la ingesta de alimento (Fg4.9.C).

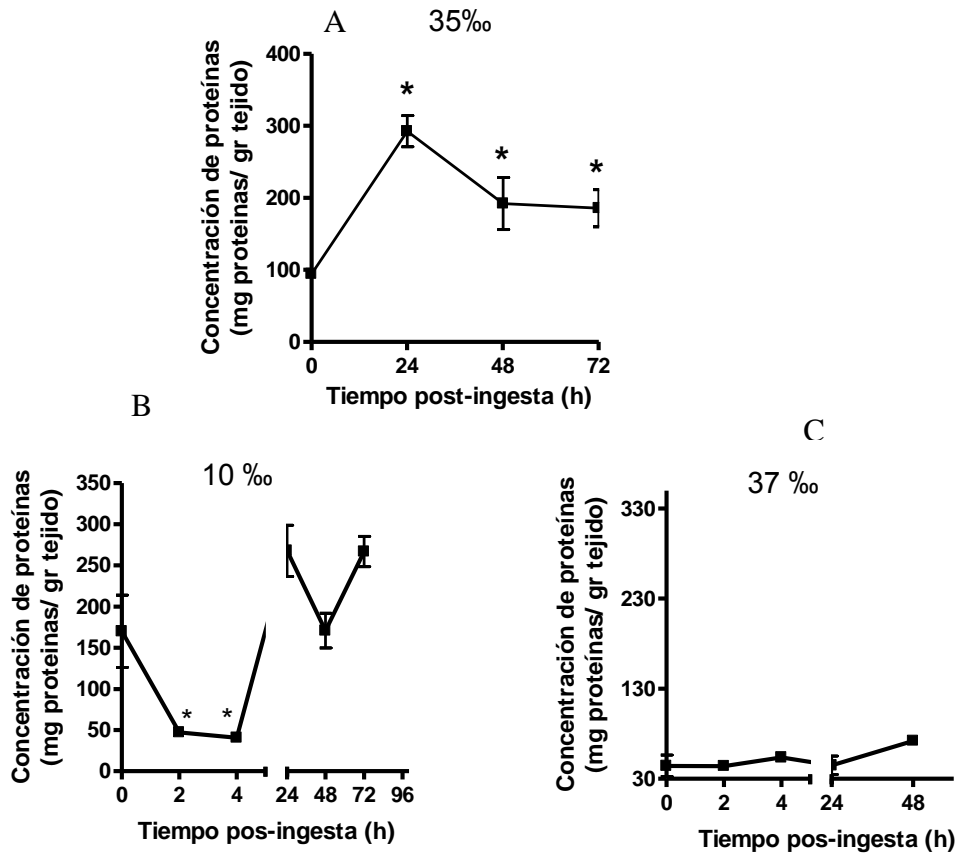


Figura.4.9.- Concentración de proteínas en músculo de la quela a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 1, F:10, P: 0,001; gl: 19, F: 3,4, P: 0,0044)

Contenido de sustratos de energía en branquias anteriores y posteriores luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Triglicéridos (TG)

No se detectaron TG en branquias anteriores ni posteriores.

Proteínas

En 35‰ de salinidad no se detectaron diferencias significativas en la concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores a los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento (Figs.4.10.A y 4.10.B).

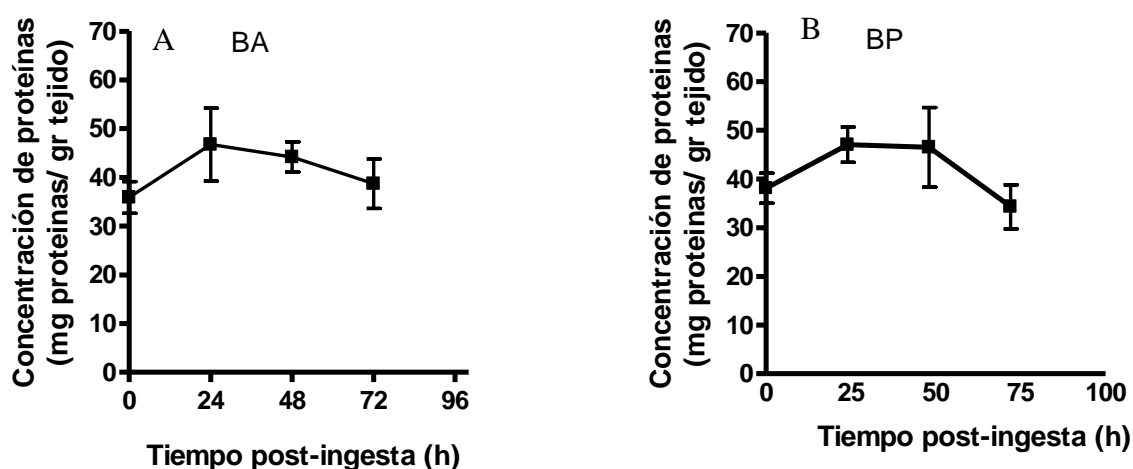


Figura.4.10.- Concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35 ‰ de salinidad.* Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias \pm S.E. para 5 individuos.

En baja salinidad (10‰), la concentración de proteínas en branquias anteriores a las 2-4 h luego de la ingesta de alimento fue menor (aproximadamente un 75%) del valor a tiempo cero (Fig.4.11.A). Por otro lado, la concentración de proteínas en branquias posteriores a las 48hs luego de la ingesta de alimento fue mayor (aproximadamente 77%) del tiempo cero (Fig. 4.11.B).

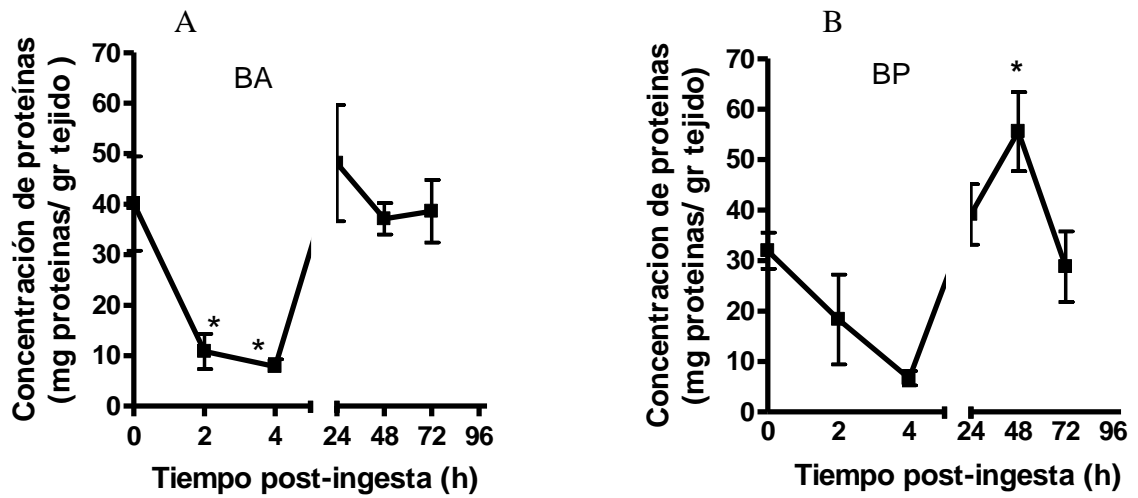


Figura.4.11.- Concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a baja (10%) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$. Los valores son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 29; F: 0,001; P: 0,001; gl: 28; F: 6,86; P: 0,001)

En 37% de salinidad, no se detectaron diferencias significativas en la concentración de proteínas en branquias anteriores o posteriores (Figs.4.12.A y 4.12.B).

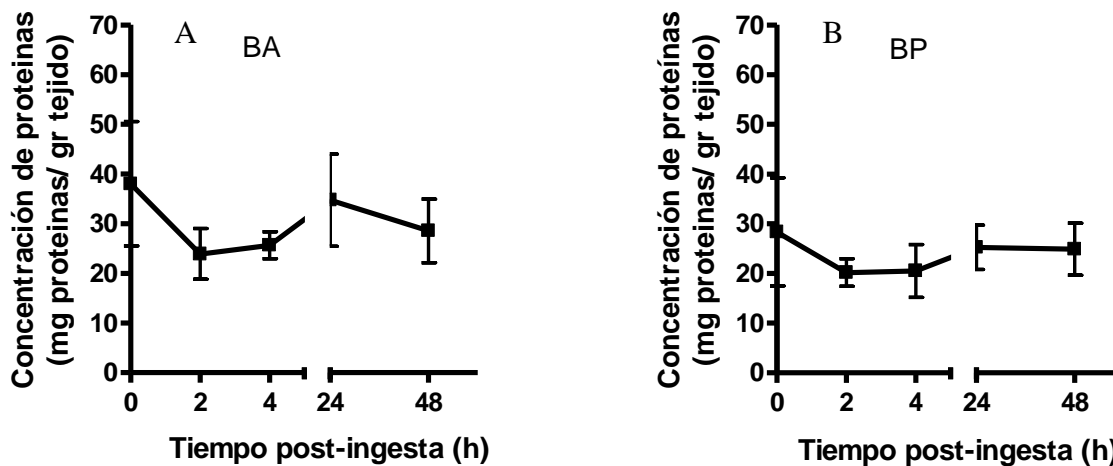


Figura.4.12.- Concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a alta (37 ‰) salinidad * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. Los valores son las medias \pm S.E. para 5 individuos.

Discusión

Los cangrejos hiper/hiporreguladores son capaces de mantener la concentración osmótica de la hemolinfa dentro de un rango estable, por encima o debajo de la del medio externo en baja y alta salinidad, respectivamente (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Pinoni et al., 2013; Larsen et al., 2014). Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que individuos machos adultos de *N. granulata* de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita muestran una fuerte capacidad hiper-regulatoria a baja salinidad (6-10‰) e hiporregulatoria a alta salinidad (45-60‰) mientras que osmoconforman en 35 ‰ de salinidad (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Pinoni et al., 2005; Pinoni y López Mañanes, 2009; Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013; presente capítulo). Los resultados del presente capítulo muestran que individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas se comportaron como hiper-reguladores en

condiciones de baja salinidad (10‰) y como hiporreguladores en alta salinidad (37‰) manteniendo la concentración osmótica de la hemolinfa por encima y por debajo de la del correspondiente medio externo, respectivamente (Figs 4.1 y 4.2). El mantenimiento de la capacidad osmorregulatoria (parámetro usualmente utilizado para evaluar la performance osmorregulatoria) (Charmantier et al., 1989; Lignot et al., 2000; Charmantier y Anger., 2011) en valores similares luego de la ingesta de alimento en condiciones de baja y alta salinidad podría relacionarse con el hecho de que *N. granulata* es un osmorregulador fuerte (Curtis and McGaw., 2010). Se ha observado que algunas especies de cangrejos hiporreguladores débiles con una distribución o permanencia más limitada en áreas con condiciones más extremas de baja salinidad, no son capaces de balancear las demandas de la hiper-regulación y la digestión (Curtis y McGaw, 2010). En este contexto, se ha sugerido que más que la habilidad osmorregulatoria sola, la habilidad para enfrentar las demandas concomitantes de la osmorregulación y de los procesos digestivos y absorptivos permitiría explotar o persistir en áreas de baja salinidad (Curtis y McGaw, 2010). Así, los resultados presentados en este capítulo que muestran que la osmolalidad de la hemolinfa y la capacidad hipo e hiperregulatoria exhibieron valores similares antes y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento podría asociarse con la ocupación exitosa de todo el intermareal de la laguna costera de Mar Chiquita por *N. granulata*. Como hemos señalado anteriormente, la adaptación bioquímica a la salinidad ambiental en cangrejos osmorreguladores constituye un proceso complejo que implica la participación de diferentes enzimas y sistemas de transporte en branquias y en diferentes órganos y tejidos tales como hepatopáncreas y músculo (Jahn et al., 2006; Pinoni y López Mañanes., 2004, 2008, 2009; Athamena et al., 2011; Martins et al., 2011; Pinoni et al 2013). Los diferentes cambios moleculares y bioquímicos (ej: en la actividad de sistemas de transporte en branquias tales como diferentes ATPasas y de aminoácidos en la hemolinfa) involucrados en el proceso osmorregulatorio requieren energía

(Bianchini et al., 2008; Freire et al., 2008; McNamara y Faria., 2012; Romano y Zeng, 2012; Romano et al., 2014). Esto podría conducir a la modificación del metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y/o proteínas resultando en una movilización diferencial de reservas de energía en diferentes órganos de reserva (Luvizzotto-Santos et al., 2003; Bianchini et al., 2008; Romano y Zeng, 2012). La modulación de la actividad de enzimas digestivas, al ser un vínculo entre la digestión y la absorción, puede llevar a una disponibilidad diferencial de sustratos de energía (ej: lípidos/proteínas) para la aclimatación a diferentes salinidades (Li et al., 2008; Romano y Zeng., 2012; Pinoni et al., 2013; Wang et al., 2013). La hiper e hiposmorregulación en cangrejos requieren diferentes mecanismos (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Larsen et al., 2014). Trabajos previos de nuestro laboratorio en *N. granulata* muestran que las respuestas a largo plazo a la salinidad ambiental en machos adultos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas involucra la modulación integrativa de varios componentes tales como la actividad de $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$ en branquias anteriores y posteriores, y de Na^+ ATPasa (la denominada segunda bomba de sodio) y fosfatasas alcalinas en músculo de la quela (Schleich et al., 2001; Pinoni et al., 2005; Pinoni, 2009; Pinoni y López Mañanes., 2009; González et al., 2012) y de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas y sustratos de energía (Asaro et al., 2011; Michiels et al., 2013; Pinoni et al., 2013). Los ajustes diferenciales en enzimas clave en branquias y músculo de la quela en relación a baja y alta salinidad sugieren que diferentes mecanismos osmorregulatorios estarían operando en relación a la hiper e hiporregulación (López Mañanes et al., 2000; Scheich et al., 2001; González et al., 2012, resultados no publicados). Los resultados del presente capítulo de esta tesis muestran que individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita exhiben respuestas diferenciales en la actividad de enzimas digestivas (lipasa, proteolítica total, APN) en hepatopáncreas y en el contenido de reservas de energía (triglicéridos, proteínas) a diferentes tiempos luego de la

ingesta de alimento en baja y alta salinidad sugiriendo la existencia de ajustes diferenciales a nivel bioquímico en la dinámica de procesos digestivos, absorptivos y en el metabolismo de lípidos y proteínas en relación al estado hipo e hiper-regulatorio.

En varias especies de crustáceos, los lípidos constituyen una fuente principal de energía para el mantenimiento de varios procesos fisiológicos (Sánchez Paz et al., 2006, 2007; Buchup et al., 2008). Como se describió anteriormente en la presente tesis (capítulo 3), los lípidos digeridos son principalmente almacenados como triglicéridos siendo el hepatopáncreas el principal sitio de reserva en la mayoría de las especies (Wright y Ahearn, 1997; Gonzalez-Baró et al., 1988; Pakasri et al., 1989; Muriana et al., 1993; Jones y Obst, 2000; García et al., 2002, Sánchez Paz et al., 2006, 2007; Buckup et al., 2008; Dima et al., 2009; Pinoni et al., 2011, 2013). Variaciones en el nivel de actividad de lipasa en el hepatopáncreas (sitio de inicio de la digestión intracelular y principal sitio de absorción de nutrientes; Mc Gaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014) podrían constituir importantes ajustes a nivel bioquímico que potencialmente afectarían el metabolismo lipídico. Se ha sugerido que las lipasas en hepatopáncreas, desempeñarían un importante rol en el metabolismo de lípidos de reserva y por ende en la movilización de metabolitos lipídicos en estados fisiológicos diferenciales (Sánchez Paz et al., 2006, 2007). En este contexto, los resultados presentados en el capítulo 3 de la presente tesis sugieren la relación entre actividad de lipasa sensible a dopamina y AMPc y el contenido de triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita. Los resultados del presente capítulo que muestran la modulación (disminución a las 48 h seguido de un aumento) luego de la ingesta de alimento de la actividad de lipasa y el aumento en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de individuos mantenidos a 35‰ de salinidad (Fig.4.3.A y Fig.4.6A) sugieren, por un lado, el rol del hepatopáncreas de *N. granulata* en procesos iniciales de síntesis de macromoléculas como se reportó para otros

crustáceos decápodos (McGaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014) y por otro lado, soporta la idea de una relación entre nivel de actividad de lipasa en hepatopáncreas y contenido de triglicéridos. La disminución en el contenido de triglicéridos en músculo de la quela a las 48 h post-ingesta (Fig.4.8.A) sugeriría la movilización de esta reserva probablemente para mantenimiento de diferentes procesos fisiológicos y soporta la idea del rol de este tejido en ajustes del metabolismo lipídico como sugerimos previamente (Pinoni et al., 2013).

Trabajos previos de nuestro grupo sugieren que la modulación diferencial de la actividad de lipasa en hepatopáncreas constituye uno de los componentes involucrados en respuestas a la exposición a largo plazo a baja (6-10‰) y alta salinidad (45-60‰) en machos adultos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas (Michiels, 2010; Pinoni et al., 2013). El hecho que no se observaron cambios en la actividad de lipasa en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos en condiciones de baja salinidad (10‰) y el aumento en la actividad a las 48 h luego de la ingesta de alimento en condiciones de alta salinidad (37‰), respuestas diferenciales a su vez a las observadas en 35‰ de salinidad (osmoconformación) (Fig.4.3.B y 4.3C) sugiere la existencia de ajustes diferenciales en la dinámica post-ingesta de la actividad de lipasa y por ende en la capacidad lipolítica del hepatopáncreas en relación a la hiper e hiporregulación. El aumento en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas a las 4 h luego de la ingesta de alimento en baja salinidad (10‰) y su posterior disminución a largo plazo sugiere la existencia de mecanismos diferenciales de regulación del metabolismo (anabolismo/catabolismo) de lípidos en condiciones de hiper-regulación (Fig.4.6.B). Por otro lado, si bien la disminución en el contenido de triglicéridos en músculo de la quela en individuos mantenidos en 10‰ de salinidad a las 48 hs post-ingesta fue similar a lo observado en individuos en condiciones de osmoconformación, el mayor contenido de triglicéridos en baja salinidad comparado con los valores en 35‰ de salinidad sugieren ajustes en reservas de lípidos en este tejido en relación a

la hiperrregulación (Fig.4.8.B). Trabajos previos de nuestro laboratorio sugieren el rol del músculo de la quela en ajustes en el metabolismo lipídico en condiciones de aclimación a baja salinidad (Pinoni et al., 2013).

La mayor concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de individuos expuestos a 37 ‰ de salinidad en comparación con la observada en individuos de *N. granulata* mantenidos en condiciones de osmoconformación (35 ‰) o baja salinidad sugiere un rol principal del mismo como sitio de reserva de triglicéridos en condiciones de hiporregulación (Fig. 4.6). Además, el hecho que no se produjeron variaciones en el contenido de triglicéridos en hepatopáncreas en alta salinidad (Fig.4.6.C) podría sugerir que la modulación de esta reserva no estaría involucrada en procesos de ajustes post-ingesta en relación a la hiporregulación. Sin embargo, debido a que se produjo un aumento de la actividad de lipasa en hepatopáncreas a las 48 horas luego de la ingesta de alimento (Fig.4.3.C) no puede descartarse la posible existencia de ajustes a tiempos más largos post-ingesta en la concentración de triglicéridos. Sorprendentemente, no se detectaron triglicéridos en músculo de la quela de individuos expuestos a 37 ‰ de salinidad a tiempo cero ni a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Fig.4.8.C). En trabajos previos de nuestro laboratorio se detectaron triglicéridos en músculo de la quela de individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita expuestos a largo plazo a 45‰ de salinidad aunque en una concentración menor con respecto a condiciones de osmoconformación sugiriendo la movilización de esta reserva en condiciones de alta salinidad (Pinoni et al., 2013). Si el hecho de no haber detectado triglicéridos en músculo de la quela de individuos expuestos a 37 ‰ de salinidad se debe a su utilización en relación a la hiporregulación y a ajustes diferenciales en procesos de anabolismo/catabolismo de lípidos en este tejido requiere mayor investigación. Por otro lado, el hecho que no se detectaron triglicéridos en branquias anteriores o posteriores en condiciones de osmoconformación o en

baja y alta salinidad está de acuerdo con lo encontrado a trabajos previos de nuestro laboratorio que sugiere que las branquias no constituirán órganos de reserva de estos sustratos de energía en este cangrejo (Pinoni et al., 2013). En otras especies de cangrejos eurihalinos tales como *Uca tangeri* hemos detectado alto contenido de esta reserva en branquias en condiciones de osmoconformación (resultado no publicados). Los resultados presentados en el capítulo 3 de la presente tesis que mostraron la modulación por dopamina, glucagón y APMc de la actividad de lipasa y de dopamina y AMPc del contenido de triglicéridos *in vitro* en hepatopáncreas de *N. granulata* sugieren la existencia de diferentes vías de regulación por mensajeros químicos de componentes a nivel bioquímico del metabolismo lipídico. Si el nivel y/o ajustes diferenciales post-ingesta en la actividad de lipasa y contenido de triglicéridos en hepatopáncreas y/o músculo de la quela de individuos de *N. granulata* luego de la ingesta de alimento en osmoconformación y en baja o alta salinidad (presente capítulo) están relacionados con la existencia de mecanismos diferenciales de modulación por mensajeros químicos requiere mayor investigación.

Como se mencionó anteriormente, en crustáceos decápodos, el hepatopáncreas constituye el sitio principal donde se lleva a cabo principalmente la digestión intracelular y el sitio inicial de síntesis de macromoléculas (ej: proteínas) (McGaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014). En el capítulo 2 de la presente tesis se demostró la existencia de actividad de APN, ectopeptidasa con un rol principal en pasos finales de la digestión proteica (Alpers, 1987; Mentlein, 2004; Goodman, 2010; Fairweather et al., 2012) sugiriendo el rol del hepatopáncreas de *N. granulata* en dicho proceso. Las variaciones a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento de componentes indicadores a nivel bioquímico de ajustes en el metabolismo proteico (actividad de APN, actividad proteolítica total) en individuos mantenidos en 35‰ de salinidad (condiciones de osmoconformación) soportan la idea del rol del hepatopáncreas como órgano involucrado en procesos de regulación del metabolismo

proteico en *N. granulata* (Fig.4.4.A y 4.5.A). En este contexto, el aumento de la actividad de APN a las 24 h luego de la ingesta de alimento y la posterior disminución de esta actividad a valores similares a tiempo cero (Fig.4.5.A) sugiere la capacidad para ajustes (aumento y vuelta a nivel basal) en pasos finales de la digestión de ítems proteicos dietarios. La disminución de la actividad proteolítica total a las 48 h post-ingesta y el mantenimiento de la concentración de proteínas sugiere la disminución de la capacidad proteolítica intracelular (Figs.4.4.A y 4.7.A). En varias especies de crustáceos decápodos, se ha descrito que la síntesis de proteínas en hepatopáncreas puede continuar hasta 2-3 días luego de la ingesta de alimento (Houlihan et al., 1990; Mente, 2003; Mente et al., 2003; McGaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014). Si en *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita en condiciones de osmoconformación ocurren ajustes en la síntesis de proteínas a tiempos mayores a los estudiados en esta tesis requiere mayor investigación. Por otro lado, el aumento en la concentración de proteínas a las 24 h luego de la ingesta de alimento en músculo de la quela y el mantenimiento en niveles similares a tiempos más largos (hasta 72 h) (Fig.4.9.A), sugiere que en *N. granulata* el mismo constituiría un sitio de reserva post-ingesta como ha sido sugerido por trabajos previos de nuestro laboratorio (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2013) y en otros crustáceos decápodos (Carter y Mente, 2014).

En varias especies de crustáceos decápodos, el metabolismo de proteínas juega un rol esencial en respuestas a nivel bioquímico a la salinidad soportando una adecuada provisión de aminoácidos necesaria para el mantenimiento de la osmorregulación (Shinji et al., 2012; Romano y Zeng, 2012). El hecho que no se encontraron diferencias significativas en la actividad proteolítica total y en la actividad de APN a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de individuos en condiciones de baja o alta salinidad (Fig.4.4.B y C y Fig.4.5.B y C) sugiere el mantenimiento de la capacidad proteolítica del hepatopáncreas en relación a la osmorregulación. Sin embargo, la disminución en la

concentración de proteínas a las 2-4 h luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de individuos mantenidos en baja salinidad (10‰) y una posterior recuperación (mientras se mantuvo la actividad proteolítica total) (Fig.4.7.B) sugiere la existencia de ajustes en procesos de síntesis y/o degradación de proteínas y la posible modulación diferencial de distintas proteasas. Además, la diferente respuesta en relación a individuos en osmoconformación y en alta salinidad sugiere la existencia de ajustes relacionados a la hiper-regulación. Las branquias posteriores constituyen el sitio principal de componentes a nivel bioquímico involucrados en la maquinaria hiper-regulatoria (López Mañanes et al., 2000; Bianchini et al., 2008; McNamara et al., 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Larsen et al., 2014). El aumento en el contenido de proteínas en branquias posteriores a las 48 h luego de la ingesta de alimento en condiciones de baja salinidad, junto con la disminución en el hepatopáncreas a tiempos más cortos (Fig.4.11.B), sugieren que las mismas podrían constituir un sitio de reserva post-ingesta en condiciones de hiper-regulación (ej: de destino post-ingesta de aminoácidos). En varias especies de crustáceos decápodos se ha demostrado que las branquias constituyen un sitio de síntesis de proteínas luego de la ingesta de alimento (Mente et al., 2003, 2011; Carter y Mente, 2014). Trabajos previos de nuestro laboratorio, muestran que las branquias anteriores juegan un importante rol en la adaptación bioquímica a baja salinidad en *N. granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* (López Mañanes et al., 2000, 2002; Schleich et al., 2001; Artillo et al., 2008; Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2011; González et al., 2012, resultados no publicados). La disminución en la concentración de proteínas a las 2-4h luego de la ingesta de alimento en branquias anteriores de individuos de *N. granulata* mantenidos en baja salinidad (10‰) y el posterior aumento en la misma hasta valores similares a tiempo cero sugieren la movilización de proteínas a corto plazo y la existencia de ajustes en procesos de degradación y/o síntesis (Fig.4.11.A). El hecho que no se produjeron modificaciones en el contenido de proteínas luego de la ingesta de alimento en condiciones de

alta salinidad (37 ‰) en ninguno de los órganos estudiados soporta la idea de la existencia de ajustes diferenciales a nivel bioquímico en relación a la osmoregulación pero además en relación al tipo de desafío osmótico que implica respuestas osmo-regulatorias diferenciales (hiper e hiporregulación). Como se mencionó más arriba, en varios crustáceos, el metabolismo proteico juega un rol esencial en la adaptación bioquímica a la salinidad, sin embargo esta no es una respuesta universal (Romano y Zeng, 2014). En *N. granulata* de otras áreas geográficas la salinidad afecta el metabolismo proteico *in vitro* pero las variaciones dependen del grado y tipo de desafío osmótico (Bianchini et al., 2008), Este podría ser también el caso para *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita.

En conclusión, las diferentes respuestas en la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en individuos expuestos a condiciones de baja (10 ‰) y alta (37‰) salinidad y en condiciones de osmoconformación (35‰) sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos postprandiales diferenciales a nivel bioquímico en relación al diferente estado osmorregulatorio (hiper o hiporregulación) en individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita. Las diferentes respuestas en las actividades enzimáticas estudiadas y en el contenido de sustratos de energía sugieren además la participación diferencial de diferentes rutas metabólicas y probablemente de mecanismos diferenciales de regulación. Debido a que se desconocen las rutas de digestión-absorción en *N. granulata* se necesita mayor investigación para establecer la posible relación entre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas y las rutas metabólicas de almacenamiento y/o movilización de reservas de energía en diferentes condiciones de salinidad. Los resultados de este capítulo contribuyen a incrementar el conocimiento sobre las complejas respuestas integrales a nivel bioquímico a baja y alta

salinidad ambiental en camarones hiper/hiporreguladores en general y en *N. granulata* en particular.

CAPÍTULO 5:

***Flexibilidad fenotípica en respuesta a un
cambio abrupto de salinidad: actividad de
enzimas digestivas y reservas de energía en***

Neohelice granulata

Introducción

Las condiciones de variabilidad irregulares en la salinidad ambiental en las zonas de planicie de mareas de estuarios y/o lagunas costeras imponen a cangrejos hiper/hiporreguladores enfrentarse a cambios temporales abruptos y amplios de salinidad ambiental. Los cambios abruptos de salinidad (ej: cambios desde alta a baja salinidad o viceversa) imponen desafíos osmóticos diferenciales y de esta manera, pueden implicar cambios a corto plazo en la respuesta osmorregulatoria. Diversos trabajos en cangrejos osmorreguladores han demostrado que varias especies son capaces de cambiar a corto plazo (≤ 24 h) desde osmoconformación a hiper-regulación en respuesta a cambios abruptos desde agua de mar (33-35‰ de salinidad) a baja salinidad (Schleich et al., 2001; López Mañanes et al., 2002; Lucu y Towle, 2003; Kirschner, 2004; Freire et al., 2008; Mc Namara et al., 2012; Henry et al., 2012; Havird et al., 2013). Sin embargo, estos estudios se han realizado con individuos privados de alimento (generalmente 48 h) y faltan estudios en relación a cambios de alta a baja salinidad (ej: desde condiciones de hipo a hiperregulación). Debido a que los cangrejos que habitan estuarios y lagunas costeras pueden estar sujetos a cambios abruptos en la salinidad al mismo tiempo en que se produce la ingesta de alimento, falta aún investigar la posible existencia de modulación digestiva y metabólica a nivel bioquímico en individuos recién alimentados y expuestos a un cambio abrupto a corto plazo (hasta 24 h) de alta a baja salinidad.

Como se señaló anteriormente en la presente tesis, la adaptación bioquímica de cangrejos eurihalinos en relación a diferentes condiciones de salinidad ambiental es un proceso complejo que involucra la participación de diferentes enzimas y sistemas de transporte en branquias y en tejidos y órganos extrabranquiales (Jahn et al., 2006, Pinoni y

López Mañanes, 2004, 2008, 2009, Martins et al., 2011; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zheng., 2012; Michiels et al., 2013; Pinoni et al., 2013). En este contexto, las respuestas a corto (≤ 24 h) y largo plazo a la salinidad ambiental pueden implicar cambios diferenciales en componentes involucrados a nivel bioquímico (Schleich et al., 2001; López Mañanes et al., 2002; Pinoni et al., 2005; Mc Namara et al., 2012; Romano et al., 2012; Henry et al., 2013, Havird et al., 2013; Larsen et al 2014). Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita exhibe capacidad hiper-regulatoria a corto plazo en respuesta a un cambio abrupto desde condiciones de osmoconformación a baja salinidad (Schleich et al., 2001; Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2005). La respuesta diferencial de diferentes actividades enzimáticas en branquias y músculo de la quela sugiere la existencia de ajustes a corto plazo en relación al cambio en el estado osmorregulatorio (Schleich et al., 2001; Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2005). Los resultados presentados en el capítulo anterior de la presente tesis muestran el mantenimiento de la capacidad hipo e hiperregulatoria a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en condiciones de baja y alta salinidad de individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita sugiriendo la capacidad para balancear las demandas concomitantes de la osmorregulación y la digestión como ha sido sugerido para osmorreguladores fuertes (Curtis y McGaw, 2010). Las diferentes respuestas en la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en individuos expuestos a largo plazo a condiciones de baja (10 ‰) o alta (37‰) salinidad (capítulo 4, presente tesis) sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos postprandiales diferenciales a nivel bioquímico en relación al diferente estado osmorregulatorio (hiper o hiporregulación). En este contexto, y como se ha mencionado anteriormente, podría hipotetizarse que un cambio abrupto de salinidad (ej: de alta a baja

salinidad) que impliquen diferentes respuestas osmorregulatorias a corto plazo (hipo/hiperregulación) podrían conducir a ajustes digestivos y metabólicos diferenciales a nivel bioquímico.

En este capítulo se describen estudios realizados para determinar el efecto de un cambio abrupto desde alta a baja salinidad sobre la respuesta osmorregulatoria, la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas y el contenido de reservas de energía en órganos de reserva en individuos expuestos al cambio de salinidad inmediatamente después de ser alimentados. .

Materiales y Métodos

Productos químicos

La Azocaseína, el pNPpalmitato (p-nitrophenylpalmitato), la L-alanina-p-nitroanilida (L-Ala pNA), la Na-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BPNA), el Tris-(hydroxymethylamino-methano) (Tris), el ácido ethyleneglicol N,N',N'-tetraacético y la sero albúmina bovina fueron de Sigma (St. Louis, MO, USA), el Coomassie blue G250 fue de Fluka (Alemania). Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Sitios de estudio y recolección de animales

Los individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas fueron mantenidos en laboratorio durante 10 días en 37‰ de salinidad como se describió en el capítulo 4. Para estudiar el efecto de un cambio abrupto de alta a baja salinidad, los individuos fueron alimentados individualmente. Cuando la cantidad total de alimento ofrecido fue ingerida (lo

que tomó como máximo 5 minutos) los individuos fueron abruptamente transferidos a 10 ‰ de salinidad (tiempo cero). Los individuos fueron crioanestesiados a tiempo cero y luego de 2, 4 y 24 h del cambio abrupto de salinidad para realizar las correspondientes determinaciones.

Preparación de muestras

Según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo 4

Osmolalidad de la hemolinfa

Se determinó como fue descrito en el capítulo 4

Determinación de las actividades enzimáticas

Se realizó de acuerdo a lo descrito en los capítulos 2, 3 y 4

Análisis estadísticos

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas de Levene y un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico (One Way ANOVA). Para identificar diferencias se utilizó un test *a posteriori* ANOVA (Test Holm-Sidak). Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando el valor de *p* fue menor a 0.05.

Resultados

Efecto de un cambio abrupto de alta a baja salinidad en individuos alimentados

Osmolalidad de la hemolinfa y capacidad osmorregulatoria

A las 2, 4 y 24 h luego del cambio abrupto de 37 a 10‰ de salinidad, la osmolalidad de la hemolinfa fue mayor (alrededor de 160%) que la osmolalidad del medio externo (10‰) (Fig. 5.1). No hubo diferencias significativas entre los valores de osmolalidad a las 2, 4 o 24 h luego del cambio abrupto de salinidad (Fig. 5.1). De esta manera, individuos alimentados y transferidos exhibieron capacidad hiper-regulatoria luego del cambio abrupto desde alta a baja salinidad.

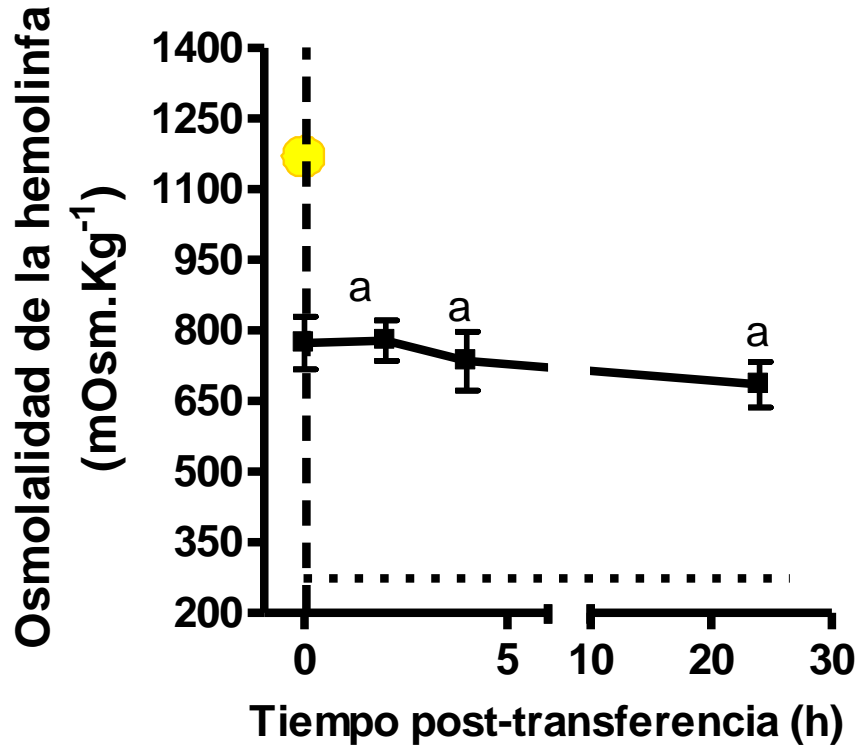


Figura.5.1.- Osmolalidad de la hemolinfa a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto de alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. ● Indica el valor de la Osmolalidad del medio a 37‰. La línea discontinua inferior indica la osmolalidad del medio de 10 ‰ de salinidad. Letras iguales significan valores similares entre sí. Los datos son las medias \pm S.E para 5 individuos para cada condición. (gl: 6, T: 3,81, P: 0,009; gl: 18, F: 22, P:0,001)

Actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas

A las 2 y 4 h luego del cambio abrupto de 37 a 10‰ de salinidad, la actividad de lipasa fue similar con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia. A las 24 h luego del cambio la actividad de lipasa, disminuyó alrededor de un 54% con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia (Fig. 5.2).

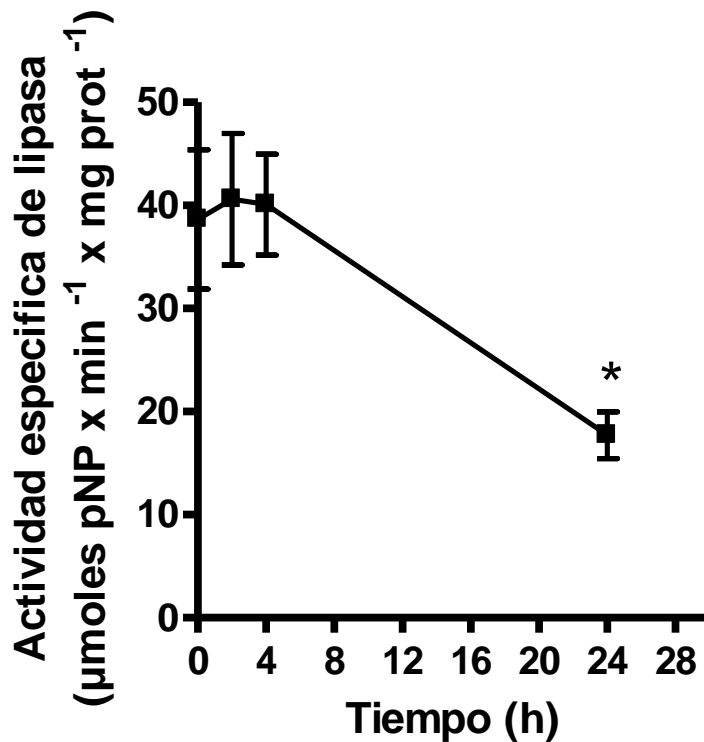


Figura.5.2- Actividad de lipasa en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm S.E. 5 individuos. *Indica diferente del valor a tiempo cero. *Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$)(gl:18, F: 4,52, P:0,019)

La actividad proteolítica total luego de 2 y 4 h del cambio de salinidad fue similar a la actividad antes de la transferencia, disminuyendo a las 24 h aproximadamente un 45% con respecto a la actividad a tiempo cero (Fig. 5.3).

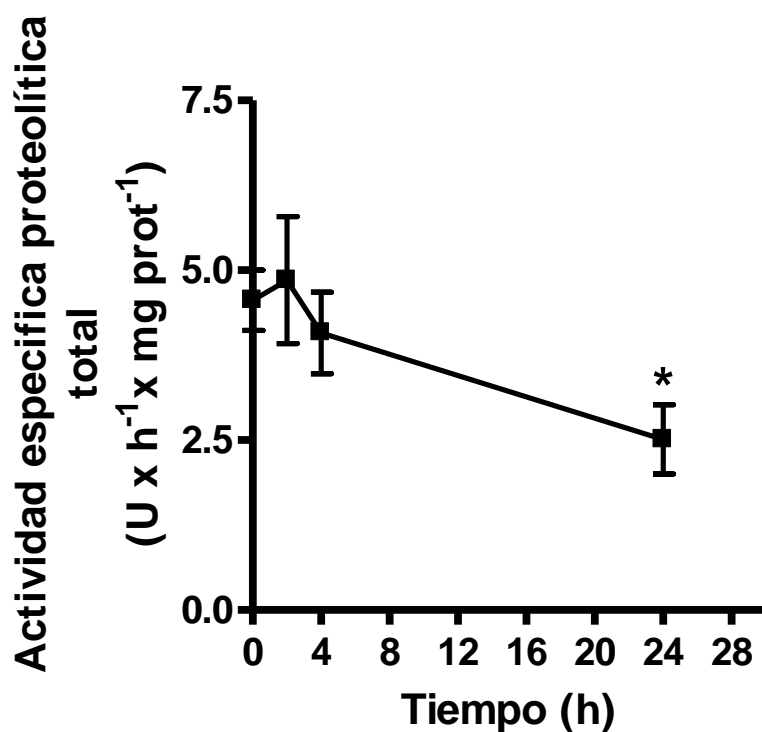


Figura.5.3.- Actividad proteolítica total a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 %) a baja (10 %) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm S.E 5 individuos. *Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$) (gl:7; F: 3,42, P: 0.047)

Similarmente, la actividad de APN a las 2 y 4 h de la transferencia de los individuos desde alta a baja salinidad fue similar con respecto al correspondiente valor antes de la

transferencia disminuyendo alrededor de un 30% con respecto a tiempo cero a las 24 h luego del cambio. (Fig. 5.4).

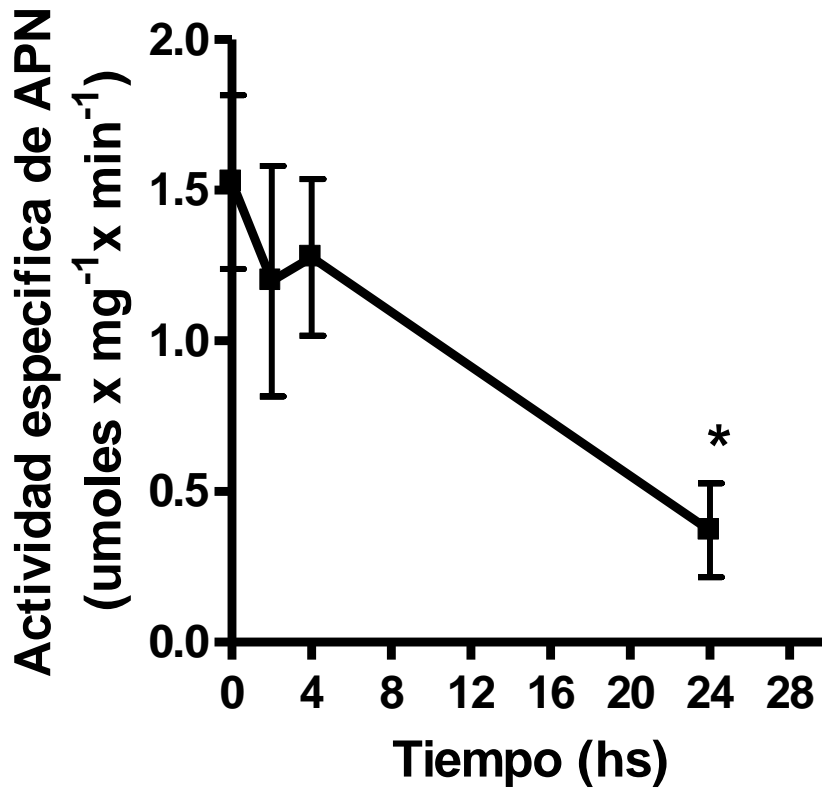


Figura.5.4.- Actividad de APN en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm S.E 5 individuos. *Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$). (gl: 16, F: 4,52, P: 0,022)

No se observaron diferencias significativas en la actividad de tripsina en hepatopáncreas a ningún tiempo después del cambio abrupto de salinidad (Fig.5.5).

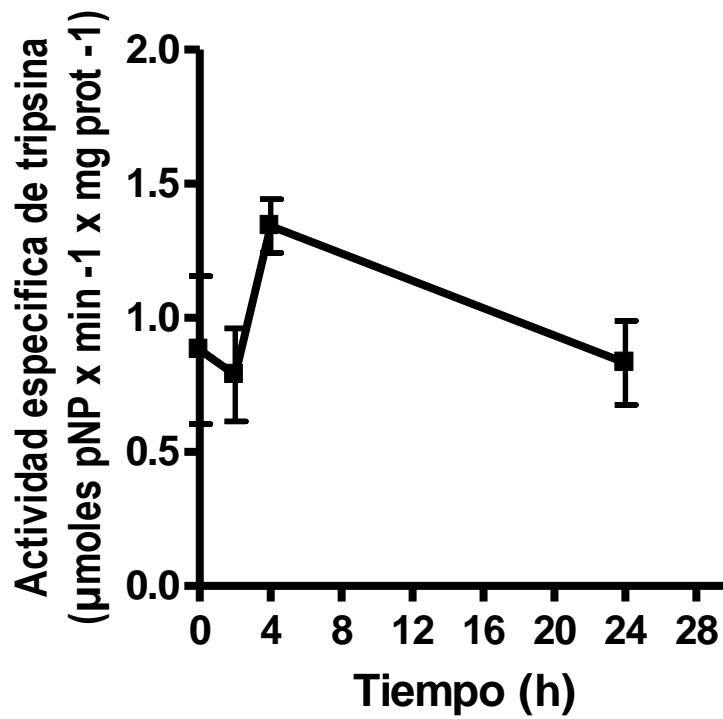


Figura.5.5.- Actividad de tripsina en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm S.E 5 individuos.

Concentración de reservas de energía en hepatopáncreas

Dos y 4 h después de la transferencia de alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad, la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas fue similar al valor a tiempo 0. A las 24 h luego de la transferencia, la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas fue mayor (alrededor de un 700%) que la concentración a tiempo cero (Fig. 5.6).

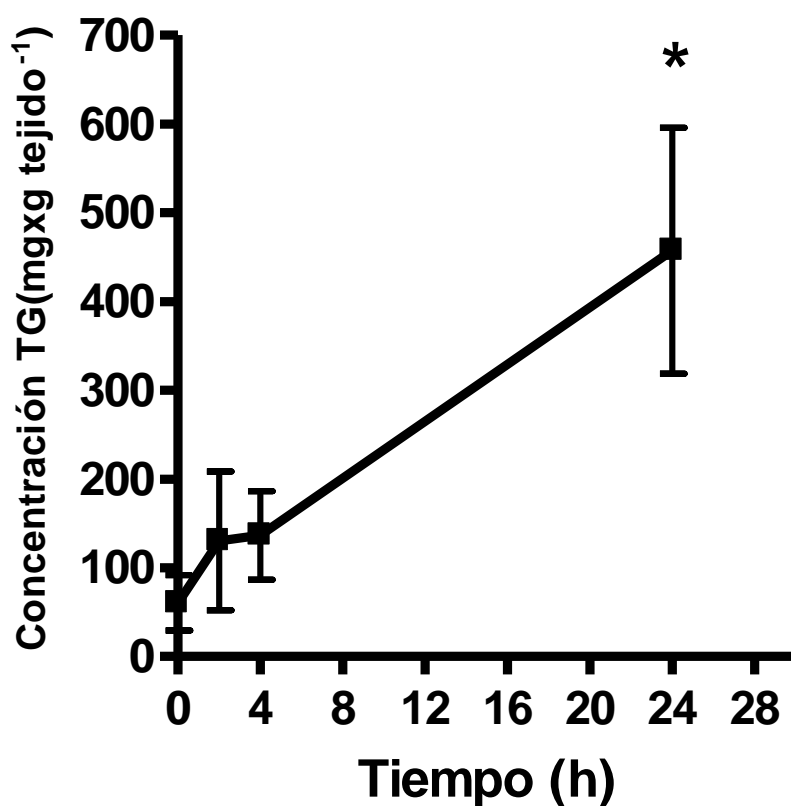


Figura. 5.6.- Concentración de triglicéridos a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm S.E 5 individuos. *Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$) (gl: 16, F: 4,53, P: 0,022).

Similarmente, a las 2 y 4 h después del cambio abrupto de salinidad, la concentración de proteínas en hepatopáncreas fue similar al valor a tiempo 0 siendo mayor (alrededor de un 47%) a las 24 h luego de la transferencia (Fig. 5.7).

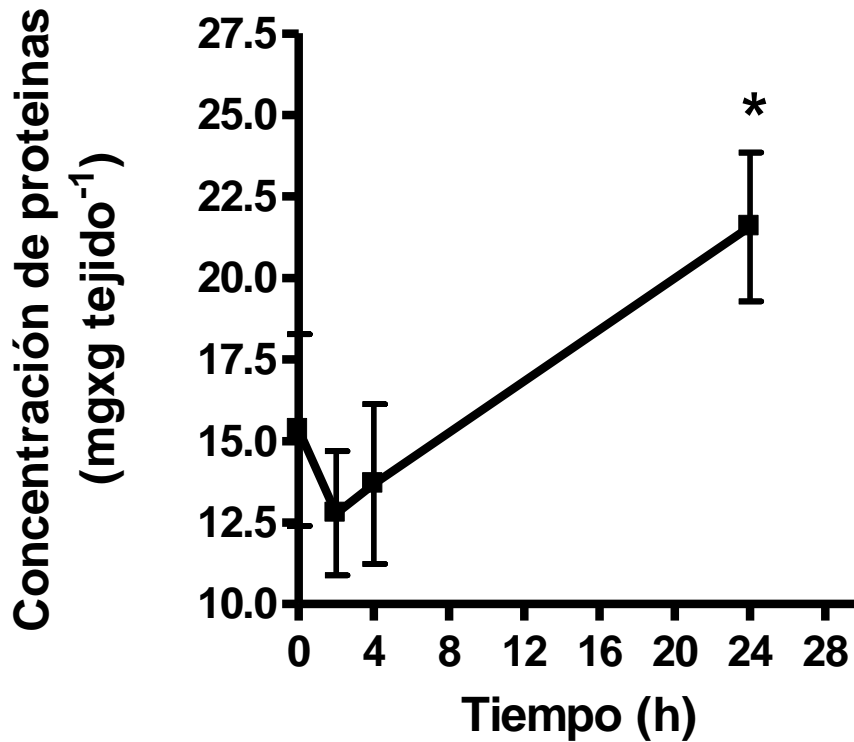


Figura. 5.7.- Concentración de proteínas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm S.E 5 individuos. *Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$) (gl:17, F: 4,46, P:0,021).

Concentración de reservas de energía en músculo de la quela y branquias

No se detectaron triglicéridos en músculo de la quela antes o a ningún tiempo luego del cambio abrupto alta a baja salinidad. No se determinó concentración de triglicéridos en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas en músculo de la quela, branquias anteriores o posteriores, luego de la transferencia de alta a baja salinidad (Fig. 5.8).

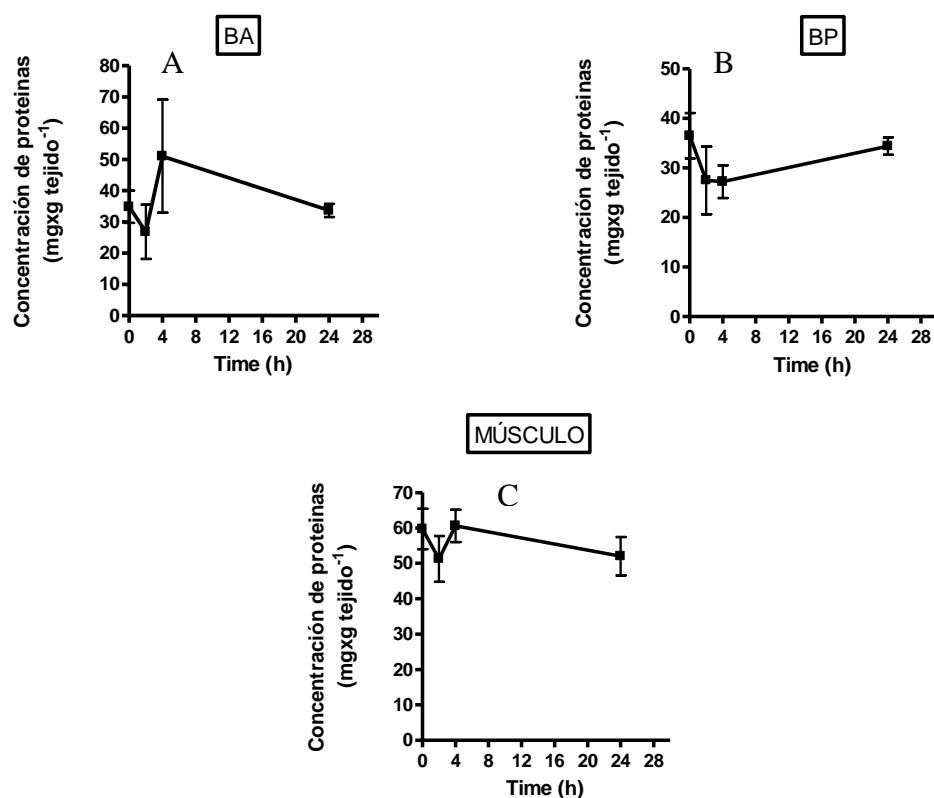


Figura. 5.8.- Concentración de proteínas en branquia anterior (A), branquias posterior (B) y músculo de la quela (C) a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37 ‰) a baja (10 ‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm E.S 5 individuos.

DISCUSIÓN

Las respuestas osmóticas a la salinidad pueden conducir a la modificación del metabolismo de lípidos y proteínas resultando en cambios en el contenido reservas de energía en diferentes sitios de reserva (Luvizzotto-Santos et al., 2003; Romano y Zeng, 2012; Pinoni et al., 2013). Esta reorganización metabólica se ha asociado a cambios moleculares y bioquímicos que requieren energía (Bianchini et al., 2008; McNamara y Faria, 2012; Romano and Zeng 2012, Romano et al., 2014). En *N. granulata* de planicie de mareas de la laguna de Mar Chiquita hemos demostrado la modulación diferencial de diferentes enzimas branquiales (ej: V-ATPasa, Na⁺K⁺ ATPasa, anhidrasa carbónica) en respuesta a diferentes condiciones de salinidad lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación diferenciales en relación a diferentes estados osmorregulatorios (López Mañanes et al 2000; Schleich et al., 2001; González et al., 2012).

Trabajos previos de nuestro laboratorio y resultados de la presente tesis (capítulo 4) sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos (ej: modulación de la actividad de enzimas digestivas/contenido de reservas de energía, cambios en la dinámica post-pandrial) diferenciales a nivel bioquímico en relación a la hiper e hiporregulación en *N. granulata* de la planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita (Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013; capítulo 4 presente tesis). En este contexto, los diferentes cambios moleculares asociados a las distintas respuestas osmorregulatorias podrían implicar también ajustes diferenciales a corto plazo en la reorganización metabólica en relación a un cambio abrupto de alta a baja salinidad (ej: desde hipo a hiperregulación). Los resultados presentados en este capítulo que muestran que individuos de *N. granulata* alimentados y transferidos inmediatamente desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad exhibieron respuestas de la actividad de enzimas digestivas (disminución a las 24 h de la

actividad de lipasa, proteolítica total, APN) y en la concentración de reservas de energía (aumento en la concentración de triglicéridos y de proteínas a las 24 h) en hepatopáncreas que difieren a las observadas en individuos alimentados y mantenidos en baja y alta salinidad (capítulo anterior) sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos a nivel bioquímico particulares en relación al cambio abrupto de salinidad desde condiciones de hipo a hiperregulación.

El hecho que la osmolalidad de la hemolinfa fuera similar a las 2, 4 y 24 h luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad y más alta con respecto a la del medio de baja salinidad, sugiere la capacidad de los individuos alimentados e inmediatamente transferidos para hiper-regular a corto plazo luego de la transferencia (Fig.5.1). La disminución en el hepatopáncreas en la actividad de APN y en la actividad de lipasa, y proteolítica total a las 24 h luego del cambio abrupto de salinidad (Figs. 5.2, 5.3 y 5.4) sugiere una disminución de la capacidad para la digestión final de items proteicos y de la capacidades lipolítica y proteolítica en general del hepatopáncreas. Lo cual podría llevar a ajustes en el contenido de sustratos de energía. Esta idea es soportada por el aumento observado en la concentración de triglicéridos y proteínas en el hepatopáncreas luego del cambio abrupto de salinidad (Figs.5.6 y 5.7). Más aún, si la diferencia en el grado de aumento en la concentración de triglicéridos (700%) en comparación con el observado en la concentración de proteínas (60%) en hepatopáncreas podría estar relacionado con una regulación diferencial de diferentes rutas metabólicas requiere mayor investigación. En secciones de hepatopáncreas de *N. granulata* de otras áreas geográficas se ha encontrado que un estrés hipo o hiperosmótico *in vitro* induce ajustes diferenciales en distintas rutas metabólicas (ej: cambios en el flujo de aminoácidos entre gluconeogénesis y síntesis de lípidos) (Martins et al., 2011). Por otro lado, no puede descartarse que el aumento en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas luego

de la transferencia se relacione con su almacenamiento y posterior utilización en relación a procesos hiper-regulatorios si estos perduran a largo plazo. En este contexto, los resultados del capítulo 4 de la presente tesis mostraron que en individuos de *N. granulata* expuestos a largo plazo a 10‰ de salinidad, los niveles de triglicéridos en hepatopáncreas son particularmente bajos lo que sugiere su utilización en relación a la hiper-regulación. El hecho de que no se produjeron cambios en la concentración de triglicéridos o proteínas en músculo de la quela o en la concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores (Fig. 5.8) soporta la idea del rol del hepatopáncreas como sitio principal y central de ajustes metabólicos a nivel bioquímico a corto plazo luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad.

En mamíferos, varios mensajeros químicos primarios (ej: hormonas peptídicas y aminas biogénicas) y vías de transducción de señales están involucrados en la modulación de la actividad de enzimas digestivas y en el almacenamiento y/o movilización de reservas de energía (Isenman et al., 1999; Kaspar et al., 2003; Warzecha et al., 2006; Dufresne et al 2006; Murphy et al., 2008; Murashita et al., 2008; Williams et al., 2009; Dockray, 2014; Trowers y Tischler, 2014). Si las variaciones en la actividad de enzimas digestivas y en el contenido de triglicéridos implica la modulación diferencial de vías de regulación mediada por mensajeros químicos primarios y secundarios (ej: dopamina/glucagón/AMPC; capítulos 2 y 3 de presente tesis) en relación al cambio abrupto de salinidad requiere mayor investigación. Los resultados presentados en los capítulos 2 y 3 de la presente tesis muestran o la regulación *in vitro* por dopamina de la actividad de APN y de la actividad lipolítica por dopamina y glucagón en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo su rol en mecanismos de modulación de la actividad de enzimas digestivas. En este contexto, queda por investigar si la disminución en la actividad de APN y de lipasa en hepatopáncreas luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad están relacionados con cambios en los

niveles plasmáticos y/o en hepatopáncreas de dopamina y/o glucagón en respuesta al cambio de salinidad. Recientemente, se ha demostrado en el camarón *L. vananamei* la existencia de cambios a corto plazo (≤ 24 h) en los niveles plasmáticos de dopamina luego de un cambio abrupto de agua de mar a baja salinidad (Pan et al., 2014).

Capítulo 6

Estudios de caracterización parcial y

modulación de actividad de enzimas

digestivas en hepatopáncreas de

Cyrtograpsus angulatus

Introducción

La digestión constituye un proceso clave en el metabolismo, ya que determina el grado de disponibilidad de nutrientes (ej: lípidos/proteínas) requeridos para el mantenimiento de diversas funciones bioquímico-fisiológicas. La actividad de enzimas digestivas constituye un vínculo funcional entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (Karasov y Martínez del Río, 2007, Karasov, et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013). El nivel de actividad de enzimas digestivas específicas constituye uno de los factores claves que afecta la capacidad digestiva de los organismos (Bozinovic, 1993; 2003, Caviedes-Vidal et al., 2000; Balslev-Clausen et al., 2003; del Valle et al., 2004; 2006; del Valle y López Mañanes, 2008). Así, conocer las características de parámetros digestivos clave a nivel bioquímico (ej: existencia, características bioquímicas y modulación de actividad de enzimas digestivas) y los ajustes en los mismos en relación al ambiente y estados fisiológicos diferenciales constituye una herramienta fundamental para evaluar la performance de los individuos. En el cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*, faltan estudios sobre su fisiología bioquímica en general y sobre aspectos de su fisiología bioquímica digestiva particular (ej: existencia, características bioquímicas y modulación de actividad de enzimas digestivas), a pesar de su importancia ecológica en zonas intermareales de las lagunas costeras templadas del este sudamericano, particularmente, en ecosistemas de marismas y estuarios (Boschi, 1964; Spivak et al., 1997, Iribarne et al., 1997, 2003)

El cangrejo eurihalinos *C. angulatus* se lo encuentra desde Rio de Janeiro (Brasil) hasta la Patagonia (Argentina) en la costa Atlántica y la costa del Pacífico en Perú y Chile (Spivak, 1997). En la laguna costera de Mar Chiquita, *C. angulatus* constituye una de las especies dominantes de cangrejos, *C. angulatus* es un especie

epirbentónica que habita entre las rocas o en las playas abiertas de la zona marino-estuarial (Spivak et al. 1994, 1997, 2012). Estudios en campo, indican que *C. angulatus* se comporta como omnívoro-detritívoro (Spivak, 1997, Botto et al., 2005) pero la batería digestiva subyacente a nivel bioquímico no ha sido dilucidada aún. En varios crustáceos decápodos, se ha relacionado la presencia y el nivel de actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas con la naturaleza de los componentes dietarios que pueden ser potencialmente utilizados para los procesos metabólicos (Pavasovic et al., 2007, Figueiredo y Anderson, 2009, Ramirez-Otarola et al. 2011; Fairwather et al., 2012). En este contexto, estudios previos de nuestro grupo muestran la existencia de actividad de amilasa y disacaridasas y de alta actividad proteolítica total en hepatopáncreas de *C. angulatus* sugiriendo la habilidad para la digestión de carbohidratos y proteínas (Asaro, 2009; Pinoni, 2009, Asaro et al., 2010, 2011). Sin embargo, faltan estudios de determinación de existencia de actividad y características bioquímicas de la actividad de lipasa y proteasas tales como tripsina y N-aminopeptidasas (APN),

En la zona de planicie de mareas *C. angulatus* está expuesto a cambios abruptos, frecuentes, y variables en la salinidad ambiental entre 4 a 40 ‰ (aunque extraordinariamente puede experimentar valores más bajos y más altos)(Anger et al., 1994; Spivak et al, 1994; López Mañanes et al., 2002; Pinoni y López Mañanes, 2004; 2008; Pinoni, 2009). Como se ha descrito previamente en la presente tesis (capítulos 3 y 4) los cangrejos eurihalinos que habitan zonas de mareas, aguas costeras y estuarios presentan adaptaciones a distintos niveles (bioquímico, fisiológico, morfológico y/o de comportamiento) que les permiten soportar un amplio rango de variación en la salinidad ambiental (Kirschner, 1991, 2004). Trabajos previos de nuestro grupo muestran que *C. angulatus* exhibe alta capacidad hiper-regulatoria en relación a diferentes condiciones

de baja salinidad (López Mañanes et al., 2002; Pinoni y López Mañanes, 2004; 2008; Pinoni, 2009). La adaptación bioquímica a baja salinidad de *C. angulatus* involucra respuestas complejas e integradoras a nivel bioquímico que implican la modulación de diferentes actividades enzimáticas en branquias individuales y en músculo de la quela (López Mañanes et al, 2002, Schelich et al., 2001; Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2005; Pinoni y López Mañanes, 2004; 2008). Por otro lado, estudios preliminares en nuestro laboratorio muestran la modulación de la actividad de fosfatasa alcalina, enzima que se ha propuesto desempeña un rol en la síntesis de enzimas digestivas en crustáceos decápodos (Barker y Gibson, 1977; Wang et al., 2014) en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* expuestos a baja salinidad, lo que sugiere la existencia de ajustes digestivos en relación a la hiper-regulación (Pinoni, 2009, resultados no publicados). Sin embargo, faltan estudios, sobre la posible modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas en diferentes condiciones de salinidad ambiental

Estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que las aminas biogénicas estarían involucradas en la regulación de distintos procesos fisiológicos claves en *C. angulatus*. Así se ha demostrado el efecto diferencial de serotonina sobre la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa de branquias individuales (Elhalem, 2003; Elhalem y López Mañanes, 2003), y de dopamina *in vivo* sobre la actividad de AP en músculo (Pinoni y López Mañanes, 2004), *in vivo* sobre glicemia y contenido de glucógeno (López Mañanes, 2004, del Valle et al., 2012 a,b) e *in vitro* sobre la liberación de glucosa en hepatopáncreas (López Mañanes, 2004). Sin embargo, faltan estudios sobre el posible rol de aminas biogénicas sobre la regulación de enzimas digestivas claves en el hepatopáncreas de *C. angulatus*. Los resultados presentados en los capítulos 2 y 3 de la presente tesis que mostraron la modulación *in vitro* de la actividad de lipasa y APN en

hepatopáncreas de *N. granulata* sugieren el rol de esta amina biogénica en vías de regulación de componentes digestivos a nivel bioquímico en hepatopáncreas.

Materiales y Métodos

Productos químicos

El pNPPalmitato (p-nitrophenylpalmitato), la Azocaseína, la L-alanina-p-nitroanilida (L-Ala pNA), la Na-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BAPNA), el tris-(hidroximetilamino-metano) (Tris), el ethyleneglicol N, N', N'-tetraacético (EGTA), la seroalbúmina bovina, dopamina, histamina y serotonina fueron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.); el Coomassie blue G250 fue de Fluka (Alemania). Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Se recolectaron machos adultos de *Cyrtograpsus angulatus* en intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967, Moriyasu y Mallet, 1986), con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, de la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, 37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Los individuos se transportaron inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección y se mantuvieron durante 10 días en agua de mar (35‰), agua de mar diluida (10‰) o agua de mar concentrada (40‰) antes de los experimentos, en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y fotoperíodo (12 h. luz/ 12 h. oscuridad). El agua se aireó y filtró permanentemente. Los acuarios se cubrieron con nylon negro para reducir disturbios. Los individuos fueron alimentados tres veces por semana con alimento comercial balanceado Vitafish (0,07 g por individuo) y fueron privados de alimento 24-48 h antes de los experimentos. Los experimentos de caracterización se llevaron a cabo con individuos aclimados a 35‰.

Efecto in vivo de aminas biogénicas sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas

Los individuos fueron crianestesiados durante 20 minutos y posteriormente inyectados en la base de la quelípodo con 100 ul de solución salina (NaCl 400 mM, KCl 10 mM) en ausencia (control) o en presencia de dopamina, serotonina o histamina 10^{-4} M. Luego de 30 minutos de la inyección, se determinaron las correspondientes actividades de enzimas digestivas en hepatopáncreas.

Efecto in vitro de aminas biogénicas sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas

Para estudiar el efecto *in vitro* de distintos agentes sobre la actividad en enzimas digestivas se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo 2 incubando secciones de hepatopáncreas en presencia de 10^{-4} M. de dopamina, histamina o serotonina. Se determinó la actividad de lipasa, proteolítica total y tripsina en el medio de incubación como indicador de la posible secreción de enzima (Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999; Lwalaba et al, 2010).

Preparación de extractos enzimáticos

La preparación de extractos enzimáticos se realizó según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo 1.

Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo 1.

Análisis estadístico

Los resultados del efecto de las diferentes concentraciones de pNPP, L-Ala y BPNA se analizaron por medio de análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 2.01 software). Las curvas que se muestran son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores K_m (constante de Michaelis -Menten) se estimaron de las mismas (GraphPad Prism 2.01 software). El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas de Levene y un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico (One Way ANOVA) se utilizó un test a posteriori ANOVA (Test Holm-Sidak). Para testear las diferencias de la actividad de enzimas digestivas en condiciones de osmoconformación y osmorregulación se utilizó un *test-t* para muestras independientes. Para identificar diferencias en la actividad de enzimas digestivas en presencia y/o ausencia de un agente determinado también se utilizó un *test-t* para muestras independientes. Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados

Actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*

La actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* se determinó en un rango de pH de 5,4 a 10,0. La mayor actividad se encontró a pH 8,5. La actividad fue similar en el rango de pH de 5.4 a 7.2 siendo alrededor de un 40-55% de la actividad determinada a pH 8,5. A pH 10,0 la actividad disminuyó siendo alrededor de un 35% de la actividad a pH 8,5 (Fig.6.1).

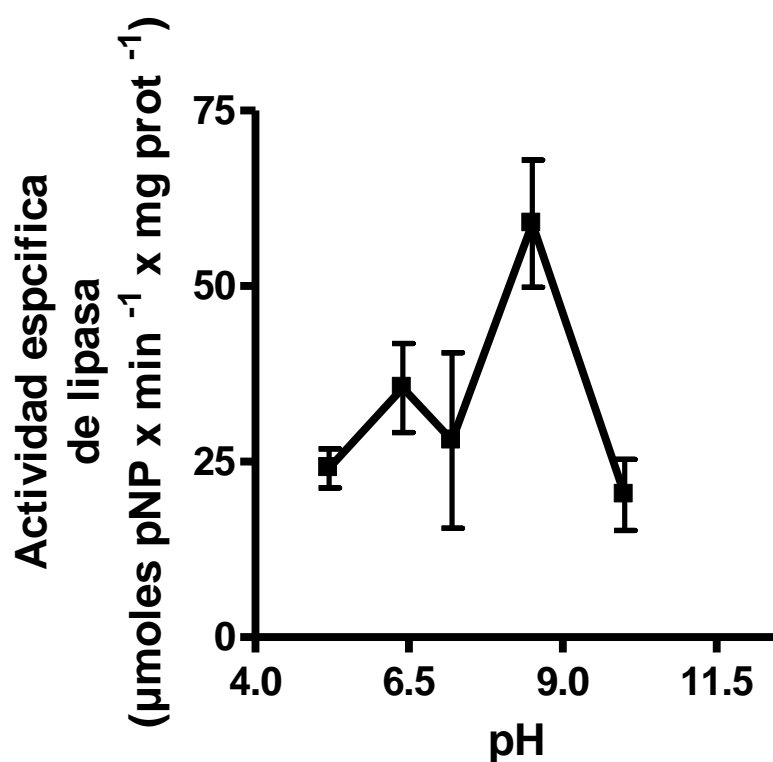


Figura. 6.1 -. Efecto del pH (5,4 a 10,0) sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos (gl:24, F: 3,77, P:0,019).

La figura 6.2 muestra el efecto de la temperatura (4-45 ° C) sobre la actividad de lipasa. La actividad disminuyó entre 4 y 20 ° C. A 37 ° C la actividad aumentó, alcanzando valores similares a los correspondientes a 4 ° C. A 45 ° C la actividad fue similar a la actividad a 37 ° C.

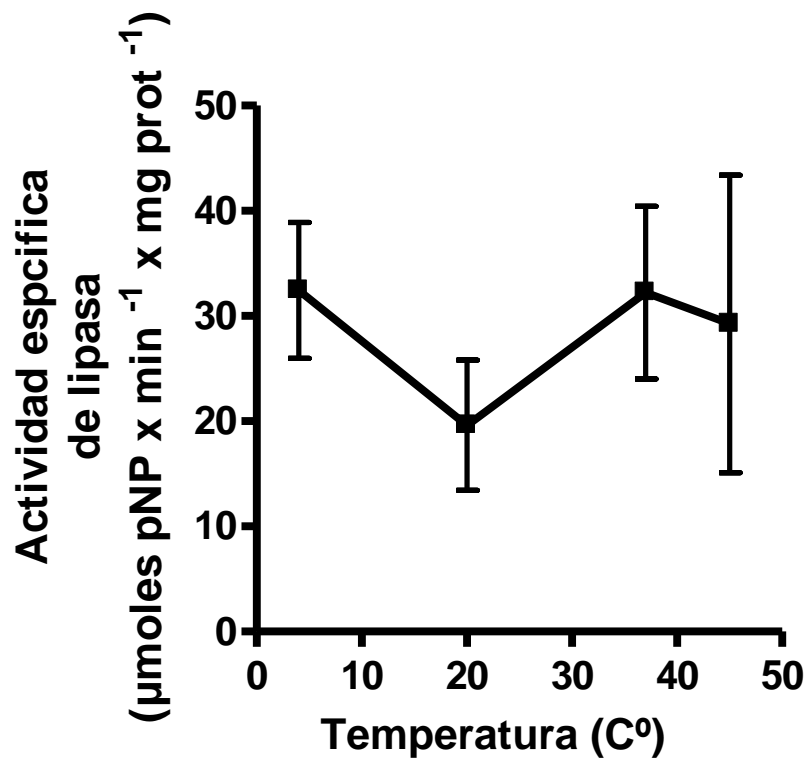


Figura.6.2- Efecto de la temperatura (4-45 ° C) sobre la actividad de lipasa en el hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus*. Los datos son las medias \pm S.E de 3 individuos.

El efecto de concentraciones crecientes de p-nitrofenilpalmitato (pNPP) sobre la actividad de lipasa se muestra en la figura 6.3. La actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* exhibió una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 0,019 mM).

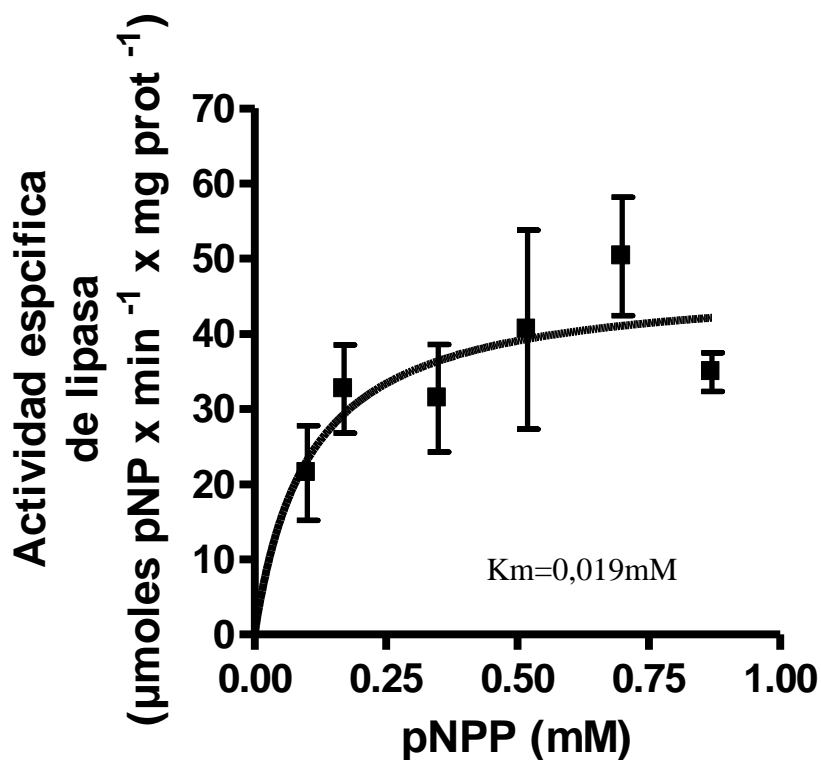


Figura.6.3.- Efecto de la concentración p-nitrofenilpalmitato (pNPP) sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*. Las curvas son las que mejor se ajustan a los datos experimentales (GraphPad Prism 2.01). Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos.

Caracterización de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus*

La actividad de tripsina en hepatopáncreas aumentó desde pH 4,0 hasta pH 7,6. A pH 11,0 la actividad de tripsina fue aproximadamente un 40% más baja que la actividad a pH 7,4 (Fig.6.4).

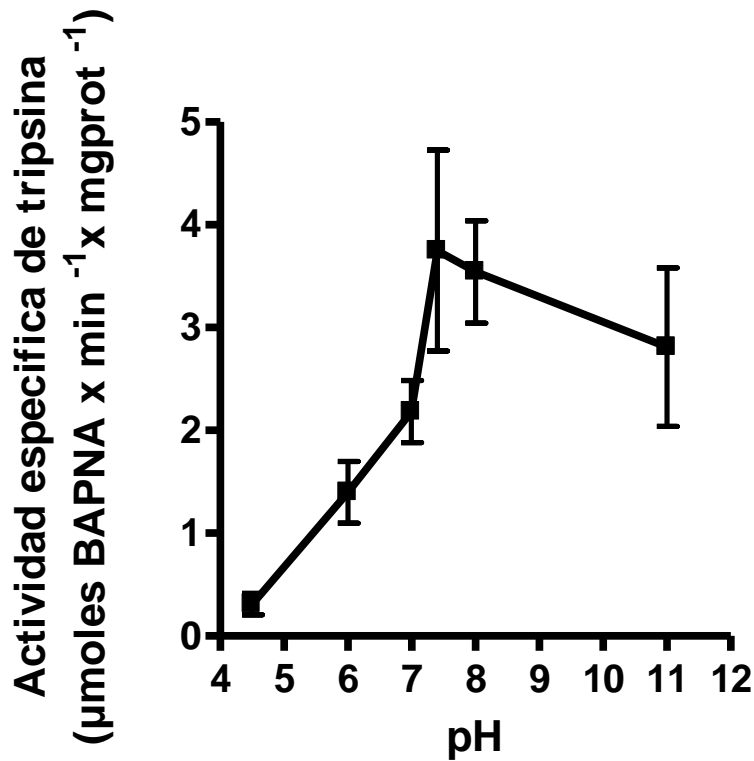


Figura 6.4.- Efecto del pH (4,5 a 11,0) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C.angulatus*. La actividad se midió a 45 ° C y en presencia de 0,6 mM de BPNA. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos. (gl: 27, F: 5,54, P: 0,002)

La actividad de tripsina fue similar entre 4 y 37°C y aumentó a 45 °C. A 70°C, la actividad disminuyó, aproximadamente un 80%, con respecto a la actividad a 45°C (Fig.6.5)

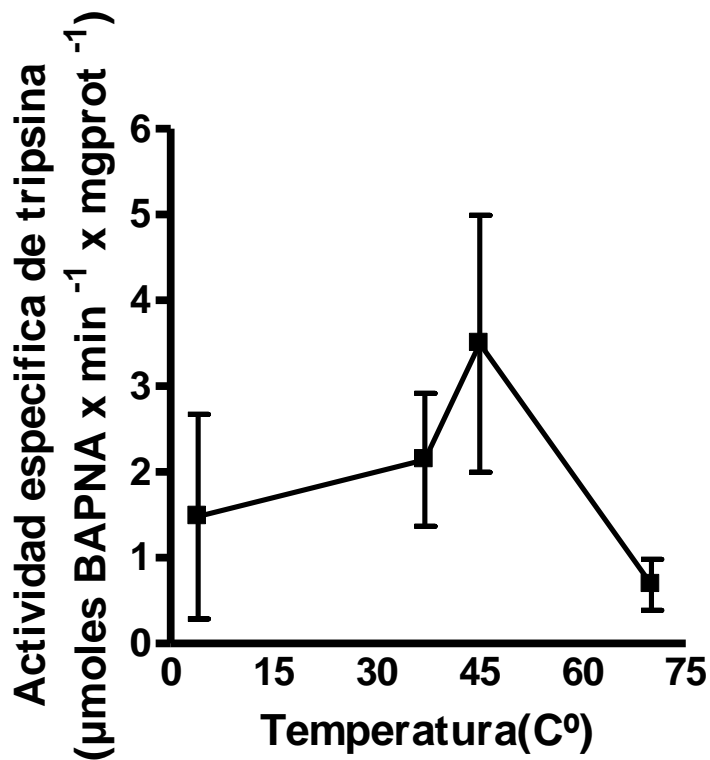


Figura. 6.5.- Efecto de la temperatura (4 a 70°C) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus*. La actividad se midió a pH 7,6 y en presencia de 0,6 mM de BPNA. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos.

El efecto de distintas concentraciones de BAPNA (0,08 a 1,23 mM) sobre la actividad de tripsina se muestra en la figura. 6.5. La actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus* exhibió una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 0,36 mM).

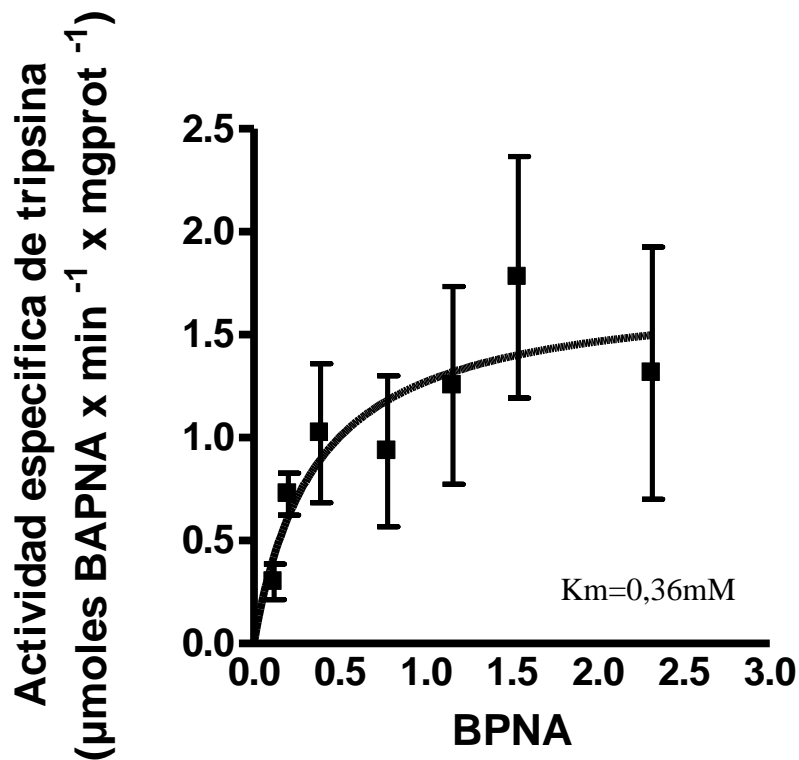


Figura. 6.6.- Efecto de las concentraciones crecientes de BAPNA (0,12 a 2,32mM) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus*. La actividad se midió a pH 7,6 a 45°C. Los datos son la medias \pm S.E para 5 individuos.

Caracterización de la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*

La actividad de APN se incrementó desde pH 6,6 a 7,6. A pH 8,0 la actividad de APN fue alrededor de un 15% menor que la actividad a pH 7,6 (Fig.6.7)

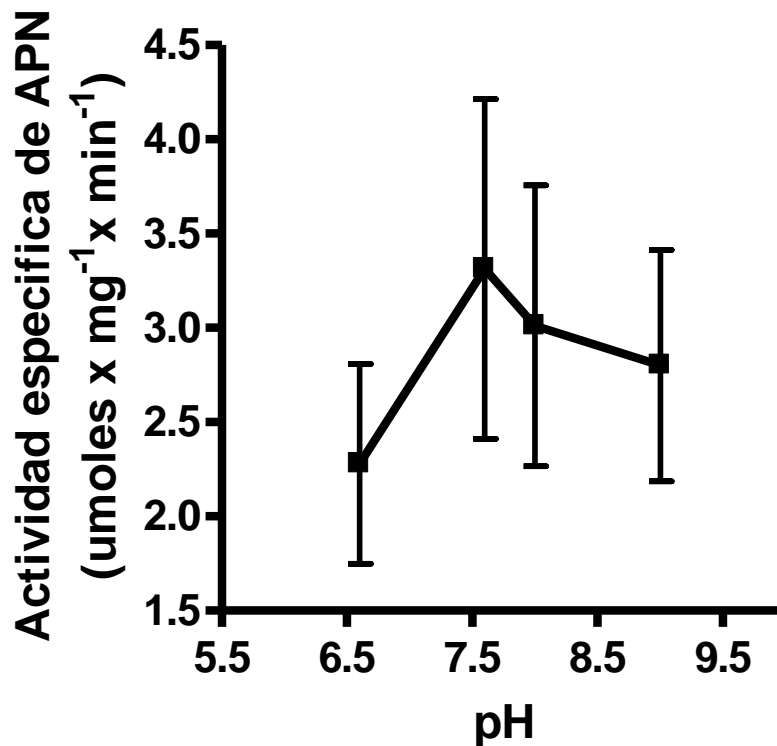


Figura. 6.7.- Efecto del pH (6,6 a 9) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*. La actividad se midió a 37 ° C y en presencia de 0,41 mM de L-Ala pNA. . Los datos son la media \pm SE para 5 individuos.

La figura 6.8 muestra el efecto de la temperatura (4-45 ° C) sobre la actividad de APN. La actividad se incrementó levemente entre los 4° C y 20° C y el mayor valor de actividad se observó a 37 ° C. A 45 ° C, la actividad de APN fue aproximadamente un 47% más baja que la actividad registrada a 37°C.

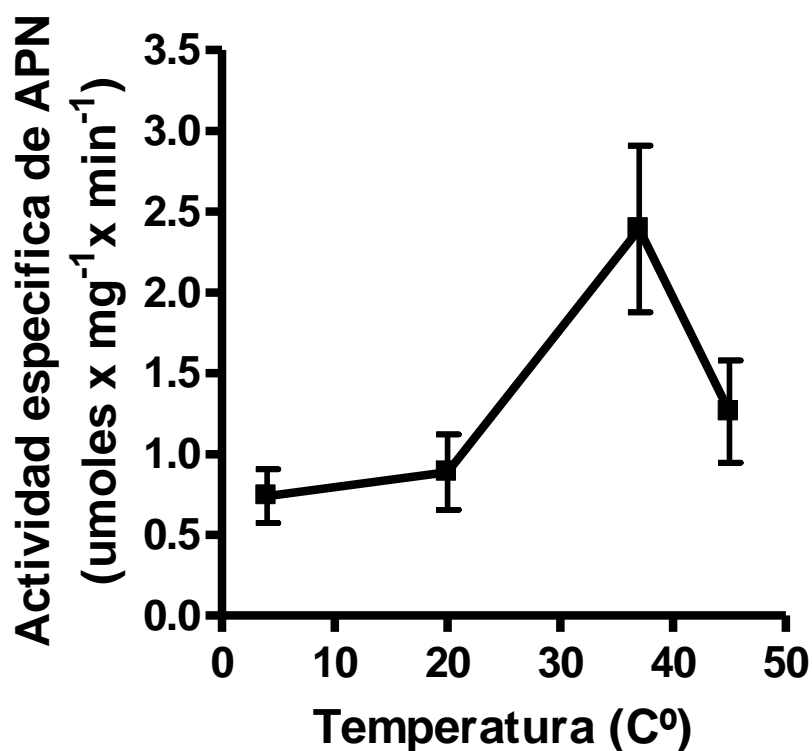


Figura.6.8.-Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*. La actividad se midió a pH 7,6 y en presencia de 0,41 mM de L-Ala pNA. Los datos son la media \pm S.E para 5 individuos. (gl: 19, F: 4,97, P: 0,013)

El efecto de distintas concentraciones de L-Ala pNA (0,04 a 0,58 mM) sobre la actividad de APN se muestra en la figura. 6.9. La actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus* exhibió una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente =0,07 mM).

La actividad de APN en hepatopáncreas no fue inhibida por bestatina (13mM-55mM) (datos no mostrados)

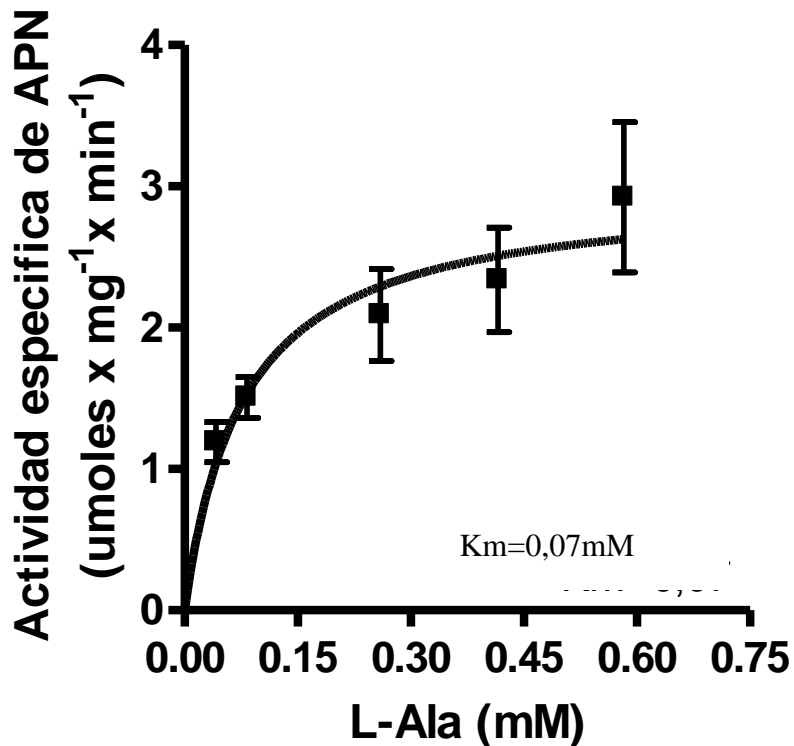


Figura.6.9.- Efecto de las concentración de L-Ala pNA (0,04 a 0,58 mM) sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*. La actividad se midió a 37 ° C y a pH de 7,6. Los datos son la media ± S. E para 5 individuos.

Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de *C. angulatus*

Para determinar el efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de lipasa, proteolítica total, tripsina y APN en hepatopáncreas de *C. angulatus* los individuos se mantuvieron en 35, 10 y 40 ‰ salinidad, salinidades en las cuales este cangrejo osmoconforma, hiper-regula e hipo-regula, respectivamente (tabla 7.1).

Tabla 6.1. – Osmolalidad (mOsm kg⁻¹) en el medio externo y en hemolinfa de *C. angulatus*

	35 ‰		10 ‰		40 ‰	
	Medio	Hemolinfa	Medio	Hemolinfa	Medio	Hemolinfa
Osmolalidad	882± 6	872± 21	269± 15	653± 14*	1015 ±16	878 ±8*

*Indica diferencias significativas del correspondiente valor en el medio externo. Los datos corresponden a la media ±E.S. de 5-10 individuos.

En individuos mantenidos en baja salinidad (10‰) y alta salinidad (40 ‰), la actividad de lipasa fue más alta (aproximadamente 3 veces mayor) que la correspondiente actividad a 35 ‰ (37 micromoles pNP min⁻¹ mg prot⁻¹). (Fig.6.10).

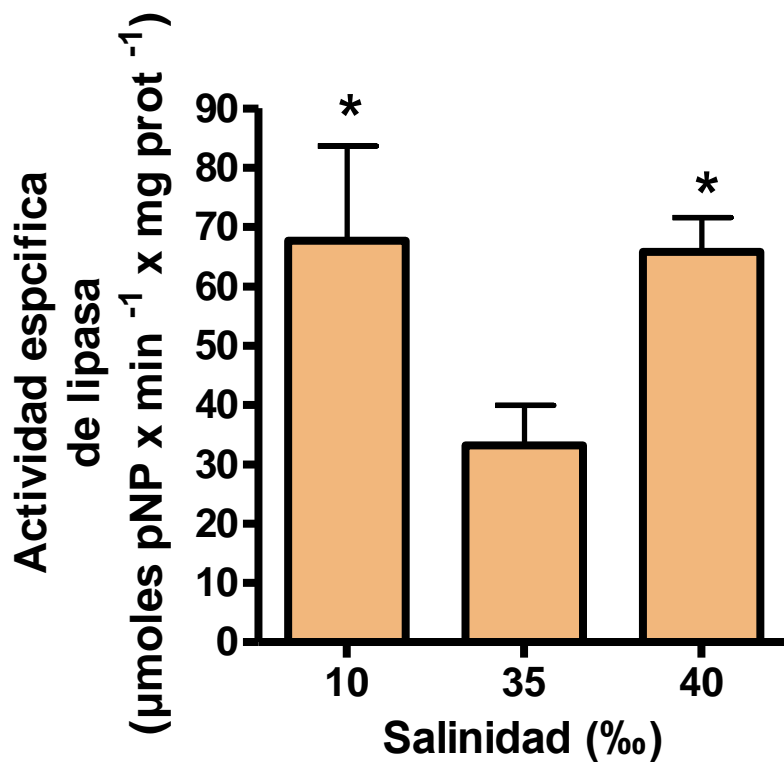


Fig. 6.10 -. Actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* expuesto a diferentes condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 35‰. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm S.E para 5 individuos. (gl: 6, T: 3,6, P: 0,011; gl: 1, T: 4,33, P:0.003)

En individuos expuestos a baja salinidad (10 ‰) la actividad proteolítica total en hepatopáncreas fue más alta (300%) que la correspondiente actividad en 35 ‰ de salinidad (Fig.6.11). La actividad proteolítica total en hepatopáncreas de cangrejos expuestos a 40‰ fue similar a la actividad en individuos expuestos a 35‰ de salinidad.

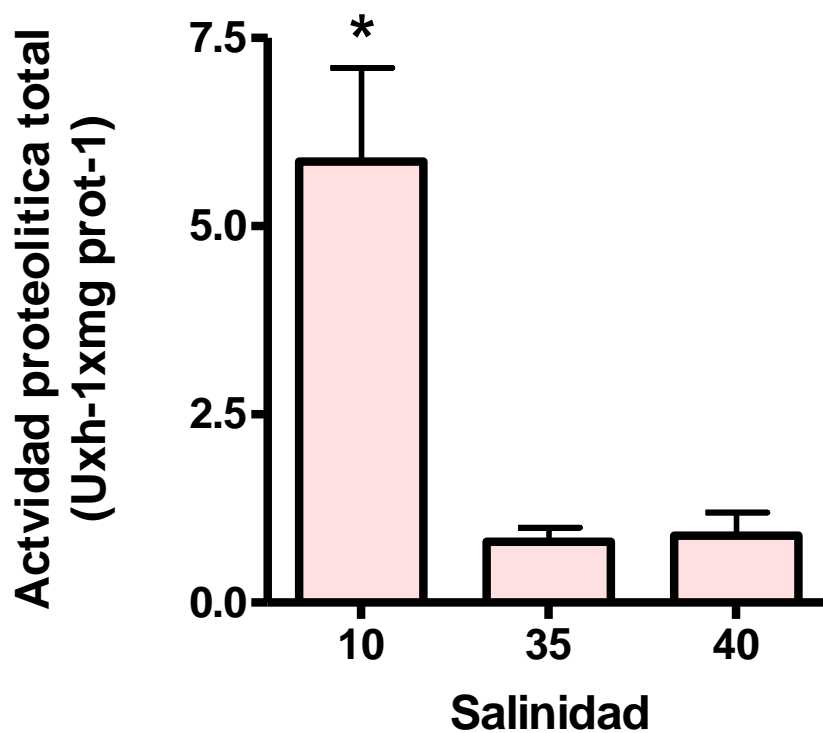


Fig. 6.11 -. Actividad proteolítica total en hepatopáncreas de *C. angulatus* expuesto a diferentes condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 35‰. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm E.S. para 5 individuos. (gl: 5, T: 3,40, P: 0,019)

La actividad de APN en hepatopáncreas de individuos expuestos a 10 ‰ de salinidad fue aproximadamente un 200% más alta que en individuos expuestos a 35‰. La actividad de APN en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* expuestos a 40‰ de salinidad fue similar a la correspondiente actividad en 35‰ (Fig.6.12)

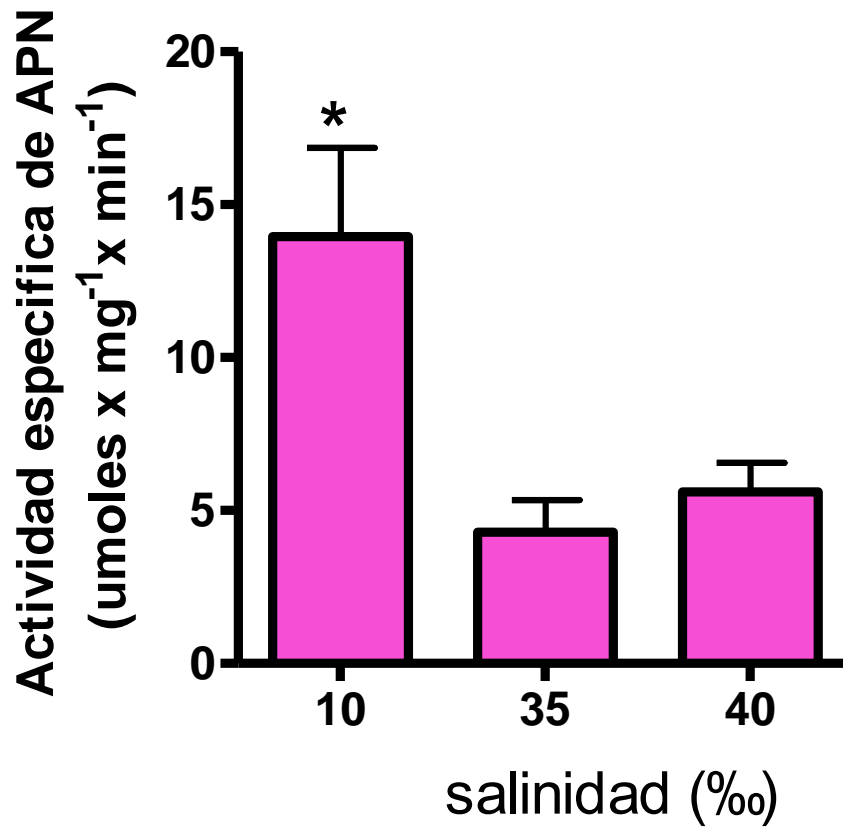


Fig. 6.12 -. Actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus* expuesto a diferentes condiciones de salinidad ambiental. * Indica diferencias significativas con respecto a 35‰. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 4, T: 3,15, P: 0,035)

No se observaron diferencias significativas entre los valores de actividad de tripsina en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* expuestos a baja o alta salinidad y en 35‰ de salinidad.

Efecto in vivo de aminas biogénicas sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*

Actividad de lipasa

En 35‰ de salinidad, la inyección de dopamina $10^{-4}M$ disminuyó significativamente la actividad de lipasa (aproximadamente 45%) en hepatopáncreas (Fig.6.13). Por el contrario, no se observó efecto de la inyección de dopamina sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos expuestos a 10 o 40 ‰ de salinidad (datos no mostrados).

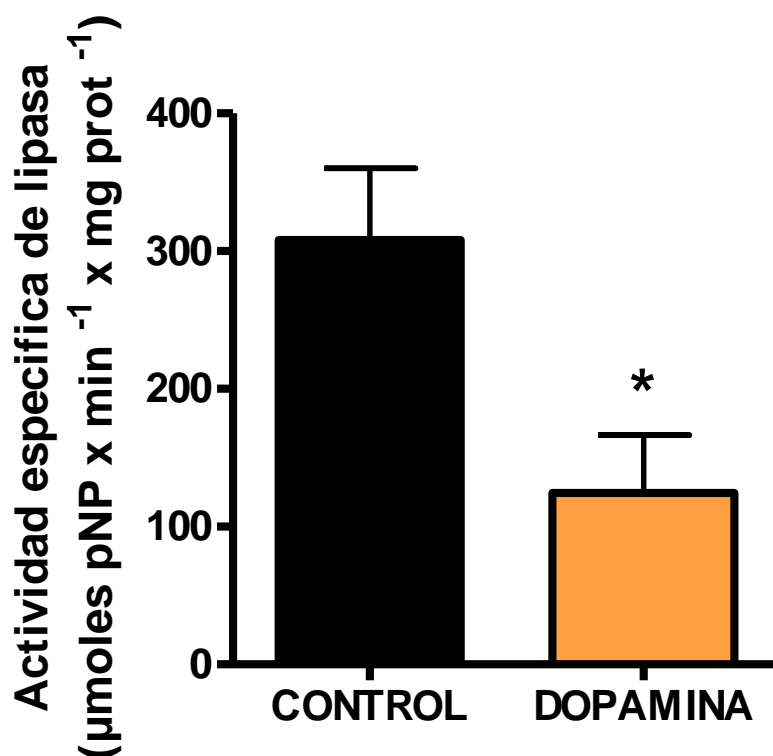


Fig. 6.13 -. Efecto *in vivo* de dopamina $10^{-4}M$ sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*. Barras negras: control; barras naranjas: DA $10^{-4}M$. * Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente control. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm E.S. para 5-10 individuos. (gl: 11, T: 27, P: 0,019)

La inyección de histamina 10^{-4} M produjo un aumento en la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* de alrededor de 200% en hepatopáncreas de individuos mantenidos en 35‰ de salinidad, (Fig.6.14), pero no tuvo efecto en individuos expuestos a 10‰ de salinidad (datos no mostrados). No se estudió el efecto en individuos mantenidos en 40‰ de salinidad.

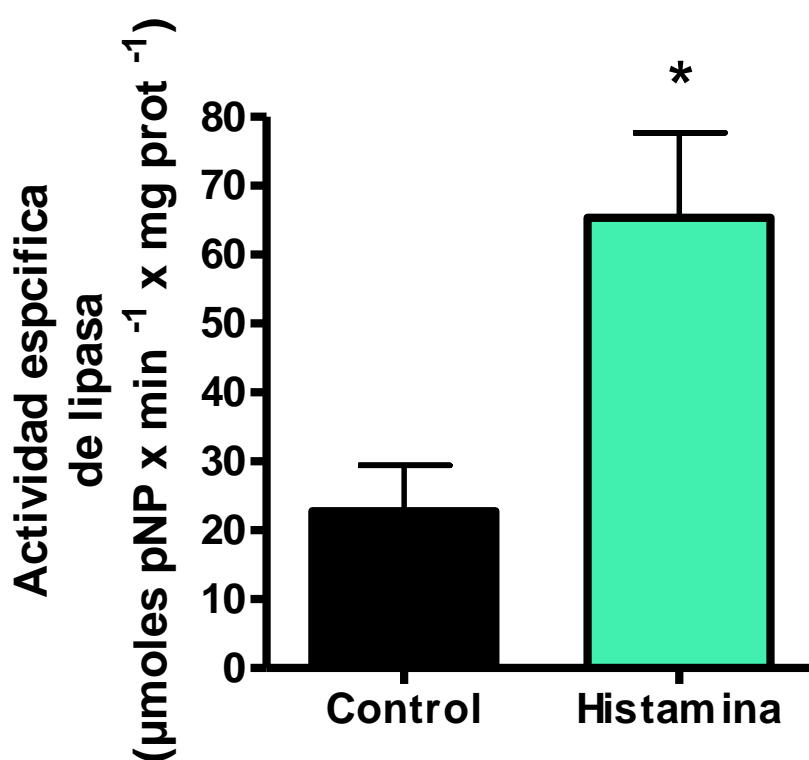


Fig. 6.14 -. Efecto *in vivo* de histamina sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*. Barras negras: Control; Barras verdes: Histamina 10^{-4} M. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente control. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl:8, T:3.03, P:0,016).

La inyección de serotonina 10^{-4} M no tuvo efecto sobre la actividad de lipasa de hepatopáncreas de *C. angulatus* mantenidos en 35 % de salinidad (datos no mostrados). No se estudió el efecto en individuos mantenidos en 10 y 40‰ de salinidad.

Actividad proteolítica total

Para estudiar el efecto *in vivo* de aminas biogénicas sobre la actividad de proteasas en hepatopáncreas de *C. angulatus* se trabajó con individuos mantenidos en 35‰ de salinidad.

La inyección de serotonina 10^{-4} M en individuos mantenidos en 35‰ de salinidad disminuyó aproximadamente un 15% la actividad de proteolítica total (Fig. 6.15).

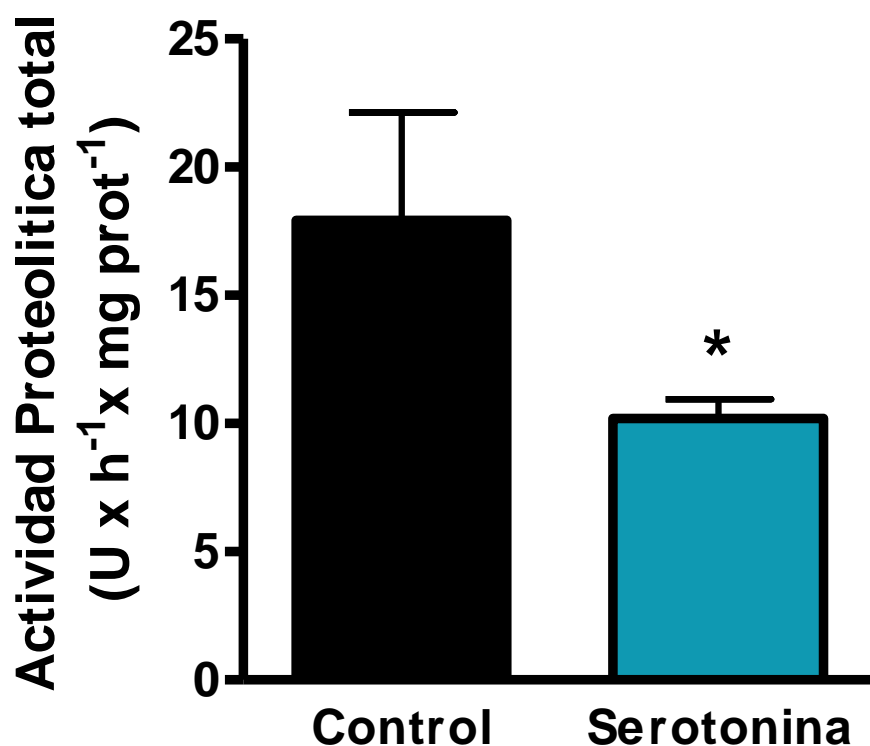


Figura.6.15. Efecto *in vivo* de serotonina 10^{-4} M sobre la actividad proteolítica total de hepatopáncreas de *C. angulatus*. Barras negras: control; Barras azules: serotonina 10^{-4} M. * Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente control. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son la media \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 4, T: 0.08, P: 0,001)

Actividad de APN

La inyección de histamina $10^{-4}M$ no tuvo efecto sobre la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulaus*.

Efecto in vitro de aminos biogénicas sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de *C. angulatus*

En estos experimentos se trabajó con individuos mantenidos en 35‰ de salinidad.

Actividad de lipasa

Histamina $10^{-4}M$ produjo un aumento *in vitro* de aproximadamente un 83 % en la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* (Fig 6.16). Histamina $10^{-4}M$ no produjo liberación de lipasa a partir del hepatopáncreas.

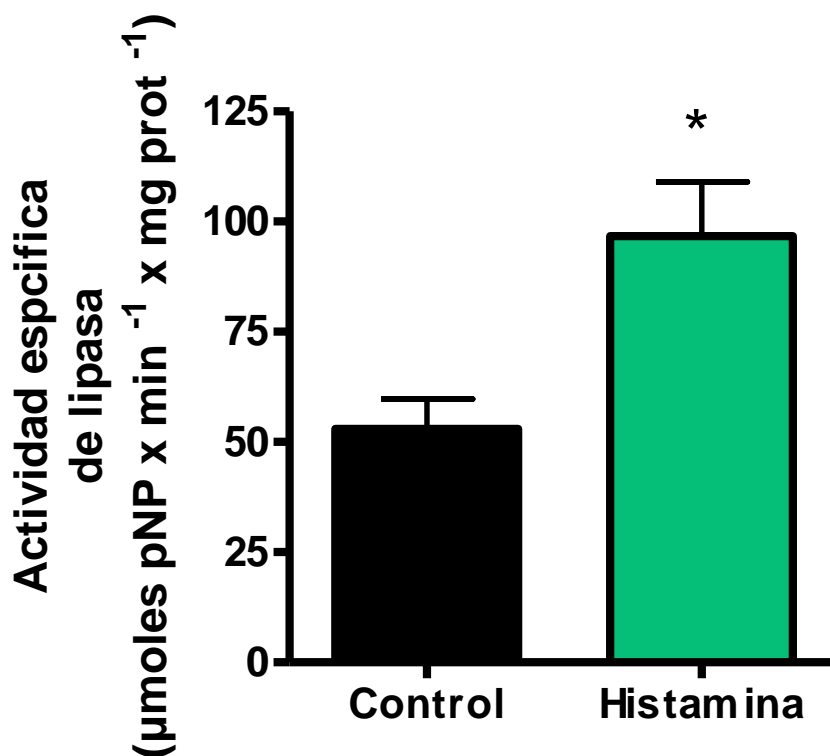


Fig.6.16. Efecto *in vitro* de Histamina sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus*. Barras negras: Control; Barras verdes: Histamina 10^{-4} M. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente control. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 8, T: 3,11, P: 0,014)

Dopamina 10^{-4} M y serotonina 10^{-4} M *in vitro*, no afectaron la actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* (resultados no mostrados).

Actividad proteolítica total

Dopamina 10^{-4} M y serotonina 10^{-4} M no afectaron *in vitro*, la actividad proteolítica total en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* (resultados no mostrados).

Actividad de tripsina

Histamina 10^{-4} M in vitro produjo una disminución de alrededor un 48% de la actividad de tripsina en hepatopáncreas (Fig 6.17). Histamina 10^{-4} M no produjo liberación de tripsina a partir del hepatopáncreas.

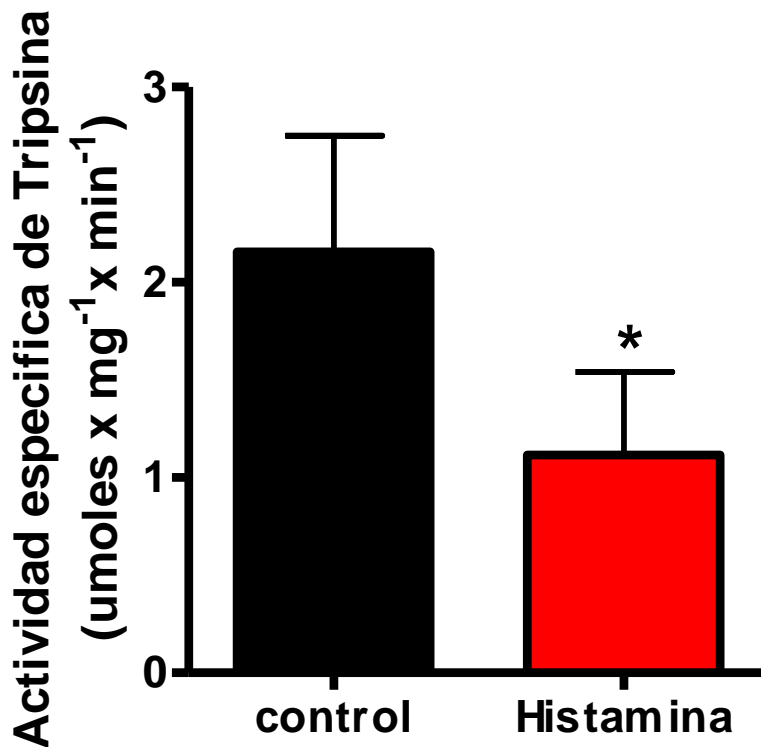


Fig. 6.17 -. Efecto *in vitro* de Histamina sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus*. Barras negras: Control; Barras rojas: Histamina 10^{-4} M. *Indica significativamente diferente del correspondiente control. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos son las medias \pm S.E. para 5 individuos. (gl: 8, T: 3,08, P: 0,015)

Discusión

Los resultados del presente capítulo constituyen la primer evidencia de la existencia de actividad de lipasa, tripsina y APN en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*.

En varios crustáceos, la presencia y el nivel de actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas ha sido relacionado con la naturaleza de los componentes dietarios que pueden ser potencialmente utilizados para los procesos metabólicos (Pavasovic et al., 2007, Figueiredo y Anderson, 2009, Ramirez-Otarola et al., 2011; Fairwather et al., 2012). *C. angulatus* de la planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita se comporta como omnívoro-detritívoro (Spivak, 1997). La existencia de actividad de lipasa y de actividad de enzimas proteolíticas (endo y ectopeptidasas) en hepatopáncreas sugiere la capacidad de este cangrejo para la hidrólisis de diferentes sustratos dietarios y el rol del mismo en los pasos finales de la digestión de ítems proteicos de la dieta tal como sugerimos para *N. granulata* (capítulo 2 presente tesis).

La mayor actividad de lipasa a pH 8,5 en hepatopáncreas de *C. angulatus* (Fig. 6.1) está de acuerdo con lo que hemos descripto previamente para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (Michiels, 2010), para nuestro conocimiento el único cangrejo eurhalino en el cual se han descripto características bioquímicas de esta actividad en hepatopáncreas. Por otro lado, está de acuerdo también con lo descripto para esta actividad en hepatopáncrea de la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii* (Hammer et al., 2003), la langosta azul *Cherax quadricarinatus* (López-López et al., 2003) y el cangrejo marino *Carcinus mediterraneus* (Smichi et al., 2012) y se encuentra dentro del rango óptimo para la actividad de la lipasa en la langosta *Panulirus argus* (Perera et al., 2008) y el cangrejo *Cherax albidus* (Coccia et al., 2011) y para las lipasas purificadas de

hepatopáncreas de *C. mediterraneus*. (Cherif et al., 2007; Cherif y Gargouri, 2009) y del langostino *Macrobrachium borellii* (Pasquevich et al, 2011). Por otro lado, la alta actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* a pH ácido (alrededor de 40-50% de la actividad máxima) es diferente de lo observado en hepatopáncreas de la langosta *C. quadricarinatus* (López-López et al, 2003). El mantenimiento de la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* en un amplio rango de pH (5,4 a 8,5) (Fig. 6.1) está de acuerdo con lo encontrado para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (Michiels, 2010) y en hepatopáncreas de la langosta *P. arhus* (Perera et al., 2008) y *C. mediterraneus* (Smichi et al., 2012). La mayor actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* a 37 ° C (Fig. 6.2) está dentro del rango de temperaturas óptimas (35-45°C) descrito para esta actividad en hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* (López-López et al, 2003), pero difiere de lo descrito en hepatopáncreas de *C. albidus* (Coccia et al, 2011) y de *C. mediterraneus* en el cual se ha descrito una temperatura máxima de 60 ° C (Cherif y Gargouri, 2009; Schimi et al., 2012). Por otro lado, si el mantenimiento de actividad de lipasa en hepatopáncreas a baja temperatura (4° C) de la mezcla de reacción podría relacionarse con el mantenimiento de la capacidad lipolítica en condiciones de baja temperatura en el ambiente natural como se ha sugerido para el copépodo *Calanus glacialis* (Freese et al., 2012) requiere mayor investigación. En este contexto, *C. angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita está comúnmente expuesto a bajas temperaturas (hasta 1°C) (Spivak et al, 1994; Observaciones personales). El comportamiento michaeliano de la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* (Fig. 6.3) coincide con lo descrito anteriormente para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (Michiels, 2010), en el cangrejo de río *Procambarus clarki* (Hammer et al., 2003) y para enzima purificada a partir del hepatopáncreas de *M. borellii* (Pasquevich et al., 2011).

La actividad más alta de tripsina a pH 7,6-8,0 difiere de lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1, presente tesis) pero es similar a lo descrito para otros crustáceos decápodos tales como *Penaeopsis serrata* (Bate, 1881), *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), *Homarus americanus* (Brokehof et al. 1970), *Pleuroncodes planipes* (Vega-Vilassante et al., 1995), *Pleoticus muelleri* (Fernandez Gimenez et al. 2001), *F. paulensis* (Buarque et al., 2009) *Metapenaeus bennettiae* (Figueiredo y Anderson, 2009), *F. subtilis* (Buarque et al. 2010), *M. rossenbergii* (Sriket et al., 2012) y *M. amazonicum* (Silva Santos et al., 2014) (Fig.6.4). El mantenimiento de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus* dentro de un amplio rango de pH es similar a lo encontrado en *N. granulata* (Capítulo 1, presente tesis) y en otros crustáceos (García-Carreño, 1992; García-Carreño et al., 1994; Ceccaldi, 1997, Buarque et al, 2009, 2010). Sin embargo, a diferencia de lo observado en *N. granulata* (Capítulo 1 presente tesis), se observó una alta actividad de tripsina a pH básico (Fig.6.4). La máxima actividad de tripsina a 45°C (Fig.6.5) está de acuerdo con lo observado para la esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1, presente tesis), *P. serrata* (Van Wormhoudt et al., 1980), *F californiensis* (Vega-Vilassante et al., 1995), *F. paulensis* (Buarque et al 2009), *F subtilis* (Buarque et al., 2010) pero difiere de lo encontrado en *P. japonicus* (Golgoni and Nagayama 1987), *M. monodom* (Jiang et al. 1991) y *M. amazonicum* (Silva Santos et al. 2014) en donde esta actividad fue máxima a temperaturas de aproximadamente 65 °C. La actividad de tripsina exhibió una cinética de Michaelis-Menten similarmente a lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (capítulo 1, presente tesis) y para la actividad de esta enzima en hepatopáncreas de otros crustáceos decápodos tales como *Macrobrachium lamarrei* (Murthy y Saxena, 1979); el cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Guizani et al., 1992) y el cangrejo real *Paralithodes camtschaticus* (Papilova et al., 2008).

Los trabajos sobre la presencia de APN en hepatopáncreas de crustáceos son escasos y fragmentarios (Saborowski et al., 2006, Rossano et al., 2011), siendo los estudios realizados sobre existencia y caracterización bioquímica de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* (capítulo 2, presente tesis) los primeros en un cangrejo eurihalino. La alta actividad de APN entre el rango de pH 7,6 a 9 (Fig. 6.7) fue similar a lo encontrado para *N. granulata* (Capítulo 2 presente tesis) y a lo encontrado para esta actividad en intestino de humanos (Sanderik et al., 1988) e intestino de las aves *Zonotrichia capensis* y *Diuca diuca* (Sabat et al., 1998). La mayor actividad de APN a 37°C está dentro del rango descrito para *N. granulata* (Capítulo 2 presente tesis). Sin embargo, la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus* fue menor a 45°C. La actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus* exhibió una cinética Michaelis-Menten similarmente a lo encontrado para esta actividad en *N. granulata* (Capítulo 2 presente tesis). Diferencialmente a lo observado en *N. granulata* (Capítulo 2 presente tesis), la bestatina (13mM-55mM) no afectó la actividad de APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*. Si las diferencias encontradas en algunas de las características bioquímicas entre las actividades de tripsina y APN en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* se deben a la existencia de distintas isoformas en hepatopáncreas de estas especies requiere mayor investigación.

Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que la adaptación bioquímica de *C. angulatus* de laguna de Mar Chiquita a la salinidad ambiental es un proceso complejo que implica la modulación diferencial e integrativa de la actividad de Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales anteriores y posteriores y de la actividad de Na^+/K^+ ATPasa y fosfatasa alcalina en músculo de la quela (López Mañanes et al, 2002; Pinoni y López Mañanes, 2004; 2008; Pinoni, 2009). La modulación diferencial de enzimas digestivas constituye uno de las respuestas a salinidad ambiental en *N. granulata* (Pinoni et al 2013;

capítulos 4 y 5 presente tesis). La mayor actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* expuestos a 10 ‰ y 40‰ de salinidad (Fig.6.10), salinidades en las cuales este cangrejo hiper e hipo-regula, respectivamente (Tabla 6.1), sugiere que la modulación de la actividad lipolítica es un componente de la adaptación bioquímica a la salinidad en *C. angulatus*. La mayor actividad de lipasa en hepatopáncreas a baja y alta salinidad (Fig. 6.10) sugiere un aumento potencial de la capacidad lipolítica en condiciones de osmorregulación, lo que podría conducir a una mayor disponibilidad de metabolitos lipídicos (Romano y Zeng, 2012, Pinoni et al., 2013; Romano et al., 2014). La mayor actividad proteolítica total en el hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos en 10 ‰ de salinidad (Fig. 6.11) en comparación con individuos a 35‰ (condición de osmorregulación) podría constituir un ajuste digestivo (ej.: capacidad proteolítica del hepatopáncreas) que permita incrementar la disponibilidad de metabolitos proteicos. Sin embargo, el hecho que la actividad proteolítica total fue similar en individuos mantenidos en 40‰ de salinidad sugeriría ajustes particulares en la capacidad proteolítica del hepatopáncreas en relación a la hiperregulación. La mayor actividad de APN en hepatopáncreas de individuos en 10‰ de salinidad soporta la idea de ajustes diferenciales (incremento de la capacidad para los pasos finales de la digestión de ítems proteicos) en el metabolismo proteico en relación a la hiperregulación. Por otro lado, el hecho que no se observaron diferencias en la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus* sugiere la posible modulación por salinidad de otras proteasas en el hepatopáncreas. Trabajos de investigación realizados en paralelo en nuestro laboratorio demostraron que la actividad de carbohidrasas (amilasa, sacarasa y maltasa) en hepatopáncreas de *C. angulatus* son afectadas por salinidad y que la movilización de glucógeno desde branquias ocurre sólo en condiciones de alta salinidad (Asaro et al., 2012) reforzando así la hipótesis

sobre la existencia de ajustes específicos y diferenciales en relación a distintas condiciones de osmorregulación.

Los resultados de los capítulos 2 y 3 de la presente tesis y los presentados en este capítulo, soportan la idea del rol de las aminas biogénicas en mecanismos de regulación de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos.

Como mostramos anteriormente (Capítulo 3 presente tesis) dopamina 10^{-4} M *in vitro* moduló la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo el rol de esta amina biogénica en vías de regulación de esta actividad y su efecto directo sobre este tejido. Los resultados del presente capítulo que muestran el efecto *in vivo* de dopamina 10^{-4} M sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* sugieren, también, la participación de esta amina biogénica en vías de regulación de la actividad lipolítica en hepatopáncreas de *C. angulatus*. Sin embargo, el hecho que dopamina 10^{-4} M no afectó *in vitro* la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* sugeriría la posible existencia de mecanismos de regulación indirectos por dopamina. Por otro lado, el hecho que la dopamina no tuvo efecto sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* en cangrejos mantenidos en baja o alta salinidad, sugeriría que la respuesta diferencial de esta actividad a la salinidad podría ser, al menos parcialmente, atribuida a la existencia de una diferente participación de dopamina en mecanismos diferenciales de regulación en relación al estado osmorregulatorio. Trabajo previos en nuestro laboratorio han demostrado el efecto *in vivo* de dopamina 10^{-4} M sobre los niveles de glucosa en hemolinfa, la actividad de fosfatasa alcalina en músculo de la quela de *C. angulatus*, y el contenido de glucógeno de órganos de reserva de *C. angulatus* (López Mañanes, 2004; del Valle et al., 2012 a,b). Así, la dopamina parece tener múltiples efectos sugiriendo su rol en vías de regulación que participan en el control de respuestas asociadas a la adaptación bioquímica a la salinidad y de procesos digestivos y metabólicos (López Mañanes, 2004;

Pinoni y López Mañanes, 2004). Trabajos de nuestro grupo que muestran la estimulación *in vitro* por dopamina 10^{-4}M de la liberación de glucosa a partir de hepatopáncreas de *C. angulatus* sugieren el efecto directo de esta amina biogénica en este tejido (López Mañanes, 2004). Por otro lado, el hecho que dopamina 10^{-4}M no tuvo efecto sobre la actividad proteolítica total *in vivo* o *in vitro* sugeriría la existencia de mecanismos diferenciales de regulación de la actividad de enzimas digestivas. En este contexto serotonina 10^{-4}M no afectó *in vivo* o *in vitro* la actividad de lipasa mientras que *in vivo* produjo una disminución de la actividad proteolítica total (Fig.6.15). Además, el hecho que serotonina 10^{-4}M tuvo efecto *in vivo* sugeriría mecanismos indirectos de regulación de la actividad proteolítica.

La histamina es una de las principales aminas biogénicas involucradas en la regulación de componentes a nivel bioquímico de procesos digestivos en mamíferos (Sander et al., 2006; Breuning et al., 2007; Ramsay et al., 2011). El efecto *in vivo* de histamina 10^{-4}M sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* (Fig.6.14) sugieren la participación de esta amina biogénica en la regulación de la actividad de enzimas digestivas en este cangrejo. La modulación diferencial (inducción de un aumento de la actividad) por histamina 10^{-4}M con respecto al efecto por dopamina, de la actividad de lipasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*, sugiere el rol de estas aminas biogénicas en vías antagónicas de regulación. Además, la mayor actividad de lipasa inducida por histamina 10^{-4}M *in vitro*, sugiere el efecto directo sobre este tejido (Fig.6.16), aunque, para nuestro conocimiento, no se ha reportado la existencia de receptores histamínicos en hepatopáncreas de crustáceos. Por otro lado, histamina 10^{-4}M *in vivo* no tuvo efecto sobre la actividad de APN lo cual soporta aún más la idea de la existencia de mecanismos de regulación diferenciales de la actividad de enzimas digestivas por aminas biogénicas. En este contexto, histamina 10^{-4}M *in vitro* produjo una disminución de la actividad de tripsina

(Fig.6.17) diferencialmente al efecto encontrado sobre la actividad lipolítica. Más aún, el hecho que la histamina *in vitro* no estimuló la liberación de tripsina ni de lipasa a partir del hepatopáncreas, sugiere la existencia de modulación de actividad de tripsina y lipasa intracelular como se sugirió para el efecto de dopamina sobre la actividad lipolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 3 presente tesis).

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran la existencia de actividad de lipasa, tripsina y APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*, sugiriendo su capacidad para la hidrólisis de distintos sustratos dietarios y la existencia de procesos de modulación diferencial de enzimas digestivas por salinidad y aminas biogénicas.

Discusión General y Consideraciones finales

Los estudios sobre diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva (ej: sobre actividad de enzimas digestivas clave) constituyen un área de fundamental importancia para el conocimiento integrado de estrategias digestivas a nivel bioquímico-fisiológico. Las enzimas digestivas cumplen un rol fisiológico esencial ya que constituyen el vínculo entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013). En varios vertebrados, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas clave constituye un mecanismo de ajuste a nivel bioquímico en respuesta a condiciones fisiológicas y/o ambientales (Balslev-Clausen et al., 2003; del Valle et al., 2004, 2006; del Valle y López Mañanes, 2008, 2009, 2011, 2012, Naya et al., 2008, 2009; Iglesias et al., 2009; Brezk et al., 2013; Liu et al., 2013; McWilliams et al., 2014).

Diversos mensajeros químicos primarios (entre ellos aminas biogénicas y varias hormonas peptídicas) están involucrados en la compleja regulación de diferentes componentes a nivel bioquímico (ej: actividad de enzimas digestivas/reservas de energía) en procesos digestivos, secretorios y absorptivos (Dufresne et al., 2006; Murphy et al., 2008; Williams et al., 2009; Goodman, 2010; Williams, 2010; Stengel y Taché, 2011; de Araujo et al., 2012; Wang et al., 2012; Dockray, 2014; Trowers y Tischler, 2014). Sin embargo, faltan estudios en grupos de importancia ecológica tales como cangrejos eurihalinos intermareales. Los estudios de localización y determinación de características bioquímicas de actividades enzimáticas digestivas clave en tracto digestivo constituyen un paso básico fundamental en el conocimiento de la fisiología bioquímica digestiva.

- Si bien es ampliamente reconocido que el hepatopáncreas de crustáceos decápodos desempeña un rol central en la digestión y absorción de nutrientes, siendo el sitio

principal de producción de enzimas digestivas y un importante órgano endocrino (Ceccaldi, 1989; Fingerman et al., 1993; Muhlia-Almazan y Garcia-Carreño, 2003; Huang et al., 2005; Zeng et al., 2010; McGaw y Curtis, 2013) los procesos y mecanismos de regulación de la actividad de enzimas digestivas (y de reservas de energía) están muy poco comprendidos.

- Los cangrejos eurihalinos hiper/hiporreguladores son capaces de mantener la concentración osmótica de la hemolinfa dentro de un rango estable, por encima o debajo de la del medio externo en baja y alta salinidad, respectivamente (Lucu y Towle 2003; Freire et al., 2008; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Henry et al., 2013; Larsen et al., 2014). Los cambios moleculares y bioquímicos implicados en las respuestas osmorregulatorias (particularmente en branquias) han sido intensivamente estudiados pero, sin embargo, faltan estudios aún sobre algunos de los mecanismos involucrados a nivel bioquímico, particularmente desde una perspectiva metabólica (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012). Las respuestas a nivel bioquímico a la salinidad ambiental constituyen un proceso complejo que implica la participación de diferentes enzimas y sistemas de transporte en diferentes órganos y tejidos (Jahn et al., 2006; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008, 2009; Athamena et al., 2011; Martins et al., 2011; Pinoni et al., 2013).
- Los resultados de la presente Tesis representan un estudio integrativo de caracterización y modulación de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de de los cangrejos eurihalinos *Neohelice granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires).

- *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna exhibió actividad de tripsina (endopeptidasa) en hepatopáncreas con características bioquímicas que sugieren una alta capacidad para la digestión proteolítica (Capítulo 1).
- Determinamos la existencia de actividad de APN (ectopeptidasa) en hepatopáncreas de *N. granulata* de la planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita la cual se caracterizó parcialmente. La existencia de actividad de APN en hepatopáncreas sugiere la capacidad para la digestión total de ítems proteicos. El hecho que parte de la actividad total de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* fue sensible a bestatina sugiere por un lado, la existencia de actividad de APN similar a la descrita en intestino de mamíferos y por otro de diferentes isoformas de APN. El aumento *in vitro* de la actividad de APN inducido por la amina biogénica dopamina (mensajero químico primario con un importante rol en la regulación de diferentes procesos y respuesta a condiciones ambientales en crustáceos decápodos) sugiere su rol en la modulación de componentes a nivel bioquímico de la digestión proteica y de APN en vías de regulación mediadas por dopamina en hepatopáncreas (Capítulo 2).
- Se demostró la existencia de actividad de lipasa sensible *in vitro* a dopamina, AMPc y glucagón en hepatopáncreas de *N. granulata* y la modulación concomitante por dopamina y AMPc del contenido de triglicéridos en hepatopáncreas (Capítulo 3). Estos resultados sugieren la existencia de actividad de lipasa sensible a hormonas en hepatopáncreas, la existencia de modulación de actividad de lipasa intracelular, el rol de dopamina, glucagón y AMPc en dicha regulación, el efecto directo de dopamina y glucagón sobre el hepatopáncreas y la posible relación entre modulación de la actividad de lipasa por dopamina y AMPc y el metabolismo (ej: catabolismo) de triglicéridos.

- Las respuestas diferenciales de la actividad de lipasa, proteolítica total y APN en hepatopáncreas; del contenido de triglicéridos y proteínas en órganos de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela, branquias anteriores y posteriores) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos en baja y alta salinidad en condiciones de hipo e hiperregulación, respectivamente, sugieren la existencia de ajustes diferenciales postprandiales (ej: en la dinámica) digestivos y metabólicos a nivel bioquímico en relación a la osmorregulación y al tipo de respuesta osmorregulatoria (hipo ó hiperregulación) (Capítulo 4). Por otro lado, las respuestas en la actividad de enzimas digestivas y el contenido de reservas de energía en individuos alimentados y transferidos de alta (condiciones de hiporregulación) a baja salinidad (condiciones de hiperregulación) sugieren la existencia de ajustes diferenciales digestivos y metabólicos a nivel bioquímico particulares en relación al cambio abrupto de salinidad (Capítulo 5).
- Se demostró la existencia de actividad de lipasa, tripsina y APN en hepatopáncreas de *C. angulatus*, las cuales se caracterizaron parcialmente lo que sugiere la capacidad potencial para la hidrólisis de diferentes ítems dietarios y, similarmente a lo sugerido para *N. granulata*, el rol del hepatopáncreas en pasos finales de la digestión de ítems proteicos de la dieta (Capítulo 6). Se demostró la sensibilidad diferencial de las actividades proteolítica total y de lipasa a salinidad ambiental sugiriendo el rol de las mismas como componentes en ajustes digestivos a nivel bioquímico en relación al estado osmorregulatorio (Capítulo 6). Por otro lado la sensibilidad diferencial a la salinidad sugiere la existencia de mecanismos de modulación diferenciales en relación a la hipo e hiperregulación y la posible participación diferencial de distintas rutas metabólicas en dichos procesos. Los

resultados obtenidos sobre el efecto de diferentes aminas biogénicas (dopamina, serotonina, histamina) sobre las actividades de lipasa, proteolítica total y tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus* sugieren el rol de estas aminas como mensajeros químicos primarios involucrados en la regulación de procesos digestivos y/o metabólicos a nivel bioquímico, la modulación intracelular de la actividad de enzimas digestivas y la posible existencia de mecanismos indirectos y directos de regulación diferenciales y específicos (Capítulo 6).

Bibliografia

- Abumrad, N. A., Davidson, N. O. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiological reviews*. 92(3), 1061-1085.
- Ahearn, G. A., Duerr, J. M., Zhuang, Z., Brown, R. J., Aslamkhan, A., & Killebrew, D. A. (1999). Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiological and Biochemical Zoology*. 72(1):1–18.
- Ahearn, G.A. (1982). Water and solute transport in crustacean gastrointestinal tract. In: Podesta RB (ed) *Membrane physiology of invertebrates*. Marcel-Dekker, Inc., New York, pp 261–339.
- Ahearn, G.A., Clay, L.P. (1988) .Sodium-coupled sugar and amino acid transport in an acidic microenvironment. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 90: 627-634.
- Allen, C.E., Tyler, P.A., Varney, M.S. (2000). Lipid profiles of *Ematocarcinus gracilisa* deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Hydrobiologia*. 440: 273–279.
- Alpers, D.H. (1987). Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. In Johnson LR (ed). *Physiology of The Gastro-intestinal Tract*. Raven Press, New York, pp.1469–1487.
- Arnaldo, F. B., Van Anthony, M. V., Konkalmatt, P. R., Owens, S. A., Asico, L. D., Jones, J. E., Concepcion, G. P. (2014). D1-like dopamine receptors downregulate Na⁺-K⁺-atpase activity and increase camp production in the posterior gills of the blue

crab *Callinectes sapidus*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 307(6): R634-R642.

- Arnon, R., Neurath, H. (1969). "An immunological approach to the study of evolution of trypsins." Proceedings of the National Academy of Sciences. 1323-1328.
- Artillo, R., Pinoni, S.A, Asaro. A., López Mañanes, A.A. (2008). Glycogen storage sites in *Chasmagnathus granulatus* upon hyperregulation: differential postingesta response. *Biocell* 32:85.
- Asaro, A., del Valle, J.C., López Mañanes, A.A. (2011). Amylase, maltase and sucrase activities in hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Brachyura: Varunidae): partial characterization and response to low environmental salinity. *Scientia Marina*. 75:517-524.
- Athamena ,A., Brichon, G., Trajkovic-Bodenec, S., Pequeux, A., Chapelle, S., Bodenec, J., Zwingelstein, G. (2011). Salinity regulates N-methylation of phosphatidylethanolamine in euryhaline crustaceans hepatopancreas and exchange of newly formed phosphatidylcholine with hemolymph. *Journal of Comparative Physiology B*. 181: 731–740.
- Avramov, M., Rock, T., Pfister, M., Schramm, K.W., Schmidt, S.I., Griebler. C., (2013). Catecholamine levels in groundwater and stream amphipods and their response to temperature stress. *General and comparative endocrinology*. 194:110-117.
- Balslev-Clausen, A., mccarthy, J.M., Carey, H.V. (2003). Hibernation reduces pancreatic amylase levels in ground squirrels. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 134:573-578.
- Barker, P. L., Gibson, R. (1977). Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the european lobster *Homarus gammarus*

(Decapoda: Nephropidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 26(3): 297-324.

- Barros, A., Bridi, A., Souza, J., de Castro, Junior B., Lima Torres, C., Malard, K., Jorio, L., Marques de Miranda, A., Ashrafi, D., Romano-Silva, K.M. (2014). Dopamine Signaling Regulates Fat Content through β -Oxidation in *Caenorhabditis elegans*. *Plos one*. 9:1-11.
- Bartness, T., Liu, Y., Shrestha, Y., Ryu, V. (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis *Frontiers in Neuroendocrinology*. In press.
- Bauvois, B., Dauzonne, D. (2006). Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: Chemistry, Biological Evaluations, and Therapeutic Prospects. *Medicinal research reviews*. 26:188 -130
- Beltrame, M. O., De Marco, S. G., y Marcovecchio, J. E. (2008). Cadmium and zinc in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina): salinity effects on lethal toxicity in juveniles of the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 55(1): 78-85.
- Bertin, E.L., Arner, P., Bolinder, J., Hagström-Toft, E.(2001).Action of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86:1229-34.
- Bianchini, A., Lauer, M. M., Nery, L. E. M., Colares E. P., Monserrat J. M., Dos Santos, F. E. A. (2008). Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation .*Comparative Biochemistry and Physiology*. A. 151: 423-436.

- Birsoy, K., Festuccia, W. T., Laplante, M. (2013). A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of cell science*, 126(7): 1541-1552.
- Bortolus, A., Iribarne, O. (1999). Effects of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Marine ecology. Progress series*. 178: 79-88.
- Bortolus, A., Lateralra, P., Iribarne, O. (2004). Crab-mediated phenotypic changes in *Spartina densiflora*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 59(1): 97-107.
- Bortolus, A., Schwindt, E., Iribarne, O. (2002). Positive plant-animal interactions in the high marsh of an Argentinean coastal lagoon. *Ecology*. 83: 733-742
- Bosch, B. J., Smits, S. L., y Haagmans, B. L. (2014). Membrane ectopeptidases targeted by human coronaviruses. *Current opinion in virology*.6: 55-60.
- Boschi, E.E. (1964). Los crustáceos decápodos *Brachyura* del litoral bonaerense (R. Argentina). *Instituto de Biología Marina. Mar del Plata*. 6: 1-99.
- Bozinovic, F. (1993). Fisiología ecológica de la alimentación y digestión en vertebrados: modelos y teorías. *Revista Chilena de Historia Natural*. 66: 375-382.
- Bozinovic, F. (2003). *Fisiología Ecológica y Evolutiva. Teoría y casos de estudio en animales*. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile. 1-531 pp.
- Bradford, M.M. (1976) .A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.
- Breunig, E., Michel, K., Zeller, F., Seidl, S., Weyhern, C. W. H. V., Schemann, M. (2007). Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *The Journal of physiology*, 583(2): 731-742.

- Brzęk, P., Kohl, D., Caviedes-Vidal, E., Karasov, W.H. (2013). Activity of intestinal carbohydrases responds to multiple dietary signals in nestlinghouse sparrows. *The Journal of Experimental Biology*. 216: 3981-3987.
- Buarque, D. S., Castro, P. F., Santos, F. M. S., Amaral, I. P. G., Oliveira, S. M., Alves, K. B. Bezerra, R. S. (2010). Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) in two sub-adult stages. *Aquaculture Nutrition*. 16(4):359-369.
- Buarque, D. S., Castro, P. F., Santos, F. M. S., Lemos, D., Júnior, L. B. C., Bezerra, R. S. (2009). Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 40(7):861-870.
- Buckup L, Dutra B, Ribarcki F, Fernandes F, Noro C, Oliveira G, Vinagre A (2008) Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 149: 59-67
- Burnstock G., Novak I. (2013). Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal*. 9: 307–324.
- Carter, C. G., Mente, E. (2014). Protein synthesis in crustaceans: a review focused on feeding and nutrition. *Central European Journal of Biology*. 9(1): 1-10.

- Casas- Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A.(2012). In: Sandobal, G. (Ed). Methods in Molecular Biology. Vol 861. Human Press, Springer Science- Business, New York, pp 547.
- Caviedes-Vidal, E., Afik, D., Marti´nez del Rio, C., Karasov, W.H.(2000).Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*), testing an adaptative hypothesis. Comparative Biochemistry and Physiology A. 125: 11 – 24.
- Ceccaldi, H. J., 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. Crustacean nutrition.6: 261-291.
- Ceccaldi, H.J. (1989). Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. Advances in Tropical Aquaculture Aquacop-Ifremer. Actes de Colloque. 9: 243-259.
- Celis-Guerrero, L. E., Garcı́a-Carreño, F. L., & del Toro, M. A. N. (2004). Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). Marine Biotechnology.6(3): 262-269.
- Chang, C.C., Wu, Z.R., Kuo, C.M., Cheng, W. (2007). Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunology. 23: 24-33
- Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P., Trilles, J.-P., (1989). Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of peneid shrimps. Special Publication. European Mariculture Society. 10: 65–66
- Charmantier, G., y Anger, K. (2011). Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Loss of hypo-regulation in a land-

locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 396(2): 89-98.

- Chen, L., Yi-Lun, L., Guiqing, P., Fang, L. (2013). Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of the National Academy of Sciences* .109, 17966–71
- Cheng, W., Chieu, H.T., Tsai, C.H., Chen, J.C . (2005). Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunology*. 19:375-385
- Cherif, S., Fendri, A., Miled, N., Trabelsi, H., Mejdoub, H., Gargouri, Y. (2007). Crab digestive lipase acting at high temperature: purification and biochemical characterization. *Biochimie*. 89: 1012–1018.
- Cherif, S y Gargouri, Y.(2009). Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab. *Food Chemistry*. 116: 82-86.
- Chiu, H.T., Yeh, S.P., Huang, S.C., Chang, C.C., Kuo, C.M., Cheng, W. (2006). Dopamine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 25: 558-566.
- Christie, A.E. (2011). Crustacean neuroendocrine systems and their signaling agents. *Cell Tissue Research* .345, 41-67.
- Christie, A. E., Fontanilla, T. M., Roncalli, V., Cieslak, M. C., Lenz, P. H. (2014). Identification and developmental expression of the enzymes responsible for dopamine, histamine, octopamine and serotonin biosynthesis in the copepod crustacean *Calanus finmarchicus*. *General and comparative endocrinology*. 195: 28-39.

- Coccia, E., Varricchio, E., Paolucci, M. (2011). Digestive Enzymes in the Crayfish *Cherax albidus* Polymorphism and Partial Characterization International Journal of Zoology. 1-9.
- Coleman, R. A., y Mashek, D. G. (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. Chemical reviews. 111(10): 6359-6386.
- Crocker, D. E., Fowler, M. A., Champagne, C. D., Vanderlugt, A. L., Houser, D. S. (2014). Metabolic response to a glucagon challenge varies with adiposity and life-history stage in fasting northern elephant seals. General and comparative endocrinology. 195: 99-106.
- Curtis, D. L., y McGaw, I. J. (2010). Respiratory and digestive responses of postprandial Dungeness crabs, Cancer magister, and blue crabs, Callinectes sapidus, during hyposaline exposure. Journal of Comparative Physiology B.180(2), 189-198.
- Curtis, D.L., van Breukelen, F; McGaw, I.J. (2013). Extracellular digestion during hyposaline exposure in the Dungeness crab, Cancer magister, and the blue crab, Callinectes sapidus. Comparative Biochemistry and Physiology. 166A: 564-570.
- da Silva Santos, F. M., Ribeiro, K., de Freitas, A. C. V., de Carvalho, L. B., Valenti, W. C., de Souza Bezerra, R. (2014). Digestive proteases from wild and farmed male morphotypes of the Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*). Journal of Crustacean Biology, 34(2): 189-198.
- Dashty, M., (2014). A Quick Look at Biochemistry: Lipid Metabolism. Journal of Diabetes Metabolism. 2: 1-17.

- De Araujo, I. E., Ferreira, J. G., Tellez, L. A., Ren, X., & Yeckel, C. W. (2012). The gut–brain dopamine axis: a regulatory system for caloric intake. *Physiology & behavior*. 106(3), 394-399.
- del Valle, J.C., López Mañanes, A.A., Busch, C. (2004). Phenotypic flexibility of digestive morphology and physiology of the South American omnivorous rodent *Akodon azarae* (Rodentia:Sigmodontinae). *Comparative Biochemistry and Physiol A*. 139:503-512
- del Valle, J.C., Busch, C., López Mañanes, A.A. (2006). Phenotypic plasticity in response to low quality diet in the South American omnivorous rodent *Akodon azarae* (Rodentia:Sigmodontinae). *Comp Biochem Physiol A* 145: 397-405
- del Valle, J.C., López Mañanes, A.A. (2008). Digestive strategies in the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 150:387-394.
- del Valle, J.C., López Mañanes, A.A. (2011). Digestive flexibility in females of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* in their natural habitat. *Journal of Experimental Zoology A*. 315:41–148
- del Valle, J.C., Panzeri, A., López Mañanes, A.A. (2012a). Glucose homeostasis in the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* from Mar Chiquita coastal lagoon: regulation by dopamine XIII Congress – XXXI Annual Meeting Rosario Society Biology, 1-2 dic, *Biocell*. 35:66.

- Del Valle, C., Panzeri, A., López Mañanes, A.A. (2012b). XIV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología/Primer Encuentro Rioplatense de Biología, Buenos Aires, Argentina.
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C. R., Lim, K. C., Dvořák, J., Hsieh, I., y McKerrow, J. H. (2006). A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *Journal of Biological Chemistry*. 281(51): 39316-39329.
- Dendinger, J.E. (1987). Digestive proteases in the midgut gland of the atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 88:503–506
- Dendinger, J.E., O'Connor, K.L. (1990) Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*.. *Comparative Biochemistry and Physiology B*.95(3), 525-530.
- Diaz-Mendoza, M., Ortego, F., García de Lacoba, M., Magana, C., De la Poza, M., Farinós, G. P., Hernández-Crespo, P. (2005). Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(9),:1005-1020.
- Dima, J.M., De Vido, N.A., Leal, G.A., Barón, P.J. (2009).Fluctuations in the biochemical composition of the Patagonian stone crab *Platyxanthus patagonicus*. A. Milne Edwards, 1879 (Platyxanthidae: Brachyura) throughout its reproductive cycle. *Scientia Marina*. 73: 423–430.
- Dittrich, B. (1992). Thermal acclimation and kinetics of a trypsin-like protease in eucarid crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*. 162: 38-46

- Dockray, G. J. (2014). Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. *The Journal of physiology* .1-15
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C. (1967). Sur le methode de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie Milieu*. 18: 595–607
- Drewnowski, A. (1992). Sensory properties of fats and fat replacements. *Nutrition Reviews*. 50:17-20.
- Dufresne, M., Seva, C., y Fourmy, D. (2006). Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiological Reviews*. 86(3): 805-847.
- Duka, A y Ahearn, G.A. (2013) .l-leucine, l-methionine, and l-phenylalanine share a Na⁺/K⁺-dependent amino acid transporter in shrimp hepatopáncreas. *Journal of Comparative Physiology B*. 183:763-771
- Elhalem, L.M., López Mañanes, A.A.(2003). *Biocell* 27 (2): 242 (Abstract).
- Ezquerra, J., García-Carreño, F. L., Haard, N. (1997). Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of food biochemistry*. 21(2): 401-419.
- Fairweather, S.J, Bröer, A., O'Mara, L.M., Broer, S. (2012). Intestinal peptidases form functional complexes with the neutral amino acid transporter B0AT1. *Biochemical Journal*. 446: 135–148
- Figueiredo, M.S.R.B., Kricker, J.A., Anderson, A.J. (2001). Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae: Decapoda). *Journal of Crustacean Biology*. 21:334-344.

- Figueiredo, M.S.R.B, Anderson, A.J. (2009). Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (Paleomonidae, Portunidae and Penaeidae) feeding in the natural habitat. *Aquaculture Research*. 40:282-291
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Sarojini, R., Reddy, P. S. (1994). Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *Journal of Crustacean Biology*, 413-437.
- Freire, C.A., Onken, H., McNamara J.C. (2008). A structure function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 151: 272–304.
- Gallagher, E. J., Leroith, D. (2010). Insulin, insulin resistance, obesity, and cancer. *Current diabetes reports*. 10: 93-100.
- Gallardo, N., Carrillo, O., Moltó, E., Deás, M., González-Suárez, R., Carrascosa, J. M., Andrés, A.(2003). Isolation and biological characterization of a 6-kda protein from hepatopancreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *General and comparative endocrinology*. 131: 284-290.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, C. (2003). Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*. 34:1403–1411.
- García, F., González-Baró, M., Pollero, R. (2002). Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*. 37:581–585.

- Garcia-Carreño, F. L., Hernandez-Cortes, M. P., Haard, N. F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(7):1456-1461.
- Gates, B. J., Travis, J. (1969). Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*. 8(11): 4483-4489.
- Geerling, J.J., Boon, M.R., Kooijman, S., Edwin, T., Parlevliet. L.M., Havekes, J.A., Romijn, I., Meurs, M., Rensen, P.C.N.(2014). Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. *Journal of Lipid Research*. 55:180-189
- Genovese G, Senek M, Ortiz N, Regueira M, Towle DW, Tresguerres M, Luquet CM.(2006). Dopaminergic regulation of ion transport in gills of the euryhaline semiterrestrial crab *Chasmagnathus granulatus*: interaction between D1- and D2- like receptors. *Journal of Experimental biology*. 209:2785-2793
- Genovese, G., Senek, M., Ortiz, N., Regueira, M., Towle. D.W., Tresguerres, M., Luquet, C.M.(2006). Dopaminergic regulation of ion transport in gills of the euryhaline semiterrestrial crab *Chasmagnathus granulatus*: interaction between D1- and D2-like receptors. *Journal of Experimental biology*. 209: 2785-2793.
- Gibson, R., Barker, P.L. (1979). The decapod hepatopáncreas. *Oceanographic Marine Biology annual review*. 17: 285-346
- Gimenez, A. F., Garcia-Carreno, F. L., Del Toro, M. N., Fenucci, J. L. (2001). Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial

characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 130(3): 331-338.

- Giménez, L. (2003). Potential effect of physiological plastic responses to salinity on population networks of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Helgol. Marine Research*. 56, 265-273.
- Girusse, A., y Langin, D. (2012). Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *International Journal of Obesity*, 36(4), 581-594.
- Goebel-Stengel, M., Stengel, A., Taché, Y., Reeve, J. R. (2011). The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Analytical biochemistry*, 414(1): 38-46.
- González, M., Pinoni, S.A., López Mañanes, A.A. (2012) . Atpases activities in gills of crab *Neohelice granulata* from contrasting habitats of mar chiquita coastal lagoon: differential response to hyporegulation. Abstracts XXIII Annual Meeting Rosario Biology Society. Biocell
- González - Baró, M. R., Heras, H., Pollero, R. J. (2000). Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*. *Journal of Experimental Zoology*. 286(3): 231-237.
- Goodman, B.E. (2010). Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education* Ed.34:44–53.
- Gravholt, C.H.L., Møller, N., Jensen, M.D., Christiansen, J.S., Schmitz, O. (2001). Physiological levels of glucagon do not influence lipolysis in abdominal adipose

tissue as assessed by microdialysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.86:2085-2089.

- Halperin, J., Genovese, G., Tresguerres, M., Luquet, C.M. (2004). Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* by dopamine and camp. *Comparative Biochemistry and Physiology A* .139:103-109.
- Hammer H. S., Bishop C D, Watts SA. 2003. The characterization of three digestive enzymes from the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Alabama Academy. Science*.74(1):47-59.
- Havird. J.C, Henry, R.P., Wilson, A.E. (2013). Altered expression of Na⁺/K⁺–atpase and other osmoregulatory genes in the gills of euryhaline animals in response to salinity transfer: A meta-analysis of 59 quantitative PCR studies over 10 year. *Comparative Biochemistry and Physiology D*. 8: 131–140
- Heinrich Dircksen. 2013. Crustacean bioactive peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides Academic Press Elsevier, New York.*, pp. 209-221.
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N., & Stanton, C. (2014). Role of the Gut in Modulating Lipoprotein Metabolism. *Current cardiology reports*, 16(8): 1-12.
- Hesse, D., Jaschke, A., Chung, B., y Schurmann, A. (2013). Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Bioscience reports* 33(1):1-9.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. New York: Oxford Univ. Press ISBN: 0-19-511702-6. Hdbk; 0-19-511703-4. Pbk.

- Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters*. 354:1–6
- Houlihan, D.F., Waring, C.P., Mathers, E., Gray, C. (1990). Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiological Zoology*. 63: 735–756,
- Hsieh SL, Chen SM, Yang YH, Kuo CM (2006). Involvement of norepinephrine in the hyperglycemic responses of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* under cold shock. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 143: 254-263
- Huang, H., Haihui, Y., Shaojing, L., Guizhong, W. (2005). Immunocytochemical localization of endocrine cells in the digestive system of the mud crab, *Scylla serrata*. *Journal of Xiamen University. Natural Science*. 44:94-97.
- Iglesias, S., Tracy, C.R., Bedford, G.S., McWhorter, T.J., Christian, K.A. (2009). Seasonal effects on intestinal enzyme activity in the Australian agamid lizard, *Lophognathus temporalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 153: 89–94.
- Iqbal, J., Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 296(6):E1183-E1194.
- Iribarne, O.O., Bortolus, A., Botto, F. (1997). Between-habitats differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. *Marine Ecology Progress Series*. 155, 132-145
- Iribarne, O.O., Martinetto, P., Schwindt, E., Botto, F., Bortolus, A., Garcia Borboroglu, P. 2003. Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296: 167-182.

- Isenman, L.D., Liebow, C., Rothman, S. (1999).The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 276: E223–E232,
- Jahn, M.P., 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
- Jiang, S. T., Moody, M. W., Chen, H. C. (1991). Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of food science*. 56(2): 322-326.
- Johnston, D.J. (2003). Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* (Decapoda; Palinuridae). *Marine Biology*. 143: 1071–1082.
- Jones, P.L., Obst, J.H. (2000). Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*. 20: 431–441.
- Karasov, W. H., y del Rio, C. M. (2007). *Physiological ecology: how animals process energy, nutrients, and toxins*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 275 pp.
- Karasov, W.H., Douglas, A. E. (2013). Comparative digestive physiology.*Comprehensive Physiology*. 271-283

- Karasov, W.H., Martínez del Rio, C., Caviedes-Vidal, E. (2011). Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annual review of physiology*. 73: 69–93
- Kaspar, K. M., Thomas, D. D., Weng, N., Groblewski, G. E. (2003). Dietary and hormonal stimulation of rat exocrine pancreatic function regulates CRHSP-28 phosphorylation in vivo. *The Journal of nutrition*, 133(10): 3072-3075.
- Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H. (2013). Crustacean Peptide Hormones: Structure, Gene Expression and Function. *Aqua-BioScience Monographs*, 6(2): 49-90.
- Kelly, S.A., Panhuis, T.M., Stoehr, A.M. (2012). Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance. *Comparative Physiology*. 2:1417-1439.
- Kirschner, L.B. (1991). En: Prosser, L. (Ed.), *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, Londres.13-107 pp.
- Kirschner, L.B. (2004). The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207:1439-1452
- Lancia, J. P., Bas, C., Spivak, E. (2013). Food manipulation and selection in the omnivorous grapsoid crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Varunidae). *Scientia Marina*. 78(4).
- Larsen, E. H., Deaton, L. E., Onken, H., O'Donnell, M., Grosell, M., Dantzler, W. H., Weihrauch, D. (2014). Osmoregulation And Excretion. *Comprehensive Physiology*. 4(2)
- Latyshev, N.A., Kasyanov, S.P., Kharlamenko, V.I., Svetashev, V.I. (2009). Lipids and of fatty acids of edible crabs of the north-western Pacific. *Food Chemistry*. 116, 657–661.

- Leignel, V., Stillman, J. H., Baringou, S., Thabet, R., Metais, I. (2014). Overview on the European green crab *Carcinus spp.*(Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models. Environmental Science and Pollution Research. 1-16.

- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., Qin, J.G.(2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopáncreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* at various salinities. Aquaculture.274: 80–86.

- Li, E., Wang, S., Li, C., Wang, X., Chen, K., & Chen, L. (2014). Transcriptome sequencing revealed the genes and pathways involved in salinity stress of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Physiological genomics, 46(5): 177-190.

- Lignot, J. H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G. (2000). Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture, 191(1): 209-245.

- Linton, S. M., Saborowski, R., Shirley, A. J., Penny, J. A. (2014). Digestive enzymes of two brachyuran and two anomuran land crabs from Christmas Island, Indian Ocean. Journal of Comparative Physiology B, 184(4):449-468.

- Liu, H., Pan, L., Fu, L. (2008). Effect of salinity on hemolymph osmotic pressure, sodium concentration and Na⁺-K⁺-atpase activity of gill of Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. J Ocean Univ China 7: 77-82

- López Mañanes, A.A. (2004). Effect of dopamine on glucose levels in hemolymph of *Cyrtograpsus angulatus*. Abstracts XXIII Annual Meeting Rosario Biology Society. Biocell. 28: 225
- López Mañanes, A.A., Magnoni, L.J., Goldemberg, A.L. (2000). Branchial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). Comparative Biochemistry and Physiology. B. 127, 85-95.
- López Mañanes, A.A., Meligeni, C.D., Goldemberg, A.L. (2002). Response to environmental salinity of Na⁺- K⁺ atpase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 274: 75-85.
- López-López, S., Nolasco, H., Vega-Villasante, F. (2003). Characterization of digestive gland esterase–lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Biochemistry and Physiology B. 135: 337–3
- López-Otín, Carlos., Bond, J. S. (2008): "Proteases: multifunctional enzymes in life and disease." Journal of Biological Chemistry. 283(45): 30433-30437.
- Lorenzon, S. (2005). Hyperglycemic stress response in Crustacea. ISJ 2:132-141
- Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettullo, R., Ferrero, E.A. (2005). Role of biogenic amines and CHH in the crustacean hyperglycemic stress response. Journal of Experimental Biology. 208:3341-3347
- Luciani, N., Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C. (1998). Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). Insights into its mechanism of action. Biochemistry. 37: 686–692

- Lucu, C., Towle, D.W. (2003). Na⁺,K⁺-atpase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 135: 195-214.
- Luppi, T., Bas, C., Casariego, A.M., Albano, M., Lancia, J., Kittleinm, M., Iribarne, O. (2013). The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgoland Marine Research*. 67: 1-15
- Luvizotto-Santos, R., y Bianchini, A. (2003). Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* (dana, 1851) (crustacean-grapsidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 295(2): 200-205.
- Lwalaba, D., Hoffmann, K.H., Woodring, J.(2010). Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochemistry and Physiology*. 73:14-29.
- Maeda-Martínez, A.M., Obrego'n-Varboza, V., Navarrete-Del Toro, M.A., Obrego'n-Barboza, H., García-Carreño, F.L.(2000). Trypsin-like enzymes from two morphotypes of the 'living fossil' *Tryops* (Crustacea: Braciopoda: Notostraca). *Comparative Biochemistri and Physiology. B* .126: 317– 323.
- Mane, S., Madhujit, D., Padmanabhakurup, H., Sahayog, J., Wasudeo, G. (2010). Purification and characterization of aminopeptidase N from chicken intestine with potential application in debittering. *Process in Biochemistry*.45:1011–1016
- Manfrin, C., Tom, M., De Moro, G., Gerdol, M., Guarnaccia, C., Mosco, A., Pallavicin, A., Giulianini, P.G. (2013). Application of D-Crustacean Hyperglycemic Hormone Induces Peptidases Transcription and Suppresses Glycolysis-Related

Transcripts in the Hepatopancreas of the Crayfish *Pontastacus leptodactylus* — Results of a Transcriptomic Study. PLOS ONE 8: e65176

- Marcovecchio, J., Freije, H., De Marco, S., Gavio, A., Ferrer, L., Andrade, S., y Asteasuain, R. (2006). Seasonality of hydrographic variables in a coastal lagoon: Mar Chiquita, Argentina. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16(4): 335-347.
- Markweg, H., Lang, M.S., Wagner, F. (1995). Decanoic acid inhibition of lipase from *Acetivobacter sp.* OPA 55. *Enz Microb Tech.* 17:512-516.
- Marmaras V. J. y Fragoulis E. G. (1971) .Studies On The Metabolism Of 14c-Dopa In The Hepatopancreas Of Decapod Crustacean *Upogebia Littorata* Ralis. *Comp. gen. Pharmac.*, 197.
- Martins, T.L., Chittó, A.L.F., Rossetti, C.R., Brondani, C.K., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M. (2011). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* .158:400-405.
- McCoole, M.D., Atkinson, N.J., Graham, D.I., Grasser, E.B., Joselow, A.L., mccall, N., Christie, A.E., (2012). Genomic analyses of aminergic signaling systems (dopamine, octopamine and serotonin) in *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology D*. 7: 35-58.
- McGaw, I. J., y Curtis, D. L. (2013). Effect of meal size and body size on specific dynamic action and gastric processing in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(3): 414-425.

- McGrath, C., S., Lendeckel, U., Ebert, M., y Röcken, C. (2006). Ectopeptidases in tumour biology: a review. *Histology and Histopathology*. 21: 1339-1353.
- McNamara, J.C., Faria, S.C. (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 182: 997-1014.
- McWilliams, S. R., Karasov, W. H. (2014). Spare capacity and phenotypic flexibility in the digestive system of a migratory bird: defining the limits of animal design. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 281(1783), 20140308.
- Méndez, E. (2010) Efecto de la salinidad ambiental sobre parámetros digestivos a nivel bioquímico-fisiológico en el cangrejo eurihalino *Neohelice granulata* en estados fisiológicos diferenciales Undergraduate thesis University of Mar del Plata 2010.
- Mente, E., Legeay, A., Houlihan, D. F., Massabuau, J. C. (2003). Influence of oxygen partial pressures on protein synthesis in feeding crabs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(2): R500-R510.
- Mente, E., Carter, C. G., Barnes, R. S., Karapanagiotidis, I. T. (2011). Protein synthesis in wild-caught Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409(1): 208-214.
- Mentlein, R (2004). Cell-surface peptidases. *Int Rev Cytol* 235:165–213
- Michiels, M.S. (2010). Actividad de lipasa en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*: modulación en relación a estados fisiológicos diferenciales. Tesis de grado. UNMDP, FCEyN.

- Michiels, M.S., del Valle, J.C., López Mañanes, A.A. (2013). Effect of environmental salinity and dopamine injections on key digestive enzymes in hepatopancreas of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda: Brachyura: Varunidae). *Scientia Marina*. 77:129-136
- Mina-Osorio, P. (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in molecular medicine*, 14(8): 361-371.
- Mitchell, R. T., Henry, R. P. (2014). Carbonic anhydrase induction in euryhaline crustaceans is rate-limited at the post-transcriptional level. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 169: 15-23.
- Mitchell, R.T. (2014). Phd Thesis Faculty of Auburn University. Transcriptional Adaptations to Low Salinity in Euryhaline Crustaceans
- Moriyasu, M., Mallet, P. (1986). Molt stages of the snow crab *Chionoecetes opilio* by observation of morphogenesis of setae on the maxilla. *Journal of Crustacean Biology*. 709-718.
- Mótóyán J, Tóth F, Tózsér J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. 3. 923–942.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L.(2003). Digestion Physiology and Proteolytic Enzymes of Crustacean Species of the Mexican Pacific Ocean. In: Henrickx, M. E., (Ed), *Contributions to the Study of the East Pacific Crustaceans, Volume 2*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México.pp 77-91.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez Paz, A., García Carreño, F.L. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *Journal of Comparative Physiology*. B.178: 655–672.

- Muldford, A.L., Villena, A.J.(2000). Cell cultures from crustaceans: shrimps, crabs and crayfish. In: Mothersill, C., Austin, B. (Eds.), Aquatic Invertebrate Cell Culture. Praxis
- Murashita, K., Fukada, H., Rønnestad, I., Kurokawa, T., Masumoto, T. (2008). Nutrient control of release of pancreatic enzymes in yellowtail *Seriola quinqueradiata*: Involvement of CCK and PY in the regulatory loop. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 150(4): 438-443.
- Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutierrez, V., Gallardo-Guerrero, M.L., Minguez-Mosquera, M.L. (1993). A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*. 114:223–229.
- Murphy, J. A., Criddle, D. N., Sherwood, M., Chvanov, M., Mukherjee, R., McLaughlin, E., ... & Sutton, R. (2008). Direct Activation of Cytosolic Ca Signaling and Enzyme Secretion by Cholecystokinin in Human Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*. 135(2): 632-64
- Murthy, R. C., y Saxena, P. (1979). Trypsin activity in the hepatopancreas of *Macrobrachium lamarrei* (Crustacea: Decapoda). *Experientia*, 35(6): 789-790.
- Nagur-Babu, K., Pallavi, P.N., Reedy, D.C., Kalarani, V.(2012). Effect of 5-hydroxytryptamine and dopamine on the carbohydrate metabolism in the shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *World Journal of Fish Marine Science*. 4:586–593.
- Naya, D., Bozinovic, F., Karasov, W. (2007). Gut size flexibility in laboratory mice and rats: A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology. A* 148: 133-134.

- Naya, D.E, Veloso, C., Bozinovic, F., 2008. Physiological flexibility in the Andes ranges: seasonal changes in organs size and metabolic rate in the lizard *Liolaemus bellii*. *Journal of Comparative Physiology* .178B,1007–1015.
- Naya, D. E., Veloso, C., Sabat, P., Bozinovic, F. (2009). Seasonal flexibility of organ mass and intestinal function for the Andean lizard *Liolaemus nigroviridis*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311(4): 270-277..
- Novak, I., Haanes, K. A., y Wang, J. (2013). Acid-base transport in pancreas—new challenges. *Frontiers in physiology*, 4.
- Ogoyi, D.O., Osir, E.O., Olembo, N.K.(1998). Fat body triacylglycerol lipase in solitary and gregarious phases of *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *Comparative Biochemistry and Physiology B119*: 163–69.
- Ong, B., Johnston, D.(2006). Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon* *Journal of Shellfish Research*.25:113-121.
- Page, M. J., Di Cera, E. (2008). "Serine peptidases: classification, structure and function." *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65.7-8: 1220-1236.
- Pakrashi, S.C., Dutta, P.K., Achari, B., Misra, S., Choudhury, A., Cahttopadhyay, S. And Ghosh, A. (1989). Lipids and Fatty Acids of the Horseshoe Crabs *Tachypleus gigas* and *Carcinoscorpius rotundicauda*. *Lipids* 24: 443– 447.
- Pan L, Liu H, Zhao Q . (2013) Effect of salinity on the biosynthesis of amines in *Litopenaeus vannamei* and the expression of gill related ion transporter genes. *Journal of Oceanography University of China*. 13:453-459

- Pan, L., Liu, H., Zhao, Q., 2013. Effect of salinity on the biosynthesis of amines in *Litopenaeus vannamei* and the expression of gill related ion transporter genes. J Ocean Univ China. 1-7.
- Pan, Y., Cheng, K., Mao, J., Liu, F., Liu, J., Ye, M., Zou, H. (2014). Quantitative proteomics reveals the kinetics of trypsin-catalyzed protein digestion. Analytical and bioanalytical chemistry. 406(25), 6247-6256.
- Papisova, A. I., Semenova, S. A., Kislitsyn, Y. A., Rudenskaya, G. N. (2008). Peculiarities of substrate hydrolysis by endopeptidases from hepatopancreas of king crab. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 34(4). 428-434.
- Pasquevich, M.Y., Dreona, M.S., Lavaría, S., Heras, H.(2011). Triacylglycerol catabolism in the prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemoniade). Comparative Biochemistry and Physiology B. 160:1–207.
- Pavasovic A, Anderson AJ, Mather PB, Richardson NA (2007) Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture Research. 38:644-652
- Perera, E., Moyano, F. J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Alonso, E., Galich, G. S. (2008). Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 150(3): 247-254.
- Perera, E., Rodríguez-Viera, L., Rodríguez-Casariego, J., Fraga, I., Carrillo, O, Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M . (2012) Dietary protein quality differentially regulates trypsin enzymes at the secretion and transcription level in *Panulirus argus* by distinct signaling pathways. Journal of Experimental Biology. 215: 853-862

- Perera, E., Rodríguez-Viera, L., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M. (2014). Trypsin isozymes in the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): from molecules to physiology. *Journal of Comparative Physiology B*. 1-19.
- Perera, E., Rodríguez-Viera, L., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M. (2014). Trypsin isozymes in the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): from molecules to physiology. *Journal of Comparative Physiology B*, 1-19.
- Pfenning, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D., Moczek, A.P (2010). Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*. 25: 459–467
- Piersma, T., Drent, J.(2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology and Evolution*.18: 228-233.
- Pinoni, S.A. (2009) Mecanismos de mantenimiento del medio interno en respuesta a estrés ambiental en crustáceos decápodos de interés regional. Phd Thesis, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata.
- Pinoni, S.A., López Mañanes, A.A .(2004). Alkaline phosphatase activity sensitive to environmental salinity and dopamine in muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.307, 35-46.
- Pinoni, S.A, Goldemberg, A.L, López Mañanes, A.A. (2005). Alkaline phosphatase activities in muscle of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*: response to environmental salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 326, 217-226.

- Pinoni, S.A., López Mañanes, A.A. 2008. Partial characterization and response upon hyperregulating conditions of Na⁺-K⁺ atpase atpase and levamisole-sensitive alkaline phosphatase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Scientia Marina*.72: 15-24.
- Pinoni, S.A., López Mañanes,A.A. 2009. Na⁺ atpase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: Differential response to environmental salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 372: 91-97.
- Pinoni, S. A., Iribarne, O., & Mañanes, A. A. L. (2011). Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(4), 552-559.
- Pinoni, S. A., Michiels, M. S., López Mañanes, A. A. L. (2013). Phenotypic flexibility in response to environmental salinity in the euryhaline crab *Neohelice granulata* from the mudflat and the saltmarsh of a SW coastal lagoon. *Marine biology*, 160(10), 2647-2661.
- Ramirez-Otarola N. C., Narváez, Sabat P (2011). Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds:dietary and phylogenetic correlates. *Journal of Comparative Physiology B* 181:817-827.
- Ramsay, P. T., Carr, A. (2011). Gastric acid and digestive physiology. *Surgical Clinics of North America*, 91(5): 977-982.
- Rawlings, N. D. (2013). Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In *Proteases: Structure and Function* Springer Vienna (pp. 1-36).

- Resch-Sedlmeier, G., Sedlmeier, D. (1999) .Release of digestive enzymes from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comp Biochem Physiol B* 1: 187-192
- Ribeiro, K., Papa, L. P., Vicentini, C. A., Franceschini - Vicentini, I. B. (2014). The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopancreas of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture Research*. DOI: 10.1111/are.12582
- Rivera-Pérez, C., del Toro, M., García-Carreño, F. (2011). Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(1):99-105.
- Romano, N., Zeng, C. (2012) Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*. 334,12-23.
- Romano, N., Wu, X., Zeng, C., Genodepa, J., & Elliman, J. (2014). Growth, osmoregulatory responses and changes to the lipid and fatty acid composition of organs from the mud crab, *Scylla serrata*, over a broad salinity range. *Marine Biology Research*, 10(5):460-471.
- Roncari, G., Zuber, H. (1969). Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*. Isolation, specificity, and general properties of the thermostable aminopeptidase. *Internal Journal of protein research I*: 45–61
- Rossano, R., Larocca, M., Riccio, P. (2011) .Digestive Enzymes of the Crustaceans *Munida* and Their Application in Cheese Manufacturing: A Review. *Marine Drugs metabolism*. 9,1220-1231

- Rotllant, G., Mente, E., Gisbert, E., & Karapanagiotidis, I. T. (2014). Effects of Different Diets on the Digestive Physiology of Adult Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. *Journal of Shellfish Research*, 33(1), 1-9.
- Sabat P, Novoa, F, Bozinovic F, Martinez del Rio C. (1998). Dietary Flexibility and Intestinal Plasticity in Birds: A Field and Laboratory Study. *Physiology Biochemistry and Zoology*. 71,226–236
- Sabat, P., J.A. Lagos, y F. Bozinovic. 1999. Test of the adaptive modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 23: 83-7.
- Sabat, P. (2000). Intestinal disaccharidases and amino-peptidase-N in two species of *Cinclodes* (Passerine: Furnariidae). *Revista Chilena de Historia Natural*. 73: 345-350.
- Saborowski, R., Æ S. Thatje, Æ J. A. Calcagno, G. A. Lovrich., Æ .K. Anger(2006). Digestive enzymes in the ontogenetic stages of the southern king crab, *Lithodes santolla* *Marine Biology*. 149, 865–873.
- Sagar.V., Shahu.N.P., Pal. A.K., Jain.K.K.,Venugopal, G. (2009). Growth and digestive enzymes of *Macrobrachium rosenbergii* juveniles: effect of different stocktypes and dietary protein levels under a similar culture environment *Aquaculture Research*. 1-11.
- Sainz, J.C., García-Carreño, F., Hernández-Cortés, P.(2004). *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 138: 155–162.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and

plasma energy reserves of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(2): 184-193.

- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazan, A., Peregrino-Uriarte, A., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G. (2006). Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect biochemistry molecular biology* 36:241-9.

- Sander, L. E., Lorentz, A., Sellge, G., Coeffier, M., Neipp, M., Veres, T., ... & Bischoff, S. C. (2006). Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut*, 55(4), 498-504.

- Sanderink, G.J., Artur, Y., Siest, G. (1988). Human Aminopeptidase. A review of the literature. *Clinical Chemical and Laboratory Medicine*. 26, 795-807.

- Schleich, C.E., López Mañanes, A.A., Goldemberg, A.L. (1999). Regulación por mensajeros químicos de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+$ atpasa branquial de *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decápoda) de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. De Buenos Aires) en condiciones de salinidad reducida. In: Trisierra, A.E., Aguilar, Z.G. (eds), COLACMAR, vol. 1. Culquichicón Malpica, Perú, pp. 529-530

- Schleich, C. E., Goldemberg, L. A., Lopez Mananes, A. A. (2001). Salinity dependent $\text{Na}^+\text{-K}^+$ atpase activity in gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Physiol. Biophys*, 20, 255-266.

- Scornik, O.A., Botbol, V. (2001) .Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr drug metabolism* 2:67–85.

- Sharshar, K.M., Haroon, M.A. (2009). Comparative investigations on some Biological and Biochemical Aspects in Freshwater crayfish (*Procambrus clarkii*) fed on

Eichhornia crassipes, *Eichhornia stagnina*, L. And *Poligonun tomentosum* L. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 5 (4): 579-589

- Shinji, J., Okutsu, T., Jayasankar, V., Jasmani, S., Wilder, M. N. (2012). Metabolism of amino acids during hyposmotic adaptation in the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Amino acids*, 43(5), 1945-1954.
- Simmons, T., Mozo, J., Wilson, J., Ahearn, G.A. (2012) .Cation-dependent nutrient transport in shrimp digestive tract. *Journal of Comparative Physiology B* .182, 209–216
- Sjöblom, M. (2011). Duodenal epithelial sensing of luminal acid: role of carbonic anhydrases. *Acta Physiologica*, 201(1), 85-95.
- Slavin. B., Ong, J., Kern, P.A.(1994). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mrna levels in isolated rat adipocytes. *Journal of Lipid Research*. 35: 1535-1541.
- Smichi, N., Fendri, A., Zarai, Z., Bouchaala, E., Chérif, S., Gargouri, Y., Miled, N., (2012). Lipolytic activity levels and colipase presence in digestive glands of some marine animals. *Fish Physiol. Biochem. Fish Physiology and Biochemistry*.38:1449-1458.
- Somero, G. N., & Suarez, R. K. (2005). Peter Hochachka: adventures in biochemical adaptation. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 25-37.
- Spivak, E., Anger, K., Luppi, T., Bas, C., Ismael, D. (1994) Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita lagoon (Pcia. Bs As. Argentina). *Helgol Meeres* 48:59-78.

- Spivak, E.(1997). Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Invest Mar Val* 25:105-120
- Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W., Hara, K., Yoshida, A., Liang, X. (2012). Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Characteristics and biochemical properties. *Food Chemistry*, 134(1): 351-358.
- Stöcker, W., & Gomis-Rüth, F. X. (2013). Astacins: Proteases in Development and Tissue Differentiation. In *Proteases: Structure and Function* (pp. 235-263). Springer Vienna.
- Storey, K. B. (2004) Biochemical Adaptation, in *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* (ed K. B. Storey), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Sukthaworn, S., Panyim, S., Udomkit, A. (2013). Molecular and functional characterization of a dopamine receptor type1 from *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 380, 99-105.
- Tan, G. (2014).The Pancreas. *Anaesthesia and intensive care medicine*. 485-488
- Thompson, G. E. (1984). Dopamine and Lipolysis In Adipose Tissue Of The Sheep Quart. *Journal of experimental Physiology*. 69:155-159.
- Trowers, E., Tischler, M. E. (2014). *Gastrointestinal Physiology: A Clinical Approach*. Springer. The University of Arizona Tucson, AZ, USA. DOI 10.1007/978-3-319-07164-0
- Umetsu, H., Mito, A., Toshinori, O., Ryohei, K., Hitomi, S., Hiroyuki, I., Kazuo, S. (2003) . Purification and properties of an aminopeptidase from the mid-gut gland of

scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 136: 935–942

- Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M., Takeuchi, T. (1976). Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *Journal of Antibiotic*. 29: 97–99

- Vandermarliere, E., Michael, M., Lennart, M.(2013): "Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics." *Mass spectrometry reviews* 32:6 453-465.

- Vaughan, M., Berge,r J.E., Steinberg, D.(1964). Hormone-sensitive lipase and monoglycerol lipase activities in adipose tissue *Journal of Biology and Chemistry* 239: 401–409.

- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, PK, Ingrosso, L., Zonno, V., Viella, S., Ahearn, G.A., Storelli, C.(2001). D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 130:585–606.

- Villaseñor-Cardoso, M. I., Frausto-Del-Río, D. A., Ortega, E. (2013). Aminopeptidase N (CD13) Is Involved in Phagocytic Processes in Human Dendritic Cells and Macrophages. *Biomedical research international*. 1-12.

- Wang, L., Li, F., Wang, B., y Xiang, J. (2012). Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 33(6), 1285-1291.

- Wang, R., Zhuang, P., Feng, G., Zhang, L., Huang, X., Zhao, F., Wang, Y. (2013). The response of digestive enzyme activity in the mature Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Brachyura), to gradual increase of salinity. *Scientia Marina*, 77(2):323-329.

- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H., Cheng, Y.(2014).Insights into Hepatopancreatic Functions for Nutrition Metabolism and Ovarian Development in the Crab *Portunus trituberculatus*: Gene Discovery in the Comparative Transcriptome of Different Hepatopancreas Stages. Plos one. 9:1-15.
- Warzecha, Z., Dembinski, A., Ceranowicz, P., Dembinski, M., Cieszkowski, J., Konturek, S. J., Konturek, P. C. (2006). Influence Of Ghrelin On Gastric And Duodenal. Journal of physiology and pharmacology, 57(3):425-437.
- Watt, M.J., Spriet, L.L.(2010). Triacylglycerol lipases and metabolic control: implications for health and disease. Am J Physiol-Endoc M . 299: 162-168.
- Williams, J. A., Chen, X., Sabbatini, M. E. (2009). Small G proteins as key regulators of pancreatic digestive enzyme secretion. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 296(3): E405-E414.
- Williams, J.A. (2010). Regulation of acinar cell function in the pancreas. Current Opinion in Gastroenterology 26: 478–483
- Wong, A.H.M., Zhou, D., Rini, J.M. (2012) .The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. Journal of Biological Chemistry. 287, 36804–36813.
- Wright, S.H., Ahearn, G.A. (1997) .Nutrient absorption in invertebrates. In Handbook of Physiology, Section 13: Comparative Physiology. Ed. W. H. Dantzler, New York: Oxford University Press, pp. 1137-1206
- Yang, Y. J., and D. M. Davies. (1971). "Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin."Journal of insect physiology. 17.1 117-131.

- Yeh, S., Chiu, H.T., Cheng, W. (2006) .Norepinephrine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 254, 693-700
- Zeng, H., Ye, H., Li, S., Wang, G., Huang, J.(2010). Hepatopancreas cell cultures from mud crab, *Scylla paramamosain*. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*. 46,431–437.
- Zwillig, R., Neurath, H. (1981). Invertebrate proteases. *Methods Enzymol*. 80, 633-664.