

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-CONICET

**Estrategias a nivel bioquímico-fisiológico en
cangrejos eurihalinos: mecanismos de ajustes
digestivos en respuesta a variaciones
en las condiciones ambientales**

Autora: Antonela Asaro

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 2016



I I M Y C

“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la
ciencia duda”

Voltaire

Doctorando

Directora

Co-directora

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.

Resúmenes publicados en revistas con referato indexadas (En inglés)

- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2012. Responses to salinity in *Cyrtograpsus angulatus*: osmoregulation and energy stores. *Biocell*. 36(1) ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).
- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2013. Effect of an abrupt change of salinity on carbohydrase activities in the hepatopancreas of crab *Neohelice granulata*. *Biocell*. 37(1) ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).
- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2014. Carbohydrase activities in the hepatopancreas of crab *Neohelice granulata*: differential long-term post-ingest responses under different salinities. *Biocell*. 37(2) ISSN:0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).
- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2015. Differential digestive enzymes activities responses upon emersion in crab *Neohelice granulata*. *Biocell*. 37(2) ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).

Resumen publicado en acta de resumen:

✚ Asaro A., Paggi R.A., de Castro R.E., López Mañanes A.A. Estudios sobre α -amilasa en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*. X encuentro de Biólogos en Red. 16-17 de noviembre del 2015, ciudad de Mar del Plata, prov. de Buenos aires, Argentina.

Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue realizar un estudio de mecanismos de ajuste a diferentes niveles (molecular, bioquímico y fisiológico) en cangrejos eurihalinos en relación a su hábitat y estilo de vida. Dentro del objetivo general se realizaron estudios de caracterización y modulación de enzimas digestivas en hepatopáncreas y del contenido de reservas de energía 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) y de *Uca tangeri* de la Bahía de Cádiz (España) con el fin de establecer el posible rol como componentes en mecanismos de ajustes digestivos y/o metabólicos en relación a variables ambientales clave. Para cumplir con el objetivo se llevaron a cabo estudios: de identificación de formas de α -amilasa presentes en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1); de purificación y caracterización parcial de la forma con mayor actividad amilolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1); de secuenciación y caracterización de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1); de secuenciación y caracterización de isoformas de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 2); del efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión, número de formas y actividad total de α -amilasa y tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 3); sobre modulación de la actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas, y el contenido de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en baja y alta salinidad en diferentes estados osmorregulatorios en *N. granulata* (Capítulo 4); del efecto de un cambio abrupto desde alta a baja salinidad sobre la actividad de carbohidrasas y el contenido de glucógeno y glucosa libre en individuos de *N. granulata* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Capítulo 5); sobre la existencia de ajustes post-prandiales en la actividad de enzimas

digestivas en hepatopáncreas, en la concentración de glucosa en hemolinfa y en el contenido de reservas de energía en individuos de *N. granulata* expuestos a emersión inmediatamente luego de ser alimentados en condiciones de hiper e hiporregulación (Capítulo 6); del efecto de baja y alta salinidad sobre el número de formas de α -amilasa y actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas y contenido de reserva de glucógeno en *C. angulatus* (Capítulo 7); de caracterización parcial y modulación por baja y alta salinidad de la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* (Capítulo 8). *N. granulata* exhibió al menos cinco formas de α -amilasa en el hepatopáncreas. Se purificó parcialmente la forma de α -amilasa con mayor actividad (29 kDa), la cual exhibió halotolerancia, sensibilidad a diversos iones y capacidad para degradar almidón y glucógeno. La clonación parcial de una secuencia de α -amilasa en hepatopáncreas *N. granulata* y su posterior caracterización mostraron la presencia de: tres sitios potenciales de glicosilación, sitio de unión al Ca^{2+} , sitios de reconocimiento de sustrato y aminoácidos que participan en el sitio catalítico. La clonación parcial y posterior caracterización molecular de dos isoformas de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*, mostraron que ambas presentan: los aminoácidos involucrados en la triada catalítica, el residuo de D que determina especificidad de sustrato y la región del sitio catalítico. *N. granulata* exhibió una modulación diferencial por baja y alta salinidad en la expresión y en la actividad de α -amilasa y tripsina y número de formas de α -amilasa. *N. granulata* exhibió ajustes diferenciales en la actividad de diferentes enzimas digestivas y reservas de energía luego de la ingesta de alimento en individuos mantenidos en baja y alta salinidad, luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad y luego de la emersión en condiciones de hiper e hiporregulación. *C. angulatus* exhibió dos formas de α -amilasa en hepatopáncreas. La exposición a largo plazo a la baja y alta salinidad de *C. angulatus* no afectó el número de formas de α -

amilasa y la actividad de carbohidrasas, mientras que se observó una modulación de las reservas de glucógeno y glucosa libre en músculo de la quela y/o branquias anteriores. En hepatopáncreas de *U. tangeri* se detectó la existencia de la actividad de carbohidrasas y tripsina y su modulación diferencial por baja y alta salinidad. Los resultados de esta tesis representan un enfoque original que permite ampliar los conocimientos sobre estrategias digestivas y metabólicas a diferentes niveles en animales en general y de organismos eurihalinos en particular y establecer aspectos comparativos en relación al hábitat y estilo de vida, cubriendo un área de vacancia de la fisiología bioquímica, ecológica y adaptativa.

Palabras clave: Enzimas digestivas, flexibilidad fenotípica, reservas de energía, cangrejos eurihalinos, salinidad, emersión, hepatopáncreas, clonación, purificación.

Abstract

The general aim was to study mechanisms of adjustment at different levels (i.e. molecular, biochemical and physiological) in euryhaline crabs in relation to their habitat and lifestyle. Within the general aim we made studies of characterization and modulation of digestive enzymes in hepatopancreas and content of energy reserves in the euryhaline crabs *Neohelice granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires Province) and *Uca Tangeri* from Bay from Cádiz (Spain) in order to establish the possible role as components in mechanisms of digestive and/or metabolic adjustments in relation to key environmental variables. To achieve this aim, we carried out studies on: identification of amylase forms present in the hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 1); purification and partial characterization of form with the highest amylolytic activity in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 1); sequencing and characterization of α -amylase in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 1); sequencing and characterization of trypsin isoforms in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 2); the effect of low and high salinity on expression, number of forms and total activity of α -amylase and trypsin in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 3); modulation of activity of carbohydrases in hepatopancreas, and glycogen and glucose free content in storage organs at different times after food intake in low and high salinity in different osmoregulatory conditions in *N. granulata* (Chapter 4); the effect of an abrupt change from high to low salinity on carbohydrase activities and glycogen and free glucose content in individuals of *N. granulata* at different times after food intake (Chapter 5); the existence of postprandial adjustments in digestive enzyme activities in hepatopancreas, hemolymph glucose concentration and energy reserves content in individuals of *N. granulata* exposed to emersion immediately after feeding upon conditions of hyper and hyporegulation (Chapter 6); the effect of low and high

salinity on the number of α -amylase forms, carbohydrase activities and content of glycogen in *C. angulatus* (Chapter 7); partial characterization and modulation by low and high salinity of α -amylase, maltase, sucrase and trypsin activities, in hepatopancreas of *U. tangeri* (Chapter 8). *N. granulata* exhibited at least five forms of α -amylase in hepatopancreas. The α -amylase form with the highest activity (29 kDa) was partially purified, which exhibited halotolerance, sensitivity to several ions and ability to degrade starch and glycogen. Partial cloning of an α -amylase sequence in hepatopancreas of *N. granulata* and its subsequent characterization showed the presence of three potential glycosylation sites, Ca^{2+} binding site, substrate recognition sites and amino acids that participate in the catalytic site. The partial cloning and subsequent molecular characterization of two trypsin isoforms in hepatopancreas of *N. granulata* showed that they presented: amino acids involved in the catalytic triad, D residue that determine substrate specificity and the catalytic site region. *N. granulata* exhibited a differential modulation by low and high salinity in the expression and activity of α -amylase and trypsin and number of α -amylase forms. *N. granulata* exhibited differential adjustments in the activity of different digestive enzymes and energy reserves after food intake in relation to low and high salinity acclimation, after an abrupt change from high to low salinity and **after the** emersion in hyper and hyporegulation conditions. *C. angulatus* exhibited two forms of α -amylase in hepatopancreas. The long-term exposure to low and high salinity of *C. angulatus* did not affect the number of forms of α -amylase and the activity of carbohydrases, whereas a modulation of the reserves of glycogen and free glucose was observed in muscle and /or anterior gills. In hepatopancreas of *U. tangeri* was detected the existence of carbohydrases and trypsin activities and its differential modulation by low and high salinity. The results of this work represent an original approach that allows to increase the knowledge of about digestive and metabolic

strategies at different levels in animals in general and euryhaline organisms in particular and to establish comparative aspects in relation to habitat and lifestyle, covering an area of vacancy in biochemical, ecological and adaptive physiology.

Key words: digestive enzymes, phenotypic flexibility, energy reserves, euryhaline crabs, salinity, emersion, hepatopancreas, cloning, purification.

Agradecimientos

A la Dra. Alejandra López Mañanes (directora de esta tesis) por toda su ayuda y dedicación. A la Dra. Cristina del Valle (co-directora de esta tesis), por su disponibilidad y paciencia.

Para mis amigas y compañeras del grupo de investigación (Silvina Pinoni, Eugenia Méndez y Soledad Michiels), tengo sólo palabras de agradecimiento, especialmente por aquellos buenos momentos, por su amistad sincera y apoyo incondicional. Me van (y las voy) a extrañar !!!!

Agradezco de manera muy especial a Ana Panzerri y a Patricia Strazza por su apoyo, amabilidad, disponibilidad y charlas durante esta tesis.

Agradesco la colaboración del Dr. Roberto Paggi, Dra. Roxana de Castro, Dr. Juan M. Mancera, Dr. Juan A. Martos-Sitcha y Dr. Gonzalo Martínez-Rodríguez por su colaboración. Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi padres (Marisa y Juan Carlos), a mis hermanos (Lucia y Francisco) y a toda mi familia que sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llegar hasta acá.

A Pablo, mi marido, por ser el principal responsable de que este trabajo llegara a buen puerto, estando incondicionalmente siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Le doy las gracias por haberme hecho creer cada día que podía hacerlo, por toda su ayuda y, principalmente, por hacerme feliz.

A todos mi eterno agradecimiento!!!

Indice

Introducción general	1
Capítulo 1: α-amilasa en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i>: purificación parcial, caracterización bioquímica y clonación.....	10
Introducción.....	11
Materiales y métodos	13
Captura y mantenimiento de los animales.....	13
Osmolalidad de la hemolinfa.....	14
Preparación del hepatopáncreas.....	14
Purificación parcial de α -amilasa	15
Análisis por zimograma para la actividad de α -amilasa	15
Determinación de la actividad de α -amilasa	16
Determinación de la concentración de proteínas	17
Clonación de la secuencia parcial de ADNc de α -amilasa.....	17
Obtención del 3' final por Amplificación Rápida de ADNc (3'RACE).....	19
Análisis filogenético	20
Resultados	21
Análisis por zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i>	21
Purificación parcial y características bioquímicas de α -amilasa en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	22
Clonación y características de la secuencia parcial de ADNc de α -amilasa	28
Análisis filogenético de α -amilasa de <i>N. granulata</i>	31
Discusión	33
Capítulo 2: Tripsina en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i>: clonación parcial y caracterización molecular.....	40
Introducción.....	41

Materiales y métodos	43
Captura y mantenimiento de animales	43
Preparación del hepatopáncreas.....	43
Clonación de la secuencia parcial de ADNc de tripsina y β -actina.....	43
Obtención del 3' final por Amplificación Rápida de ADNc Final (RACE) de tripsina y β -actina	43
Análisis filogenético	44
Resultados	44
Clonación y características de las secuencias parciales de ADNc de tripsina	44
Clonación de la secuencia parcial de ADNc de β -actina	52
Discusión.....	53
Capítulo 3: Flexibilidad fenotípica en respuesta a la salinidad en <i>Neohelice granulata</i>: expresión, número de formas y actividad de α-amilasa y tripsina	56
Introducción.....	57
Captura y mantenimiento de animales	60
Preparación de hepatopáncreas.....	60
Osmolalidad de la hemolinfa.....	60
Cuantificación de los niveles de expresión de ARNm de α -amilasa y tripsina.....	61
Análisis por zimograma para la actividad de α -amilasa	62
Determinación de actividades enzimáticas	62
Determinación de la concentración de proteínas	63
Análisis estadísticos	63
Resultados	64
Osmolalidad de la hemolinfa en individuos de <i>Neohelice granulata</i> mantenidos a baja y alta salinidad	64
Efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión de α -amilasa en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	65

Efecto de baja y alta salinidad sobre el número de formas con actividad amilolítica en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	66
Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	67
Efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión de isoformas de tripsina en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	68
Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad total de tripsina en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	69
Discusión	70
Capítulo 4: Flexibilidad fenotípica en respuesta a baja y alta salinidad luego de la ingesta de alimento: actividad de carbohidrasas, glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva en <i>Neohelice granulata</i>	74
Introducción.....	75
Materiales y Métodos.....	76
Captura y mantenimiento de los animales.....	76
Preparación de muestras.....	77
Osmolalidad de la hemolinfa.....	77
Determinación de las actividades enzimáticas	78
Determinación de la concentración de proteínas	78
Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre	78
Análisis estadísticos	79
Resultados	80
Capacidad osmorregulatoria en baja y alta salinidad a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento	80
Actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad	81
Contenido de glucógeno y glucosa libre en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad	86
Contenido de glucógeno y glucosa libre en músculo de la quela luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad	89

Contenido de glucógeno y glucosa libre en branquias anteriores luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad	93
Contenido de glucógeno y glucosa libre en branquias posteriores luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad	95
Discusión	98
Capítulo 5: Flexibilidad fenotípica digestiva y metabólica en respuesta a un cambio abrupto de alta a baja salinidad: actividad de carbohidrasas, glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva en <i>Neohelice granulata</i>	106
Introducción.....	107
Materiales y métodos	108
Sitios de estudio y recolección de animales	108
Preparación de muestras.....	109
Osmolalidad de la hemolinfa.....	109
Determinación de las actividades enzimáticas	109
Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa	109
Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre	109
Análisis estadísticos	110
Resultados	110
Capacidad osmorregulatoria luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad	110
Actividades de carbohidrasas en hepatopáncreas luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad	111
Concentración de glucosa en hemolinfa luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad	114
Concentración de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad.....	115
Discusión	119
Capítulo 6: Flexibilidad fenotípica en respuesta a la emersión: actividad de enzimas digestivas, glucosa en hemolinfa y reservas de energía en <i>Neohelice granulata</i>.....	125
Introducción.....	126

Materiales y métodos	128
Captura y mantenimiento de los animales.....	128
Osmolalidad de la hemolinfa.....	129
Preparación de extractos enzimáticos	129
Determinación de la actividad de enzimas digestivas.....	129
Determinación de la concentración de proteínas	130
Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa	130
Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre	131
Determinación de la concentración de triglicéridos	131
Análisis estadístico.....	131
Resultados	132
Osmolalidad de la hemolinfa a distintos tiempos luego de la emersión en individuos expuestos a baja y alta salinidad	132
Actividades de enzimas digestivas en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la emersión a baja y alta salinidad	133
Concentración de glucosa en hemolinfa a distintos tiempos luego de la emersión en baja y alta salinidad	142
Concentración de sustratos de energía en músculo de la quela a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad	150
Concentración de sustratos de energía en branquias anteriores a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad	154
Concentración de sustratos de energía en branquias posteriores a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad	160
Discusión	166
Capítulo 7: Estudios sobre el efecto de la salinidad ambiental sobre actividad de carbohidrasas y número de formas de α-amilasa en hepatopáncreas, glicemia y reservas de glucógeno y glucosa libre en el cangrejo eurihalino <i>Cyrtograpsus angulatus</i>	175
Introducción.....	176
Materiales y métodos	178

Captura y mantenimiento de los animales.....	178
Osmolalidad de la hemolinfa.....	179
Preparación de extractos enzimáticos	179
Determinación de la actividad de enzimas digestivas.....	179
Determinación de la concentración de proteínas	179
Análisis por zimograma para la actividad de α -amilasa	180
El zimograma se realizó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.....	180
Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa	180
Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre	180
Análisis estadístico.....	180
Resultados	181
Zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de <i>Cyrtograpsus angulatus</i> ..	181
Osmolalidad de la hemolinfa de individuos de <i>C. angulatus</i>	182
Actividad y número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas de individuos de <i>C. angulatus</i> expuestos a baja y alta salinidad.....	184
Actividad de maltasa y sacarasa en hepatopáncreas de individuos de <i>C. angulatus</i> expuestos a baja y alta salinidad.....	185
Glucosa en hemolinfa de individuos de <i>C. angulatus</i> expuestos a baja y alta salinidad	186
Glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva de individuos de <i>C. angulatus</i> mantenidos a baja y alta salinidad	187
Discusión.....	189
Capítulo 8: Estudios de caracterización parcial y modulación por salinidad ambiental de actividad de carbohidrasas y tripsina en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino <i>Uca tangeri</i>.....	195
Introducción.....	196
Materiales y métodos	197
Captura y mantenimiento de los animales.....	197
Preparación del hepatopáncreas.....	198

Determinación de la actividad de enzimas digestivas.....	198
Determinación de la concentración de proteínas	199
Análisis estadístico.....	200
Resultados	201
Caracterización parcial de la actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de <i>Uca. tangeri</i>	201
Caracterización parcial de la actividad de maltasa en hepatopáncreas de <i>U. tangeri</i>	203
Caracterización parcial de la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de <i>U. tangeri</i> ..	206
Caracterización parcial de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de <i>U. tangeri</i>	209
Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de <i>U. tangeri</i>	212
Discusión	216
Discusión general	223
Bibliografía.....	230

Introducción general

La plasticidad fenotípica es la capacidad de expresar diferentes fenotipos en respuesta a múltiples condiciones ambientales (de Witt et al., 1998; Whitman y Agrawal, 2009; Chevin y Lande, 2015; Murren et al., 2015; Wright y Turko, 2016; Zhang et al., 2016). Mientras que la flexibilidad fenotípica es una categoría particular de plasticidad fenotípica, involucrando variaciones reversibles, a distintos niveles de organización biológica (desde molecular a organismo), que pueden aumentar la posibilidad de supervivencia de especies que enfrentan variaciones espacio-temporales en las condiciones ambientales (Piersma y Drent, 2003; Pfenning et al., 2010; Piersma y van Gills, 2011; Buehler et al., 2012; Kelly et al., 2012; McWilliams y Karasov, 2014; Wright y Turko, 2016). Debido a que el tracto digestivo constituye un puente funcional entre la ingesta de alimento, procesamiento y asignación de nutrientes y energía, la flexibilidad digestiva tiene importantes implicancias para la performance de los individuos, particularmente para aquellos que habitan ambientes altamente variables en tiempo y/o espacio (Starck y Wang, 2005; Brzek et al., 2011; Karasov et al., 2011; del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov y Douglas, 2013; McWilliams y Karasov, 2014; Zhang et al., 2016). Las enzimas digestivas cumplen un rol fisiológico esencial ya que constituyen un vínculo entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (Karasov et al., 2011; del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov y Douglas, 2013). En este contexto, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas en respuesta a variaciones en condiciones ambientales claves que impliquen una reorganización metabólica conduce a ajustes en la capacidad digestiva y de esta manera en la disponibilidad de diferentes nutrientes y metabolitos (Starck y Wang, 2005; Brzek et al., 2011; Karasov et al., 2011; del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov y

Douglas, 2013; McWilliams y Karasov, 2014; Zhang et al., 2016). En varias especies de invertebrados y vertebrados, además de ajustes en procesos digestivos, puede ocurrir una regulación diferencial del metabolismo de reservas de energía en respuesta a variaciones en condiciones ambientales (Clissold et al., 2010; del Valle y López Mañanes, 2012). Sin embargo, los ajustes en la actividad de enzimas digestivas (ej. enzimas involucradas) y de distintos sustratos de reserva (tipo de biomolécula y órgano de reserva involucrados) parecen variar con la especie y el tipo y grado de desafío ambiental. Así, resulta evidente la importancia de llevar a cabo estudios integrativos sobre modulación de enzimas digestivas y del contenido de reservas para comprender las respuestas de diferentes organismos frente a variaciones en factores ambientales clave. Más aún, establecer la existencia y conocer características moleculares y bioquímicas de enzimas digestivas específicas es importante no sólo para inferir la potencial capacidad digestiva de los individuos para distintos sustratos dietarios y/o de reserva (ej. carbohidratos, proteínas) sino también como paso previo para llevar a cabo posteriores estudios sobre ajustes digestivos y/o metabólicos en relación a variables ambientales. En este contexto, el conocimiento sobre existencia, características bioquímicas y modulación a diferentes niveles (actividad/expresión) de enzimas digestivas clave en cangrejos eurihalinos es aún escaso y fragmentario (Azzalina y Trainer, 1985; Asaro et al., 2010, 2011a, b; Pinoni et al., 2011, 2013; Wang et al., 2013; Michiels, 2015; Michiels et al., 2013, 2015a, b).

Los cangrejos eurihalinos que habitan la zona intermareal de estuarios y lagunas costeras están expuestos a amplias y abruptas variaciones espacio-temporales en diferentes factores, particularmente en la salinidad ambiental. Para estos organismos, la flexibilidad en el comportamiento osmorregulatorio (capacidad de mantener la concentración osmótica de la hemolinfa) constituye una estrategia fisiológica

fundamental para su supervivencia y para la ocupación y uso del hábitat. La osmorregulación es un proceso complejo que requiere de una reorganización metabólica (Bianchini et al., 2008; Romano y Zeng, 2012). Por otra parte, por su estilo de vida, varios cangrejos eurihalinos que habitan zonas de mareas pueden soportar períodos de emersión variables por lo que presentan estrategias a distintos niveles que le permiten su supervivencia bajo estas condiciones (Robertson et al., 2001; McGaw et al., 2007). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los ajustes digestivos (ej. modulación de enzimas digestivas) y metabólicos (contenido de sustratos de reserva de energía) a nivel bioquímico posiblemente asociados a la osmorregulación y/o emersión (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2013, 2015; Wang et al., 2014)

En crustáceos decápodos, la homeostasis de glucosa es crucial para el adecuado funcionamiento de distintos procesos fisiológicos (Verri et al., 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Obi et al., 2011; Dutra et al., 2008; Wang et al., 2016a). El mantenimiento de los niveles de glucosa en hemolinfa depende principalmente de la presencia y/o modulación de enzimas digestivas que participan en la degradación de sustratos glucogénicos dietarios (ej. α -amilasa, maltasa, sacarasa) y de su absorción en el hepatopáncreas (principal sitio de síntesis de enzimas digestivas y de absorción de nutrientes en crustáceos decápodos). Otra fuente importante de glucosa hemolinfática proviene de la degradación de glucógeno en distintos órganos y/o tejidos de reserva (Verri et al., 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Sánchez-Paz et al., 2006; Buckup et al., 2008; Obi et al., 2011; Dutra et al., 2008; Chung, 2014; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a, b).

Las α -amilasas (α -1,4-glucano-4-gluconohidrolasa, EC 3.2.1.1) tienen una importancia fisiológica central debido a su papel en la digestión de sustratos glucogénicos clave tales como almidón y glucógeno dietarios y/o glucógeno de reserva

(Singh y Kayastha, 2014; Janeček et al., 2014; Xie et al., 2014; Date et al., 2015; Peng et al., 2015; Tiwari et al., 2015; Azzopardi et al., 2016; Janeček y Svensson 2016; Rodríguez-Viera et al., 2016). Si bien existen diversos estudios de caracterización de α -amilasa en hepatopáncreas de crustáceos decápodos y se ha detectado la presencia de varias formas aunque con un alto grado de variabilidad interespecífica (Dutta et al., 2006; Van Wormhoudt et al., 1995; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Aragón-Axomulco et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016), la información en cangrejos eurihalinos es escasa (Blandamer y Beechey, 1966; Azzalina y Trainer, 1985; Van Wormhoudt et al., 1995; Asaro et al., 2010, 2011a). Así, y a pesar de su inherente importancia fisiológica, faltan estudios sobre existencia, identificación de formas, características bioquímicas y modulación a diferentes niveles (actividad/expresión) de α -amilasa en hepatopáncreas de crustáceos decápodos en general y en cangrejos eurihalinos en particular. Por otro lado, la actividad de disacaridasas (ej. maltasa y sacarasa) al estar involucradas en las etapas finales de degradación cumplen un rol esencial en la digestión de sustratos glucogénicos (Diaz-Sotomayor et al., 2013; Lin et al., 2012, 2014, 2016; Dhital et al., 2013; Simsek et al., 2015). Sin embargo, han sido muy poco estudiadas su existencia, características bioquímicas y modulación por factores ambientales en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos (Asaro et al., 2010, 2011a, b).

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 el tracto digestivo de varios vertebrados e invertebrados (Sainz, 2004; Muhlia-Almazán et al., 2008; Vandermarliere et al., 2013, Wang et al., 2014; Perera et al., 2015). En crustáceos decápodos, la tripsina es la principal endopeptidasa en hepatopáncreas (Johnson et al., 2002; Lemos et al., 2000;

Sainz, 2004; Muhlia-Almazán et al., 2008; Vandermarliere et al., 2013; Wang et al., 2013; Sacristán et al., 2014, 2015; Perera et al., 2015; Tantikitti et al., 2016). La alta actividad de tripsina en el hepatopáncreas de crustáceos decápodos ha sido asociada con la presencia de varias isoformas (Muhlia-Almazán et al., 2008; Perera et al., 2008a, b, 2015). No obstante, la clonación y secuenciación de diferentes isoformas de tripsina en hepatopáncreas solo se ha realizado en pocas especies de cangrejos (ej *Paralithoes camtschatices*, *Cancer pagurus*, *Scylla paramamosain*) (Rudenskaya et al., 2004; Hehemann et al., 2008; Jiang et al., 2011).

Los cangrejos eurihalinos *Neohelice granulata*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Uca tangeri* habitan ambientes que se caracterizan por cambios temporales y espaciales en la salinidad ambiental (Spivak et al., 1994; Spivak, 1997; Pinoni et al., 2011; Luppi et al., 2013; Spivak y Cuesta, 2009; González Gordillo et al., 2003). *N. granulata* y *C. angulatus* habitan en las zonas intermareales de las lagunas costeras templadas del este sudamericano, encontrándose, particularmente, en ecosistemas de marismas y estuarios (Boschi, 1964; Spivak, 1997; Iribarne et al., 2003; Mendez Casariego et al., 2011; Luppi et al., 2013). *N. granulata* y *C. angulatus* representan las especies dominantes de cangrejos en la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. Bs. As., Argentina) (37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Ambas especies poseen una fuerte capacidad hiper/hipo osmorregulatoria (Schleich et al., 2001; López Mañanes et al., 2002; Pinoni, 2009; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008a; Pinoni et al., 2005, 2013, 2015a; Asaro et al., 2011a, b; Michiels et al., 2013, 2015a; Michiels, 2015).

N. granulata es considerada una especie modelo para estudios bioquímicos, fisiológicos y ecológicos (Spivak, 2010). *N. granulata* exhibe ajustes en la dinámica y patrón de modulación post-ingesta en baja y alta salinidad y de un cambio abrupto de salinidad de la actividad de lipasas y proteolítica y en el contenido de triglicéridos y

proteínas sugiriendo la existencia de ajustes post-prandiales en el metabolismo lipídico y proteico (Michiels, 2015; Pinoni et al 2015a).

Por su estilo de vida, *N. granulata* puede permanecer fuera del agua por largos períodos de tiempo (Schmitt y Santos, 1993; Maciel et al., 2008), siendo activo en condiciones de emersión (Boschi, 1964; Santos et al., 1987; Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998; Halperin et al., 2000; de Lima et al., 2015). Este comportamiento se ha observado también en individuos de *N. granulata* de la planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita (Spivak, 1997; Luppi et al., 2013; Bas et al., 2014). Individuos de *N. granulata* sometidos a emersión en condiciones de privación de alimento y osmoconformación, mostraron la modulación de actividad proteolítica en hepatopáncreas sugiriendo ajustes digestivos y metabólicos a nivel bioquímico (Pinoni, 2009). Sin embargo, faltan estudios sobre la existencia de posibles ajustes diferenciales post-prandiales de la actividad de diferentes enzimas digestivas y del contenido de distintas reservas de energía en individuos sometidos a emersión en condiciones de salinidad que impliquen diferentes estados osmorregulatorios.

C. angulatus en condiciones de hiper e hiporregulación presenta ajustes en componentes involucrados en el metabolismo de lípidos y proteínas (enzimas digestivas y contenido de reserva de energía) (Michiels et al., 2013; Michiels, 2015). Además, demostramos la existencia de diferentes carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas de esta especie (Asaro et al., 2010, 2011b).

U. tangeri es la única especie de cangrejo violinista que se encuentra presente en Europa (Rosenberg, 2001; Spivak y Cuesta, 2009; Boa y Guerra-García, 2015). Una de las poblaciones de *U. tangeri* en la costa Atlántica del sur de España, se encuentra en la Bahía de Cádiz (España; 36°23'-37'N, 6°8'-15'W). Sin embargo, a pesar de su importancia ecológica y económica faltan estudios sobre su fisiología digestiva en

general y a nivel bioquímico en particular (ej. existencia y características bioquímicas de enzimas digestivas clave en hepatopáncreas) y sobre flexibilidad digestiva en relación a la salinidad ambiental. Los individuos de *U. tangeri* exhiben una alta capacidad osmorregulatoria y modulación diferencial de metabolitos y reservas de energía en distintos órganos en condiciones de baja y alta salinidad en relación a la osmorregulación (Pinoni et al., 2015b).

El objetivo general de esta tesis fue estudiar mecanismos de ajuste a diferentes niveles (molecular, bioquímico y fisiológico) en cangrejos eurihalinos en relación a su hábitat y estilo de vida. Dentro del objetivo general se realizaron estudios de caracterización y modulación de enzimas digestivas en hepatopáncreas y del contenido de reservas de energía en los cangrejos eurihalinos *N. granulata* y *C. angulatus* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires) y de *U. tangeri* de la Bahía de Cádiz (España) con el fin de establecer el posible rol como componentes en mecanismos de ajustes digestivos y/o metabólicos en relación a variables ambientales clave. La laguna costera de Mar Chiquita se caracteriza por presentar amplios, abruptos y frecuentes cambios en la salinidad debido a la influencia de las mareas (diarias y estacionales) y al aporte de agua dulce que proviene de las precipitaciones y de los arroyos que confluyen en ella. Este ambiente posee un clima templado oceánico con una amplitud térmica diaria y estacional. Las especies *N. granulata* y *C. angulatus* (ambas miembros de la familia Varunidae), son la especies dominantes en la laguna costera de Mar Chiquita. *C. angulatus* se encuentra en la zona inter y submareal, mientras que *N. granulata* habita zonas del intermareal medio. Además, *N. granulata* es una especie semiterrestre y excavadora construyendo sus cuevas en la zona de planicie de mareas y espartillar (Iribartne et al., 1997; Luppi, et al., 2013). Por otro lado, *Uca tangeri* (familia Ocypodidae), es la única especie de cangrejo

violinista que se encuentra presente en Europa. Es una especie de cangrejo semiterrestre, su alimentación como su vida social tiene lugar en la bajamar. Durante la pleamar, esta especie permanece en sus cuevas y cierran la salida hacia el exterior. En la zonas de planicie de mareas del Rio San Pedro (Bahía de Cádiz) los individuos de *U. cangeri* están expuestos a variaciones en la salinidad y temperatura ambiental (Boa y Guerra-García, 2015). *N. granulata* y *C. angulatus* tiene una relación filogenéticamente cercana dentro de la familia Varunidae, mientras que *U. tangeri* (familia Ocypodidae) presenta una relación filogenética alejada de *N. granulata* y *C. angulatus* (Schubart et al., 2000; Ng et al., 2008).

Para cumplir con el objetivo general se llevaron a cabo:

- ✚ Estudios de identificación por análisis por zimograma de las formas de α -amilasa presentes en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1).
- ✚ Purificación parcial y posterior caracterización bioquímica de la forma con mayor actividad amilolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1).
- ✚ Estudios de secuenciación y caracterización de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1).
- ✚ Estudios de secuenciación y caracterización de isoformas de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 2).
- ✚ Estudios sobre el efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión, número de formas y actividad total de α -amilasa y tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 3).
- ✚ Estudios sobre modulación de la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas, y el contenido de glucógeno y glucosa libre en

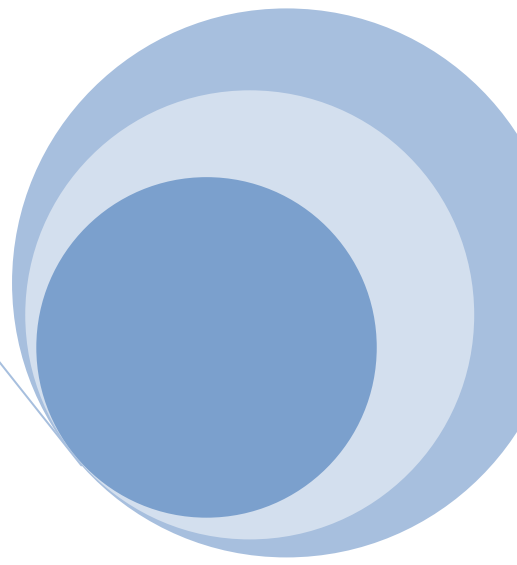
órganos de reserva a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en baja y alta salinidad en diferentes estados osmorregulatorios en *N. granulata* (Capítulo 4).

📌 Estudios sobre el efecto de un cambio abrupto desde alta a baja salinidad sobre la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas y el contenido de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva en individuos de *N. granulata* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Capítulo 5).

📌 Estudios sobre la existencia de ajustes post-prandiales en la actividad de enzimas digestivas (carbohidrasas, proteolítica total y lipasa) en hepatopáncreas, en la concentración de glucosa en hemolinfa y en el contenido de reservas de energía (glucógeno, triglicéridos y proteínas) en individuos de *N. granulata* expuestos a emersión inmediatamente luego de ser alimentados en condiciones de hiper e hiporegulación (capitulo 6).

📌 Estudios sobre el efecto de baja y alta salinidad sobre el número de formas de α -amilasa y actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas, y contenido de reserva de glucógeno y glucosa libre en distintos órganos en *C. angulatus* (Capítulo 7).

📌 Estudios de caracterización parcial y de modulación por baja y alta salinidad de la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) y tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* (Capítulo 8).



Capítulo 1:

**α -amilasa en hepatopáncreas de *Neohelice
granulata*: purificación parcial, caracterización
bioquímica y clonación**

Introducción

Las endo amilasas (α -1,4 glucan-4-gluconohidrolasa, EC 3.2.1.1) son enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis aleatoria de uniones internas α -D-(1, 4) glucosídicas de α -glucanos (ej. almidón, glucógeno y polímeros relacionados). En animales, las amilasas tienen una importancia fisiológica central debido a su rol en los pasos iniciales de la digestión de sustratos glucogénicos clave tales como almidón y glucógeno dietarios y/o glucógeno de reserva (Singh y Kayastha, 2014; Janeček et al., 2014; Janeček y Svensson, 2016; Xie et al., 2014; Date et al., 2015; Peng et al., 2015; Tiwari et al., 2015; Azzopardi et al., 2016; Rodríguez-Viera et al., 2016). A pesar de su importancia fisiológica, el conocimiento actual sobre la existencia de diferentes formas de α -amilasa y/o sus características bioquímicas en hepatopáncreas de grupos de importancia ecológica tales como cangrejos eurihalinos, sigue siendo escasa y fragmentaria (Blandamer y Beechey, 1966; Azzalina y Trainer, 1985; Van Wormhoudt et al., 1995; Asaro et al., 2010, 2011a; Wang et al., 2013).

En crustáceos decápodos, el mantenimiento de los niveles de glucosa en la hemolinfa es esencial para soportar las funciones regulares de varios órganos (ej. branquias y músculo) y en respuestas a varios factores (Verri et al., 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Sánchez-Paz et al., 2006; Buckup et al., 2008; Obi et al., 2011; Dutra et al., 2008; Chung, 2014; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a, b). El hepatopáncreas de crustáceos decápodos, cumple un papel central en la síntesis de enzimas digestivas, digestión y absorción de nutrientes, además de constituir uno de los principales sitios de almacenamiento de sustratos energéticos (ej. glucógeno) (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003; Ong y Johnston, 2006; Zeng et al., 2010; Wang et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Sacristán et al., 2014, 2015, 2016;

Saborowski, 2015; Bibo-Verdugo et al., 2015, 2016). En este contexto, una de las fuentes principales de glucosa hemolinfática es la digestión de sustratos glucogénicos y la absorción de glucosa vía el hepatopáncreas (Verri, 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Dutra et al., 2008; Obi et al., 2011; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016 a, b). Así, el nivel y/o modulación de la actividad de α -amilasa en hepatopáncreas tienen una importancia fisiológica central ya que determinan la habilidad para la digestión y/o utilización de carbohidratos glucogénicos. En el hepatopáncreas de varios crustáceos decápodos se ha observado la existencia de diferentes formas de α -amilasa aunque con un alto grado de variabilidad interespecífica. Además, se ha sugerido que la presencia de distintas formas de α -amilasa podría estar relacionada con cambios en factores internos y externos (Le Moullac et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Aragón-Axomulco et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016). El trabajo realizado por Van Wormhoudt et al. (1995) en *Carcinus maenas* muestra la presencia de diferentes formas de α -amilasa en hepatopáncreas de un cangrejo eurihalino. Por otro lado, para nuestro conocimiento solo se ha realizado la clonación y caracterización de la secuencia de α -amilasa del hepatopáncreas del camarón *Peneus vannamei* y la langosta *Panulirus argus* (Van Wormhoudt y Sellos, 1996; Rodríguez-Viera et al., 2016). Hasta el momento, no hemos hallado trabajos sobre clonación de α -amilasa en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos.

Neohelice (Chasmagnathus) granulata de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita se comporta como omnívoro-detritívoro (Iribarne et al., 1997; Bortolus e Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Lancia et al., 2013; Bas et al., 2014). En hepatopáncreas de *N. granulata* se determinó la existencia de una alta actividad de α -amilasa, lo que permite sugerir que este cangrejo es capaz de digerir sustratos

glucogénicos tales como almidón y glucógeno provenientes de la dieta y/o glucógeno almacenado como reserva de energía (Asaro et al., 2011a).

En este contexto, los objetivos del presente capítulo fueron:

- a) Identificar diferentes formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*;
- b) Llevar a cabo la purificación parcial y estudiar características bioquímicas de la forma con mayor actividad amilolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*;
- c) Llevar a cabo la clonación de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*, como paso preliminar para posteriores estudios de modulación por salinidad (capítulo 3).

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de los animales

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, se recolectaron en la 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 se transportaron inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección. Los cangrejos se aclimataron durante 10 días en acuarios a 35‰ de salinidad (condición de osmoconformación) (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013, 2015a; Michiels et al., 2015a) y en condiciones controladas de temperatura (22±2°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 (proteínas: 36%, lípidos: 4%, hidratos de carbono: 51%) (0,07 g

por individuo) y fueron privados de alimento 120 h antes de los experimentos (Méndez et al., 2011, 2012).

Osmolalidad de la hemolinfa

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

Preparación del hepatopáncreas

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 20 minutos. Posteriormente, se pesaron y se extrajo el hepatopáncreas. Luego de pesar el tejido una sección de hepatopáncreas (aproximadamente de 30-40 mg) se colocó en tubos conteniendo 1 ml de RNAlater (Ambion), mantenidos por 96 h a 4°C y se almacenó a -20°C hasta su utilización para la extracción de RNA. El remanente del hepatopáncreas 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. El sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -20°C con glicerol 1,3% p/v (Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2015a; Michiels et al., 2015a).

Purificación parcial de α -amilasa

El extracto enzimático de hepatopáncreas de 13 cangrejos aclimatados a 35‰ de salinidad fue usado para la purificación parcial de α -amilasa. El sobrenadante fue inicialmente tratado con 10% p/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por 4 h a 4°C y se centrifugó a 10000 x g por 30 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le agregó sulfato de amonio (60% p/v) y se dejó toda la noche. Luego se obtuvo un precipitado por centrifugación a 10000 x g por 30 min a 4°C, el cual fue disuelto en buffer 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), dializado durante toda la noche contra el mismo buffer y utilizado como solución enzimática. La solución enzimática se cargó en una columna de FPLC (cromatografía líquida veloz de proteínas) (Superose 12 10/300 GL, GE Healthcare) equilibrada con el mismo buffer. Las fracciones de 0,25 ml fueron colectadas a una tasa de 0,25 ml x min⁻¹ y se determinó la actividad de α -amilasa. La concentración de proteínas en la fracciones colectadas fue medida por monitoreo de la absorbancia en 280 nm.

Análisis por zimograma para la actividad de α -amilasa

El análisis por zimograma (sustrato SDS-PAGE) para la actividad amilolítica se realizó en las correspondientes muestras de acuerdo a Perera et al., (2008a) con modificaciones menores. Las muestras no fueron hervidas o tratadas con mercaptoetanol antes de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Después de la electroforesis, los geles se sumergieron en solución de almidón (1% w/v) a pH 6,0 durante 90 min y luego se tiñeron con una solución de yodo/KI (10 mM). La masa molecular aparente se determinó a través de la utilización de Marcadores de peso molecular (MWM) (12-250 kDa, Amersham-gama del arco iris). Para el análisis por

zimograma de la actividad amilolítica se sembró en el gel homogenato de hepatopáncreas de 5 individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad.

Determinación de la actividad de α -amilasa

La actividad de α -amilasa se determinó colorimétricamente midiendo la cantidad de maltosa liberada (Biesiot y Capuzzo, 1990, con modificaciones). La reacción se inició con la adición de una alícuota adecuada de la correspondiente muestra (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas) a una mezcla de reacción conteniendo almidón ($15 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) en buffer fosfato 50 mM pH 5,2 a 30°C. Luego de la incubación durante 15 min, la reacción se detuvo por adición de 1,5 ml del reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Después de 10 min a 100°C, se colocó en hielo e inmediatamente se colocó a temperatura ambiente durante 5 min. La cantidad de maltosa liberada se cuantificó por lectura de absorbancia en 540 nm. La actividad de α -amilasa se expresó como $\text{mg maltosa} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$. Para los estudios de caracterización de la actividad de α -amilasa, el procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente, excepto que la actividad se determinó a distintas temperaturas (4-70°C) de la mezcla de reacción. Para estudiar el efecto de NaCl, la actividad fue determinada en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de NaCl (0,5-4 M) en la mezcla de reacción. El efecto de diferentes iones sobre la actividad de α -amilasa fue determinado por ausencia o presencia de 5 mM de K^+ , Li^+ , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} (como sales de cloruro o sulfato) en la mezcla de reacción. El efecto de Ca^{2+} fue analizado por determinación de la actividad amilolítica en ausencia o presencia de 5 mM de Ca^{2+} (como sal de cloruro), 5 mM de EDTA o 5 mM de Ca^{2+} más 5 mM de EDTA en la mezcla de reacción. Para estudiar el

efecto de concentraciones crecientes de almidón, el procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente excepto que la actividad se determinó en presencia de varias concentraciones de almidón ($0,15-15 \text{ mg x ml}^{-1}$) en la mezcla de reacción. Para determinar la capacidad para la hidrólisis de glucógeno, la actividad enzimática fue determinada como se describió anteriormente pero en presencia de varias concentraciones de glucógeno ($0,15-15 \text{ mg x ml}^{-1}$) en la mezcla de reacción. Los valores de K_m (constante de Michaelis-Menden) y V_{max} fueron estimados por análisis de los datos usando una representación gráfica de Lineweaver-Burk (GraphPad Prism 5.01 software).

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina ($0,96 \text{ mg x ml}^{-1}$).

Clonación de la secuencia parcial de ADNc de α -amilasa

Inicialmente, un grupo de primers degenerados se diseñaron de acuerdo a las secuencias de ADNc altamente conservadas de α -amilasa de diferentes especies de crustáceos, insectos, aves y peces (descrito por Rodríguez-Viera et al., 2016; *Oreochromis niloticus*, GenBank acc. no. DQ064646; *Gallus gallus*, NCBI Reference Sequence NM_001001473; *Litopenaeus vannamei*, GenBank acc. no. AJ496537; *Drosophila melanogaster*, AY322195; *Apis mellifera*, GenBank acc. no. AB022908), y se sintetizaron por IDT[®] (Integrated DNA Technologies). La secuencia de nucleótidos se muestra en la tabla 1.1. El ARN total fue aislado del hepatopáncreas usando el kit NucleoSpin RNA II[®] (Macherey-Nagel) con un volumen apropiado de RA1 acorde al

peso del tejido y digestión por DNAasas libre de RNAasas en la columna de acuerdo al protocolo del fabricante. La cantidad de ARN se midió espectrofotométricamente en 260 nm con BioPhotometer Plus (Eppendorf) y su calidad se determinó a través de un bioanalizador Agilent 2100 usando el nano kit RNA 600 (Agilent technologies). Luego de la transcripción reversa para obtener la primer cadena de ADNc, (Super Script III, Life Technologies™), la amplificación por PCR fue realizada con la ADN polimerasa Velocity (BIOLINE) y las muestras fueron cicladas (98°C, 5 min; [98°C, 30 s; 65–55°C en touchdown, 30 s; 72°C, 1 min] x 35 ciclos; 72°C, 10 min). Para su visualización, los productos de PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1%, se utilizó GelRed™ (Biotium) para su tinción. Los productos de PCR de tamaño esperado, se cortaron del gel, se purificaron con los kit NucleoSpin® Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany) y se clonaron en células de *Escherichia coli* (Top 10, Invitrogen™) utilizando el vector de clonación pJET1.2/blunt del kit CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Diversos clones para la α -amilasa putativa se secuenciaron en ambas cadenas utilizando las secuencias de los primers Forward y Reverse de pJET1.2, por el método dideoxy en la compañía de secuenciación StabVida (Caparica, Portugal). Todos los kit se utilizaron de acuerdo a las instrucciones de manufactura. La secuencia homóloga para todos los productos de PCR fueron confirmados por “blast” usando el sitio “web” “NCBI” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). “ClustalW” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) fue utilizado para ensamblaje de fragmentos. El análisis de homología de secuencias de proteínas putativo se llevó a cabo con blast en el sitio “web” “NCBI”. “ClustalO” se utilizó para la alineación de proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) la secuencias de proteínas de α -amilasa de *Marsupinaeus japonicas* (AHN91844.1), *L.*

vannamei (AIJ02083.1), *Panulirus argus* (CDU84835.1), *Daphnia pulex* (EFX81580.1).

Obtención del 3' final por Amplificación Rápida de ADNc (3'RACE)

El RNA total se utilizó como templado, el 3' final de α -amilasa fue amplificado usando 3' final por Amplificación Rápida de ADNc (3' RACE) (FirstChoice® RLM-RACE kit, Life Technologies™). “Primers forward” específicos fueron diseñados en los fragmentos previamente clonados (ver más arriba) a dos o tres posiciones diferentes (Tabla 1.1) y usados en combinación con primers específicos provistos en el kit Againt 3'RACE adapter, como también un primer poli-T(V) para amplificar el 3' final. Los “primers fowards” específicos fueron diseñados para lograr un solape de al menos 150 pb entre los clones de 3' RACE y los ADNc parciales obtenidos previamente. La clonación y secuenciación de los productos de PCR fueron realizados como se describe arriba. Un análisis de homología de las secuencias de proteínas putativas se realizó a través de “NCBI blast”.

Tabla 1.1.- Secuencia de nucleótidos de primers degenerados diseñados para identificación molecular de la secuencia parcial de ADNc de α -amilasa y primers específicos usados para la identificación del 3' RACE.

“Primers” degenerados	Secuencia de nucleótidos	Tamaño amplificado
amy Fw ₁	5'-ATBGTSCAYYTBTTYGARTGG-3'	
amy Rw ₁	5'-TVACVNBCTTBCCMGTGCA-3'	1250 pb
amy Fw ₂	5'-GGCCDTGGTGGGARMGDTAC-3'	
amy Rw ₂	5'-CCRGARATSACRTRCAGTA-3'	1155 pb
amy Fw ₃	5'-GCYDSCAARCACATGTGGCC-3'	
amy Rw ₃	5'-TTNCGGAADNBVACCATGTT-3'	550 pb

Nombre de “primers 3'RACE”	Secuencia de nucleótidos	Posición	Dirección
Ng Amyelong3 Fw1	5'-TCCGGGGACATTGAGAACTAC-3'	266-287	“Forward”
Ng Amyelong 3' Fw2	5'-CAACTCAAGTGGCTGGTCAAC-3'	645-665	“Forward”
Ng Amyelong 3' Fw3	5'-CCCCCTCACGACGATAGTTAC-3'	906-926	“Forward”

Análisis filogenético

El análisis filogenético de todas las secuencias traducidas se realizó utilizando el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) con el algoritmo “Neighbor-Joining” basado en la diferencias de aminoácidos (p-distancias) y deleciones de pares. La fiabilidad del árbol se evaluó con el método de bootstrap (1000 repeticiones). Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de la base de datos de proteínas “NCBI” (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed, consultado en octubre de 2015).

Resultados

Análisis por zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de

Neohelice granulata

Para determinar la posible existencia de diferentes formas de α -amilasa, se realizó un análisis por zimograma de hepatopáncreas de individuos mantenidos a 35‰ de salinidad. En esta condición de salinidad, la osmolalidad de la hemolinfa fue similar (827 ± 27 mOsmol Kg⁻¹) a la del medio externo (820 ± 12 mOsmol Kg⁻¹), por lo tanto *N. granulata* osmoconforma a 35‰ de salinidad. El análisis por zimograma muestra que se detectaron al menos cinco bandas con actividad amilolítica (Figura 1.1). Las bandas pueden dividirse en dos grupos: un grupo “más lento” con dos bandas y una masa molecular aparente de aproximadamente 36 kDa. Un segundo grupo “más rápido” con una masa molecular aparente en el rango de 26-29 kDa. La banda de 29 kDa exhibió la mayor actividad.

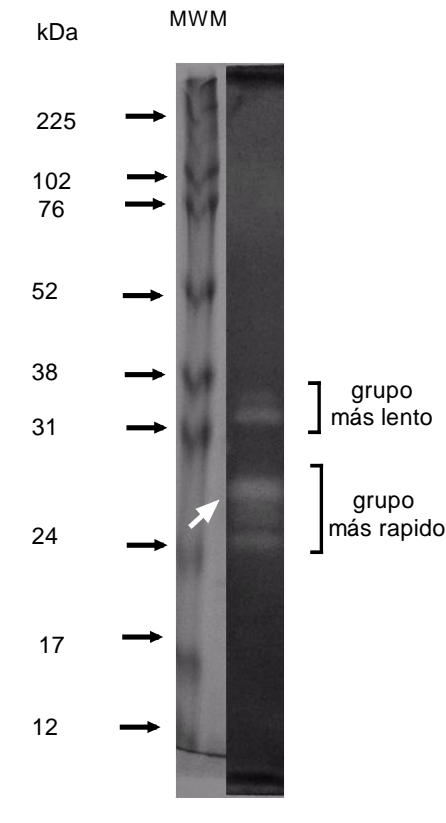


Figura 1.1.- Zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad. Luego de la electroforesis, el gel fue inmerso en solución de almidón (1%) a pH 6,0 por 90 min y luego teñido con solución yodo/KI (10 mM). La flecha blanca indica la banda con mayor actividad (29 kDa).

Purificación parcial y características bioquímicas de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*

El extracto de hepatopáncreas de individuos mantenidos a 35‰ de salinidad se utilizó para obtener una fracción enriquecida con la forma de α -amilasa de mayor actividad en el zimograma (Figura 1.1). Con ella, posteriormente se realizó la determinación de características bioquímicas. Inicialmente, la actividad amilolítica se precipitó con sulfato de amonio entre 10-60% (no mostrado). Esta fracción se dializó

utilizando buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0 y luego se cargó en una columna de FPLC (Figura 1.2). En la figura 1.2A se muestra el perfil de proteínas (A_{280}) y de actividad amilolítica en todas las fracciones colectadas de la columna. Las fracciones con los picos con baja (41 a 42) y alta (46 a 48) actividad amilolítica se juntaron (“pool” A y B, respectivamente) y posteriormente se analizaron por zimograma (Figura 1.2B). El análisis por zimograma mostró que el pool B presentó principalmente la forma de 29 kDa. En base a lo observado en el análisis por zimograma (Figura 1.2) se determinaron posteriormente, características bioquímicas del pool B (Figuras 1.3 a 1.7).

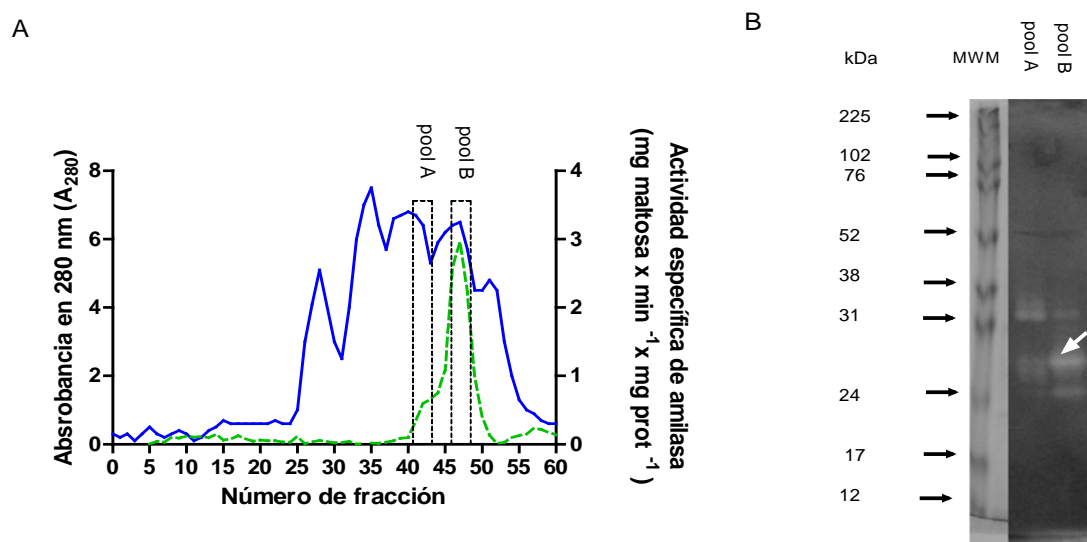


Figura 1.2.- A) Perfil de elución de FPLC de actividad amilolítica y proteínas. El extracto de hepatopáncreas de cangrejos mantenidos a 35‰ se precipitó con sulfato de amonio (10-60%) y el sobrenadante se dializó y se cargó en una columna de FPLC como se describe en materiales y métodos. (—) A_{280} ; (---) actividad amilolítica. “Pool” A y B indican las fracciones con actividad amilolítica. Los valores son la media de ensayos por triplicado. B) Zimograma de actividad amilolítica de los grupos A y B. La flecha blanca indica la banda de mayor actividad (29kDa).

El efecto de la temperatura (4-70°C) sobre la actividad de α -amilasa fue similar entre 4-20°C (Figura 1.3). La actividad aumentó de 20°C a 30°C, siendo máxima en el

rango de 30-40°C. La actividad de α -amilasa a 50°C fue de, aproximadamente, un 90% de la actividad a 30°C. La actividad de α -amilasa a 70°C fue un 80% menor que la actividad determinada a 30°C.

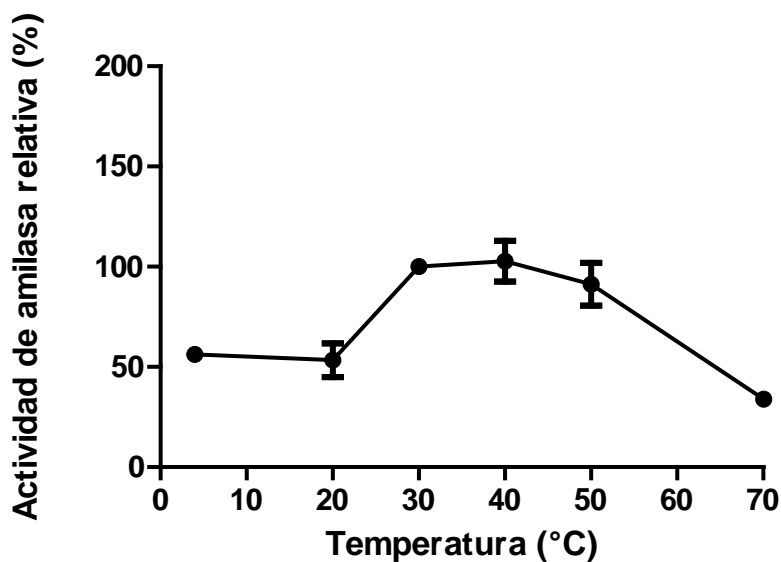


Figura 1.3.- Efecto de la temperatura (4-70°C) sobre la actividad amilolítica de α -amilasa parcialmente purificada en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad fue medida a pH 5,2 y en presencia de 15 mg x ml¹ de almidón. Los valores de actividad son expresados en relación a la actividad a 30°C (100% = 4,3 mg maltosa mg⁻¹x proteína x min⁻¹). Los valores son la media de ensayos por triplicado.

El efecto de concentraciones crecientes de NaCl (0-4 M) sobre la actividad amilolítica se incrementó de 0 a 1,5 M de NaCl. A concentraciones más altas (2-4 M), la actividad disminuyó. En presencia de 4 M de NaCl alrededor de un 30% de la actividad en ausencia de NaCl (Figura 1.4).

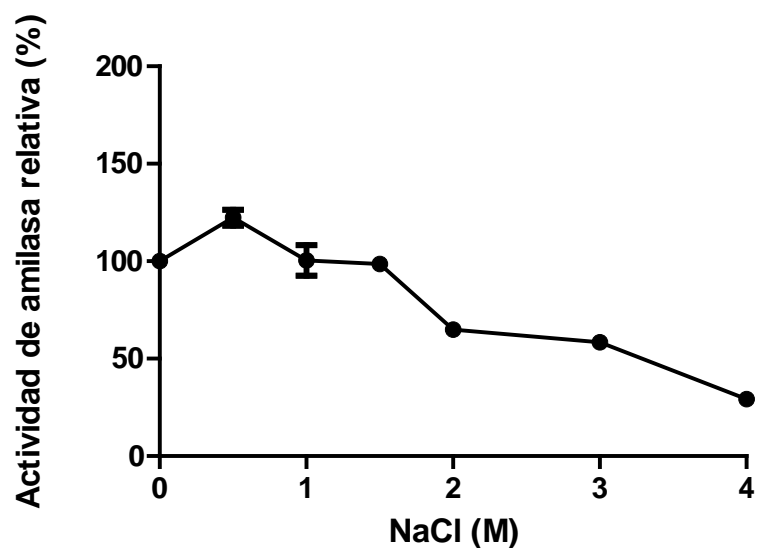


Figura 1.4.- Efecto de concentraciones crecientes de NaCl (0-4 M) sobre la actividad amilolítica de α -amilasa parcialmente purificada en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad fue medida a pH 5,2; 30°C y en presencia de 15 mg x ml⁻¹ de almidón. Los valores de actividad se expresaron en relación a la actividad en ausencia de NaCl (100% = 6,16 mg maltosa x mg⁻¹ proteína x min⁻¹). Los valores son la media de ensayos por triplicado.

Los cationes K⁺, Li⁺, Co²⁺, Mg²⁺ aumentaron la actividad entre 36-45%. Contrariamente, en presencia del ion Cu²⁺ la actividad disminuyó alrededor de un 92%, mientras que, los iones Zn²⁺, Cd²⁺, Fe²⁺ y Mn²⁺ disminuyeron la actividad entre un 55 y 24%. Los cationes Ni²⁺ y Ba²⁺ no afectaron la actividad amilolítica (Figura 1.5).

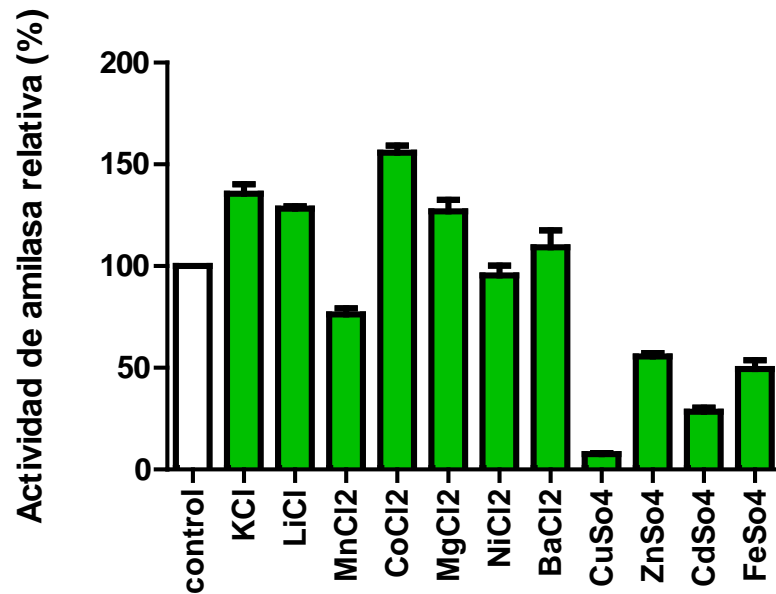


Figura 1.5.- Efecto de diferentes iones sobre la actividad amilolítica de α -amilasa parcialmente purificada en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad fue medida a pH 5,2, 30°C en presencia de 15 mg x ml⁻¹ de almidón y en ausencia (control) o en presencia de los iones indicados (5 mM) (sal de cloruro o sulfato). Los valores de actividad son expresados en relación al control (100% = 7,5 mg maltosa x mg⁻¹ proteína x min⁻¹). Los valores son la media de ensayos por triplicado.

La actividad amilolítica fue mayor (alrededor del 100%) en presencia de Ca²⁺. La actividad amilolítica en presencia de Ca²⁺ más EDTA o en presencia de EDTA (en ausencia de Ca²⁺) no fue afectada (Figura 1.6).

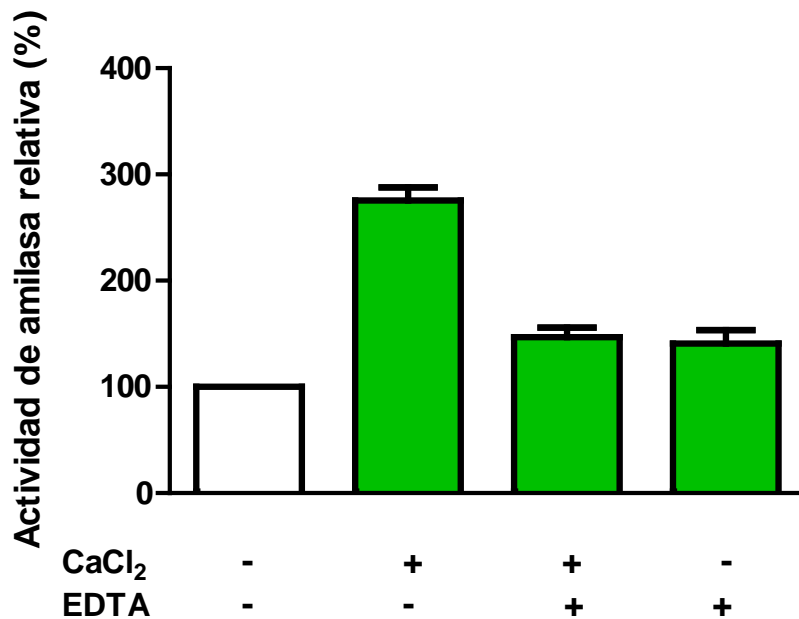


Figura 1.6.- Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad amilolítica de α -amilasa parcialmente purificada en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad se determinó a pH 5,2 en presencia de $15 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de almidón, 30°C y en ausencia o presencia de 5 mM de CaCl_2 , 5 mM de EDTA o ambos. Los valores de actividad son expresados en relación a la actividad en ausencia de CaCl_2 y EDTA ($100\% = 3,3 \text{ mg}$ maltosa $\times \text{mg}^{-1}$ proteína $\times \text{min}^{-1}$). Los valores son la media de ensayos por triplicado.

La actividad amilolítica exhibió una cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 1,24 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$). La α -amilasa parcialmente purificada también hidrolizó glucógeno exhibiendo una cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 16,19 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) (Figura 1.7).

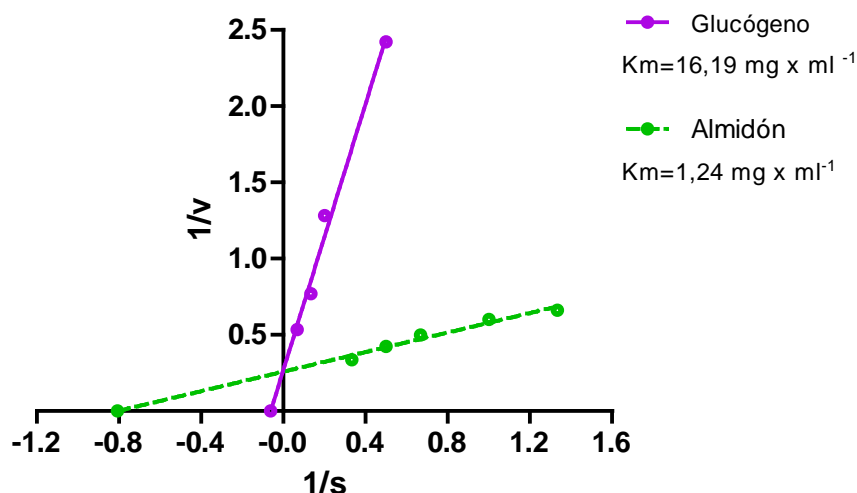


Figura 1.7.- Gráfico de Lineweaver-Burk de la actividad de α -amilasa parcialmente purificada del hepatopáncreas de *N. granulata* utilizando almidón o glucógeno como sustratos. Las correspondientes actividades fueron medidas a pH 5,2 y 30°C. Los valores son el promedio de ensayos por triplicado.

Clonación y características de la secuencia parcial de ADNc de α -amilasa

La secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos deducida de α -amilasa de hepatopáncreas de *N. granulata* se muestra en la figura 1.8. La secuencia parcial de ADNc de α -amilasa se identificó y se subió a GenBank (número de acceso KU531567). La secuenciación reveló que el ADNc parcial de α -amilasa tiene 1.367 pb. El codón de terminación (TAA) está en la posición 1.320 seguido de la región 3' no traducida. La secuencia de ADNc de α -amilasa codifica 439 residuos de aminoácidos e incluye 3 sitios potenciales de O-glicosilación (S^{10} , S^{17} y T^{70}).

P W W E R Y Q P V S Y N L V T R S G	18
5'-ggccatggtgggagcggtaccagcccgtgtcctacaacctggtgacccgctcagg	56
D E S A F X D M V S R C X X V X V R I Y	38
gacgagtcagccttccangacatggtgagcaggtgcancancgtggncgtcaggatttac	116
A D I V M N H M T G W Q P S X H G G D W	58
gctgacatagtgatgaaccatatgaccggctggcaaccctctnnggcacgggggcgactgg	176
W F L V R C X A Q S L T X A V P Y S A Y	78
tggttcctcgttcgatgccnggctcagagtcctaccnccgctaccctactccgcctat	236
D F N D G N C N S G S G D I E N Y G D A	98
gacttcaacgatgggaattgcaactcggggtcggggacattgagaactacggtgacgcy	296
N Q V R N C K L S G L N D L N Q G T D Y	118
aaccagggtccgcaactgcaagctcagcggccttaacgacctcaaccagggaacagactac	356
V R G M I R D Y M N N L I G Y G V A G F	138
gtgcggggcatgattcgagactacatgaacaatctgatcgggtacggcgtcgctgggttc	416
R V D A S K H M W P G D M Q A I F S S L	158
cgagttgacgcctccaaacatatgtggcctggcgatatgcaggccatcttcagcagcctc	476
N D L S T N Y F P A G S R P F V Y Q E V	178
aacgacctgtccacgaattacttccccgcggatcacgccccttcgtttaccaggaagt	536
I D L G G E A I T S D E Y V G I G R V T	198
attgatctcggcggagaggccatcaccagcgatgagtacgtgggcatcggacgtgtgaca	596
E F K Y G K F L G E A F R G S N Q L K W	218
gagttcaagtatggcaagttcctggggcgaggctttcaggggagcaaccaactcaagtgg	656
L V N F G E G W G M M D R G N A L V F V	238
ctggtcaacttcgggtgagggctggggcatgatggaccgaggcaacgctctggtccttcgt	716
D N H D N Q R G H G A G G D M I L T F R	258
gataaccacgacaaccagcagggccacggtgcccgggtgatgatcctgaccttccgt	776
D P K L Y K M A N A F M L A W P Y G Y T	278
gaccctaaactgtacaagatggccaacgccttcagctcgcctggccctatggttacacc	836
R V M S S Y Y W D Q N W V G G S D Q N D	298
cgcgtcatgtcctcctactactgggacaaaaactgggtgggtggctctgacaaaaatgac	896
W I G P P H D D R Y N T L S P T F I A D	318
tggatcggccccctcacgacgatagatacaaacacccttagccccaccttcacgaggac	956
G S C G N D W M C E H R W R Q I Y I M V	338
ggcagctgcccgaacgactggatgtgtgagcaccggtggaggcagatctacatcatggtg	1016
E F R N V A H G T D M N D W W D N D N N	358
gagttcagaaatggtgctcacggcacggacatgaacgactggtgggacaacgacaacaac	1076
Q I A F C R G G R G F I A I N N E G Y V	378
cagatagccttctgcaggggtggccgaggcttcacgcatcaacaacgaggggatgtc	1136
L A Q N F Q T C L S E G T Y C D V I S G	398
ctcgcgcagaacttccagacctgcttgcgagggcacatactgcgacgtcatctccggc	1196
S L E G G A C T G K S V T V G S D G T A	418
tccttggggggggcggtgcacgggcaagagtgtgacggtgggacgacggaaccgccc	1256
Y I E I A T S E D D G V L A I H A N S K	438
tacatcgagatcgccacctcggaggacgacggcgtgctggccatccacgccaactccaag	1316
L *	439
ctt taa acatcaaccagccacacggaatcatacagagcagaggagaggtcaaaacactaa	1376
gaaaaacaagaaaataacctcgggaagaaagttarcaaagaaaattacaacaacctacat	1436
aacaacaacaacaacaacaacaggccaaaggaaaataaggaaaacaacaacaaaaaa	1496
gaaaaagaaaagataacagagactcttccctatcaaaacaaggagagaaaatcacacctg	1556
tcagattaatcaaaagggtgacgtttgaggattaaagaaaagaaaaaaagtggatatata	1616
catataaaacaaaaataaaaa - 3'	1637

Figura 1.8.- Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducidos de ADNc de α -amilasa de *N. granulata*. La secuencia deducida de aminoácidos se muestra en letras mayúsculas en negrita por encima de la secuencia de nucleótidos. El codón Stop (TAA) es representado en negrita, cursiva y subrayada. Los sitios potenciales de O-glicosilación se muestran en gris.


```

N. granulata FRNVAHGTMNDWWDNDNNQIAFCRGGKGFIAINNEGYVLAQNFQTCLSEGTYCDVISGS 399
M. japonicus FRNVAHGTMNDWWDNGSNQIAFCRGGKGFIAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGS 472
L. vannamei FRNVAHGTMNDWWDNGSNQIAFCRGNKGFIAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGS 472
P. argus FRNVAHGTMNDWWDNGSNQISFCRGGKGFIAINNDPMDKESRQTCLSSGTYCDVISGS 473
D. pulex FRNIVAGTMNDWWDNGNNQIAFCRGGKGFIAINNEGSNMSQTLQTCLSAAGTYCDIISGN 473
***: . * * * * * * * * . ***: * * * * * : * * : * * * * * : : . * * * * * * * * * : * * * .

N. granulata LEGGACTGKSVTVGSDGTAYIEIATSEDDGVLAIHANSKL 439
M. japonicus KEGGSCTGKSVTVGGDGKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL 512
L. vannamei KDGGSCCTGKSVTVGGDGKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL 512
P. argus KIQGSCTGKTVTVNADGFAYIEILNSEEDGVLAIHRDSKL 513
D. pulex LVNGQCTGKSVTVGSDGKALISIGNAEDDGVLAIHVESKL 513
* * * * * : * * * * * . * * * * * . * : * * * * * * * : * * *

```

Figura 1.9.- Comparación de la secuencia de aminoácidos de diferentes especies de crustáceos usando Clustal Omega. Los aminoácidos conservados que participan en la triada catalítica están marcados en negro. El sitio de unión del ion calcio está marcado en gris. *M. japonicus* (AHN91844.1), *L. vannamei* (AIJ02083.1), *P. argus* (CDU84835.1), *D. pulex* (EFX81580.1). Los símbolos en la secuencia conservada indican: identidad (*), sustituciones conservadas (:), y sustituciones semi-conservadas (.).

Tabla 1.2.- Porcentaje de identidad para la secuencia de aminoácidos de α -amilasa de *N. granulata* y otras cuatro especies de crustáceos.

	<i>N. granulata</i>	<i>M. japonicus</i>	<i>L. vanammei</i>	<i>P. argus</i>	<i>D. pulex</i>
<i>N. granulata</i>	100				
<i>M. japonicus</i>	77,4	100			
<i>L. vanammei</i>	75,57	92,97	100		
<i>P. argus</i>	70,57	77,01	77,8	100	
<i>D. pulex</i>	67,51	66,21	67,98	62,45	100

Derivados de pares de nucleótidos y alineamiento de secuencia de aminoácidos usando “ClustalO”.

Análisis filogenético de α -amilasa de *N. granulata*

Con el objetivo de determinar la relación de la secuencia de aminoácidos deducida de α -amilasa de *N. granulata* con otras α -amilasas de varios animales (crustáceos, insectos, moluscos y vertebrados) se construyó un árbol filogenético usando el análisis de “Neighbor-Joining” (Figura 1.10). Como grupo externo se utilizó la

secuencia de la bacteria *Streptococcus equines*. El árbol obtenido del análisis filogenético muestra que las secuencias de α -amilasas de animales se dividen en dos grupos. Un grupo comprende las secuencias de α -amilasas de moluscos, vertebrados y crustáceos, mientras que el otro grupo contiene a las secuencias de insectos. Como esperábamos, la secuencia de α -amilasa de *N. granulata* se encuentra dentro del grupo de los crustáceos.

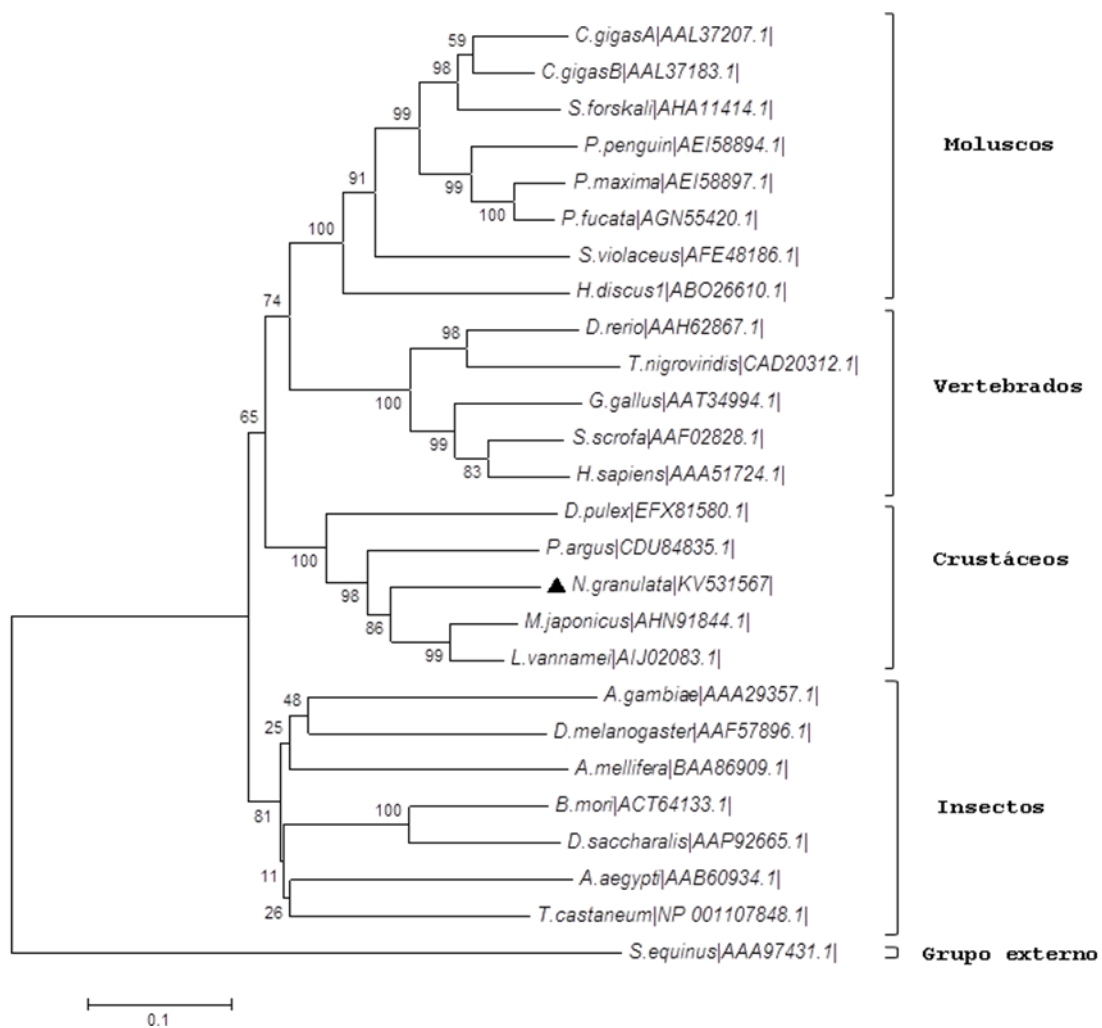


Figura 1.10.- Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos deducidas de α -amilasa de diferentes crustáceos incluyendo *N. granulata*, insectos, vertebrados y un grupo externo usando el análisis “Neighbor-joining” y basado en diferencia de aminoácidos (distancia p). La confiabilidad del árbol se evaluó por bootstrapping (1.000 repeticiones). Las especies utilizadas

y el número de acceso se muestran en el árbol. La localización de secuencia de α -amilasa de *N. granulata* está marcada con un triángulo negro.

Discusión

El uso de zimogramas utilizando almidón como sustrato, ha permitido la identificación de varias formas de α -amilasa (1 a 10 bandas) en hepatopáncreas de diferentes crustáceos decápodos (Van Wormhoudt et al., 1995; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016). Por medio de esta técnica, los resultados de este capítulo muestran en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata* en condiciones de osmoconformación (35‰ de salinidad) la presencia de cinco formas con actividad amilolítica de una masa molecular aparente dentro del rango de 26-37 kDa, y una forma de 29 kDa que exhibió la mayor actividad. Estos resultados difieren de lo mostrado en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *C. maenas* en el cual se ha reportado la existencia de dos formas de α -amilasa con una masa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa (Van Wormhoudt et al., 1995).

Con el objetivo de realizar una caracterización parcial de las actividades amilolíticas presentes en el hepatopáncreas de *N. granulata*, se realizó una purificación parcial de α -amilasa a partir de hepatopáncreas de individuos mantenidos en 35‰ de salinidad, la cual incluyó la precipitación con sulfato de amonio como paso inicial y una cromatografía en FPLC de las fracciones activas. El análisis por zimograma del pool B con mayor actividad amilolítica obtenido de la columna de FPLC mostró la presencia, principalmente, de la forma de 29 kDa. Por lo tanto, este pool se utilizó como fuente de

enzima (α -amilasa parcialmente purificada) de hepatopáncreas de *N. granulata* para realizar posteriormente una caracterización bioquímica .

La máxima actividad amilolítica se encontró entre 30-40°C, estos resultados son similares a los encontrados para la α -amilasa parcialmente purificada de los copépodos *Acartia clausi* y *Heliodiaptomus viduus* (Mayzaud, 1985; Dutta et al., 2006). La actividad amilolítica se mantuvo activa a baja (4°C) y alta (70°C) temperatura (56% y 34% de la actividad a 30°C, respectivamente). Dado que en la laguna costera de Mar Chiquita, *N. granulata* está expuesto a un amplio rango de temperaturas (Spivak, 1997; Luppi et al., 2013; observación personal), una actividad amilolítica en hepatopáncreas tolerante a un amplio rango de temperaturas podría jugar un rol en la aclimatación térmica (ej. mantenimiento de la capacidad de digestión de hidratos de carbono) como hemos sugerido para las actividades de N-aminopeptidasa (APN) y lipasa en este cangrejo (Michiels et al., 2015 a, b).

El estudio del efecto de varias concentraciones de NaCl y diversos iones es comúnmente usado para la caracterización de α -amilasas de crustáceos ya que pueden regular diferencialmente esta actividad, aunque los efectos (activación/inhibición, sin efecto) parecen ser especie-específico (Mayzaud, 1985; Dutta et al., 2006; Figueiredo y Anderson, 2009; Castro et al., 2012; Muralisankar et al., 2014; Wu et al., 2014; Rodríguez-Viera et al., 2016). La presencia de iones específicos ingeridos junto con el alimento pueden inhibir o potenciar la actividad de la α -amilasa y, por lo tanto, afectar diferencialmente la tasa de digestión de carbohidratos (Dutta et al., 2006; Coccia et al., 2011; Muralisankar et al., 2014; Wu et al., 2014). En la mayoría de aguas marinas y salobres los principales iones inorgánicos disueltos son el Na^+ y Cl^- por lo tanto, la salinidad constituye una medida de la concentración de NaCl disuelto en el agua (Romano y Zeng, 2012; Kültz, 2015). Por otro lado, *N. granulata* de la zona de planicie

de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita, está expuesto a altas concentraciones de Zn^{+2} , Cu^{+2} y Mn^{+2} , los cuales se acumulan en el hepatopáncreas (Beltrame et al., 2010, 2011). En este contexto, fue de interés evaluar el efecto de concentraciones crecientes de NaCl y de varios iones sobre la actividad amilolítica de la α -amilasa parcialmente purificada de hepatopáncreas de *N. granulata*. El hecho que la actividad no fue afectada por concentraciones de NaCl entre 0,5 y 1,5 M y además, se mantuvo en valores de aproximadamente 50% y 30% aún en presencia de NaCl 2-3 M y 4 M respectivamente, indicaría que la α -amilasa de *N. granulata* es halotolerante, similarmente a lo observado para la actividad de α -amilasa purificada de la langosta *P. argus* (Rodríguez-Viera et al., 2016). Esto difiere de lo observado para la α -amilasa parcialmente purificada a partir del copépodo *H. viduus* que exhibe una actividad máxima en ausencia de NaCl, hecho que se atribuyó a las condiciones experimentadas por este organismo en su hábitat de agua dulce (Dutta et al., 2006). La actividad amilolítica de α -amilasa parcialmente purificada de hepatopáncreas de *N. granulata* fue mayor en presencia de K^+ , Li^+ , Co^{2+} y Mg^{2+} , mientras que Ni^{2+} y Ba^{2+} no tuvieron efecto. La actividad de α -amilasa parcialmente purificada de *H. viduus* se incrementa en presencia de K^+ , Co^+ , Ni^{2+} y Ba^{2+} (Dutta et al., 2006). Estos resultados sustentan la idea que el efecto de diversos iones sobre la actividad amilolítica parece ser especie-específico (Castro et al., 2012). Por otro lado, la actividad enzimática de *N. granulata* fue menor en presencia de Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Fe^{2+} . Sin embargo, queda aún por investigar si la disminución de la actividad podría representar un impacto potencial en la digestión y/o absorción de hidratos de carbono. Todas las α -amilasas estudiadas hasta el presente pertenecen al grupo de las metaloenzimas, las cuales presentan un sitio conservado para la unión del Ca^{2+} (Boel et al., 1990; D'Amico et al., 2000; Tsuji et al., 2014; Peng et al., 2015; Azzopardi et al., 2016). El ion Ca^{2+} es un potente activador de

α -amilasa en hepatopáncreas de *C. maenas* (Blandamer y Beechey, 1966). El aumento de la actividad amilolítica de *N. granulata* por Ca^{2+} fue contrarrestado por la presencia de EDTA sugiere el efecto específico de este catión.

La cinética de Michaelis–Menten de la α -amilasa parcialmente purificada de hepatopáncreas de *N. granulata* en respuesta a concentraciones crecientes de almidón es similar a la descrita de la α -amilasa parcialmente purificada de los copépodos *A. clausi* y *H. viduus* (Mayzaud, 1985; Dutta et al., 2006) y para lo que hemos descrito previamente para la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de este cangrejo (Asaro et al., 2011a). La actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* exhibe capacidad para hidrolizar glucógeno, similar a lo descrito de la actividad de α -amilasa parcialmente purificada del copépodo *H. viduus* (Dutta et al., 2006). La habilidad de hidrolizar almidón y glucógeno permite sugerir que *N. granulata* es capaz de utilizar carbohidratos glucogénicos de origen vegetal y/o animal, lo cual estaría en relación con su hábito alimenticio en la planicie de la laguna costera de Mar Chiquita (Iribarne et al., 1997; Bortolus y Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Lancia et al., 2013; Bas et al., 2014). La capacidad de hidrolizar glucógeno de la α -amilasa parcialmente purificada también podría estar relacionada con la utilización de esta reserva en hepatopáncreas (sitio de almacenamiento de glucógeno y que presenta un alto contenido de glucosa libre, Pinoni et al., 2011, 2013; capítulos 4-7 presente tesis). En crustáceos decápodos, se ha propuesto que cuando deben movilizarse y/o utilizarse las reservas internas de las células, las enzimas digestivas serían activadas intracelularmente y finamente reguladas (Sánchez-Paz et al., 2006). En nuestro grupo hemos demostrado, la modulación intracelular de lipasa en hepatopáncreas de *N. granulata* la cual podría estar relacionada con la modulación en paralelo de reservas de triglicéridos (Michiels et al., 2015b).

Con el objetivo de ampliar los estudios de identificación y caracterización bioquímica de α -amilasa, se decidió realizar la clonación y posterior determinación de las características de la secuencia de esta enzima en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *N. granulata*. Se obtuvo una secuencia parcial de ADNc de α -amilasa de hepatopáncreas que tiene 1.637 pb y codifica 459 residuos de aminoácidos. En el camarón *P. vannamei*, se ha descrito que las secuencias de α -amilasa consisten en aproximadamente 1.600 pb, mientras que en la langosta *P. argus* la secuencia consiste en 1.539 pb y los nucleótidos son altamente conservados (Van Wormhoudt y Sellos, 1996; Rodríguez-Viera et al., 2016). El alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de proteínas revela que la secuencia de α -amilasa de *N. granulata* tiene regiones conservadas tales como el sitio de unión al Ca^{+2} , sitio de reconocimiento del sustrato y el sitio catalítico (Asp, Glu y Asp), los cuales se encuentran comúnmente en amilasas de animales (Grossi de Sa y Chrispeels, 1997; Strobl et al., 1998; Janeček et al., 1997; Bezerra et al., 2014; Peng et al., 2015). Estas regiones son esenciales para el funcionamiento de la α -amilasa (Kuriki e Imanaka, 1999; Kumari et al., 2012). Como esperábamos, el árbol resultante del análisis filogenético basado en las secuencias de proteínas deducidas de diferentes grupos de animales (crustáceos, insectos, moluscos y vertebrados) mostró que la secuencia de α -amilasa de *N. granulata* pertenece al grupo de los crustáceos.

En vertebrados, la amplia cantidad de formas de α -amilasa se atribuye a diferentes genes que codifican distintas amilasas, así como a modificaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales (ej. glicosilación y desamidación) (Karn et al., 1973; Zakowski y Bruner, 1985; Hirtz et al., 2005; Takashima y Amano, 2012). En crustáceos decápodos, se ha clonado y secuenciado tres secuencias de ADNc de α -amilasa en hepatopáncreas del camarón *P. vannamei* (Van Wormhoudt y Sellos, 1996) y

una sola secuencia en la langosta *P. argus* (Rodríguez-Viera et al., 2016). En el presente capítulo, los resultados del análisis por zimograma mostraron la existencia de cinco formas de α -amilasa con actividad amilolítica. Sin embargo, los resultados de la clonación revelaron la presencia de una sola secuencia de ADNc de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*, lo cual permite sugerir que las distintas formas presentes podrían ser el resultado de modificaciones post-traduccionales de esta enzima. Resultados similares fueron descritos para anfípodos del género *Gammarus* (Borowsky et al., 1984), el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lombraña et al., 2005) y la langosta *P. argus* (Rodríguez-Viera et al., 2016). En la secuencia de ADNc de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* se encontraron tres posibles sitios de O-glicosilación, lo que sugeriría que la glicosilación podría explicar la existencia de cinco formas con actividad amilolítica en este cangrejo. Se ha sugerido que las diferencias en la glicosilación puedan explicar la alta cantidad de formas de α -amilasa en crustáceos (Van Wormhoudt et al., 1995). Sin embargo, hasta el momento solo el trabajo de Rodríguez-Viera et al., (2016) ha mostrado la existencia de dos formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *P. argus* que podrían deberse a diferencias en la glicosilación. La realización de estudios futuros permitiría dilucidar si la glicosilación u otro mecanismo post-traduccionales (ej. proteólisis) están relacionados con la presencia de diferentes formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*.

En conclusión, los resultados del presente capítulo muestran la existencia de diferentes formas de α -amilasa con actividad amilolítica en hepatopáncreas del cangrejo *N. granulata*. La purificación parcial de la forma de α -amilasa con mayor actividad (29 kDa) y su posterior caracterización mostraron que exhibe características bioquímicas (halotolerancia, diferente sensibilidad a diversos iones y capacidad para degradar almidón y glucógeno), que podrían estar relacionadas con el hábito alimentario y las

condiciones ambientales que experimenta este cangrejo en su hábitat. La clonación parcial de la secuencia de α -amilasa y posterior caracterización molecular mostraron que presenta características (tres sitios potenciales de glicosilación, sitio de unión al Ca^{2+} , sitios de reconocimiento de sustrato y aminoácidos que participan en el sitio catalítico) similares a las descritas para otros crustáceos. Además, a través del análisis filogenético, se observó que se encuentra dentro del grupo de los crustáceos. Por último, la presencia de tres sitios de glicosilación en la secuencia sugiere la existencia de posibles modificaciones post-transcripcionales de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*.



Capítulo 2:

Tripsina en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*: clonación parcial y caracterización molecular

Introducción

Las proteínas están implicadas en varios procesos fisiológicos tales como transporte a través de membrana, movimientos coordinados, reacciones catalizadas por enzimas, protección inmunológica y mecanismos de señalización intracelular constituyendo además, componentes estructurales en una amplia diversidad de organismos (Zaia et al., 1998; Diniz et al., 2012, 2014; Jain et al., 2015; Tsiatsiani y Heck, 2015). La existencia de un adecuado nivel de proteasas en el tracto digestivo es crucial para sustentar un suministro suficiente de aminoácidos a partir de la dieta (Muhlia-Almazán et al., 2008; Carter y Mente, 2014; Cournia et al., 2015; Perera et al., 2015; Jain et al., 2015; Cao et al., 2015; Tantikitti et al., 2016).

Las proteasas, también llamadas enzimas proteolíticas, proteinasas o peptidasas, son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas de proteínas. De acuerdo al sitio de acción de la enzima, las proteasas pueden dividirse en exopeptidasas y endopeptidasas. Estas últimas, hidrolizan uniones peptídicas internas lejos del extremo terminal de la cadena polipeptídica (Mótyán et al., 2013; Rawlings, 2013; Jabalia et al., 2014; Sawant y Nagendran, 2014; Jain et al., 2015; Tsiatsiani y Heck, 2015; Verma et al., 2016).

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una endopeptidasa que pertenece al grupo de las serinproteasas que hidroliza enlaces peptídicos del lado del sitio carboxílico de residuos de Arg o Lys. Esta enzima han sido objeto de una gran cantidad de estudios debido a su papel central en la digestión de proteínas, así como en otros procesos fisiológicos o biotecnológicos importantes (Díaz-Mendoza et al., 2005; Delcroix et al., 2006; Muhlia-Almazán et al., 2008; Page y Di Cera, 2008; Perera et al., 2012 a, b, 2015; Jain et al., 2015; Tsiatsiani y Heck, 2015). La digestión de proteínas en crustáceos decápodos es

llevada a cabo por diferentes proteasas, siendo la tripsina la principal y más abundante endopeptidasa encontrada en hepatopáncreas (Lemos et al., 2000; Johnson et al., 2002; Sainz, 2004; Muhlia-Almazán et al., 2008; Vandermarliere et al., 2013; Perera et al., 2015; Wang et al., 2014; Sacristán et al., 2014, 2015). La alta actividad de tripsina en hepatopáncreas de crustáceos decápodos se ha asociado con la presencia de varias isoformas (Muhlia-Almazán et al 2008; Perera et al 2008a, b, 2015). Sin embargo, a pesar de su rol central en el metabolismo proteico, la clonación y secuenciación de tripsina en hepatopáncreas solo se ha realizado en algunas especies de cangrejos (ej. *Paralithoes camtschatices*, *Cancer pagurus*, *Scylla paramamosain*) (Rudenskaya et al., 2004; Hehemann et al., 2008; Jiang et al., 2011).

Como mencionamos en el capítulo anterior, *Neohelice granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita se comporta como omnívoro-detrítivo con una dieta con alto contenido de ítems de origen animal (Iribarne et al., 1997; Bortolus e Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Lancia et al., 2013; Bas et al., 2014). La presencia de una alta actividad proteolítica total en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiere la capacidad de digestión de ítems proteicos (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2011, 2013). , la actividad total de tripsina en hepatopáncreas de este cangrejo ha sido caracterizada parcialmente (Michiels, 2015).

El objetivo del presente capítulo fue llevar a cabo la clonación y caracterización de isoformas de tripsina en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* como paso preliminar al posterior estudio de modulación por salinidad ambiental de las mismas (capítulo 3). En este contexto, paralelamente se clonó la β -actina como paso previo en su utilización como gen de referencia en la cuantificación de los niveles de ARNm de α -amilasa y tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* (capítulo 3).

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de animales

Los individuos fueron mantenidos según lo descrito en el capítulo 1.

Preparación del hepatopáncreas

El hepatopáncreas se preparó según lo descrito en el capítulo 1.

Clonación de la secuencia parcial de ADNc de tripsina y β -actina

Las secuencias de tripsina se clonaron siguiendo la metodología indicada en el capítulo 1. Las secuencias de los “primers” degenerados utilizados para tripsina se muestran en la tabla 2.1 del presente capítulo. ClustalO se utilizó para el alineamiento de proteínas de tripsina de *Neohelice granulata* y otras especies de cangrejos: *Scylla paramamesain* (ADB55592), *Eriocheir sinensis* 1 (ABQ02519.1), *E. sinensis* 2 (ABQ02520.1), *E. sinensis* 3 (ABQ02521.1), *Portunus trituberculatus* 1 (ABQ02537.1), *P. trituberculatus* 2 (ABQ02538.1), *P. trituberculatus* 3 (ABQ02539.1), *Charybdis japonica* 1 (ABQ02512.1), *C. japonica* 2 (ABQ02513.1), *C. japonica* 3 (ABQ02514.1), *P. pelagicus* (ABM65758.1), *Paralithodes camtschaticus* (AAL67442.1).

Obtención del 3' final por Amplificación Rápida de ADNc Final (RACE) de tripsina y β -actina

La obtención del 3' RACE se determinó según materiales y métodos de capítulo 1. Los “primers forward” específicos se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Secuencia de nucleótidos de primers degenerados diseñados para identificación molecular de la secuencia parcial de ADNc de tripsina y β -actina, al igual que los primers usados para 3'RACE.

“Primers” degenerados	Secuencia de nucleótidos	Tamaño amplificado
tryp Fw ₁	5'-CCAARATCATCCARCACGARG-3'	284 pb
tryp Rv ₁	5'-AGTCACCCTGGCANGMGTC-3'	
tryp Fw ₂	5'-TTCTGCGGHGCBTCCATCTACA-3'	132 pb
tryp Rv ₂	5'-CYTCGTGYTGGATGATYTTGG-3'	
β -act Fw ₁	5'-ACCACAGCYGARMGKGAAT-3'	293 pb
β -act Rv ₁	5'-TCCKGTCWGCRAATGCCAGGGT-3'	

Nombre de “primers” 3'RACE	Secuencia de nucleótidos	Posición	Dirección
Ng Tryelong3' Fw1	5'-AAACAATACGCCGGGTTACCC-3'	18-39	“Forward”
Ng Tryelong3' Fw2	5'-TGACCTTCAACACCTTCGTT-3'	78-98	“Forward”
Ng Tryelong3' Fw3	5'-GAGAACTGGGCCGTGTGTGCC-3'	25-45	“Forward”
Ng Tryelong3' Fw4	5'-TTGGACGTTSTTRAGGGT-3'	115-132	“Forward”
Ng Tryelong3' Fw5	5'-CTGYGWYCRGSKRGRGSACT-3'	145-164	“Forward”
Ng Tryelong3' Fw6	5'-CYSWCTRCTCCTTCAKKTGT-3'	80-98	“Forward”
Ng q PCR β -act Fw1	5'-CCTCCTCCCTTGAGAAGTCC-3'	94-113	“Forward”
Ng q PCR β -act Fw2	5'-ATTCCAGCCTTCTTCTTGG-3'	179-198	“Forward”

Análisis filogenético

El análisis filogenético de la secuencias de aminoácidos de las isoformas de tripsina se realizó como se describió en materiales y métodos del capítulo 1.

Resultados

Clonación y características de las secuencias parciales de ADNc de tripsina

A través de la clonación y secuenciación se encontraron e identificaron dos isoformas de tripsina (tripsina 1 y 2). Las secuencias parciales de ADNc de las

isoformas se subieron a GenBank (número de acceso KU531568 y KU531569). La secuenciación reveló que los ADNc parciales tienen una extensión de 689 pb y 1.174 pb para tripsina 1 y tripsina 2, respectivamente.

Las secuencias parciales de nucleótidos obtenidas y de aminoácidos deducidas de las isoformas de tripsina están representadas en las figuras 2.1 y 2.2, respectivamente. Para tripsina 1, el codón de terminación (TAA) se encuentra en la posición 613 seguido de la región 3' no traducida que contiene un sitio de poliadenilación (AATAAA) en la posición 656. La secuencia codifica 204 residuos de aminoácidos e incluye los residuos de aminoácidos conservados que participan en la triada catalítica (H¹⁷-D⁶⁸-S¹⁶⁰), la especificidad de sustrato de tripsina (D¹⁵⁴) y la región conservada del sitio catalítico (CQGDSGGP) en la posición 156-163.

```

      F C G A S I Y S E N W A V C A 15
5'-ttctgCGGCGcctccatctacagCGagaactgggCGgtgtgtgCC 45
  G H C V Q G E D F E N P D Y L Q 31
ggtcactgCGtccaggggagaggacttcgagaaccctgactaccttcag 93
  V V A G E Q D L D V V E G N E Q 47
gttggtgctggCGagcaagatttggacggttgttgagggtaatgagcag 141
  E V V L S K I I Q H E D Y N G F 63
gaggttgttctgtccaagatcatccagcagcaagattacaacgggttc 189
  T I S N D I S L L Q L S S P L T 79
accatcagcaacgacatttcccttctccaactgtcctcccctctgacc 237
  F N T N V G S I G L Q T V K E Y 95
ttcaacaccaacggttgatctatcggctctgcagactgtaaaggagtac 285
  I G D C V V S G W G T L T E D G 111
atcgggagactgCGttgtgtccggctggggcactcaggaagatggc 333
  S T P S I L Q Y V D V P T V S D 127
agcactccctctatccttcagtatgtcgatgtccccactgtcagtgac 381
  A E C R D A Y G Q N D I D D S M 143
gctgaatgtcCGcagcgttacggacaaaacgacatcgatgactccatg 429
  I C A G L P E G G V D A C Q G D 159
atctgCGctggcctaccCGagggaggagtggacgcctgccaggggtgac 477
  S G G P L A C G G L L T G I V S 175
tctgggtggacctctggCGgtgtggCGgacctcctgaccggcatcgtgtcc 525
  W G Y G C A R P G Y P G V Y T E 191
tggggctatggctgtgcccCGcctggataccccggCGgtgtacactgag 573
  V A Y F T D W V E A N A S * 204
gtggcctacttcacggactgggtcgaagctaattgcttcataaattgca 621
tttcttctctctggCGgtgtgctgCCagacacaataaacacggcac 669
acacggcccagttctcatct-3' 689

```

Figura 2.1.- Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de ADNc de tripsina 1 de *Neohelice granulata*. La secuencia deducida de aminoácidos se muestra en letras mayúsculas en negrita y por encima de la secuencia de nucleótidos. El codón Stop (TAA) y la secuencia señal de poliadenilación (AATAAA) están representadas en negrita, cursiva y subrayada. Los aminoácidos conservados que participan en la triada catalítica (His-Asp-Ser) están en gris. El residuo de Asp que determina la especificidad del sustrato de tripsina se muestra en negro. El recuadro señala el motivo conservado del sitio catalítico.

La figura 2.2 muestra la secuencia de ADNc y aminoácidos deducidos de la isoforma 2 de tripsina. Similarmente a la isoforma 1, la secuencia presenta el codón de terminación (TAA) en la posición 456 seguida de la región 3' no traducida que contiene los sitios de poliadenilación (AATAAA) en las posiciones 497 y 1.065,

respectivamente. La secuencia codifica 151 residuos de aminoácidos, e incluye D¹⁰¹ que determina la especificidad de sustrato de tripsina y la región conservada del sitio catalítico (CQGDSGGP) en la posición 103-110.

	K I I Q H E Q Y N G F T L S N	15
5´-	ccaaaatcatccagcagcaacaatacaacgggttcaccctcagcaac	47
	D I S L L Q L S Q P L T F N T F V	32
	gatatttcccttctccaactgtctcagcctctgaccttcaacaccttcggt	98
	G S I D L Q S E K E Y S G E C T V	49
	ggatctatcgatctgcagagtgaaaaggagtacagtgaggagaatgcactgtg	149
	I G W G T T E E G G E T P S V L Q	66
	atcggctggggcactaccgaggagggggcgaaactccctctgtccttcag	200
	F V D L P A V T D A E C R E V Y G	83
	tttgatgatctccccgctgtcactgacgctgagtgctcgcaagtttacgga	251
	E E V E D S M I C A G V S A G G V	100
	gaagaagtgcgaagactccatgatctgcgctggagtatccgcgaggaggagtg	302
	D A C Q G D S G G P L T C G G L L	117
	gacgctgccaaggtgactctggtggacctctgacgtgtggcggcctcctg	353
	T G I V S W G Y G C A R P D S P G	134
	accggcatcggtgctctgggggttatggctgtgcccgcctgacagccccggc	404
	V Y A E V A Y F T D W V E A N V S	151
	gtgtacgccgaggtggcctacttcacggactgggtcgaagccaatgtctcg	455
	*	
	<i>taaat</i> gccattttcctctctggctgggtgtgcagtcagacac <i>aat</i> aaacaag	506
	tcacagagaactttgctttcagtcctttctagttgtaatgggtgtttcgacat	557
	gtatagtccagaccgggtgcaaaaatcaaattatacagagttataaatattga	608
	gtacgttaagacgacgggtaaatcgtgtgttttaaggaagcgcctgggggt	659
	tgattttttaacgaatatttcttaaatccacgaaatagtttttctcgtctc	710
	aacatgctgaggataccatgaaatatcaggtagtgaagtttttttttctc	761
	gaatttaagaatggcgtccctttaagacatttactaaccactaaagctct	812
	ggcgttaaaactctctccaataagtagccactgatataacttttcgta	863
	tacatcaaattctctgacacaaagactcacgcaaacacgcacgaacaatac	914
	aacgacactcacaccaactacaaaacacacacacacacacacacacaca	965
	cacaccgggtatcagtatcagtcaggtgaggtgtggtgtggcaggtcacctt	1016
	cctcttaattaacaactcacctgaactgtctcataacatcaccaaat <i>aat</i>	1067
	<i>aaag</i> tcaatacctgttctatttagaggcgcacaaaacacatttctaagcgt	1118
	tgccgagtcggatttccaacacgatcataaacaacacgtgtctattaac	1169
	gtaaa-3´	1174

Figura 2.2.- Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida de ADNc de tripsina 2 de *N. granulata*. La secuencia deducida de aminoácidos se muestra en letras mayúsculas en negrita y por encima de la secuencia de nucleótidos. El codón Stop (TAA) y las secuencias señal de poliadenilación (AATAAA) están representadas en negrita, cursiva y subrayada. Dos de los tres aminoácidos conservados que participan en la triada catalítica (His-Asp-Ser) están en gris. El residuo de Asp que determina la especificidad del sustrato de tripsina se muestra en negro. El recuadro señala el motivo conservado del sitio catalítico.

El alineamiento múltiple entre diferentes secuencias de proteínas deducidas de tripsinas de diferentes especies de cangrejos presenta un alto grado de conservación de los residuos de aminoácidos involucrados en la triada catalítica (HDS), en el residuo de D que determina la especificidad del sustrato y en la región del sitio catalítico (CQGDSGGP) (Figura 2.3). Además, la secuencias de aminoácidos deducidas de ambas isoformas de tripsina de *N. granulata* muestran un alto grado de identidad (55-89%) con respecto a tripsinas de otros cangrejos (Tabla 2.2).

<i>N. granulata</i> 1	-----FCG	3
<i>N. granulata</i> 2	-----	0
<i>E. sinensis</i> 1	-----DISFGFQFHFCG	12
<i>E. sinensis</i> 2	-----DISFSSPFHFCG	12
<i>E. sinensis</i> 3	-----DISFGFQFHFCG	12
<i>S. paramamosain</i>	MKTLVLCLLVAGALAAPSRKPTFRRLNRIVGGEDTVHGEFQYQLSLQDTSYSNPNWHFCG	60
<i>P. trituberculatus</i> 1	-----DISFGFAFHFCG	12
<i>P. trituberculatus</i> 2	-----DVSFGFAFHFCG	12
<i>P. trituberculatus</i> 3	-----DISFGFAFHFCG	12
<i>C. japonica</i> 1	-----DTSYGYKFHFCG	12
<i>C. japonica</i> 2	-----DVSYGYKFHFCG	12
<i>C. japonica</i> 3	-----DNSWGTAWHFCG	12
<i>P. pelagicus</i>	MRTLVLCLLVAGALAAPSRKPTFRRLNRIVGGEDTLHGEIQYQLSLQDTSYTEPNWHFCG	60
<i>P. camtschaticus</i>	MKYLVFCLLLGAAFAAPSRKPTFRRLNKNIVGGTEVTPGEIPYQLSFQDTSFGGGEFHFCG	60
<i>N. granulata</i> 1	ASIIYSENWAVCAGHCVQGEDFENPDYLQVVAGEQDLVDVVEGNEQEVVLSKIIQHE-DYNG	62
<i>N. granulata</i> 2	-----KIIQHE-QYNG	10
<i>E. sinensis</i> 1	ASIIYENWVGCAGHCVQGEDFNNPDYLQVVAGEQDLVDVDEGNEQAIVLSKIIQHE-DYNG	71
<i>E. sinensis</i> 2	ASIIYKNWVGCAGHCVQGGDFNNPDYLQVVAGEQELYVDEGNEQAIVLSKIIQHE-DYNG	71
<i>E. sinensis</i> 3	ASIIYENWVGCAGHCVQGEDFNNPDYLQVVAGEQDLVDVDEGNEQAIVLSKIIQHE-DYNG	71
<i>S. paramamosain</i>	GTLYNEHWGITACHCLQY-DVDNPGIVQAVAGEYTLLEANDGSEQAARLDEIILHP-YFDS	118
<i>P. trituberculatus</i> 1	ASIIYENWVAICAGHCVQGEDMNNPDYLQVVAGEHNRDVEGNEQTVLSKIIQHE-DYNG	71
<i>P. trituberculatus</i> 2	ASIIYENWVAICAGHCVQGGDFDNPYLVQVVAGEHNFVNEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNG	71
<i>P. trituberculatus</i> 3	ASIIYSENWVVCAGHWVQGENMNPDDYLQVVAGEHNRDVEGNEQTVLSKIIQHE-EYNC	71
<i>C. japonica</i> 1	ASIIYSENWVVCAGHWVQGENMYSQDYLVQVAGDHTLYVNDGYEQVLSKIIQHETDYNS	72
<i>C. japonica</i> 2	ASIIYSENWVVCAGHWVQGENMYSQDYLVQVAGDHTLYVNDGYEQVLSKIIQHE-EYNC	71
<i>C. japonica</i> 3	ASIIYENWVAICAGHCVQGGDFDNPYLVQVVAGEHNFVNEGNEQTVVLSKIIQHE-DYNG	71
<i>P. pelagicus</i>	GTLYNDHWGITACHCLQY-DVANPGIVQAVAGEYLVKVNDSGSEQPRKLEIILHP-HFDS	118
<i>P. camtschaticus</i>	ASIIYKDTWAICAGHCVQGEDFDSPASLQIVAGDHTLYSAEGNEQKIAVSKIIQHE-DYNG	119
	: * * * : :	
<i>N. granulata</i> 1	FTIISNDISLLQLSSPLTFNTFVGSITGLQTVK-EYIGDCVVSQGWGTLTEEDGSTPSVLQYVD	121
<i>N. granulata</i> 2	FTIISNDISLLQLSSPLTFNTFVGSITGLQSEK-EYSGETVIGWGTTEEGGSTPSVLQYVD	69
<i>E. sinensis</i> 1	FTIISNDISLLQLSSPLTFNFSFVGPVGLQSVK-EYIGDCVVSQGWGTTSEGGSTPSVLQYVD	130
<i>E. sinensis</i> 2	FTIISNDISLLQLSSPLTFNFSFVGPVGLQSVK-EYMGDCVVSQGWGTTSEGGSSPSVLQYVD	130
<i>E. sinensis</i> 3	FTIISNDISLLQLSSPLTFNFSFVGSVGLQSVK-EYIGDCVVSQGWGTTSEGGSTPSVLQYVD	130
<i>S. paramamosain</i>	SLLVNDVALIHFPQTMVYDDYVNPVIGLQEEKELVGVECTVTGWGALSEGGSAAATVLQKVH	178
<i>P. trituberculatus</i> 1	FTIISNDISLLKLSQPLTFNPFVGPALPEAGHAASGDCIVSGWGALSEGGSPPSVLQKVS	131
<i>P. trituberculatus</i> 2	WTIISNDISLLKLSQPLTFNDFVAPIAIPAAGHAASGDCIVSGWGTTSEGGSTPSTLMKVT	131
<i>P. trituberculatus</i> 3	FTIISNDISLLKLSQPLTFNPFVGPALPEAGHAASGDCIVSGWGALSEGGSPPSVLQKVS	131
<i>C. japonica</i> 1	FTLGNDVSLQLSESLTFDNRVKKIDLQSEK-EFLGECVVSQGWGTTTEEGDSDPNLYYVD	131
<i>C. japonica</i> 2	FTLGNDVSLQLSESLTFDNRVKKIDLQSEK-EFLGECVVSQGWGTTTEEGDSDPNLYYVD	130
<i>C. japonica</i> 3	FTIISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDIPAQGHAAASGDCIVSGWGTTSEGGSTPSVLQKVT	131
<i>P. pelagicus</i>	GLLINDVALIHFPEAMIYDEYVNPVIGLQEEKNLVGVDCVTGWGALSEGGAASVQLQKVH	178
<i>P. camtschaticus</i>	FSISNDISLLQFASPLTFNFSFVGPVIALPAQGVASGDCCTCTGWGTTTEGGYSSDALLKVT	179
	: * * : * : : : * : : : * * * : * * : * *	
<i>N. granulata</i> 1	VPT-VSDAECRDAYGQNDIDDSMICAGLPEGGVDA CQGDSSGGPLACGG----LLTGIVSW	176
<i>N. granulata</i> 2	LPA-VTDAECREYVGE-EVEIDSMICAGVSAAGVDA CQGDSSGGPLACGG----LLTGIVSW	123
<i>E. sinensis</i> 1	VPT-VSDADCRAAYGENDIDDSMICAGLPEGGVDA CQGDSSGGPMVCGG----LLT-----	180

<i>E. sinensis</i> 2	VPT-VSDADCRAAYGESDIDDSMICAGLPEGGVDA CQ GDSGGPTVCGG----LLT-----	180
<i>E. sinensis</i> 3	VPT-VSDADCRAAYGENDIDDSMICAGLPEGGVDA CQ GDSGGPMVCGG----LLT-----	180
<i>S. paramamosain</i>	VPT-VSDEECRISYY--GIEDSMICAGYPEGG KDA CQ GDS GGPMVCKG----YLTGIVSW	231
<i>P. trituberculatus</i> 1	VPI-VSDAECRDAYGQNDIDDSMICAGVPEGG KDS CQ GDS GGPLACSDTGSPYLA-----	185
<i>P. trituberculatus</i> 2	VPI-VSDEECRAAYGDSEVEDSMICAGVPEGG KDS CQ GDS GGPLACSDTGSTYLA-----	185
<i>P. trituberculatus</i> 3	VPI-VTDAECCKHYGENQIDDSMICVGLPEGG KDA CQ GDS GGPLACSDTGSPYLA-----	185
<i>C. japonica</i> 1	LPTV-TDTECRKHYGENQIDDSMICAGLPEGG KDA CQ GDS GGPLACSDTGSTYLA-----	185
<i>C. japonica</i> 2	LPTVVTD AECCKHYGENQIDDSMICVGLPEGG KDA CQ GDS GGPLACSDTGSTYLA-----	185
<i>C. japonica</i> 3	VPI-VSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGG KDS CQ GDS GGPLACSDTGSTYLA-----	185
<i>P. pelagicus</i>	VPT-VSDEECRTSYS--GIEDSMICAGYPEGG KDA CQ GDS GGPMVCKG----YLTGIVSW	231
<i>P. camtschaticus</i>	MPI-VSDADCRAASYGESDIDDSMICAGV PQGGKDA CQ GDS GGPLACSDTGSPYLAGIVSW	238
	:* :* :* * :*****.* ** *.******.* * :	
<i>N. granulata</i>1	GYGCAR P GY P GVY T EVAYFTD W VEAN A S	204
<i>N. granulata</i>2	GYGCAR D SPGVY A EVAYFTD W VEAN S	151
<i>E. sinensis</i> 1	-----	180
<i>E. sinensis</i> 2	-----	180
<i>E. sinensis</i> 3	-----	180
<i>S. paramamosain</i>	GYGCARPNYPGVY T EVAYFVD W I I ANAV	259
<i>P. trituberculatus</i> 1	-----	185
<i>P. trituberculatus</i> 2	-----	185
<i>P. trituberculatus</i> 3	-----	185
<i>C. japonica</i> 1	-----	185
<i>C. japonica</i> 2	-----	185
<i>C. japonica</i> 3	-----	185
<i>P. pelagicus</i>	GYGCARPNYPGVY T EVAYFVD W ITANTV	259
<i>P. camtschaticus</i>	GYGCARPNYPGVY C EVAY Y V D WVLANSS	266

Figura 2.3.- Alineamiento de las secuencias de proteínas de tripsinas de *N. granulata* y diferentes especies de cangrejos usando Clustal Omega. Los aminoácidos conservados que participan en la triada catalítica (His-Asp-Ser) están en gris. El residuo de Asp que determina la especificidad del sustrato de tripsina se muestra en negrita y marcada con una flecha sobre la columna. El recuadro señala el motivo conservado del sitio catalítico. Los aminoácidos que difieren entre las isoformas de *N. granulata* se muestran marcados en negro. *S. paramamosain* (ADB55592), *E. sinensis* 1 (ABQ02519.1), *E. sinensis* 2 (ABQ02520.1), *E. sinensis* 3 (ABQ02521.1), *P. trituberculatus* 1 (ABQ02537.1), *P. trituberculatus* 2 (ABQ02538.1), *P. trituberculatus* 3 (ABQ02539.1), *C. japonica* 1 (ABQ02512.1), *C. japonica* 2 (ABQ02513.1), *C. japonica* 3 (ABQ02514.1), *P. pelagicus* (ABM65758.1), *P. camtschaticus* (AAL67442.1). Los símbolos en la secuencia conservada indican: identidad (*), sustituciones conservadas (:), y sustituciones semi-conservadas (.)

Tabla 2.2.- Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de tripsina de *N. granulata* y otros cangrejos.

	<i>N. granulata1</i>	<i>N. granulata2</i>
<i>N. granulata1</i>	100	88,30
<i>N. granulata2</i>	88,30	100
<i>E. sinensis1</i>	84,21	75,42
<i>E. sinensis2</i>	88,89	74,58
<i>E. sinensis3</i>	55,22	76,27
<i>S. paramamosain</i>	77,19	56,00
<i>P. trituberculatus1</i>	71,35	66,10
<i>P. trituberculatus2</i>	71,35	66,10
<i>P. trituberculatus3</i>	71,35	65,25
<i>C.japonica1</i>	69,41	66,67
<i>C. japonica2</i>	68,42	66,10
<i>C. japonica3</i>	73,68	65,25
<i>P. pelagicus</i>	55,22	55,33
<i>P. camtschaticus</i>	67,65	66,23

Derivados de pares de nucleótidos y alineamiento de secuencia de aminoácidos usando ClustalO.

Análisis filogenético de las isoformas de tripsina de *N. granulata*

El árbol filogenético se construyó con el objetivo de determinar la relación de la secuencia de aminoácidos deducidas de tripsinas de *N. granulata* con tripsinas de otros crustáceos usando el análisis de Neighbor-Joining (Figura 2.4). La secuencia de tripsina de la bacteria *Streptococcus equines* se utilizó como grupo externo. En las relaciones evaluadas se pueden distinguir dos grupos, un de ellos con tripsinas del grupo Brachyura, y otro que incluye principalmente las tripsinas de Palinura (*Panulinus argus*), Astacoidea, Penaeoidea, Caridea y Euphausiacea. Previamente, se evidenció la relación cercana entre tripsinas de Penaeidae, Caridea y Euphausiacea (Shi et al., 2009; Perera et al., 2010a).

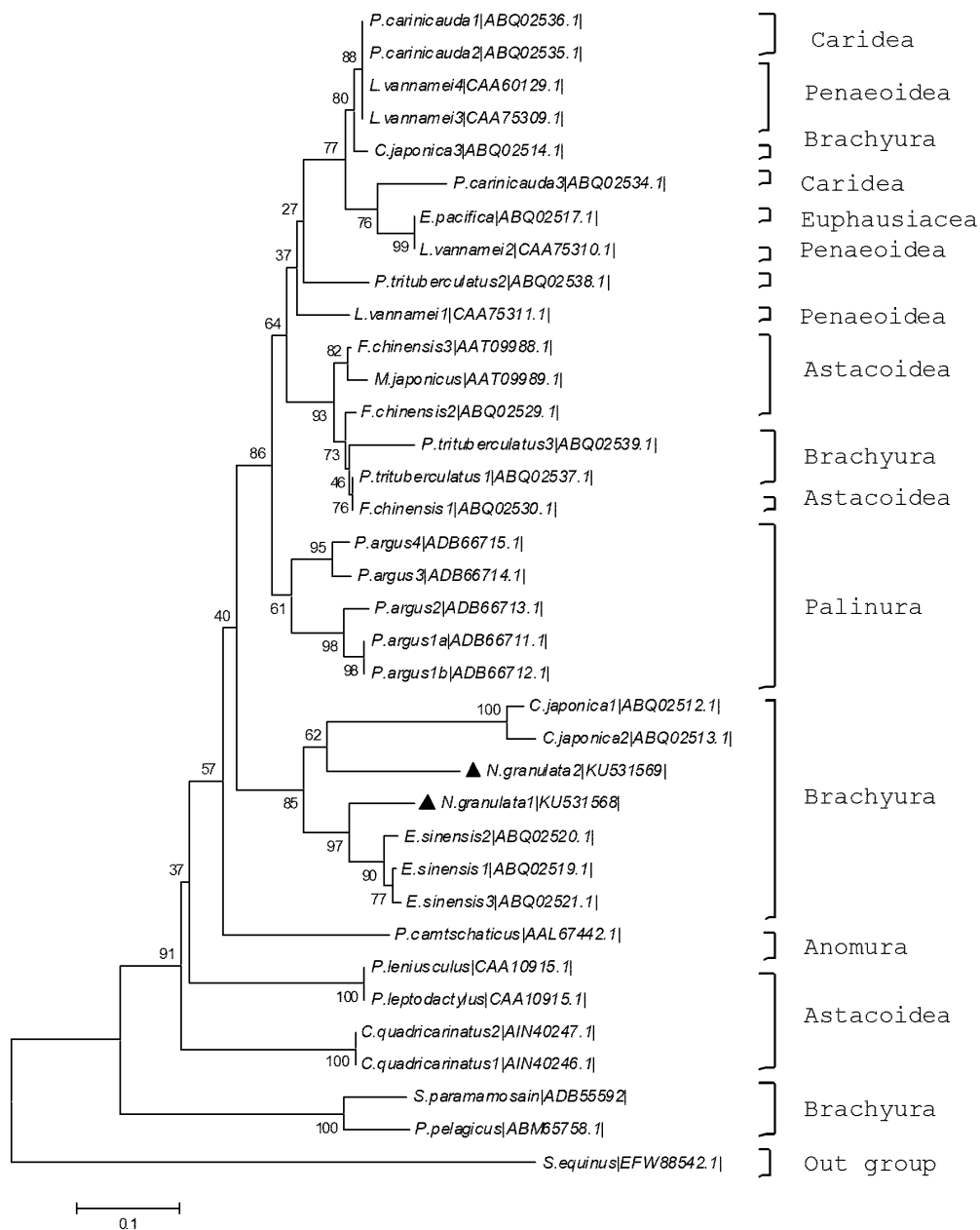


Figura 2.4.- Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos deducidas de tripsina de diferentes crustáceos incluyendo el cangrejo eurihalino *N. granulata*, y de un grupo externo usando el análisis Neighbor-Joining y basado en las diferencias de aminoácidos (distancia p). La confiabilidad del árbol se evaluó por bootstrapping (1.000 repeticiones). Las especies utilizadas y el número de acceso se muestran en el árbol. La localización de las secuencias de tripsina de *N. granulata* se indica con un triángulo negro.

Clonación de la secuencia parcial de ADNc de β -actina

La secuencia parcial de β -actina se identificó y subiendola además al GenBank (número de acceso, KU531570). La secuencia parcial y aminoácidos deducidos de β -actina de hepatopáncreas de *N. granulata* se muestran en la figura 2.5. La secuenciación reveló una secuencia de ADNc de β -actina de 349 pb. La secuencia presenta el codón de terminación (TGA) en la posición 327 a 329 y codifica 108 residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos deducida de β -actina de *N. granulata* es muy similar a la secuencia de otros cangrejos tales como *Scylla serrata*, *S. paramamosain* y *E. sinensis* (98% de identidad en todos los casos) (datos no mostrados).

T A E R E I V R D I K E K L C Y V A	18
5´- ccacagctgagagggaaatcgtgcgcgatatcaaggagaagctttgctatgtcgct	56
L D F E S E M N V A A A S S S L E K S Y	38
cttgacttcgaaagtgagatgaacgtggctgctgcctcctcctcccttgagaagtcctac	116
E L P D G Q V I T I G N E R F R A P E S	58
gagctgcccgatggtcaggatcaccatcggcaacgagcgccttccggtgcaccagaatct	176
L F Q P S F L G M E S V G I H E T V Y N	78
ctattccagccttcttcttgggtatggaatctggttggcattcacgagaccgtctacaac	236
S I M R C D I D I R K D L F A N N V M S	98
tccataatgagatgcgacattgacatcaggaaggacctgtttgcaaacaacgtaatgtct	296
G G T T M Y P G I A *	108
ggcggcaccaccatgtaccctggcatcgca <u>tga</u> ccggatctgcggaaaaattg-3´	349

Figura 2.5.- Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos de ADNc de β -actina de *N. granulata*. La secuencia de deducida de aminoácidos se muestra en letras mayúsculas en negrita y por encima de la secuencia de nucleótidos. El codón Stop (TGA) es representado en negrita, cursivo y subrayado.

Discusión

Los estudios de determinación sobre características moleculares de enzimas digestivas como tripsina en tracto digestivo constituyen un paso importante en el conocimiento de la fisiología bioquímica digestiva. En cangrejos eurihalinos solo se ha realizado la clonación de tripsina de hepatopáncreas de *Scylla paramamosain* (Jiang et al., 2011). La actividad total de tripsina en hepatopáncreas de *Neohelice granulata* de la planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita (Lancia et al., 2013; Michiels, 2015), ha sido parcialmente caracterizada en nuestro laboratorio (Michiels, 2015).

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 como sustratos para los procesos metabólicos (Pavasovic et al., 2004, 2007, Figueiredo y Anderson, 2009, Ramirez-Otarola et al., 2011; Fairwather et al., 2012). *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita se comporta como omnívoro-detritívoro con una dieta con alto contenido de ítems de origen animal (ej. diatomeas, nematodos, foraminíferos, poliquetos y restos de crustáceos) (Iribarne et al., 1997; Bortolus e Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Lancia et al., 2013; Bas et al., 2014). Por lo tanto, la presencia de una alta actividad proteolítica total y la posterior identificación y caracterización de la actividad de las diferentes proteasas presentes (ej. tripsina) (Pironi, 2009; Michiels, 2015), permitiría sugerir la capacidad de *N. granulata* para la digestión de ítems proteicos presentes en su dieta.

La tripsina apareció temprano en la evolución y está presente en todos los fila (Muhlia-Almazán et al., 2008; Perera et al., 2015; Jain et al., 2015; Tsiatsiani y Heck, 2015). La diversidad de tripsina es particularmente alta en crustáceos decápodos (Perera

et al., 2015) y es reconocida como una enzima polimórfica (Klein, 1998; Muhia-Almazán et al., 2008; Perera et al., 2015). En crustáceos, los genes que codifican tripsina están organizados en familias multigénicas dando lugar a varias isoformas. Hasta el momento, es escaso el conocimiento sobre el impacto fisiológico de la existencia de distintas isoformas (Perera et al., 2015). Nuestros resultados revelaron la existencia de dos isoformas de tripsina y la secuencia de aminoácidos predicha para tripsina 1 y 2 en hepatopáncreas de *N. granulata*. La secuencia parcial de tripsina 1 tiene una longitud de 689 pb, mientras que la isoforma 2 presenta una longitud de 1.174 pb, codificando 204 y 151 residuos de aminoácidos, respectivamente. En el cangrejo eurihalino *S. paramamosain*, la secuencia de tripsina consiste en 881 pb (Jiang et al., 2011). Las secuencias de aminoácidos de tripsina 1 y 2 fueron similares a las de otros cangrejos (ej. *Paralithodes camtschaticus* y *Scylla paramamosain*) (Rudenskaya et al., 2004; Jiang et al., 2011) .. Ambas isoformas de *N. granulata* presentan los residuos conservados que forman el sitio activo (His, Asp y Ser), así como los residuos de aminoácidos His, Asp y Gly que determinan el sitio de unión al sustrato (Muhlia-Almazán et al., 2008; Perera et al., 2015). Además, como esperábamos, el análisis filogenético de tripsina de varios crustáceos mostró que la secuencia de proteínas de las dos isoformas de hepatopáncreas en *N. granulata* pertenece al grupo de los braquiura y que ambas isoformas se encuentran cerca de las secuencias de proteínas de los cangrejos *Charybdis japonica* y *Eriocheir sinensis*.

En conclusión, los resultados del presente capítulo muestran la existencia de dos isoformas de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*, las cuales exhiben características comunes a la de otros cangrejos (ej. aminoácidos involucrados en la triada catalítica, el residuo de D que determina especificidad de sustrato y la región del sitio catalítico). Además por análisis filogenético, se determinó que ambas isoformas se

encuentran cerca de las secuencias de proteínas de otros cangrejos. Estos resultados constituyen un aporte importante para incrementar el conocimiento actual sobre procesos digestivos a nivel molecular en cangrejos y para la posterior realización de estudios sobre modulación de esta enzima en relación a factores externos e internos (ej. salinidad ambiental) (capítulo 3).



Capítulo 3:

**Flexibilidad fenotípica en respuesta a la
salinidad en *Neohelice granulata*: expresión,
número de formas y actividad de α -amilasa y
tripsina**

Introducción

La flexibilidad fenotípica implica cambios reversibles en las características fenotípicas de los individuos (desde molecular a organismo) que pueden aumentar las posibilidades de supervivencia principalmente en aquellos que enfrentan cambios frecuentes en las condiciones externas (Piersma y Drent, 2003; Pfenning et al., 2010; Kelly et al., 2012; Buehler et al., 2012; McWilliams y Karasov, 2014; Murren et al., 2015; Wright y Turko, 2016). Las enzimas digestivas desempeñan un rol esencial, ya que son un vínculo funcional entre la digestión, absorción y asimilación de nutrientes. En varios animales, se ha propuesto que la modulación de la actividad de enzimas digestivas en respuesta a cambios en las condiciones ambientales puede conducir a ajustes digestivos a nivel bioquímico (del Valle et al., 2004, 2006; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Zhang et al., 2016). Sin embargo, los estudios sobre modulación de enzimas digestivas en grupos de importancia ecológica, tales como en cangrejos eurihalinos, son aún limitados (Asaro et al., 2011a; Wang et al., 2013; Michiels et al., 2013, 2015a; Pinoni et al., 2011, 2013, 2015a).

Los cangrejos eurihalinos intermareales que habitan zonas de planicie de mareas de lagunas costeras y estuarios están expuestos a cambios en la salinidad ambiental (McNamara y Faria, 2012; Henry et al., 2012; Romano y Zeng, 2012; Havird et al., 2013, 2016). En este contexto, la adaptación bioquímica a la salinidad ambiental es un proceso complejo que involucra la participación de diferentes ajustes en varios tejidos y órganos extrabranquiales tales como hepatopáncreas (Pinoni y López Mañanes, 2008a, 2009; Michiels et al., 2013, 2015a; Pinoni et al., 2013, 2015a). En cangrejos osmorreguladores, los diferentes patrones de salinidad ambiental en el intermareal que impliquen diferentes respuestas osmorregulatorias (hipo o hiperregulación), pueden

imponer desafíos diferenciales que podrían llevar a ajustes en procesos digestivos/absortivos a nivel molecular y/o bioquímico. Como mencionamos previamente, el hepatopáncreas de los crustáceos decápodos, tiene un papel principal en la digestión y almacenamiento de nutrientes, siendo el principal sitio de síntesis de enzimas digestivas (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003; Ong y Johnston, 2006; Zeng et al., 2010; Wang et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Saborowski, 2015; Sacristán et al., 2014, 2015, 2016; Bibo-Verdugo et al., 2015, 2016). Así, diferentes niveles de actividad de enzimas digestivas específicas en el hepatopáncreas se han relacionado con la posibilidad de una disponibilidad diferencial de sustratos (ej: hidratos de carbonos, lípidos y proteínas) en relación a la baja salinidad (Li et al., 2008; Asaro et al., 2011a; Romano y Zeng., 2012; Wang et al., 2013; Michiels et al., 2015a). No obstante, faltan estudios integrativos sobre la modulación a nivel bioquímico y molecular (ej. expresión genética, variación en el número de formas de enzimas digestivas claves tales como α -amilasa y tripsina) en relación a la exposición a baja y alta salinidad ambiental. En este contexto, el trabajo de Nikapitiya et al., (2014) en el cangrejo *Macrophthalmus japonicas*, evaluó el efecto de la salinidad ambiental sobre los niveles de expresión de tripsina en el hepatopáncreas de un cangrejo eurihalino.

Los individuos de *Neohelice granulata* de la planicie de la laguna costera de Mar Chiquita se encuentran expuestos a cambios abruptos, frecuentes y altamente variables en la salinidad ambiental (2-47‰ de salinidad) (Spivak et al., 1994; Fanjul et al., 2008; Luppi et al., 2013; observaciones personales). En este contexto, previamente hemos demostrado la existencia de respuestas complejas e integrativas en individuos de *N. granulata* expuestos a largo plazo a baja y alta salinidad (López Mañanes et al., 2000; Pinoni y López Mañanes, 2009; Pinoni et al., 2005, 2013, 2015a). La modulación diferencial por salinidad de la actividad total de α -amilasa, en hepatopáncreas de *N.*

granulata ha sido observada en distintas condiciones de osmorregulación (hiper/hiporregulación) (Asaro et al., 2011a). La existencia de distintas formas con actividad amilolítica y la clonación de una secuencia de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* ha sido indicada y demostrada en el capítulo 1. Como mencionamos anteriormente (capítulo 1) el número de formas de α -amilasa puede variar en respuesta a diferentes factores (Le Moullac et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Aragón-Axomulco et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016). En este contexto, los objetivos del presente capítulo son:

- a) Estudiar el efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión, número de formas y actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*;
- b) Estudiar el efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión y actividad total de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*.

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de animales

Individuos de *Neohelice granulata* fueron capturados y mantenidos en condiciones controladas de temperatura y alimentación como se describió previamente en el Capítulo 1 y fueron aclimatados durante 10 días en acuarios a 35‰ de salinidad (condiciones de osmoconformación), a baja (10‰ de salinidad, condición de hiperregulación) y alta salinidad (37‰ de salinidad, condición de hiporregulación) (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013, 2015a; Michiels, 2015). Se utilizó entre 5 y 8 individuos por salinidad. Los individuos fueron privados de alimento 120 h antes de los experimentos (Méndez et al., 2011, 2012).

Preparación de hepatopáncreas

El hepatopáncreas se procesó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos del capítulo 1.

Osmolalidad de la hemolinfa

La osmolalidad de la hemolinfa se determinó según materiales y métodos del capítulo 1.

Cuantificación de los niveles de expresión de ARNm de α -amilasa y tripsina

El aislamiento del ARN total, cuantificación y determinación de la calidad fueron determinados como se describió previamente en el capítulo 1. Primero, varias cantidades de ADNc se aplicaron por triplicado (6 series de ½ diluciones de 10 ng a 0,325 ng por reacción) para verificar la linealidad del experimento y eficiencia de amplificación para cada uno de los pares de “primers” específicos diseñados (tabla 3.1). Aunque el ensayo fue lineal a lo largo de las 6 series de diluciones (amy: $r^2 = 0.972$, eficiencia (E) = 0.99; β -actina: $r^2 = 0.991$, E = 1.01), se utilizaron 10 ng de ADNc en cada reacción de qPCR luego de la síntesis de primera banda de ADNc usando el kit síntesis ADNc qSCRIPT™ (Quanta Biosciences). Finalmente, cada mezcla de reacción (10 μ l) contenía 4 μ l de templado (10 ng), 0,5 μ l de cada primer forward y reverse a su correspondiente concentración final (Tabla 3.1) y 5 μ l de PerfeCTa SYBR® Green FastMix™ (Quanta BioSciences). Las reacciones se llevaron a cabo en Hard-Shell® PCR Placas de 96 pocillos WHT/CLR (Bio-Rad) cubiertas con el film adhesivo Microseal® 'B' (Bio-Rad). Los procedimientos de termociclado se realizaron en un sistema en tiempo real CFX Connect (Bio-Rad). El perfil térmico de PCR fue el siguiente: 95 °C, 10 min; [95 °C, 30 s; 60 °C, 45 s] \times 40 ciclos; curva de melting [60–95°C, 20 min], 95 °C, 15 s. β -actina se utilizó como gen de referencia debido a su baja variabilidad (menos de 0,20 CT con todas las diferencias observadas entre los grupos experimentales). La cuantificación relativa de genes se realizó mediante el método de CT (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 3.1.- Secuencia de nucleótidos de primers específicos diseñados para el análisis de PCRq y tamaño amplificado para cada par de primers.

qPCR	Secuencia de nucleótidos	Concentración del "Primer"	Tamaño amplificado
Ng qPCR α -Amy Fw	5'-TCCGGGGACATTGAGAACTAC-3'	600 nM	136 pb
Ng qPCR α -Amy Rv	5'-CGTACCCGATCAGATTGTTCA-3'		
Ng qPCR Tryp 1 Fw	5'-CCCTTCTCCAACGTGCCTCC-3'	400 nM	145 pb
Ng qPCR Tryp 1Rv	5'-TGAAGGATAGAGGGAGTGCT-3'		
Ng qPCR Tryp 2 Fw	5'-GCGAAGTTTACGGAGAAGAAG-3'	400 nM	176 pb
Ng qPCR Tryp 2 Rv	5'-GGCGTACACGCCGGGGCTGTC-3'		
Ng qPCR β -act Fw	5'-ATTCCAGCCTTCCTTCTTGG-3'	600 nM	105 pb
Ng qPCR β -act Rv	5'-TTTGCAAACAGGTCCTTCT-3'		

Análisis por zimograma para la actividad de α -amilasa

El análisis por zimograma se realizó siguiendo la misma metodología indicada en el capítulo 1.

Determinación de actividades enzimáticas

La determinación de la actividad de α -amilasa se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1 de la presente tesis.

La actividad de tripsina fue determinada usando benzoílo-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) como sustrato (Ezquerro et al., 1997) con algunas modificaciones (Michiels, 2015). 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 μ l de KOH. La actividad de tripsina se expresó como $\text{mmoles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Para la determinación de la actividad enzimática se trabajó siempre con muestras que no fueron descongeladas previamente.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para el sistema operativo Windows, que realiza automáticamente una prueba previa para la igualdad de varianza y normalidad.

La diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa y medio externo se analizaron con el test paramétrico *t*-test.

Las diferencias en la expresión de amilasa en hepatopáncreas en relación a la salinidad ambiental, se analizaron utilizando el test no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre las diferentes salinidades se utilizó el test a posteriori método Dunn.

Las diferencias en la actividad de amilasa en relación a la salinidad ambiental, se analizaron utilizando el test paramétrico (One Way ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre las diferentes salinidades se utilizó el test *a posteriori* Holm-Sidak o Dunn.

Las diferencias en la expresión de tripsina 1 y 2 en relación a la salinidad ambiental se analizaron utilizando el test paramétrico (One Way ANOVA) o no

paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre las diferentes salinidades se utilizó el test a posteriori Holm-Sidak o Dunn.

Las diferencias en la actividad de tripsina en relación a la salinidad ambiental se analizaron utilizando el test no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre las diferentes salinidades se utilizó el test *a posteriori* Dunn.

Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Osmolalidad de la hemolinfa en individuos de *Neohelice granulata* mantenidos a baja y alta salinidad

En individuos expuestos a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad la osmolalidad de la hemolinfa fue mayor ($t : 8,089$; $p \leq 0,001$) y menor ($t : -2,507$; $p = 0,021$) que la osmolalidad del medio externo, respectivamente. Como se describió en el capítulo 1, la osmolalidad de la hemolinfa fue similar del medio a 35 ‰ de salinidad ($t : 1,051$; $p \leq 0,312$) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Osmolalidad (mOsmol Kg⁻¹) en medio externo y en hemolínfa de individuos de *N. granulata* aclimatados a diferentes salinidades.

10 ‰		35 ‰		37 ‰	
Medio	Hemolínfa	Medio	Hemolínfa	Medio	Hemolínfa
255±15	646±30*	813±41	869±33	974±33	899±19*

*Indica diferencias significativas del correspondiente valor en el medio externo. Los datos corresponden a la media \pm E.S. de 6-16 individuos.

Efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*

En individuos de *N. granulata* mantenidos a baja salinidad (10‰), el nivel de expresión de α -amilasa en hepatopáncreas fue similar al observado en individuos mantenidos a 35‰ (H: 6,418; p: 0,04). En individuos expuestos a alta salinidad (37‰), el nivel de expresión de α -amilasa en hepatopáncreas fue mayor (alrededor de un 300%) que el determinado en individuos mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) (H:6,418; p: 0,04) (Figura 3.1).

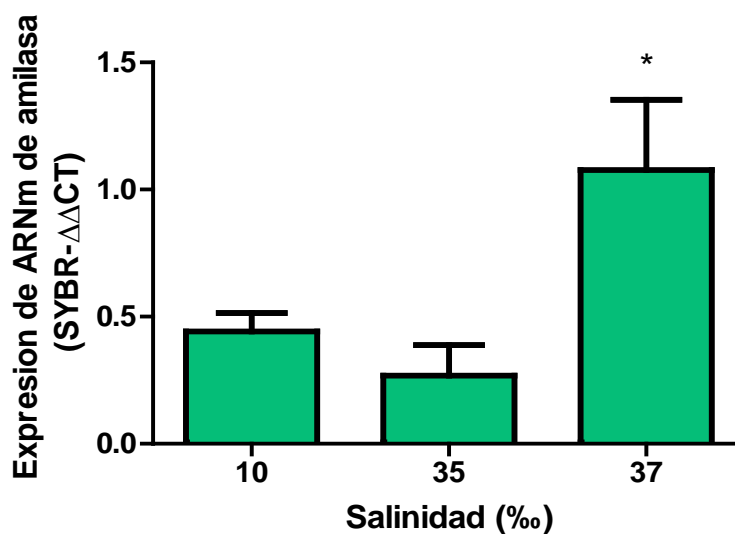


Figura 3.1.- Expresión de ARNm de α -amilasa en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* expuestos a diferentes condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 35‰ (p < 0,05). Los datos son las medias \pm E.S. para 5-7 individuos.

**Efecto de baja y alta salinidad sobre el número de formas con actividad
amilolítica en hepatopáncreas de *N. granulata***

Como se mostró en el capítulo 1 (Figura 1.1) y se muestra en la figura 3.2 del presente capítulo, en hepatopáncreas de individuos mantenidos a 35‰ de salinidad se detectaron cinco bandas con actividad amilolítica, la banda de 29 kDa exhibió la mayor actividad. En individuos mantenidos a 10‰, el zimograma mostró la existencia de una banda adicional de aproximadamente 30 kDa. En individuos mantenidos a 37‰ de salinidad, el hepatopáncreas exhibió un patrón similar de bandas que a 35‰. Similarmente a lo observado a 35‰ de salinidad, en individuos de *N. granulata* mantenidos a baja y alta salinidad, el hepatopáncreas exhibió la banda de 29 kDa con mayor actividad amilolítica (Figura 3.2).

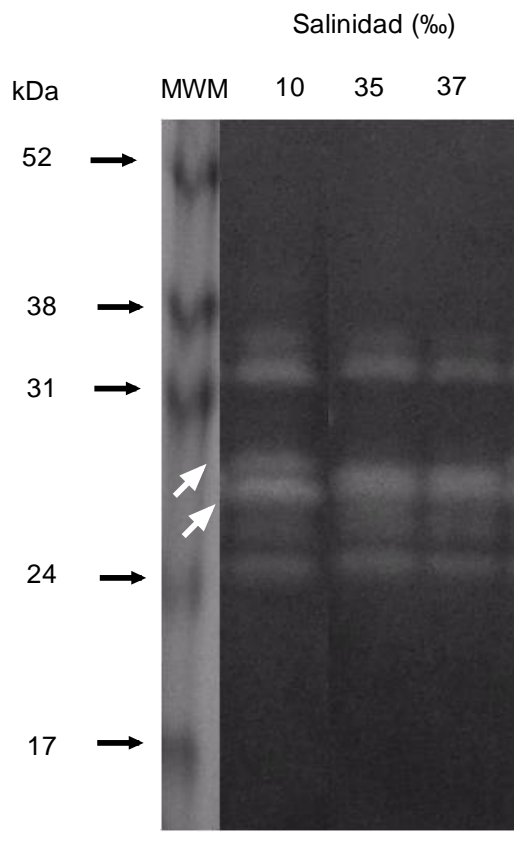


Figura 3.2. Zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* expuestos a diferentes condiciones de salinidad. Luego de la electroforesis, el gel fue inmerso en solución de almidón (1%) a pH 6,0 por 90 min y luego teñido con solución yodo/KI (10 mM). Las flechas blancas indican las bandas de 29 y 30 kDa.

Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*

En individuos mantenidos a 10‰, la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas fue similar a la actividad de individuos mantenidos a 35‰. En individuos mantenidos a 37‰, la actividad total de α -amilasa fue mayor (alrededor de 216%) a la actividad de cangrejos mantenidos a 35‰ (F: 12,04; $p \leq 0,001$) (Figura 3.3).

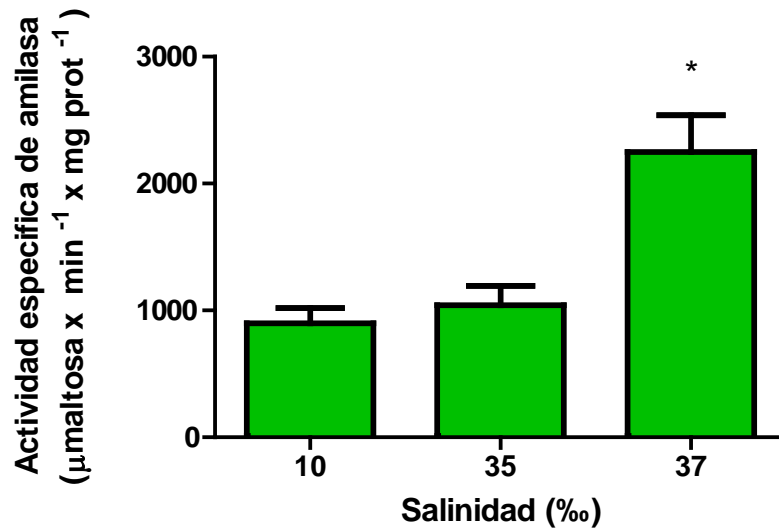


Figura 3.3.- Actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* expuestos a diferentes condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 35‰ ($p < 0,05$). Los datos son las medias \pm E.S. para 5-7 individuos.

Efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión de isoformas de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*

Ambas isoformas de tripsina (isoformas 1 y 2) presentaron diferentes patrones de expresión de ARNm con respecto a la salinidad ambiental (Figura 3.2). El nivel de expresión de ARNm de tripsina 1 fue similar en individuos mantenidos a 10‰ con respecto a 35‰ de salinidad (H: 8,648; p : 0,013). El nivel de expresión de ARNm de tripsina 1 en individuos mantenidos a 37‰ fue mayor (alrededor de 341%) comparado con respecto a los individuos mantenidos a 35‰ de salinidad (F: 13,69; $p \leq 0,001$) (Figura 3.4A).

Los niveles de expresión de ARNm de tripsina 2 disminuyeron (alrededor del 68%) en individuos mantenidos a baja y alta salinidad con respecto a 35‰ (H:8,648; p:0,013) (Figura 3.4B).

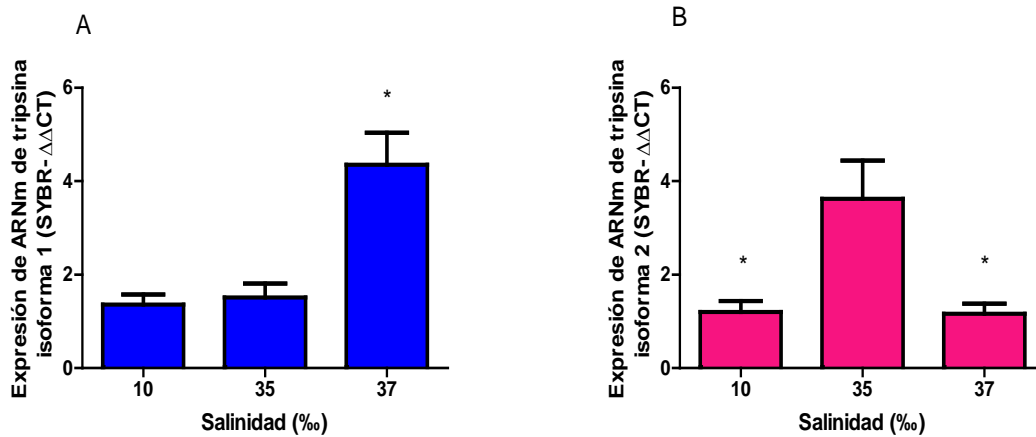


Figura 3.4.- Expresión de ARNm de tripsina 1 (A) y de tripsina 2 (B) en hepatopáncreas de *N. granulata* expuesto a distintas condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 35‰ ($p < 0,05$). Los datos son las medias \pm E.S. para 7-8 individuos.

Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad total de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata*

La actividad total de tripsina en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* mantenidos a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad fue similar a la actividad total en individuos mantenidos a 35‰ de salinidad (H: 5,524; p: 0,063) (Figura 3.5).

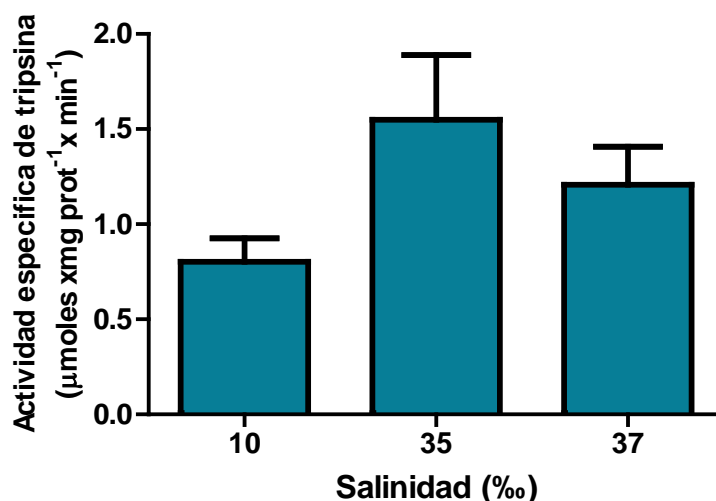


Figura 3.5.- Actividad total de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* expuesto a distintas condiciones de salinidad. Los datos son las medias \pm E.S. para 7-8 individuos.

Discusión

El efecto de baja y alta salinidad sobre la expresión, número de formas y actividad total de α -amilasa y la expresión y actividad total de tripsina en hepatopáncreas de individuos de *Neohelice granulata* indicó la existencia de ajustes diferenciales y específicos a distintos niveles en relación a la salinidad ambiental y condición de osmorregulación.

En diferentes especies de crustáceos se ha propuesto que las variaciones en la expresión, número de formas con actividad amilolítica y/o actividad total de α -amilasa y tripsina en el hepatopáncreas estarían relacionadas con cambios en factores ambientales y/o fisiológicos (Le Moullac et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; Perera et al., 2008 a, b; Peng et al., 2015; Sacristán et al., 2014, 2015; Fan et al., 2016; Rodríguez-Viera et al., 2016; Tantikitti et al., 2016). El concepto de adaptación bioquímica se

utiliza al definir los cambios a nivel bioquímico que ocurren durante la vida de un organismo en relación a cambios en factores internos y externos (Hochachka y Somero, 2002; Storey, 2004; Hochachka, 2005). En cangrejos eurihalinos, la adaptación bioquímica a baja y alta salinidad es un proceso complejo, el cual implica diferentes cambios bioquímicos en hemolinfa y en varios tejidos (Pinoni y López Mañanes, 2008a, b, 2009; Romano y Zeng, 2012; Michiels et al., 2013, 2015a; Pinoni et al., 2013, 2015a). *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita, se comporta como hiper/hiporregulador, ya que exhibe valores de osmolaridad de la hemolinfa por encima y por debajo de la del correspondiente medio externo en individuos mantenidos a 10 y 37‰ de salinidad, respectivamente, mientras que osmoconforman a 35‰ (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Pinoni et al., 2005; Pinoni y López Mañanes, 2009; Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2015a; presente capítulo). El mayor nivel de expresión (alrededor del 300%) y el incremento concomitante (alrededor del 216%) de la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos en 37‰ de salinidad comparado con individuos mantenidos en 35‰ (osmoconformación) sugiere que la modulación a nivel molecular de α -amilasa (expresión genética) es un componente involucrado en la respuesta a alta salinidad en condiciones de hiporregulación. Por otro lado, el análisis por zimograma, sugiere que la respuesta a alta salinidad no implicaría cambios en el perfil de formas de α -amilasa. En este contexto, queda por investigar si el incremento de la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas observado en 37‰ de salinidad estaría relacionado con la modulación a otros niveles (ej. nivel traduccional y/o postraduccional). Un gen de α -amilasa sensible a ecdisteroide se ha identificado en hepatopáncreas de cangrejo rojo de río *Procambarus clarkii* (Peng et al., 2015). Si en individuos de *N. granulata* mantenidos a 37‰ de salinidad, el incremento en la expresión y actividad total de α -amilasa en

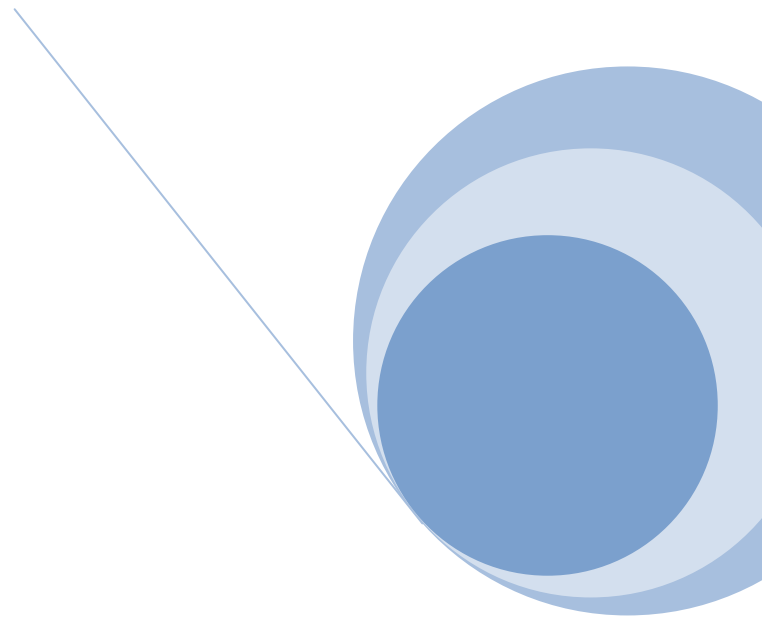
hepatopáncreas está relacionado con una capacidad digestiva diferencial para la degradación de almidón y/o glucógeno lo cual permitiría el mantenimiento de la homeostasis de glucosa en condiciones de hiporregulación requiere mayor investigación.

El hecho que, en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* mantenidos a 10‰ de salinidad (condición de hiper-regulación), no se observaron cambios a nivel del ARNm de α -amilasa soportaría la idea de la existencia de ajustes diferenciales y específicos a nivel molecular en relación a la condición osmorregulatoria. Sin embargo, la existencia de una forma extra con actividad amilolítica de 30 kDa revelada por zimograma, sugiere la posible regulación post-transcripcional de esta enzima (ej. glicosilación, Rodríguez-Viera et al., 2016) que podría asociarse con el mantenimiento de la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* en condiciones de hiperregulación (10‰ de salinidad). En el trabajo de Rodríguez-Viera et al., 2016 se ha sugerido el rol digestivo de diferentes formas de α -amilasa en hepatopáncreas de la langosta *P. argus* que permitirían una variación en la especificidad de digestión de almidón y/o glucógeno. Sin embargo, se desconoce aún si las diferentes formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* presentan diferente capacidad hidrolítica.

En diferentes especies de crustáceos, se ha demostrado que la regulación de tripsina ocurre a diferentes niveles incluyendo el transcripcional y/o traduccional (Muhlia-Almazán et al., 2008; Perera et al., 2015). Perera et al., (2012b) mostraron que diferentes isoformas de tripsina de la langosta *P. argus* son reguladas transcripcionalmente por la dieta. En *Daphnia magna*, se observó una expresión diferencial de diversas isoformas de tripsina en respuesta a inhibidores de proteasas en la dieta (Schwarzenberger et al., 2010). Los resultados del presente capítulo muestran que los niveles de expresión de ARNm de las isoformas 1 y 2 de tripsina en

hepatopáncreas de *N. granulata* parecen estar diferencialmente afectados por baja (10‰) y alta salinidad (37‰). Similarmente a lo observado para la expresión de α -amilasa, el aumento de la expresión de ARNm de tripsina 1 en alta salinidad (37‰), mientras que no se observaron cambios a 10%, sustenta aún más la idea de la existencia de ajustes digestivos diferenciales (ej. digestión de carbohidratos y proteínas) en condiciones de hiper e hiporregulación. Por otro lado, la disminución de la expresión de tripsina 2 en individuos mantenidos a baja y alta salinidad, sugiere la existencia de mecanismos específicos de regulación de las diferentes isoformas de tripsina a nivel transcripcional en hepatopáncreas de *N. granulata* en relación a la salinidad ambiental. La regulación diferencial de la expresión de tripsina 1 y 2 en baja y alta salinidad sugiere la existencia de roles fisiológicos diferenciales de las distintas isoformas de tripsina en relación a la adaptación bioquímica a la salinidad. Además, el hecho que la actividad total de tripsina no fue afectada por la salinidad ambiental en ningún caso, permite sugerir que cambios cualitativos de la enzima (ej. diferentes isoformas que representan la actividad total de tripsina) pueden ocurrir en relación a la exposición a baja y alta salinidad. En este sentido, se demostró que en la langosta *P. argus*, exhibe diversas isoformas de tripsina con diferentes propiedades catalíticas o especificidad (ej. diferencias en la eficiencia de digestión) (Perera et al., 2010b).

En conclusión, los resultados muestran una modulación diferencial por baja y alta salinidad de la expresión, número de formas y en la actividad total de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata*, así como, en la expresión de las isoformas y actividad total de tripsina, sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación a diferentes niveles que podría conducir a ajustes digestivos diferenciales en relación a la hiper-hipo-regulación.



Capítulo 4:

**Flexibilidad fenotípica en respuesta a baja y
alta salinidad luego de la ingesta de alimento:
actividad de carbohidrasas, glucógeno y glucosa
libre en órganos de reserva en *Neohelice
granulata***

Introducción

En crustáceos decápodos y particularmente en cangrejos eurihalinos los mecanismos involucrados en la adaptación bioquímica a baja y alta salinidad desde una perspectiva metabólica no están aún totalmente comprendidos (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Larsen et al., 2014; capítulo 3 presente tesis). En varias especies de crustáceos, se ha demostrado que puede ocurrir una reorganización metabólica diferencial (ej. modulación de actividad de enzimas digestivas y/o movilización de reservas de energía) en relación al tipo y grado de desafío osmótico. Diferentes niveles de actividad y/o modulación de enzimas digestivas específicas en el hepatopáncreas se han relacionado con la posibilidad de una disponibilidad diferencial de sustratos de energía en relación a la salinidad ambiental (Li et al., 2008; Romano y Zeng., 2012; Pinoni et al., 2013; Wang et al., 2013; Michiels et al., 2015a; capítulo 3 presente tesis). La existencia de respuestas a distintos niveles (molecular y/o bioquímico) de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas y/o movilización de reservas en el cangrejo eurihhalino *Nehoelice granulata* expuesto a condiciones de baja y alta salinidad sugiere la existencia de ajustes diferenciales en el metabolismo de hidratos de carbono en relación a la hiper e hiporregulación (Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013; capítulo 3 presente tesis).

Por otra parte, trabajos realizados en diferentes cangrejos eurihalinos, indican que más que la habilidad osmorregulatoria sola, la habilidad para enfrentar las demandas concomitantes de la osmorregulación y de los procesos digestivos y absorptivos permitiendo a cangrejos hiperreguladores explotar o persistir en áreas de baja salinidad (Curtis y McGaw, 2010; Curtis et al., 2013; Penney et al., 2016). La modulación diferencial luego de la ingesta de alimento de la actividad de lipasa, N-

aminopeptidasa (APN) y proteolítica total y/o en el contenido de triglicéridos y proteínas en relación a la híper/hiporregulación sugiere la existencia de ajustes diferenciales post-prandiales en la dinámica y el patrón de modulación de componentes involucrados en el metabolismo lipídico y proteico (Michiels, 2015). En este contexto, el objetivo del presente capítulo fue determinar la capacidad osmorregulatoria, la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas, y el contenido de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela y branquias anteriores y posteriores) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad en diferentes estados osmorregulatorios (López Mañanes et al., 2000; Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013; Michiels, 2015; Michiels et al., 2015a; capítulo 1 y 3 presente tesis).

Materiales y Métodos

Captura y mantenimiento de los animales

Los animales fueron capturados y mantenidos durante 13 días en las condiciones especificadas en materiales y métodos del capítulo 3. 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 críoanestesiados a tiempo cero o a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento para realizar las correspondientes determinaciones. Se utilizó entre 4-10 individuos para cada condición.

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, hepatopáncreas y músculo de la quela, se utilizaron inmediatamente en preparar los correspondientes homogenatos. El extracto de hepatopáncreas se preparó según lo descrito en el capítulo 1. El músculo de la quela se homogeneizó en buffer (0,25 M sacarosa/0,5 mM EGTA-Tris, pH 7,4) (8 mL x g⁻¹ de tejido) en homogeneizador CAT, herramienta T10 en hielo. El homogenato se fraccionó en alicuotas 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 EGTA-Tris, pH 7,4) (4 mL x g⁻¹ de tejido) y se homogeneizaron en hielo con 20 golpes en homogeneizador manual Potter-Elvehjem, (1700 rpm). El homogenato se centrifugó a 2000 g (IEC-Centra 7R refrigerada) durante 5 minutos.

Osmolalidad de la hemolinfa

La osmolalidad de la hemolinfa se determinó según materiales y métodos del capítulo 1. Asaro et al., 2011; Pinoni et al., 2013) y en condiciones de baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. La capacidad osmorregulatoria, se calculó como la diferencia entre el valor de la osmolalidad de la hemolinfa y el valor de osmolalidad del correspondiente medio externo. Esta es una herramienta comúnmente utilizada para evaluar la performance osmorregulatoria (Charmantier et al., 1989; Lignot et al., 2000; Charmantier y Anger., 2011).

Determinación de las actividades enzimáticas

La actividad de α -amilasa se determinó según materiales y métodos de capítulo 1.

Las actividades de maltasa y sacarasa fueron medidas colorimétricamente a través de la cantidad de glucosa liberada (del Valle y López Mañanes, 2008; Asaro et al., 2011a). La reacción se inició con la adición de una alícuota adecuada de la correspondiente muestra (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas) a una mezcla de reacción que contenía el correspondiente sustrato (maltosa o sacarosa) 28 mM en buffer maleato 0,1 M/OHNa pH 5,2 a 37°C. Luego de la incubación durante 10 min, la reacción se detuvo por adición de 1,5 ml del reactivo de glicemia (glucosa oxidada 10 kU/l, peroxidasa 1 kU/l, 4-aminofenazona 0,5 mmol/l, fosfatos 100 mmol/l pH 7,0 e hidroxibenzoato 12 mmol/l) (Wiener Lab AA). Después de 5 min a 37°C, se cuantificó la cantidad de glucosa liberada por lectura de absorbancia en 505 nm del complejo quinonimina rojo formado. La actividad de disacaridasas se expresó como $\mu\text{g glucosa} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos de capítulo 1.

Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre

La concentración de glucógeno se determinó según Pinoni et al., (2011). La correspondiente muestra se calentó hasta el punto de ebullición y se mantuvo así durante

4 min y luego se incubó en buffer acetato (pH 4,8) (1:2) en ausencia y presencia de 0,2 mg x ml⁻¹ de α -amiloglucosidasa durante 2,5 horas a 55°C. Luego de la incubación se determinó colorimétricamente la concentración de glucosa mediante el Kit para glicemia enzimática (Wiener-Lab AA). La concentración de glucosa libre se determinó a partir del tratamiento en ausencia de α -amiloglucosidasa. La concentración de glucógeno se calculó como la diferencia entre los ensayos con y sin α -amiloglucosidasa. La concentración de glucógeno y de glucosa libre se expresaron como mg glucosa x g tejido⁻¹.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para el sistema operativo Windows, que realiza automáticamente una prueba previa para la igualdad de varianza y normalidad.

El posible efecto de cambios de la salinidad luego de la ingesta de alimento sobre la capacidad osmoregulatoria, actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa, concentración de glucógeno o glucosa libre en los diferentes órganos de reserva, fue analizada con el test paramétrico (ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias a los diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento con respecto al tiempo cero se utilizó el test *a posteriori* (Holm-Sidak o Dunn).

Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

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

La capacidad hiperregulatoria se mantuvo a distintos tiempos (2-72 h) luego de la ingesta de alimento con respecto al tiempo cero en individuos mantenidos a 10‰ (H: 9,55; p: 0,089) (Figura 4.1A).

Similarmente a lo observado a 10‰, en individuos mantenidos a 37‰ la capacidad hiporregulatoria se mantuvo luego de la ingesta de alimento a los distintos tiempos estudiados (2-48h) (F: 0,828; p: 0,51) (Figura 4.1B).

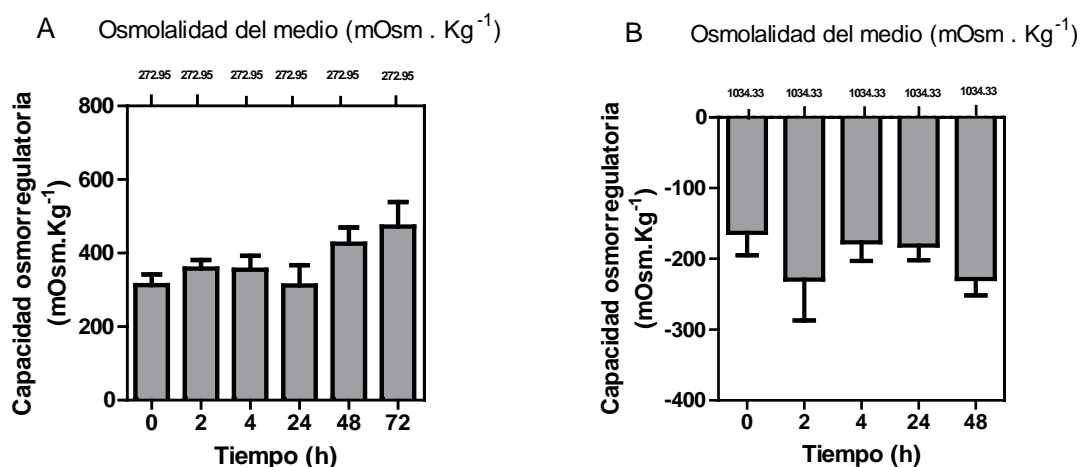


Figura 4.1.- Capacidad osmorregulatoria a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *Neohelice granulata* mantenidos a 10 y 37‰ de salinidad. Los valores son las medias ± E.S. para 5 individuos.

Actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Actividad de α -amilasa

En 35‰ de salinidad, (condición de osmoconformación) la actividad de α -amilasa 24 h luego de la ingesta de alimento fue similar al valor a tiempo cero mientras que a las 48 h fue menor (alrededor de 28%) y se mantuvo constante a las 72 h (F:5.48; p: 0,009) (Figura 4.2A).

En individuos mantenidos a 10‰ de salinidad, la actividad de α -amilasa a 2, 4, 24, 48 y 72 h luego de la ingesta de alimento fue similar a la actividad a tiempo cero (F: 2,18; p: 0,07) (Figura 4.2B).

Similarmente a lo descrito en individuos mantenidos a baja salinidad, la actividad de α -amilasa a 37‰ de salinidad fue similar al valor a tiempo cero y los distintos tiempos luego de la ingesta (2-48 h) (H: 8,58; p: 0,07) (Figura 4.2C).

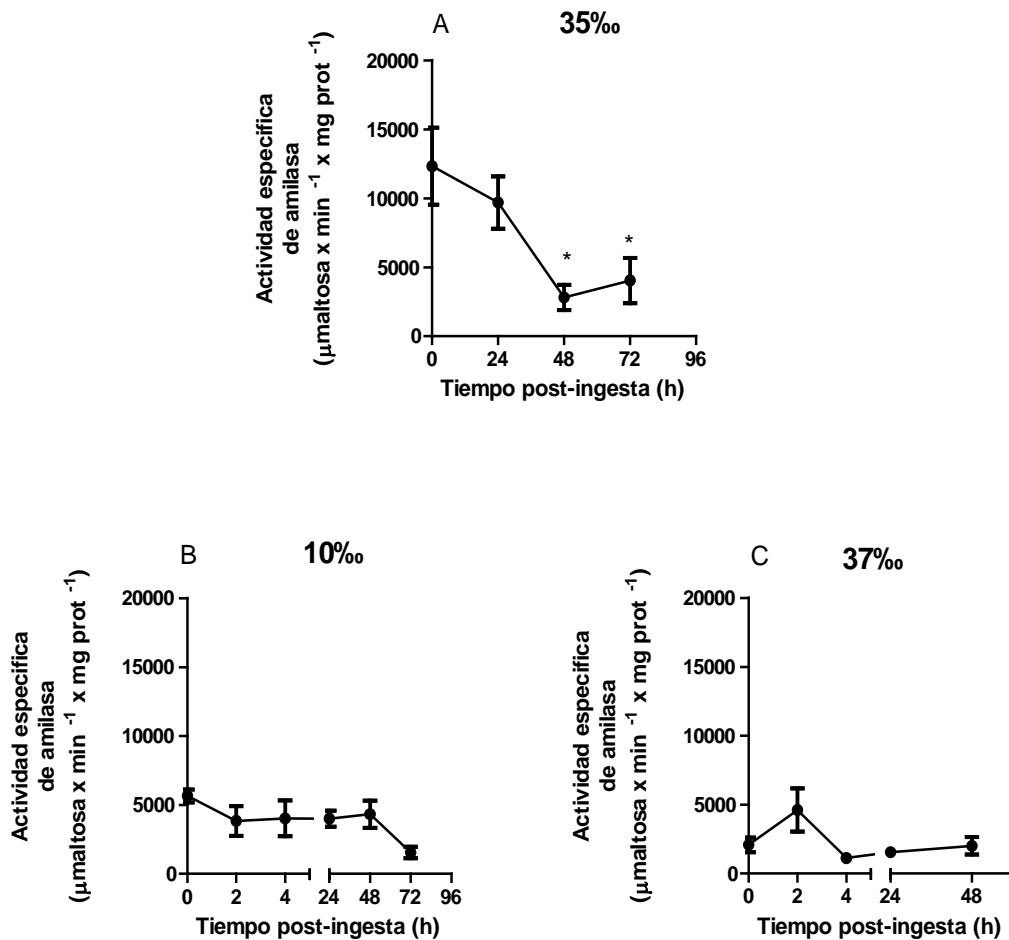


Figura 4.2.- Actividad de α -amilasa en hepatopáncreas a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$ ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-5 individuos.

Actividad de maltasa

Los cangrejos mantenidos a 35‰ de salinidad, tuvieron la actividad de maltasa a las 24 h luego de la ingesta de alimento de manera similar al valor correspondiente al

tiempo cero mientras que a las 48 h fue menor (alrededor de 28%).Este se mantuvo constante hasta las 72 h (F: 12,92; $p \leq 0,001$) (Figura 4.3A).

Los valores de actividad de maltasa obtenidos de los cangrejos mantenidos a 10‰ y 37‰ de salinidad, fueron significativamente similares al valor a tiempo cero (H: 4,88; $p: 0,43$) (F: 1,94; $p: 0,14$) (Figura 4.3 B y C).

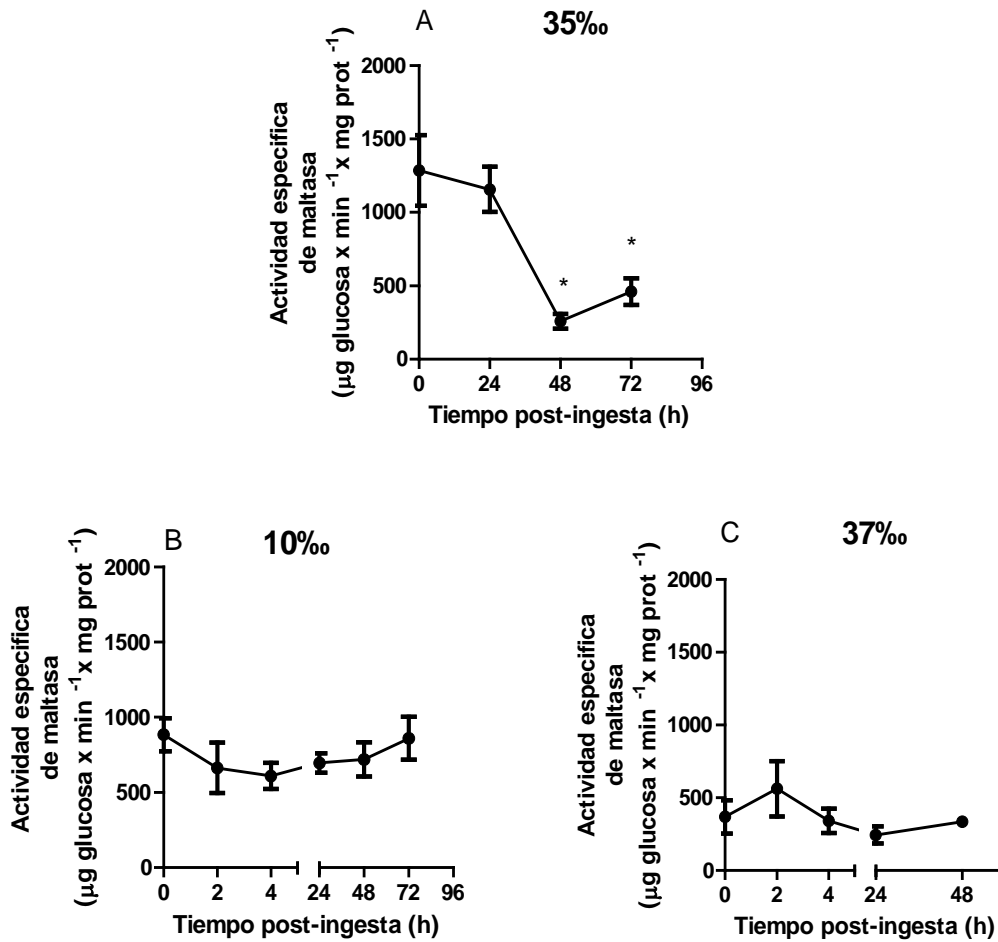


Figura 4.3.- Actividad de maltasa en hepatopáncreas a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$ ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-5 individuos.

Actividad de sacarasa

En individuos mantenidos a 35% de salinidad, la actividad de sacarasa en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego de ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 0,60; p: 0,62) (Figura 4.4A).

En 10% de salinidad, la actividad de sacarasa 2 h luego de la ingesta de alimento fue similar al valor a tiempo cero. A las 4 h, la actividad de sacarasa fue menor (alrededor de 21%). A las 24 h la actividad se incrementó hasta valores similares al tiempo cero y se mantuvo a las 48 h luego de la ingesta. A las 72 h fue aproximadamente un 208% mayor que la actividad a tiempo cero (F: 0,84; p: 0,49) (Figura 4.4B).

En 37% de salinidad, la actividad de sacarasa en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego de ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,39; p: 0,27) (Figura 4.4C).

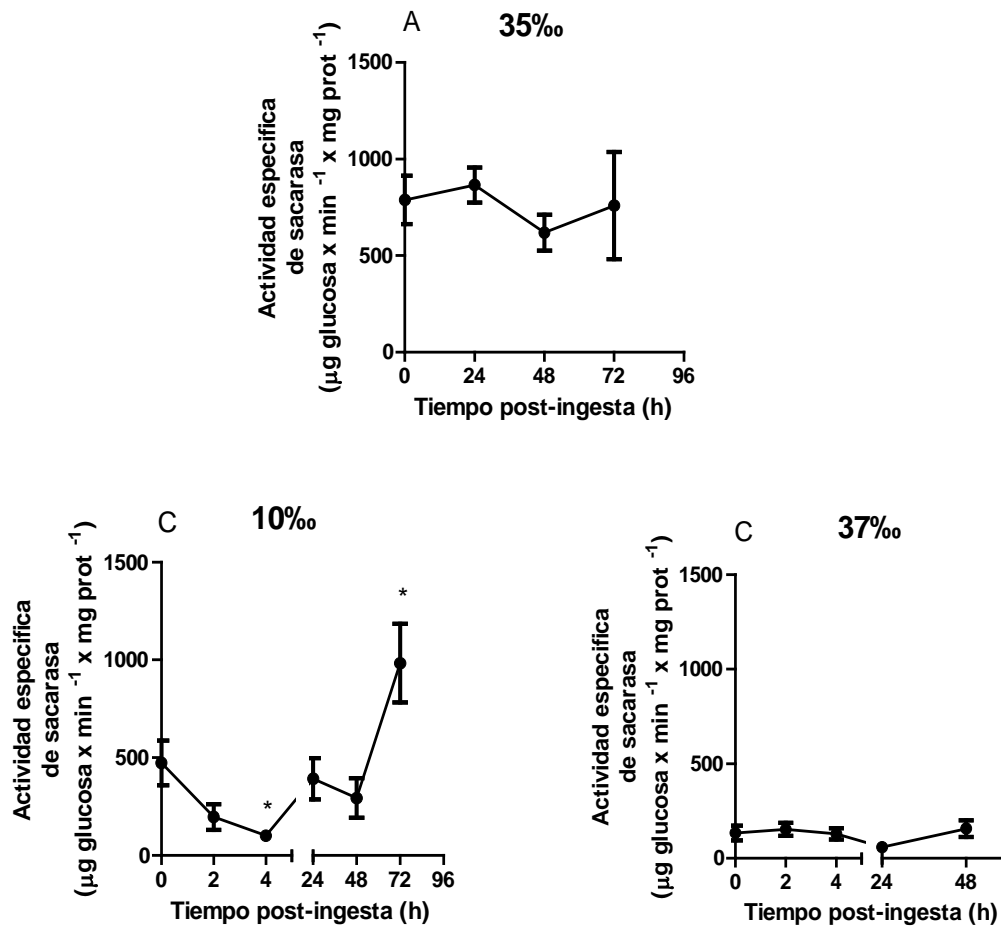


Figura 4.4.- Actividad de sacarasa en hepatopáncreas a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$ ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-5 individuos.

Contenido de glucógeno y glucosa libre en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Glucógeno

En individuos expuestos a 35‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en hepatopáncreas fue similar a los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto a tiempo cero (H: 2,71; p: 0,43) (Figura 4.5A)

En condiciones de baja salinidad (10‰), la concentración de glucógeno en hepatopáncreas fue similar a los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto a tiempo cero (F: 1,81; p: 0,13) (Figura 4.5B).

En individuos mantenidos en 37‰ de salinidad, se observó una disminución en la concentración de glucógeno en hepatopáncreas luego de 24 h de la ingesta de alimento (alrededor de 30%). Mientras que a las 48 h se produjo un aumento en la concentración de glucógeno alcanzando valores similares a tiempo cero (F: 3,62; p: 0,25) (Figura 4.5C).

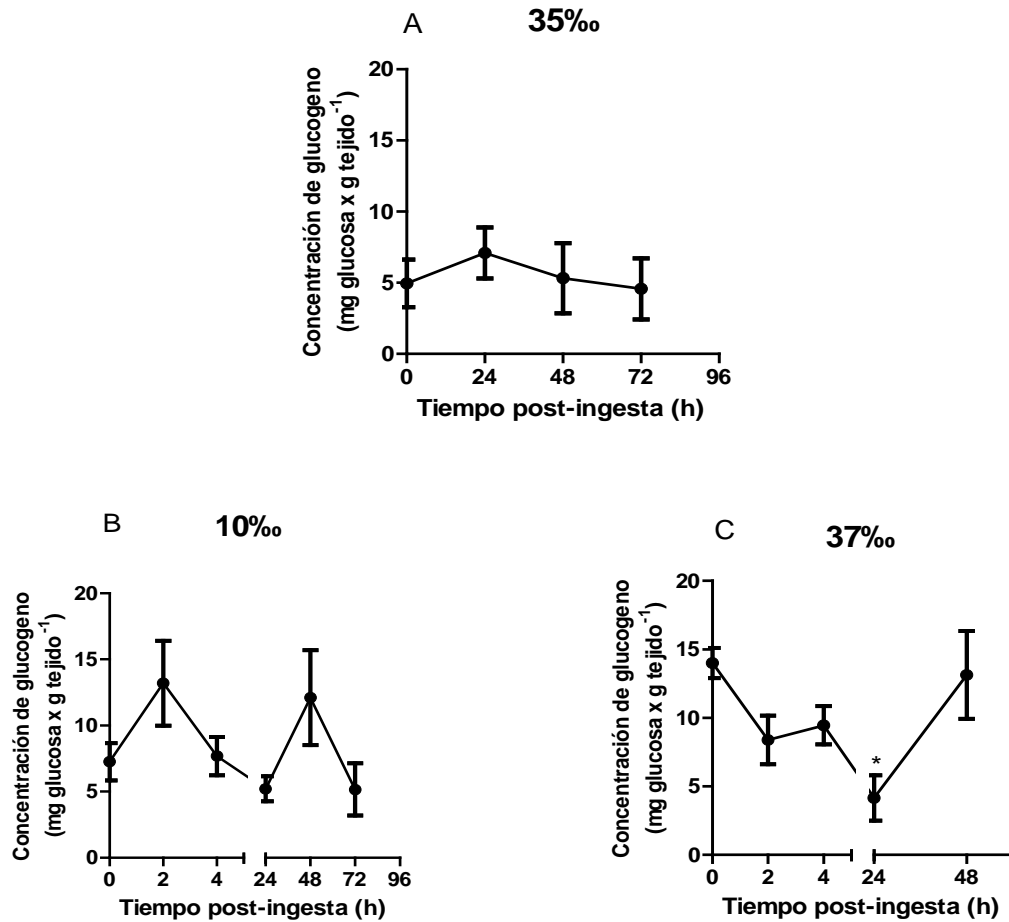


Figura 4.5.- Concentración de glucógeno en hepatopáncreas a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37 ‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$ ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En condiciones de osmoconformación (35‰), la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas fue similar a los diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero ($F: 3,42; p:0,04$) (Figura 4.6A).

En individuos expuestos a 10‰ de salinidad, la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas fue similar a las 2, 4 y 24 h con respecto al tiempo cero. Mientras que a las 48 y 72 h luego de la ingesta de alimento fue menor (alrededor de un 49%) con respecto a la concentración a tiempo cero (F:3,0; p:0,02) (Figura 4.6B).

En individuos mantenidos a alta salinidad (37‰), la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas a las 2 y 4 h luego de la ingesta fue similar a la del tiempo cero. A las 24 h luego de la ingesta de alimento fue menor (alrededor de 45%) que la concentración a tiempo cero. Posteriormente, se produjo un aumento en la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas alcanzando a las 48 h valores mayores que a tiempo cero (F: 5,21; p: 0,006) (Figura 4.6C).

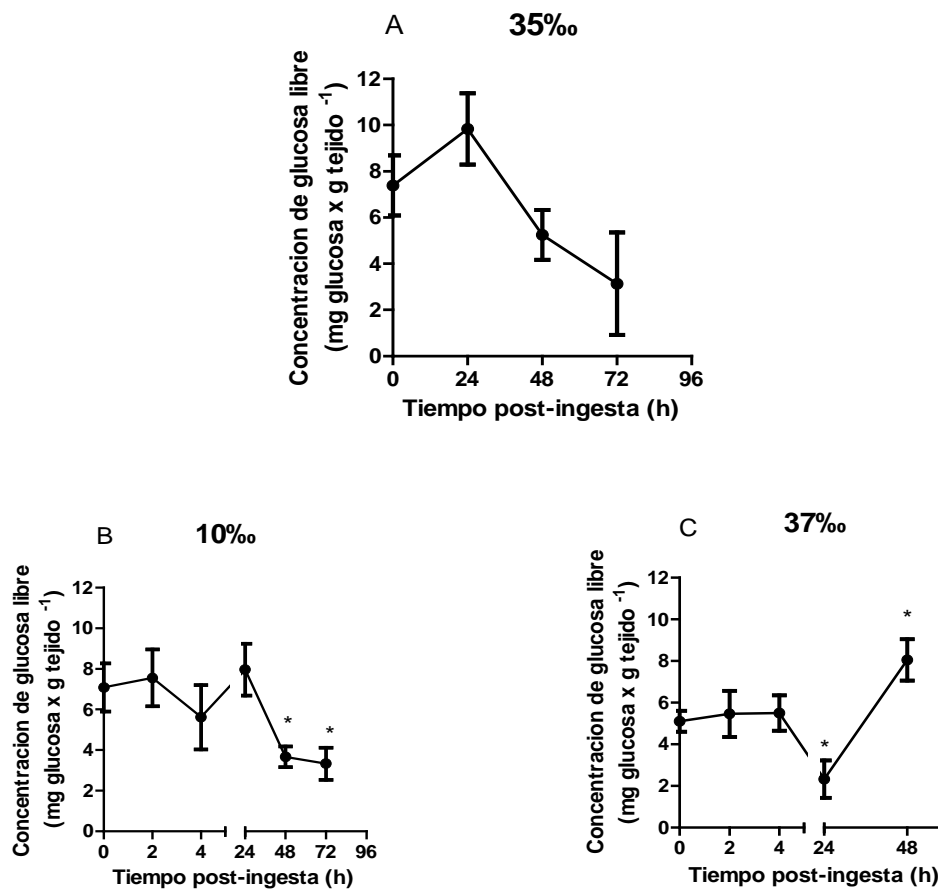


Figura 4.6.- Concentración de glucosa libre en hepatopáncreas a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Contenido de glucógeno y glucosa libre en músculo de la quela luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Glucógeno

En individuos expuestos a 35‰ o a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de glucógeno en músculo de la quela a ninguno de los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,56; p: 0,24) (H: 5,33; p: 0,37) (F: 1,57; p: 0,22) (Figura 4.7A).

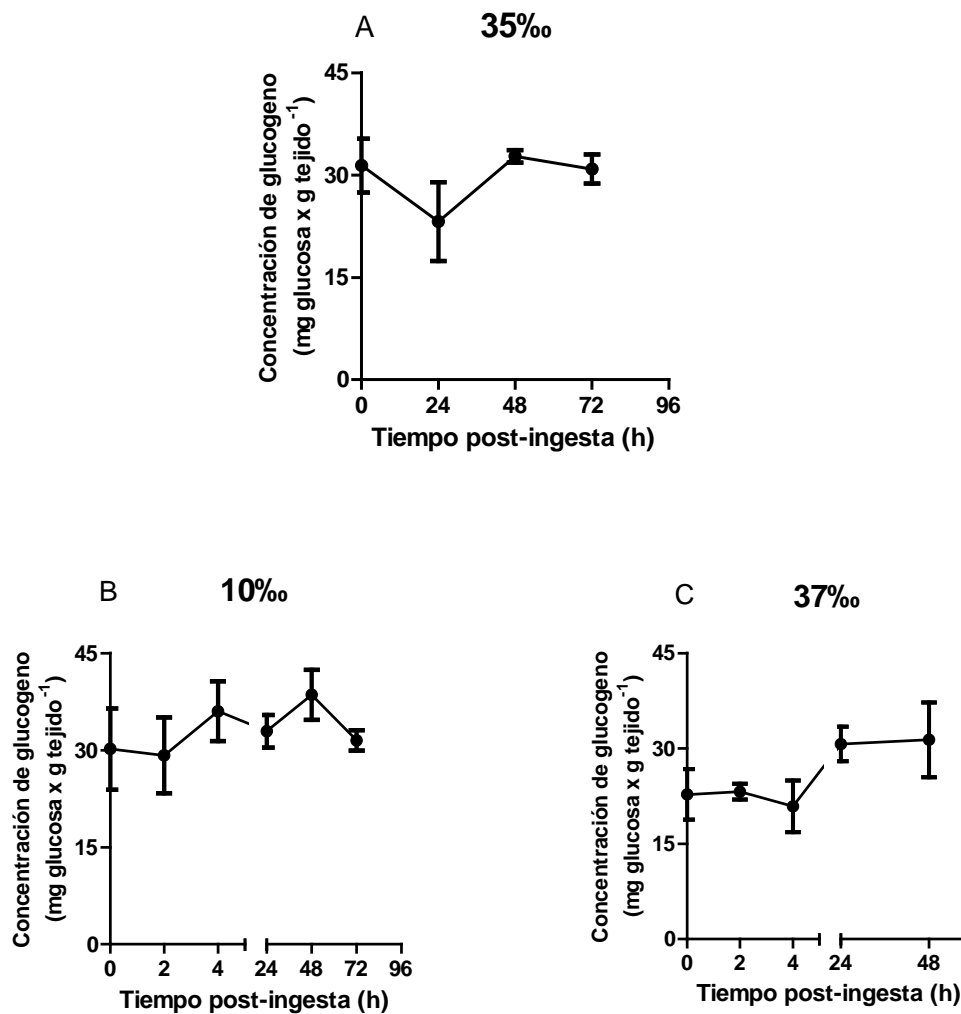


Figura 4.7.- Concentración de glucógeno en músculo de la quela a tiempo cero ($t=0$) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En individuos expuestos a 35‰, 10‰ y 37‰ salinidad, la concentración de glucosa libre en músculo de la quela fue similar a los distintos tiempos estudiados luego de la

ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,25; p:0,32) (F: 2,27; p: 0,06) (F: 1,48; p: 0,24) (Figura 4.8).

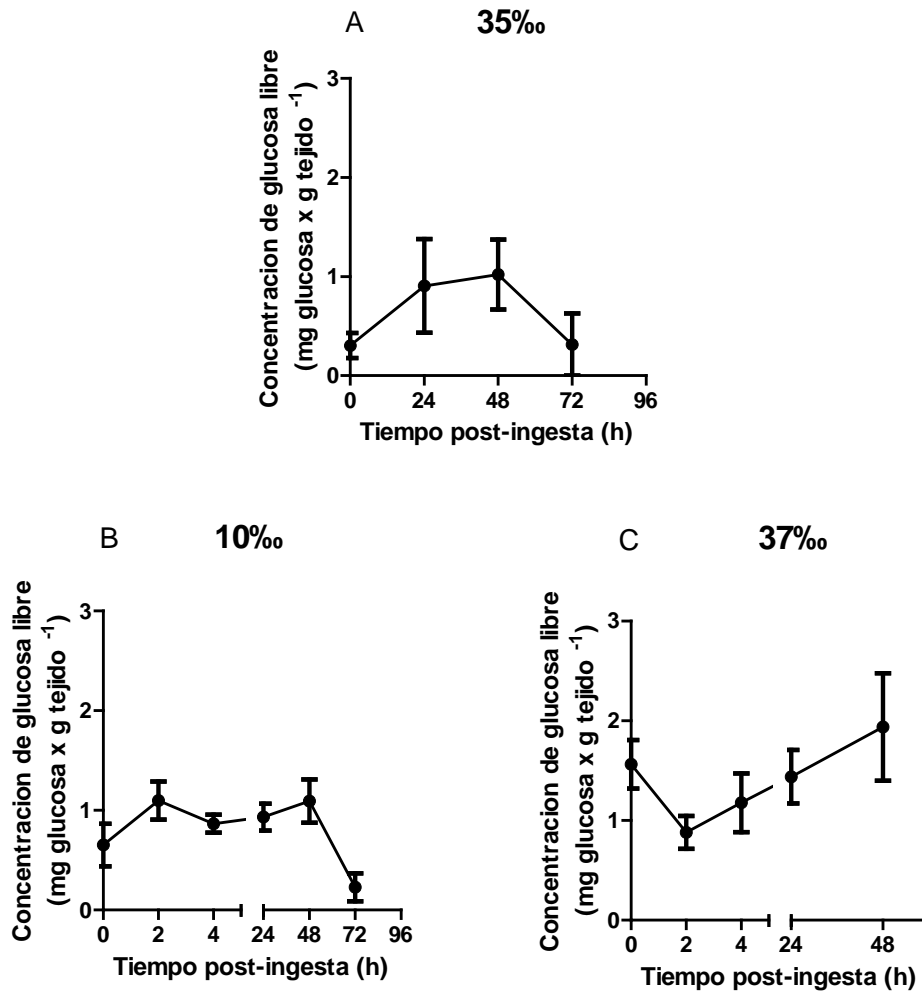


Figura 4.8.- Concentración de glucosa libre en músculo de la quela a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Contenido de glucógeno y glucosa libre en branquias anteriores luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Glucógeno

En 35‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en branquias anteriores fue similar a los diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,33; p: 0,29) (Figura 4.9A).

En 10‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en branquias anteriores fue similar a las 2 h pero fue menor a las 4 y 24 h luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero. A las 48 h, la concentración de glucógeno subió hasta valores similares a tiempo cero y se mantuvo constante hasta las 72 h (F: 2,55; p: 0,04) (Figura 4.9B).

En 37‰ de salinidad, no hubo diferencias en la concentración de glucógeno en branquias anteriores a los distintos tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,81; p: 0,16) (Figura 4.9C).

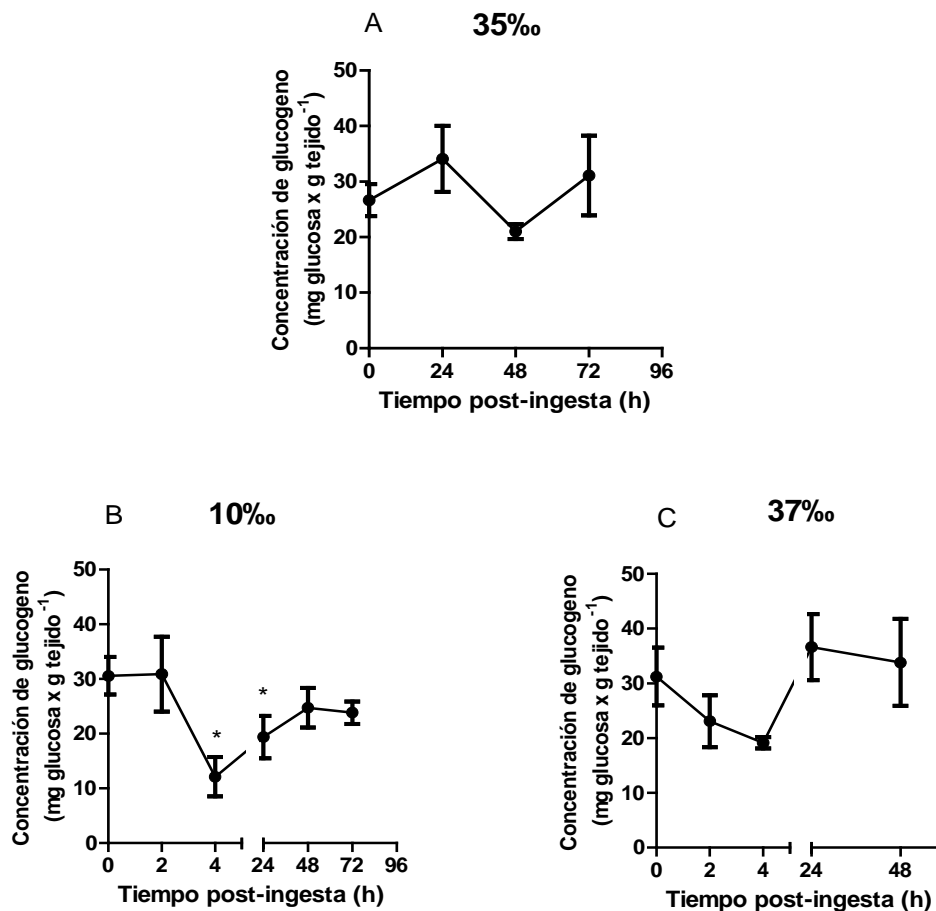


Figura 4.9.- Concentración de glucógeno en branquias anteriores a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En individuos expuestos a 35‰, 10‰ y 37‰ salinidad la concentración de glucosa libre en branquias anteriores fue similar a los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 0,64; p: 0,59) (H: 3,46; p: 0,62) (F: 0,76; p: 0,55) (Figura 4.10).

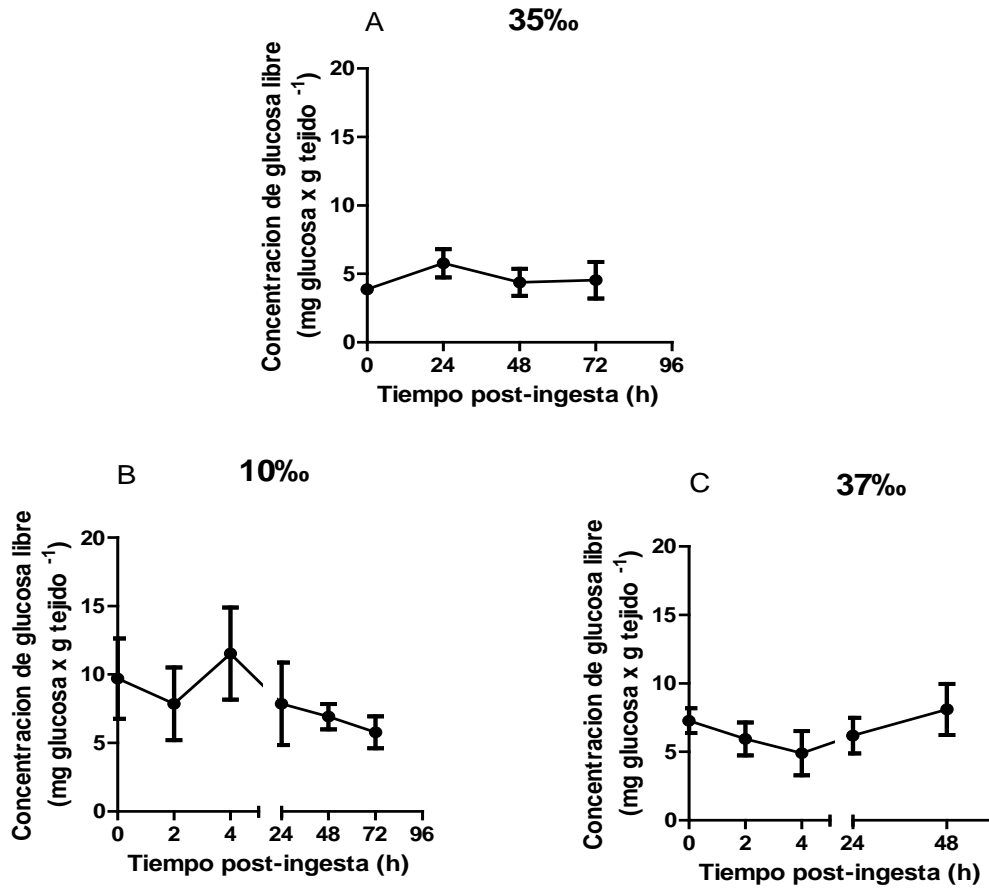


Figura 4.10.- Concentración de glucosa libre en branquias anteriores a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Contenido de glucógeno y glucosa libre en branquias posteriores luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad

Glucógeno

En individuos expuestos a 35‰, 10‰ y 37‰ salinidad, la concentración de glucógeno en branquias posteriores fue similar a los distintos tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (F: 6,78; p:0,62) (H: 8,72; p: 0,12) (H: 3,44; p:0, 48) (Figura 4.11).

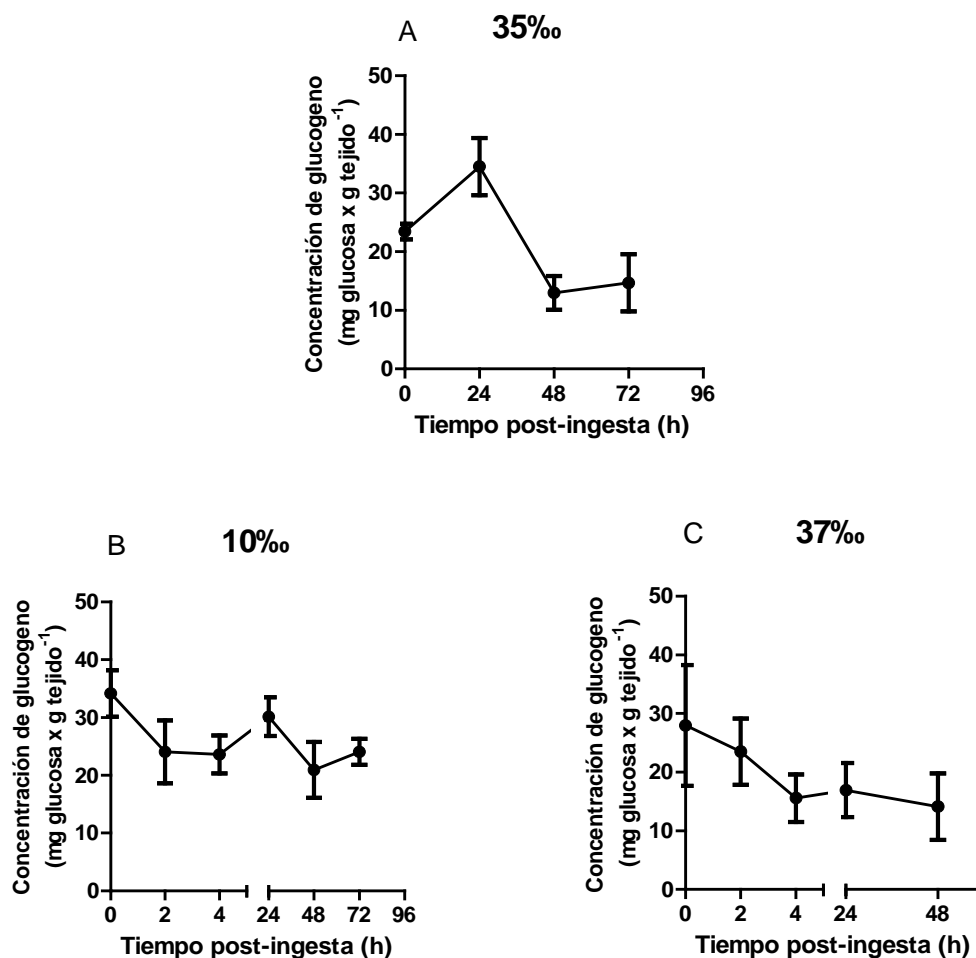


Figura 4.11.- Concentración de glucógeno en branquias posteriores a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En individuos expuestos a 35‰ y a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad la concentración de glucosa libre en branquias posteriores fue similar a los tiempos estudiados luego de la ingesta de alimento con respecto al valor a tiempo cero (H: 9,51; p:0,02) (H: 13,15; p: 0,02) (H: 4,45; p: 0,34) (Figura 4.12).

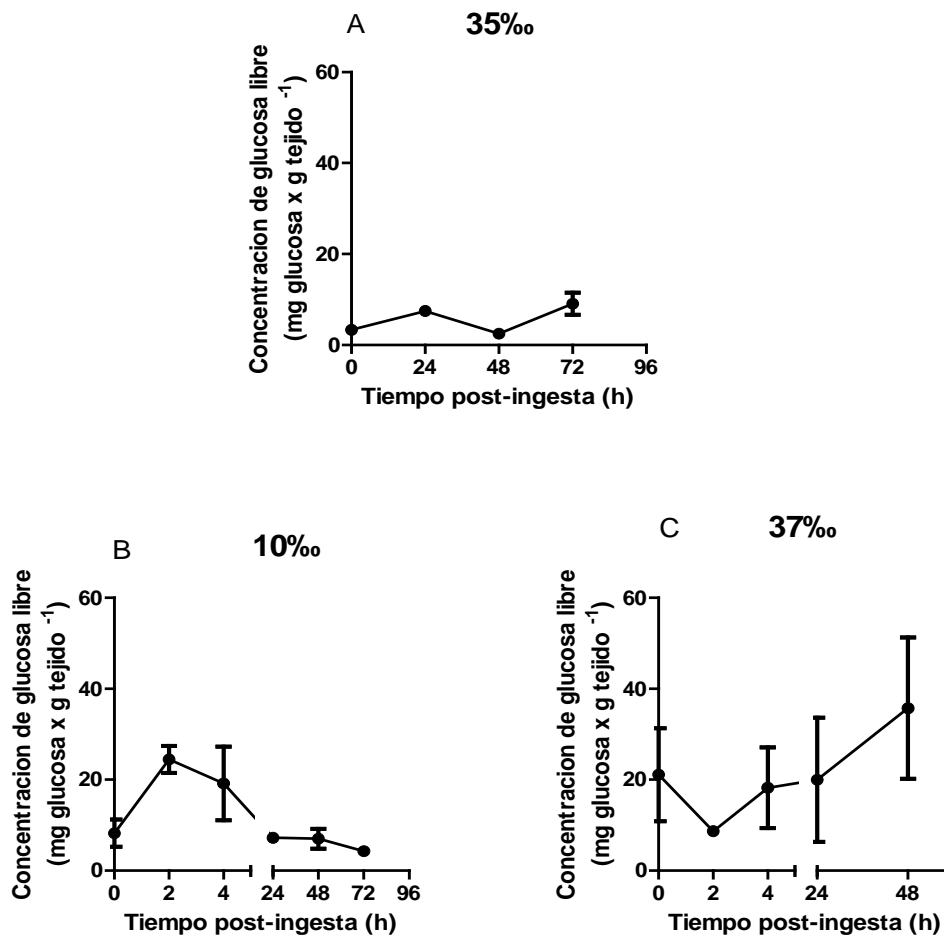


Figura 4.12.- Concentración de glucosa libre en branquias posteriores a tiempo cero (t=0) y a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Discusión

Los individuos de *Neohelicie granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita exhiben una modulación diferencial a diferentes tiempos post-ingesta en condiciones de hiper/hiporregulación de la actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas, del contenido de glucógeno y glucosa libre en hepatopáncreas y de la concentración de glucógeno en branquias anteriores sugiriendo la existencia de diferentes ajustes post-prandiales en componentes del metabolismo de hidratos de carbono en relación al estado osmorregulatorio.

En cangrejos hiperreguladores, 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; Curtis et al., 2013; Penney et al., 2016). Así, se ha descrito que cangrejos hiperreguladores débiles con una distribución o permanencia limitada en áreas con valores extremos de baja salinidad, no son capaces de balancear las demandas conjuntas de la hiperregulación y la digestión (Curtis y McGaw, 2010). En este contexto, el hecho que las capacidades hiper/hiporregulatorias se mantuvieran en valores similares luego de la ingesta de alimento, podría relacionarse con que *N. granulata* es un osmorregulador fuerte (Curtis y McGaw, 2010) y con su ocupación exitosa en diferentes zonas de todo el intermareal de la laguna costera de Mar Chiquita como sugerimos previamente (Michiels, 2015).

En hepatopáncreas de *N. granulata* expuestos a condiciones de baja (10‰) y alta salinidad (37‰) y en condiciones de osmoconformación (35‰) se determinó la existencia de modulación diferencial post-prandial en la actividad de lipasa, proteolítica total y APN, así como también, una movilización diferencial de reservas de energía

(triglicéridos y proteínas), sugiriendo la existencia de ajustes digestivos y metabólicos post-ingesta relacionados con el mantenimiento de la homeostasis de lípidos y proteínas en relación con el estado osmorregulatorio (Michiels, 2015). En varias especies de crustáceos decápodos, los hidratos de carbono son una fuente importante de energía para diferentes procesos fisiológicos (Sánchez-Paz et al., 2006; Arturo et al., 2007; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016 a, b). Así, la existencia, nivel y/o modulación de la actividad de carbohidrasas clave en hepatopáncreas juegan un rol esencial en el metabolismo de hidratos de carbono (Saborowski, 2015; Wang et al., 2016a). En crustáceos decápodos, el glucógeno constituye la principal reserva de hidratos de carbono, aunque los sitios de almacenamiento varían según la especie y/o factores internos o externos (Schmitt y Santos, 1993; Vinagre y Da Silva, 1992; Oliveira et al., 2003; Sánchez-Paz et al., 2006; Buckup et al. 2008; Pinoni et al., 2013; Bianchini et al., 2008; Jimenez y Kinsey, 2015). En individuos de *N. granulata* mantenidos a largo plazo a baja y alta salinidad, se observó una modulación diferencial de la expresión y/o actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas y del contenido de glucógeno y/o glucosa libre, lo que indicaría la presencia de ajustes diferenciales en diferentes enzimas digestivas y/o contenidos de reserva en relación a la hiper/hiporregulación (Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013; capítulo 3 presente tesis). Como mencionamos anteriormente, el hepatopáncreas es el sitio principal de síntesis de enzimas digestivas y donde comienza y se lleva a cabo principalmente la digestión intracelular y absorción de nutrientes (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003; Ong y Johnston, 2006; Zeng et al., 2010; Wang et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Saborowski, 2015; Sacristán et al., 2014, 2015, 2016; Bibo-Verdugo et al., 2015, 2016). Además en varias especies de crustáceos, se ha observado que el hepatopáncreas constituye un sitio de síntesis de macromoléculas (Mc Gaw y Curtis,

2013; Carter y Mente, 2014; Penney et al., 2016). En este contexto, se ha determinado el rol del hepatopáncreas de *N. granulata* en procesos iniciales de absorción y/o síntesis de lípidos y proteínas luego de la ingesta de alimento (Michiels, 2015). Por otro lado, demostramos la existencia de modulación de la actividad intracelular de enzimas digestivas en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* (Michiels, 2015). Similarmente a lo observado previamente para las actividades de lipasa y proteolítica total (Michiels, 2015), los resultados del presente capítulo muestran la disminución post-ingesta (48 y 72 h) de la actividad de α -amilasa y maltasa en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* mantenidos a 35‰ de salinidad (condición de osmoconformación). En tracto digestivo de vertebrados, la acción coordinada de α -amilasa y maltasa es esencial para la digestión total de sustratos glucogénicos (Diaz-Sotomayor et al., 2013; Lin et al., 2012, 2014, 2016; Dhital et al., 2013; Simsek et al., 2015). La forma de mayor actividad de α -amilasa parcialmente purificada de hepatopáncreas de *N. granulata* exhibe capacidad de degradar glucógeno (capítulo 1). En este contexto, la disminución de la actividad de α -amilasa y maltasa luego de la ingesta de alimento podría relacionarse con el mantenimiento de la concentración de glucógeno y glucosa libre en hepatopáncreas en condiciones de osmoconformación. El mantenimiento de la actividad de sacarasa luego de la ingesta de alimento a 35‰ de salinidad, sugiere por un lado la existencia de modulación diferencial post-ingesta de la actividad de carbohidrasas en condiciones de osmoconformación. Por el otro lado sugiere el mantenimiento de la capacidad para la digestión de sacarosa y su potencial uso como fuente de fructosa en este cangrejo. El conocimiento sobre los mecanismos de absorción y metabolismo de fructosa en invertebrados en general y en crustáceos decápodos en particular es escaso y fragmentario. En hepatopáncreas de la langosta

Homarus americanus se ha identificado un transportador de fructosa dependiente de Na^+ (Ahearn et al., 1985; Sterling et al., 2009; Obi et al., 2011; Duka y Ahearn, 2014).

El músculo de la quela y las branquias anteriores y posteriores constituyen sitios de almacenamiento de glucógeno en *N. granulata* (Artillo et al., 2008; Pinoni et al., 2011, 2013). El hecho que no se produjeron variaciones en el contenido de glucógeno y glucosa libre en músculo de la quela y branquias anteriores y posteriores luego de la ingesta de alimento en 35‰ de salinidad indica que no ocurriría una modulación a largo plazo post-ingesta de estas reservas en condiciones de osmoconformación. Esto difiere a lo observado para las reservas de proteínas y triglicéridos (Michiels, 2015) soportando la idea de la existencia de ajustes diferenciales en componentes del metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono en individuos de *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita (Pinoni et al., 2013).

En *N. granulata* la modulación diferencial de enzimas digestivas en hepatopáncreas y de reservas de energía (distintas reservas y/u órganos) es uno de los componentes subyacentes a la adaptación bioquímica a la salinidad ambiental, aunque la respuestas parecen ser dependientes del tipo y grado de desafío osmótico (Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013, 2015a; Michiels, 2015; Michiels et al., 2015a; capítulo 3 presente tesis). El hecho que contrariamente a lo observado en 35‰ de salinidad, en individuos de *N. granulata* luego de la ingesta de alimento en condiciones de baja y alta salinidad no se produjeron cambios en las actividades de α -amilasa y maltasa, sugiere la existencia de ajustes diferenciales en la dinámica post-ingesta de estas actividades en hepatopáncreas en relación a la hiper/hiporregulación. El mantenimiento de la actividad de α -amilasa y maltasa en condiciones de osmorregulación podría relacionarse con una distinta capacidad de degradación de diferentes sustratos glucosídicos (ej. glucógeno) en el hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento. Los resultados presentados en los

capítulos 1 y 3 de la presente tesis muestran la existencia de diferentes formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *N. granulata* y de una forma extra en baja salinidad. Además, la forma con mayor actividad amilolítica parcialmente purificada del hepatopáncreas exhibe capacidad de hidrolizar glucógeno (capítulo 1 presente tesis). Los resultados del presente capítulo no nos permiten discernir si la diferente respuesta post-ingesta de la actividad total de α -amilasa en condiciones de osmorregulación y osmoconformación podría deberse a una modulación cuantitativa y/o cualitativa de diferentes formas de α -amilasa (ej. formas de α -amilasa con distinta actividad hidrolítica) que podrían tener una potencial capacidad diferencial para degradar glucógeno. En este contexto, para establecer si el mantenimiento post-ingesta de la concentración de glucógeno en hepatopáncreas de *N. granulata* en baja salinidad (10‰) se debe a una modulación post-prandial de una actividad de α -amilasa con menor capacidad hidrolítica para este sustrato se requiere mayor investigación. La disminución de la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas a las 48 y 72 h luego de la ingesta de alimento podría soportar esta idea. Por otro lado, el descenso post-ingesta en alta salinidad (37‰) de la concentración de glucógeno y glucosa libre a las 24 h y posterior aumento a las 48 h permite reconocer la existencia de ajustes diferenciales en relación a la hiporregulación. La hipo e hiperregulación, en cangrejos eurihalinos parecen implicar diferentes mecanismos que podrían conducir a diferentes requerimientos metabólicos (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; González et al., 2012). Estudios en algunas especies de crustáceos muestran que las rutas metabólicas energéticas básicas son en gran parte similares a las de vertebrados (Jimenez y Kinsey, 2015). La gluconeogénesis es responsable de la síntesis de glucosa y glucógeno a partir de precursores no glucosídicos (Moon, 1988; Nery y Santos, 1993; Jimenez y Kinsey, 2015). En este contexto, en hepatopáncreas de *N. granulata* de otras

áreas geográficas (Rio grande, Brasil) se ha determinado la existencia de vías gluconeogénicas y su modulación por diferentes factores (ej. grado y tipo de desafío osmótico, anoxia, dieta) (Oliveira y Da Silva, 1997; Olivera et al., 2001, 2004; Martins et al., 2011).

Por otro lado, la presencia de una modulación luego de la ingesta de alimento de la actividad de sacarasa mantenidos a 10‰ de salinidad, mientras que no se produjeron cambios a 37‰ de salinidad indicaría la existencia de una regulación específica de esta actividad. Además, estos cambios podrían conducir a ajustes en el metabolismo de fructosa en hiperregulación. El metabolismo de la fructosa ha sido ampliamente estudiado en mamíferos (Lanaspa et al., 2012; Mirtschink y Krek, 2016).

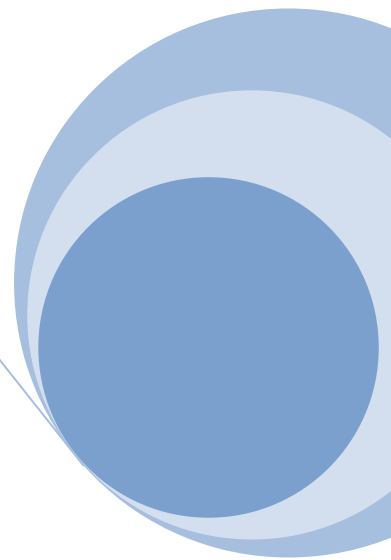
Las branquias anteriores juegan un importante rol en la adaptación bioquímica a baja y alta salinidad (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Artillo et al., 2008; Pinoni et al., 2011, 2013; González et al., 2012). La disminución de la concentración de glucógeno en branquias anteriores a las 4 y 24 h y su posterior recuperación a las 48 h luego de la ingesta de alimento en baja salinidad (Figura 4.10B), sugiere la existencia de ajustes en diferentes mecanismos de regulación de esta reserva (utilización a corto plazo y posterior almacenamiento a largo plazo). Como mencionamos anteriormente, el hepatopáncreas constituye un sitio principal de absorción de nutrientes (ej. glucosa) (Verri et al., 2001; Saborowski, 2015; Wang et al., 2016a, b). La disminución en el contenido de glucosa libre en hepatopáncreas a las 48 h post-ingesta (Figura 4.6B) concomitantemente con el aumento a las 48 h del contenido de glucógeno en branquias anteriores, sugeriría el rol del hepatopáncreas como fuente de glucosa para ser utilizada en los procesos de síntesis de glucógeno en otros tejidos. Estudios *in vitro* en individuos de *N. granulata* de otras áreas geográficas mostraron la existencia de captación de glucosa por las branquias (Kucharski et al., 2002; Valle et al.,

2009). En mamíferos, la distribución y/o captación de glucosa por diferentes tejidos depende de la existencia y eficiencia de diferentes transportadores de glucosa (ej. GLUT y SGLT) en membrana plasmática (Caccia et al., 2007; Wilson-O'Brien et al., 2010; Chen et al., 2015; Mulukutla et al., 2016). Sin embargo, es escasa la información de la existencia y mecanismos de estos transportadores en crustáceos decápodos (Verri et al., 2001; Zhao y Keating, 2007; Obi et al., 2011, 2013; Duka y Ahearn, 2014; Wang et al., 2016b; Martínez-Quintana et al., 2014, 2015, 2016). El hecho que no se observaron cambios en la concentración de glucógeno y/o glucosa libre en músculo de la quela y branquias posteriores luego de la ingesta de alimento en individuos mantenidos a baja y alta salinidad sugeriría la existencia de mecanismos de regulación específicos en branquias anteriores luego de la ingesta de alimento en condiciones de hiper/hiporregulación soportando aun más la idea de ajustes metabólicos diferenciales en relación al estado osmorregulatorio.

Resultados previos en nuestro laboratorio, mostraron la modulación *in vitro* por dopamina, glucagón y AMPc de la actividad de lipasa y por dopamina y AMPc del contenido de triglicéridos en hepatopáncreas de *N. granulata* que sugieren la existencia de diferentes vías de regulación por mensajeros químicos de componentes a nivel bioquímico del metabolismo lipídico (Michiels, 2015; Michiels et al., 2015b). En individuos de *N. granulata* de Rio grande (Brasil) se demostró que la serotonina (5-HT) estaría involucrada en la regulación del metabolismo de glucógeno en distintos tejidos de reserva a través de la unión a diferentes tipo de receptores (5-HT₁ y 5-HT₂) (Inohara et al., 2015). En hepatopáncreas de *N. granulata* se observó la liberación *in vitro* por glucagón de glucosa. En el cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*, demostramos la modulación diferencial del contenido de glucógeno en diferentes órganos de reserva por dopamina, histamina y serotonina (datos no publicados). En este contexto, si el nivel y/o

ajustes diferenciales post-ingesta en las actividades de carbohidrasas y en el contenido de glucógeno y/o glucosa libre en órganos de reserva en diferentes condiciones de salinidad están relacionados con la existencia de mecanismos de modulación por mensajeros químicos requiere mayor investigación.

En conclusión, las diferentes respuestas en la actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas y contenido de glucógeno y glucosa libre en diferentes sitios de reserva a distintos tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a baja (10‰) y alta salinidad (37‰), indican la existencia de ajustes postprandiales en diferentes componentes principales del metabolismo de hidratos de carbono a nivel bioquímico en relación al diferente estado osmorregulatorio (hiper o hiporregulación).



Capítulo 5:

**Flexibilidad fenotípica digestiva y metabólica en
respuesta a un cambio abrupto de alta a baja
salinidad: actividad de carbohidrasas, glucógeno
y glucosa libre en órganos de reserva en
*Neohelice granulata***

Introducción

Los cangrejos eurihalinos que habitan la zona de planicie de marea de estuarios y/o lagunas costeras pueden estar expuestos frecuentemente a cambios abruptos a corto plazo en la salinidad ambiental. Estos cambios abruptos en la salinidad pueden imponer desafíos osmóticos diferenciales y por ende implicar cambios a corto plazo en la respuesta osmorregulatoria (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012; Leone et al., 2015; Lignot y Charmantier, 2015). Se ha demostrado que varias especies de cangrejos osmorreguladores son capaces de cambiar a corto plazo (≤ 24 h) la condición osmorregulatoria en respuesta a modificaciones abruptas en la salinidad ambiental tales como de agua de mar a baja salinidad (Romano y Zheng, 2012; Henry et al., 2012; Havird et al., 2013, 2016; Larsen et al., 2014; Michiels, 2015). Estos cambios en la respuesta osmorregulatoria implican variaciones diferenciales en componentes a nivel bioquímico involucrados en mecanismos osmo-ionoregulatorios (Schleich et al., 2001; López Mañanes et al., 2002; Pinoni et al., 2005; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zheng, 2012; Henry et al., 2012; Havird et al., 2013, 2016; Larsen et al., 2014). Los cambios a corto plazo en los componentes de la maquinaria osmorregulatoria podrían implicar una reorganización metabólica diferencial y específica (Schleich et al., 2001; Bianchini et al., 2008; Romano y Zeng, 2012; Mitchell y Henry, 2014; Michiels, 2015). Individuos de *Neohelice granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita mostraron la respuesta diferencial de distintas actividades enzimáticas en branquias y músculo de la quela lo que sugiere la existencia de ajustes a corto plazo en relación al cambio abrupto en el estado osmorregulatorio (Schleich et al., 2001; Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2005). Además, individuos de *N. granulata* mantenidos a largo plazo a baja y alta salinidad, presentan una modulación diferencial de enzimas

digestivas y de reservas de energía sugiriendo la existencia de ajustes digestivos y metabólicos post-prandiales diferenciales y/o específicos en relación al estado osmorregulatorio (Michiels, 2015; capítulo 4 presente tesis). En este contexto, podría especularse que un cambio abrupto de salinidad que implique diferentes respuestas osmorregulatorias a corto plazo luego de la ingesta de alimento conducirían a ajustes digestivos y metabólicos a nivel bioquímico. En *N. granulata* se observó la existencia de ajustes específicos post-ingesta de componentes del metabolismo lipídico y proteico específicos en relación a un cambio abrupto de alta a baja salinidad (Michiels, 2015).

En base a lo anteriormente expuesto, se planteó el siguiente objetivo: estudiar el efecto de un cambio abrupto de alta a baja salinidad luego de la ingesta de alimento sobre la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas, concentración de glucosa en hemolinfa y el contenido de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva.

Materiales y métodos

Sitios de estudio y recolección de animales

Individuos de *Neohelice granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita fueron mantenidos en laboratorio durante 10 días en 37‰ de salinidad como se describió en el capítulo 3. 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. Se utilizaron entre 4 a 5 individuos por condición.

Preparación de muestras

Según lo descrito en la sección materiales y métodos del capítulo 3.

Osmolalidad de la hemolinfa

Se determinó como fue descrito en el capítulo 3.

Determinación de las actividades enzimáticas

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3.

Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa

La concentración de glucosa se midió en el suero inmediatamente después de la extracción y centrifugación de la hemolinfa como se describió previamente (Pinoni et al., 2011, 2013). Una alícuota adecuada de hemolinfa se incubó con 1,5 ml del reactivo para glicemia (Kit Wiener Lab AA). Luego de 5 min a 37°C, la cantidad de glucosa se determinó mediante la lectura de la absorbancia en 505 nm del complejo quinona coloreada. Los resultados se expresaron como mg glucosa x ml⁻¹.

Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre

Se realizó de acuerdo a los descrito en los capítulo 3.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para el sistema operativo Windows, que realiza automáticamente una prueba previa para la igualdad de varianza y normalidad.

Las diferencias en la capacidad osmorregulatoria entre los distintos tiempos luego del cambio abrupto se analizaron con el test no paramétrico (Kruskal-Wallis).

Las diferencias en la actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas, glucosa en hemolinfa, glucógeno y glucosa libre en los diferentes órganos de reserva luego de cambio abrupto de salinidad fue analizada con el test paramétrico (ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias a los diferentes tiempos luego del cambio abrupto con respecto al tiempo cero se utilizó el test *a posteriori* Holm-Sidak o Dunn.

Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Capacidad osmorregulatoria luego de un cambio abrupto de alta a baja

salinidad

Los individuos alimentados y mantenidos a 37‰ (tiempo cero), presentaron capacidad hiporregulatoria, mientras que los individuos alimentados y transferidos de 37 a 10‰ exhibieron capacidad hiperregulatoria a los distintos tiempos luego de la transferencia. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de capacidad osmorregulatoria registrados a los distintos tiempos luego del cambio abrupto (H: 2,66; p: 0.26) (Figura 5.1).

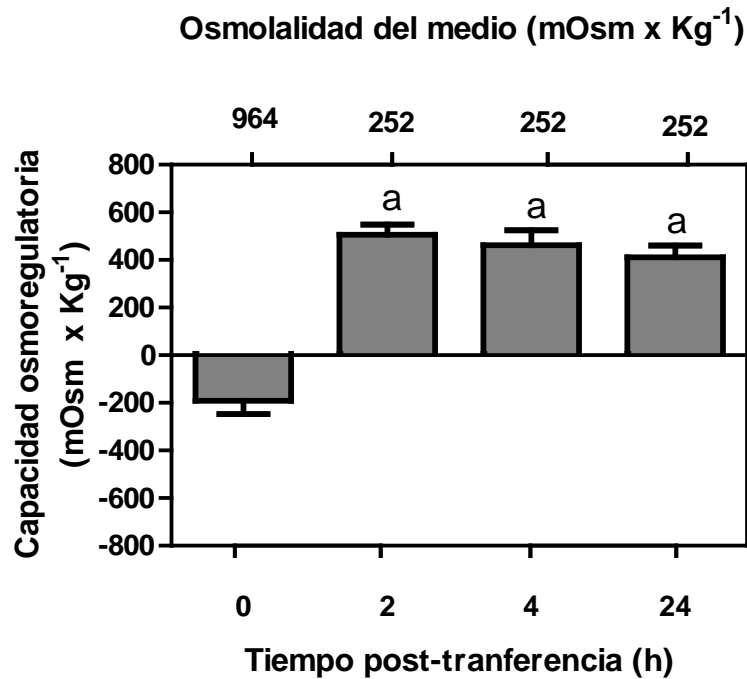


Figura 5.1.- Capacidad osmorregulatoria a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *Neohelice granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Letras iguales significan valores similares entre sí. Los datos son la media ± E.S 5 individuos

Actividades de carbohidrasas en hepatopáncreas luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad

Actividad de α -amilasa

La actividad de α -amilasa a las 2 y 4 h luego del cambio abrupto de 37 a 10‰ de salinidad fue similar con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia (tiempo 0). A las 24 h luego del cambio abrupto de salinidad, la actividad de α -amilasa

disminuyó alrededor de un 66% con respecto al valor registrado antes de la transferencia (F: 3,72; p: 0,03) (Figura 5.2).

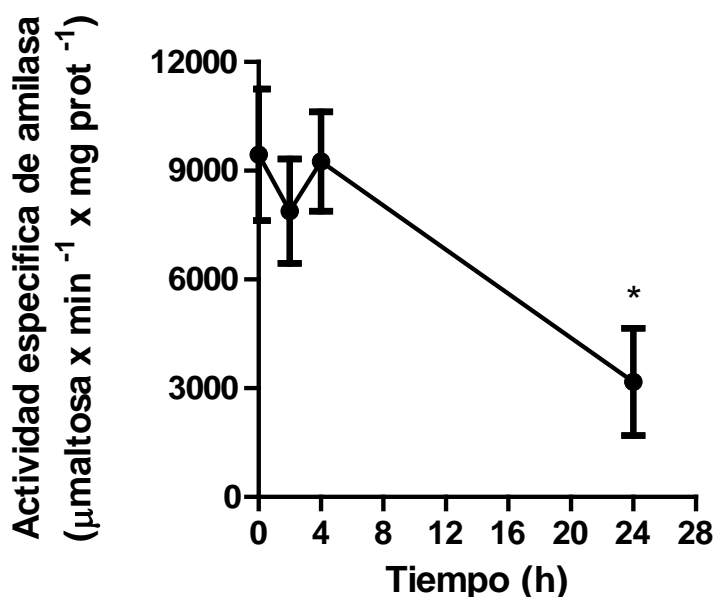


Figura 5.2.- Actividad de α -amilasa en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm E.S 4-5 individuos.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

Actividad de maltasa

La actividad de maltasa luego de 2 y 4 h del cambio abrupto de salinidad se mantuvo en valores similares a los registrados antes de la transferencia. A las 24 h, la actividad disminuyó aproximadamente un 78% con respecto a la actividad a tiempo cero (F: 5,19; p: 0,012) (Figura 5.3).

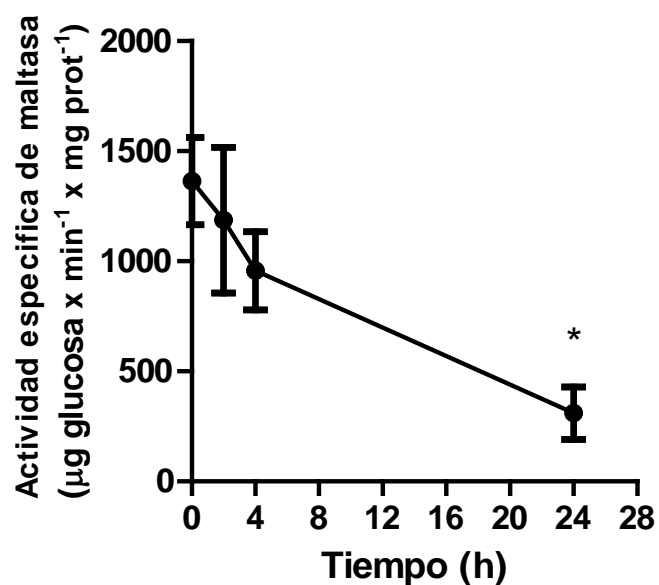


Figura 5.3.- Actividad de maltasa en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm E.S 4-5 individuos. * Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$).

Actividad de sacarasa

A las 2 y 4 h luego de la transferencia desde alta a baja salinidad los individuos exhibieron una actividad de sacarasa similar a la registrada antes de la transferencia. A las 24 h luego del cambio la actividad disminuyó alrededor de un 67% con respecto a tiempo cero (F: 4,20; p: 0,02) (Figura 5.4).

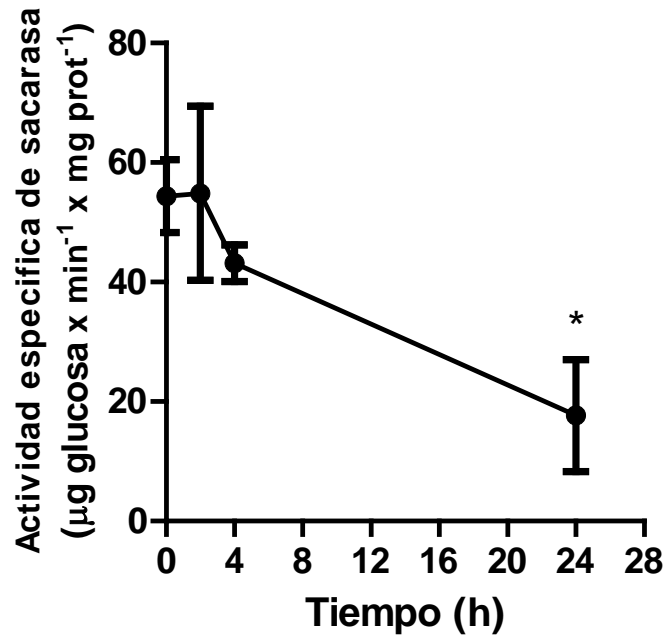


Figura 5.4.- Actividad de sacarasa en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son la media \pm E.S 4-5 individuos.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

Concentración de glucosa en hemolinfa luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad

La concentración de glucosa en hemolinfa fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero ($F: 1,15; p: 0,36$) (Figura 5.5).

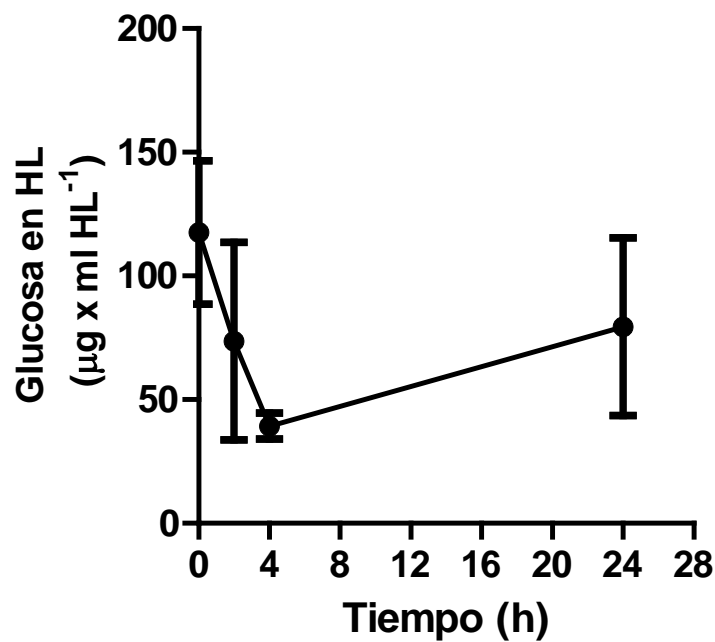


Figura. 5.5.- Concentración de glucosa en hemolinfa (HL) a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm E.S 3-4 individuos.

Concentración de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad

Hepatopáncreas

La concentración de glucógeno en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (F: 1,11; p: 0,37) (Figura 5.6A)

La concentración de glucosa libre en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (F: 1,02; p: 0,41) (Figura 5.6B).

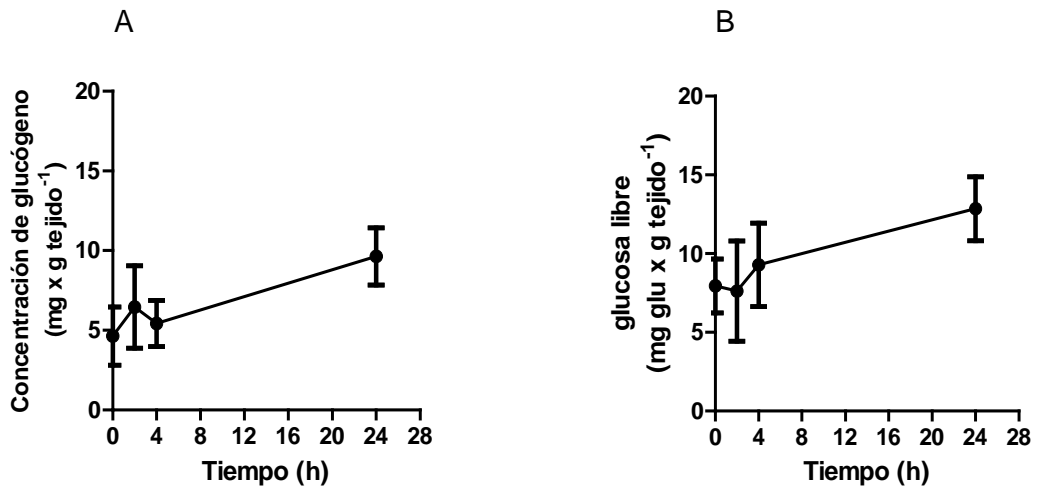


Figura 5.6.- Concentración de glucógeno (A) y glucosa libre (B) en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm E.S 4- 5 individuos.

Músculo

La concentración de glucógeno en músculo de la quela fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (F: 0,84; p: 0,49) (Figura 5.7A).

La concentración de glucosa libre en músculo de la quela fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (F: 1,89; p: 0,17) (Figura 5.7B).

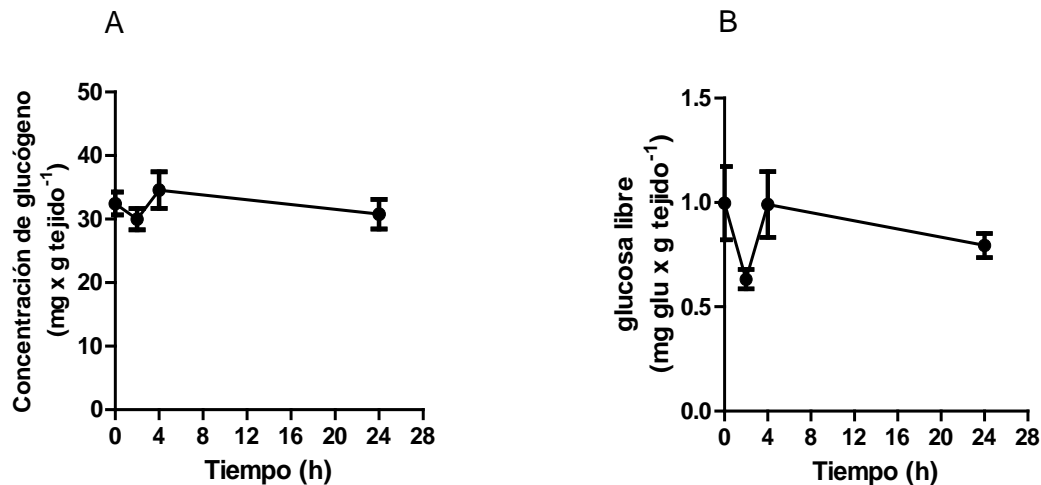


Figura 5.7.- Concentración de glucógeno (A) y glucosa libre (B) en músculo a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm E.S 4-5 individuos.

Branquias anteriores

La concentración de glucógeno en branquias anteriores fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (F: 2,59; p: 0,09) (Figura 5.8A).

La concentración de glucosa libre en branquias anteriores fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (H: 12,25; p: 0,007) (Figura 5.8B).

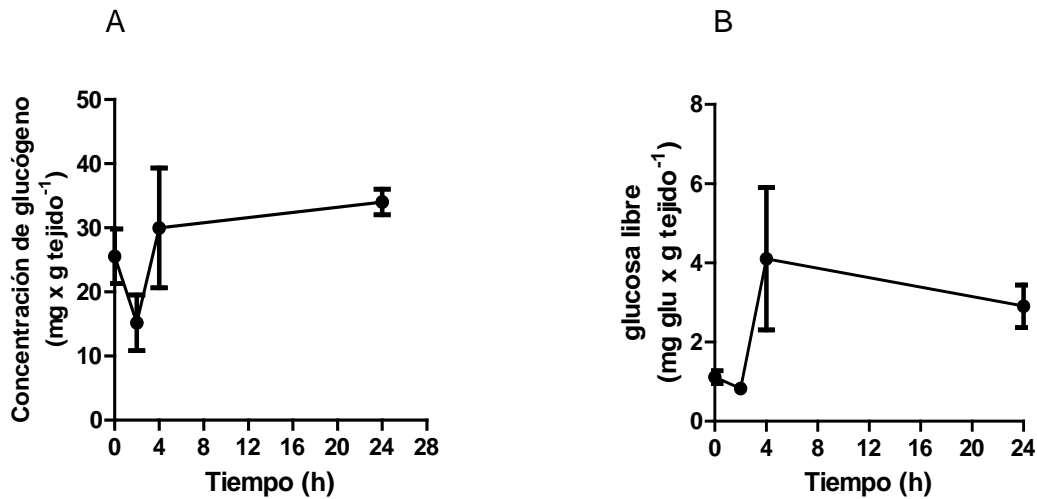


Figura 5.8.- Concentración de glucógeno (A) y glucosa libre (B) en branquias anteriores a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. Los datos son las medias \pm E.S 4-5 individuos.

Branquias posteriores

A las 2 h después del cambio abrupto no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucógeno. A las 4 h la concentración de glucógeno fue menor (alrededor de 50%) con respecto al tiempo 0. Posteriormente, se produjo un aumento en la concentración de glucógeno siendo a las 24 h 46% mayor que a tiempo cero (F: 8,93; p: 0,001) (Figura 5.9A).

La concentración de glucosa libre en branquias posteriores fue similar a los distintos tiempos luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad con respecto a la concentración a tiempo cero (F: 1,15; p: 0,36) (Figura 5.9B).

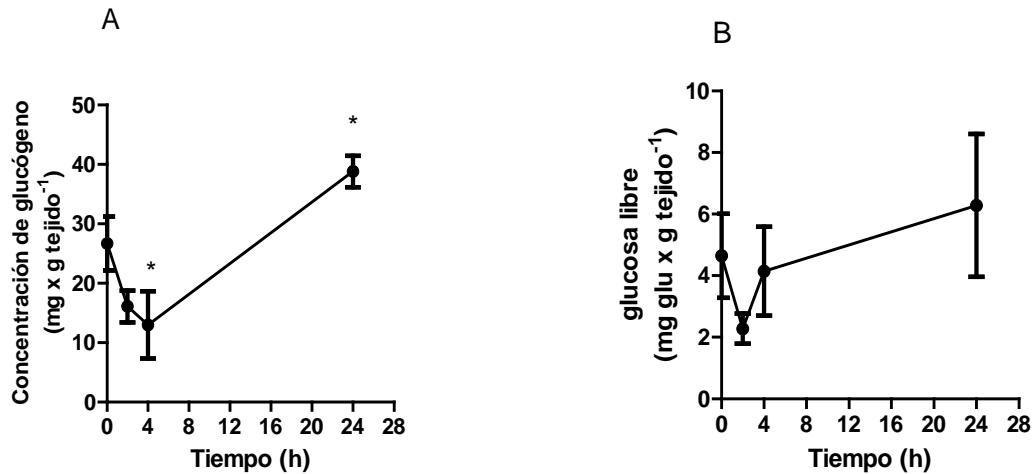


Figura 5.9.- Concentración de glucógeno (A) y glucosa libre (B) en branquias posteriores a diferentes tiempos luego de un cambio abrupto desde alta (37‰) a baja (10‰) salinidad de individuos de *N. granulata* alimentados (tiempo cero) y transferidos inmediatamente luego de la ingesta de alimento. *Indica diferente del valor a tiempo cero ($p < 0,05$). Los datos son las medias \pm E.S 4-5 individuos.

Discusión

En varias especies de cangrejos osmorreguladores, los ajustes a corto plazo en respuesta a cambios en la salinidad ambiental han sido asociados con la activación de diferentes mecanismos osmo-ionorregulatorios que involucran la participación de varios sistemas de transportes y enzimas en branquias y/o músculo (ej. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, anhidrasa carbónica y fosfatasa alcalina) (López Mañanes et al., 2000; Jahn et al., 2006; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008b, 2009; Martins et al., 2011; Henry et al., 2012; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zheng, 2012; Mitchell y Henry, 2014; Harvid et al., 2013, 2016). Los cambios en componentes de la maquinaria osmorregulatoria involucrados en la respuesta a variaciones abruptas en la salinidad ambiental podrían requerir de una reorganización metabólica diferencial y específica (Luvizzotto-Santos et

al., 2003; Romano y Zeng, 2012; Michiels, 2015; Lignot y Charmantier, 2015). En individuos de *Neohelice granulata* expuestos a un cambio abrupto de alta (37‰) a baja (10‰) salinidad luego de la ingesta de alimento mostraron la existencia de una disminución en la actividad de lipasa, proteolítica total y N-aminopeptidasa (APN) en hepatopáncreas luego de 24 h y el aumento concomitante en las reservas de triglicéridos y proteínas en hepatopáncreas, lo que sugeriría la existencia de ajustes en los procesos de degradación y/o síntesis de macromoléculas (Michiels, 2015). Los resultados del presente capítulo que muestran la existencia de cambios post-ingesta diferenciales de la actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas y en la concentración de glucógeno en branquias posteriores frente a un cambio abrupto de alta a baja salinidad sugieren la existencia de ajustes específicos en componentes del metabolismo de hidratos de carbono en relación a un cambio a corto plazo en el estado osmorregulatorio (hipo/hiperregulación).

En base a su condición de osmorregulador fuerte (Curtis y McGaw, 2010), los individuos de *N. granulata* alimentados y expuestos inmediatamente a un cambio abrupto de alta a baja salinidad fueron capaces de cambiar su condición de hipo a hiperregulación, sugiriendo la existencia de flexibilidad en su respuesta osmorregulatoria a corto plazo. La menor actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas a las 24 h luego del cambio abrupto, similarmente a lo observado para la actividad de lipasa, proteolítica y APN (Michiels, 2015), sugiere la existencia de ajustes (disminución) en la capacidad para la digestión de distintos sustratos (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) en relación al cambio abrupto de hipo a hiperregulación. Por otro lado, el hecho que la modulación de la actividad de carbohidrasas difiere a lo observado en individuos alimentados y mantenidos a largo plazo en baja y alta salinidad (capítulo 4), sugiere que estos ajustes post-prandiales a nivel bioquímico estarían relacionados

con el cambio abrupto de hipo a hiperregulación. Si, por otro lado, la menor actividad de α -amilasa implica una modulación de formas con actividad amilolítica con distinta capacidad para hidrolizar glucógeno (capítulo 1 y 3) requiere mayor investigación. En mamíferos, varias hormonas y/o mensajeros primarios están involucrados en la modulación de la actividad de carbohidrasas (Korc et al., 1981; Balas et al., 1985; Galand, 1989; Petersen et al., 2002). Resultados previos realizados en nuestro laboratorio muestran la existencia de regulación *in vitro* por dopamina de la actividad de APN y la actividad intracelular de lipasa por dopamina y glucagón en hepatopáncreas de *N. granulata*, sugiriendo que estos mensajeros estarían involucrados en mecanismos de modulación de la actividad de enzimas digestivas. En este contexto, se necesitan futuros experimentos para establecer si la disminución en la actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas de *N. granulata* luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad se debería a una modulación por mensajeros químicos (ej. dopamina/glucagón). En el camarón *L. vananamei* se ha demostrado 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). Sin embargo, faltan estudios de este tipo en *N. granulata*.

En cangrejos eurihalinos, se ha demostrado que diferentes factores pueden modular el contenido de diversos sustratos de energía en órganos de reserva, esto podría conducir a la modificación del metabolismo de lípidos, proteínas y/o hidratos de carbono (Luvizotto-Santos et al., 2003; Bianchini et al., 2008; Romano y Zeng, 2012; Pinoni et al., 2011, 2013, 2015a, b; Michiels, 2015; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a, b). El mantenimiento de la concentración de glucógeno y glucosa libre en hepatopáncreas de *N. granulata*, contrariamente a lo observado en triglicéridos y proteínas (Michiels, 2015), sugiere la existencia de una modulación diferencial de

distintos tipos de sustratos de reserva en este tejido. La homeostasis de glucosa (mantenimiento de niveles adecuados de glucosa en la hemolinfa) es esencial para soportar las funciones regulares de varios órganos y en respuestas a varios factores ambientales (Verri et al., 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Sánchez-Paz et al., 2006; Buckup et al., 2008; Obi et al., 2011; Dutra et al., 2008; Chung, 2014; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a, b). Los resultados del presente capítulo que muestran el mantenimiento de los valores de glucosa hemolinfática sugieren que la disponibilidad de este metabolito no sería una limitante post-ingesta en *N. granulata* luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad. En varios crustáceos decápodos, la mayor parte de la glucosa hemolinfática proviene del hepatopáncreas donde es absorbida hacia la hemolinfa, almacenada como glucógeno y/o puede ser sintetizada a través de la vía gluconeogénica (Verri et al., 2001; Obi et al., 2011; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a). El mantenimiento de la concentración de glucógeno y glucosa libre en hepatopáncreas sugiere el rol de este órgano para un suministro adecuado y sostenido de glucosa hemolinfática en *N. granulata* luego del cambio abrupto. El hecho que individuos de *N. granulata* mantenidos a largo plazo a 10‰ y 37‰ de salinidad exhiben una respuesta post-ingesta diferencial del contenido de glucógeno y/o glucosa libre (capítulo 4) soporta la idea de ajustes en hepatopáncreas específicos y diferenciales en diferentes componentes del metabolismo de hidratos de carbono, dependiendo del grado y tipo de desafío osmótico.

El músculo de la quela constituye un importante sitio de almacenamiento de glucógeno en *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita (Artillo et al., 2008; Pinoni et al., 2011, 2013, capítulo 4 presente tesis). Debido a que no se observaron variaciones en el contenido de glucógeno y/o glucosa libre en músculo de la quela, similarmente a lo observado en la concentración de proteínas y triglicéridos (Michiels,

2015), sugeriría que la modulación en el contenido de reservas de energía en este tejido, no sería un de los componentes de los ajustes metabólicos post-ingesta en relación a un cambio abrupto de salinidad. Hemos demostrado que ajustes en el contenido de glucógeno y glucosa libre en branquias anteriores y posteriores son parte de los mecanismos de la adaptación bioquímica a la salinidad en *N. granulata* (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001; Artillo et al. 2008; Pinoni, 2009; González et al., 2012; Pinoni et al., 2011; 2013; capítulo 4 presente tesis). Sin embargo, las diferentes respuestas observadas sugieren la participación diferencial de las branquias anteriores y/o posteriores en estos ajustes dependiendo del grado y tipo de estrés osmótico. Así, los resultados presentados en el capítulo anterior de la presente tesis (capítulo 4) muestran que en condiciones de hiperregulación solo se produjeron cambios post-prandiales del contenido de glucógeno en branquias anteriores. Sin embargo, los resultados del presente capítulo, muestran la modulación en el contenido de glucógeno en branquias posteriores, mientras que se mantuvo constante en branquias anteriores luego del cambio abrupto de alta a baja salinidad. La disminución en la concentración de glucógeno a las 4 h en las branquias posteriores, sugiere la utilización de esta reserva a corto plazo luego del cambio. El posterior aumento a las 24 h en el contenido de glucógeno en branquias posteriores (hasta valores más altos que los observados antes de la transferencia), sugiere la existencia de ajustes temporales diferenciales en mecanismos de regulación del catabolismo/anabolismo de glucógeno en relación al cambio abrupto de salinidad luego de la ingesta de alimento. Por otro lado, la modulación diferencial en el contenido de glucógeno en branquias posteriores, podría estar relacionada con cambios temporales en componentes de la maquinaria osmoregulatoria con alto costo metabólico (ej. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$). En branquias posteriores de *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita se observó el aumento

a corto plazo en la actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ luego de un cambio abrupto de salinidad seguido de una posterior disminución a partir de las 24 h (Schleich et al., 2001). Experimentos *in vitro* en branquias posteriores de *N. granulata* de otras zonas geográficas (Rio Grande, Brasil) han demostrado la existencia y la activación de enzimas involucradas en la gluconeogénesis en diferentes condiciones de estrés osmótico, siendo esta vía crucial para la síntesis y homeostasis de glucosa y para la síntesis de glucógeno en este órgano (Martins et al., 2011). Experimentos *in vitro* en branquias de *N. granulata*, mostraron que estas constituyen un sitio de captación de glucosa y de síntesis de glucógeno por la acción de la insulina (Kucharski et al., 2002). Además, experimentos *in vitro* en branquias de *N. granulata*, mostraron la modulación del contenido de glucógeno por serotonina (5-HT) (Inohara et al., 2015). Experimentos *in vivo* muestran que la dopamina e histamina afectan el contenido de glucógeno en branquias anteriores y posteriores del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus* (del Valle et al., 2012; datos no publicados). Sin embargo, se necesitan futuros estudios para establecer si algunas de las vías anteriormente mencionadas están involucradas en la modulación del contenido de glucógeno en branquias posteriores en individuos de *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita luego de un cambio abrupto de salinidad.

En conclusión, los resultados del presente capítulo que muestran la variación en la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas y en el contenido de glucógeno en branquias posteriores luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad inmediatamente luego de la ingesta de alimento, sugieren la existencia de ajustes post-prandiales diferenciales en componentes del metabolismo de hidratos de carbono específicos en relación al cambio en el estado osmorregulatorio.



Capítulo 6:

**Flexibilidad fenotípica en respuesta a la
emersión: actividad de enzimas digestivas,
glucosa en hemolinfa y reservas de energía en
*Neohelice granulata***

Introducción

La zona intermareal es un ambiente heterogéneo que se caracteriza no sólo por los cambios en salinidad sino porque representa además un sitio de transición entre el ambiente acuático y terrestre. Por su estilo de vida, varios cangrejos eurihalinos que habitan zonas de mareas pueden soportar períodos variables de exposición al aire (emersión) por lo que presentan estrategias a distintos niveles que le permiten su supervivencia bajo estas condiciones (Luquet et al., 1998; Robertson et al., 2001; McGaw et al., 2007; Simonik y Henry, 2014, de Lima et al., 2015; Lu et al., 2015; 2016; Mitra y Zanman, 2016). En este contexto, varios cangrejos eurihalinos semiterrestres con respiración bimodal presentan una serie de adaptaciones a distintos niveles (ej. morfológicas, fisiológicas y de comportamiento) que les permite realizar un intercambio respiratorio eficiente tanto en agua como en aire y de esta manera sobrellevar periodos variables de emersión (Al-Wassia et al., 1989; Henry, 1994; Airries y McMahon, 1996; Maciel et al., 2008; Lagos et al., 2011; Hsia et al., 2013; de Lima et al., 2015). Estos ajustes podrían requerir una reorganización metabólica diferencial en adición a las de la osmorregulación (Pinoni, 2009). Sin embargo, se conoce muy poco sobre ajustes a nivel bioquímico digestivos (ej. modulación de enzimas digestivas) y metabólicos (contenido de sustratos de reserva de energía) posiblemente asociados a la emersión.

Neohelice granulata es un cangrejo eurihalino semiterrestre que es capaz de mantener elevados niveles de actividad tanto en el agua como durante periodos de emersión (Boschi, 1964; Santos et al., 1987; Iribarne, 1997; Schmitt y Santos, 1993; Maciel et al., 2008; Mendez Casariego et al., 2011; Luppi et al., 2013; Bas et al., 2014; de Lima et al., 2015). En *N. granulata* de distintas áreas geográficas se han realizado

diferentes estudios sobre su fisiología respiratoria, la regulación iónica y equilibrio ácido-base durante la emersión (Santos et al., 1987; Luquet y Ansaldo, 1997; Luquet et al., 1998; Halperin et al., 2000, Pinoni y López Mañanes, 2008b; Pinoni, 2009). En *N. granulata* de Rio Grande (Brasil) se ha observado que la exposición a la emersión en condiciones controladas de laboratorio de individuos privados de alimento induce cambios en glucosa hemolinfática y reservas de energía (ej. glucógeno y lípidos) en diferentes órganos de reserva (Schmit y Santos, 1993; Dos Santos y Colares, 1986) sugiriendo la existencia de ajustes metabólicos en relación a la emersión. Sin embargo, faltan estudios integrativos sobre posibles ajustes digestivos post-prandiales (ej. actividad de enzimas digestivas clave) y sustratos de energía en órganos de reserva (ej. glucógeno, triglicéridos y proteínas) en relación a la emersión en diferentes condiciones de salinidad que impliquen estados osmorregulatorios diferenciales.

N. granulata en la planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita, se mueve principalmente durante la marea alta pero también son activos durante la marea baja durante la cual realizan excursiones exploratorias alrededor de sus cuevas y toleran amplios períodos de emersión (Spivak et al., 1994; Spivak, 1997; Luppi et al., 2013; Bas et al, 2014). Individuos de *N. granulata* expuesto a emersión en condiciones de osmoconformación y privados de alimento, exhibe modulación de la actividad de Na^+ -ATPasa, Na^+ - K^+ -ATPasa y fosfatasas alcalinas (AP) en músculo de la quela y sobre la actividad de AP, proteolítica total y concentración de proteínas en hepatopáncreas (Pinoni y López Mañanes, 2008b; Pinoni, 2009) sugiriendo la existencia de ajustes en el metabolismo proteico.

En individuos de *N. granulata* mantenidos a largo plazo en condiciones de hiper/hiporregulación y en relación a un cambio abrupto de salinidad mostraron la modulación diferencial post-prandial de distintas enzimas digestivas en hepatopáncreas

y de la concentración de reservas de energía (Michiels, 2015; capítulos 4 y 5 presente tesis). Estos resultados indicarían la existencia de ajustes digestivos y metabólicos diferenciales en relación al tipo y grado de desafío osmótico. En este contexto, en el presente capítulo se estudió la existencia de ajustes post-prandiales en la actividad de enzimas digestivas (carbohidrasas, lipasa y proteolítica total) en hepatopáncreas, en la concentración de glucosa en hemolinfa y en el contenido de reservas de energía (glucógeno, proteínas y triglicéridos) en individuos de *N. granulata* expuestos a emersión inmediatamente luego de ser alimentados en condiciones de hiper e hiporregulación.

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de los animales

Individuos de *Neohelice granulata* de la zona de planicie de mareas fueron mantenidos en laboratorio durante 10 días en 10, 35 y 37‰ de salinidad como se describió en el capítulo 3. Para estudiar el efecto de la emersión, los individuos fueron sumergidos durante 24 h (pre-emersión). Luego de las 24 h de sumergidos, se alimentaron y cuando la cantidad total de alimento ofrecido fue ingerida (lo que tomó como máximo 5 minutos) fueron expuestos al aire durante distintos tiempos. Los individuos fueron crioanestesiados a tiempo cero (pre-emersión) y luego de 1 y 4 h de emersión. El máximo de tiempo utilizado (4 h) se basa en lo previamente descrito por Luquet et al., (1998) sobre la tolerancia de *N. granulata* a la emersión. Para evitar la desecación se colocó un papel húmedo en el fondo de los recipientes. Se utilizó entre 3 a 10 individuos por condición.

Las determinaciones de individuos expuestos a 37% de salinidad, luego de 60 min de emersión no pudieron ser realizadas.

Osmolalidad de la hemolinfa

La osmolalidad de la hemolinfa se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

Preparación de extractos enzimáticos

La preparación de extractos enzimáticos se realizó según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo 3.

Determinación de la actividad de enzimas digestivas

La actividad de α -amilasa se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

La actividad de maltasa y sacarasa se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 3.

La actividad de tripsina se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 2.

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 $\mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

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 (Pinoni, 2009; Pinoni 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 (0°C) 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 $\text{U} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección materiales y métodos del capítulo 1.

Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa

La concentración de glucosa en hemolinfa se determinó según lo descrito en materiales y métodos del capítulo 4.

Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre

La concentración de glucógeno y glucosa libre en los órganos de reserva se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 4.

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) como se describió previamente (Pisoni et al., 2011, 2013; Michiels, 2015). La muestra correspondiente se incubó durante 5 min a 37°C (Pisoni 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

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 y normalidad.

La diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa a tiempo cero y la del medio externo para cada salinidad, se analizaron con *t*-test.

Las diferencias en la osmolalidad entre los distintos tiempos luego de la emersión con respecto al tiempo cero se analizaron con el test paramétrico (One Way ANOVA).

Las diferencias en la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa y proteolítica en hepatopáncreas, concentración de glucosa en hemolinfa, concentración de glucógeno, TAG y proteínas en los diferentes órganos de reserva a los distintos

tiempos de emersión con respecto al tiempo cero, se analizaron utilizando el test paramétrico (One Way ANOVA) o no paramétrico (Kruskall-Wallis) Para estimar las diferencias entre los diferentes tiempos luego del cambio abrupto con respecto al tiempo cero se utilizó el test *a posteriori* Holm-Sidak o Dunn.

Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Osmolalidad de la hemolinfa a distintos tiempos luego de la emersión en individuos expuestos a baja y alta salinidad

En individuos sumergidos y alimentados en 35‰ de salinidad (pre-emersión, tiempo cero), la osmolalidad de la hemolinfa ($796 \text{ mOmol} \times \text{Kg}^{-1}$) fue similar a la osmolalidad del medio externo ($756 \text{ mOmol} \times \text{Kg}^{-1}$) ($t: 1,09$; $p: 0,28$). Los valores de osmolalidad de la hemolinfa se mantuvieron a los distintos tiempos de emersión (1-4h) con respecto al tiempo cero ($F: 3,65$; $p: 0,51$) (Figura 6.1A).

En individuos sumergidos y alimentados en baja salinidad (10‰) (pre-emersión, tiempo cero), la osmolalidad de la hemolinfa ($651 \text{ mOmol} \times \text{Kg}^{-1}$) fue mayor que la osmolalidad del medio externo ($299 \text{ mOmol} \times \text{Kg}^{-1}$) ($t: 9,20$; $p \leq 0,001$). Los valores de osmolalidad de la hemolinfa se mantuvieron a los distintos tiempos de emersión (1-4h) ($F: 0,020$; $p: 0,97$) (Figura 6.1B).

En individuos sumergidos y alimentados en alta salinidad (37‰) (pre-emersión, tiempo cero), la osmolalidad de la hemolinfa ($857 \text{ mOsmol} \times \text{Kg}^{-1}$) fue menor que la osmolalidad del medio externo ($1.450 \text{ mOsmol} \times \text{Kg}^{-1}$) ($t: 19,67$; $p \leq 0,001$). A las 4h de la emersión, los valores de osmolalidad de la hemolinfa se mantuvieron con respecto al tiempo cero ($t: 1,93$; $p: 0,09$) (Figura 6.1C).

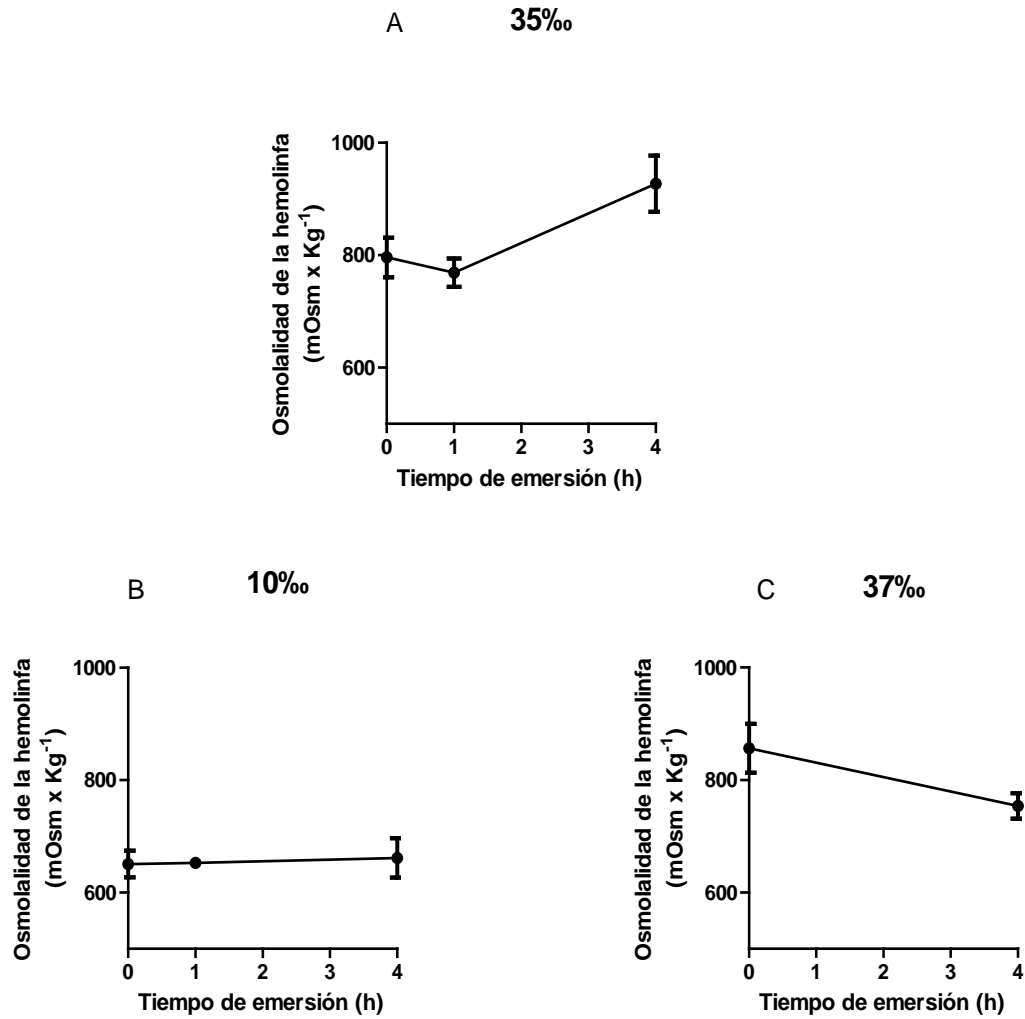


Figura 6.1.- Osmolalidad de la hemolinfa a tiempo cero (pre-emersión, $t=0$) y a distintos tiempos luego de la emersión en individuos de *Neohelice granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad. Los valores son la media \pm E.S. para 4-10 individuos.

**Actividades de enzimas digestivas en hepatopáncreas a distintos tiempos
luego de la emersión a baja y alta salinidad**

Actividad de α -amilasa

En individuos mantenidos a 35‰ y a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad, la actividad de α -amilasa luego de 1 y 4 h de exposición a la emersión fue similar al valor a tiempo cero (F: 2,43; p: 0,12) (F:0,49; p: 0,62) (t : -1,78; p:0,11) (Figura 6.2).

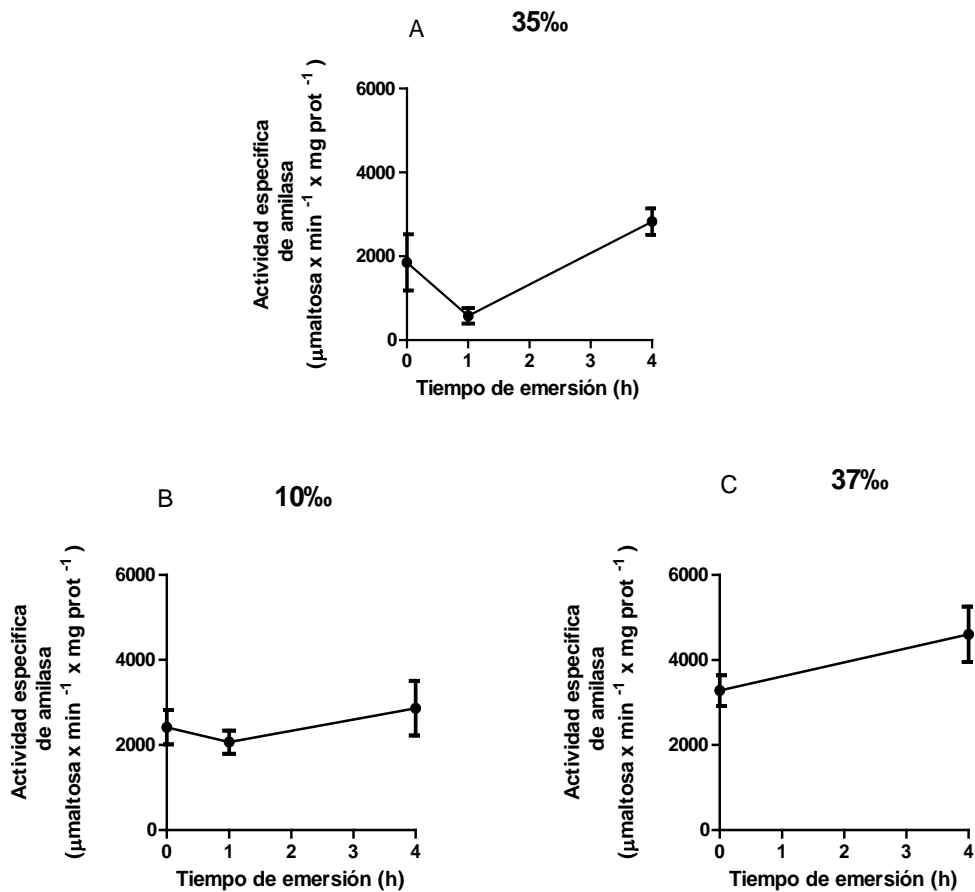


Figura 6.2.- Actividad de α -amilasa en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Actividad de maltasa

En individuos mantenidos a 35‰ y a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad, la actividad de maltasa luego de 1 y 4 h de exposición a la emersión fue similar al valor a tiempo cero (F: 2,28; p: 0,14) (F: 1,85; p:0,19) (t: 0,13; p: 0,89) (Figura 6.3).

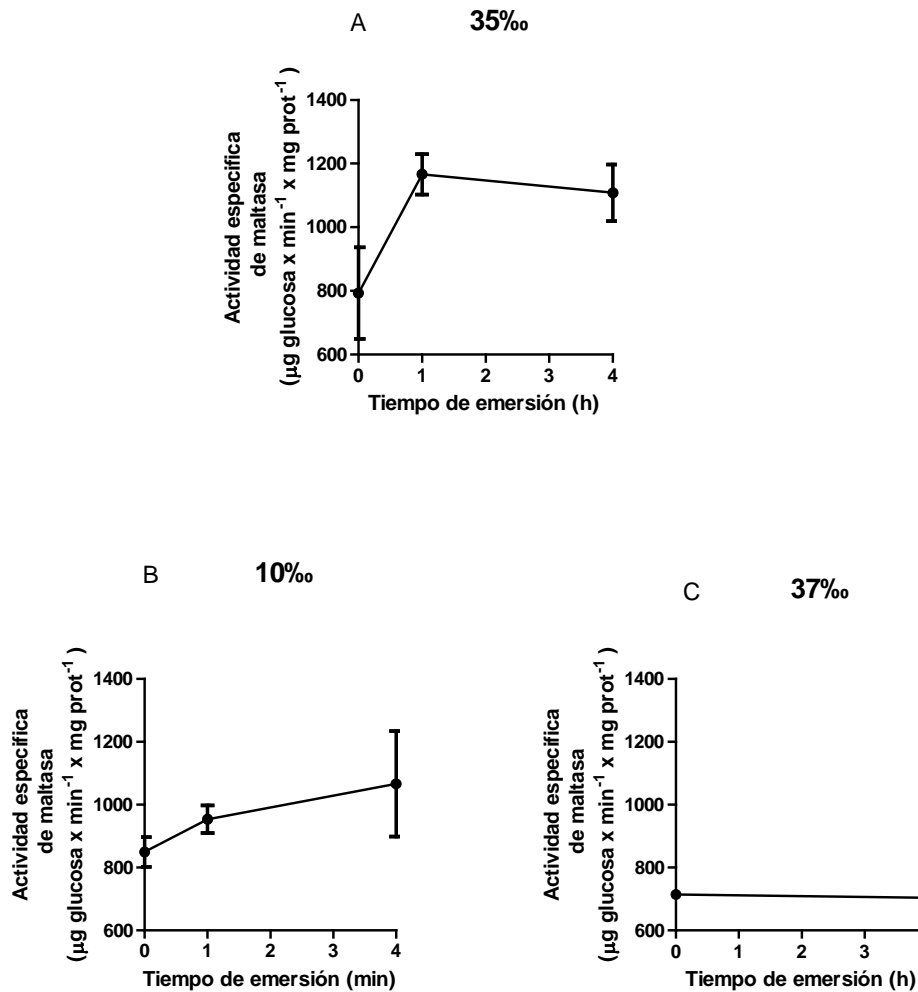


Figura 6.3.- Actividad de maltasa en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias ± E.S. para 3-10 individuos.

Actividad de sacarasa

En individuos mantenidos a 35‰ y a baja (10‰) salinidad, la actividad de sacarasa luego de 1 y 4 h de exposición a la emersión fue similar al valor a tiempo cero (F: 1,17; p: 0,33) (F: 1,60; p: 0,23) (Figuras 6.4 A y B).

En individuos mantenidos a alta salinidad (37‰), luego de 4 h de emersión la actividad de sacarasa fue mayor (alrededor de 84%) con respecto al tiempo cero (t : -2,32; p: 0,048) (Figura 6.4C).

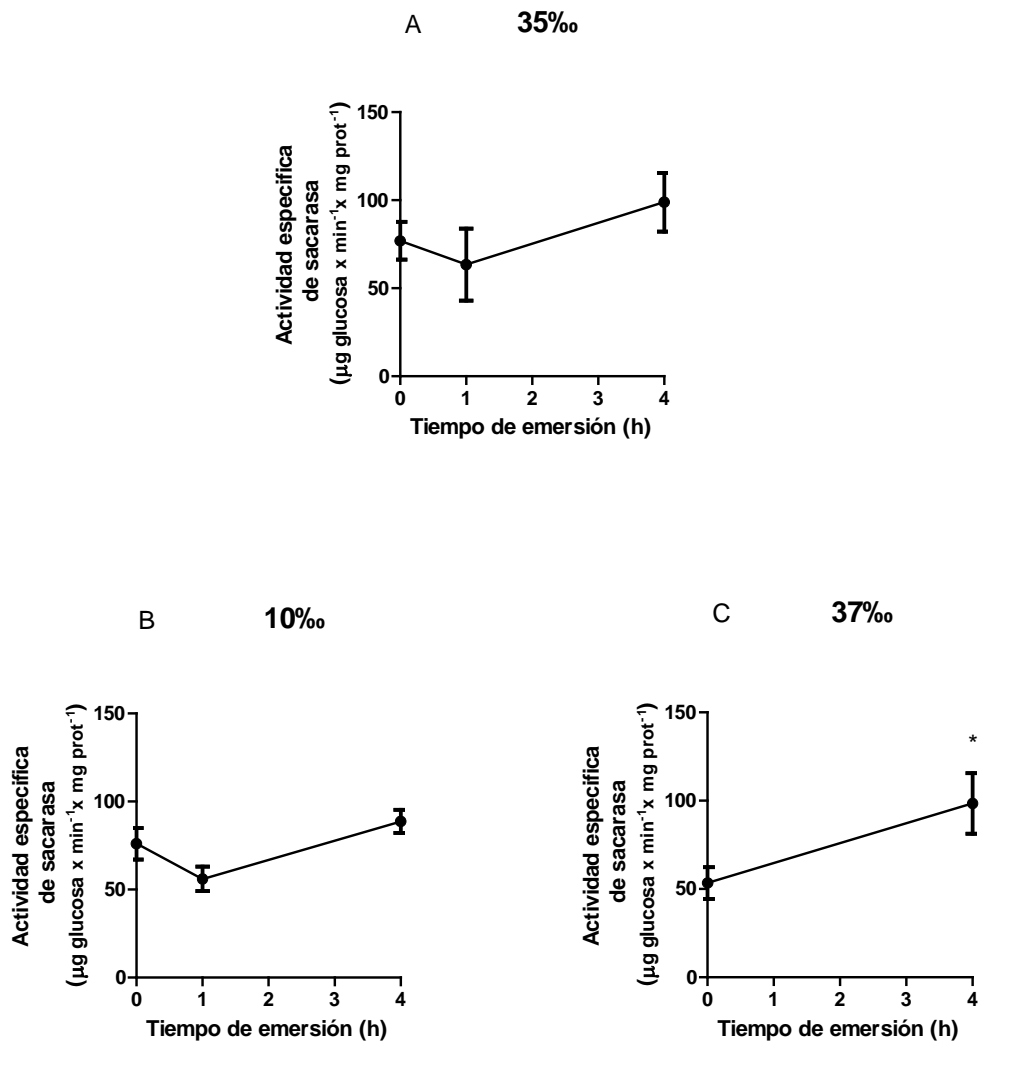


Figura 6.4.- Actividad de sacarasa en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a $t=0$ ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Actividad de lipasa

En individuos mantenidos a 35‰ de salinidad, la actividad de lipasa fue similar a los distintos tiempos de emersión con respecto al tiempo cero (F: 1,18; p: 0,33) (Figura 6.5A).

En individuos mantenidos a baja (10‰) salinidad, la actividad de lipasa 1 h luego de la emersión fue similar a la registrada a tiempo cero, mientras que a las 4 h la actividad fue mayor (alrededor de 50%) (F: 5,47; p: 0,01) (Figuras 6.5B).

En individuos mantenidos a alta (37‰) salinidad, a las 4 h la actividad de lipasa fue mayor (alrededor de 60%) con respecto al tiempo cero (t : -2,66; p: 0,03) (figura 6.5C).

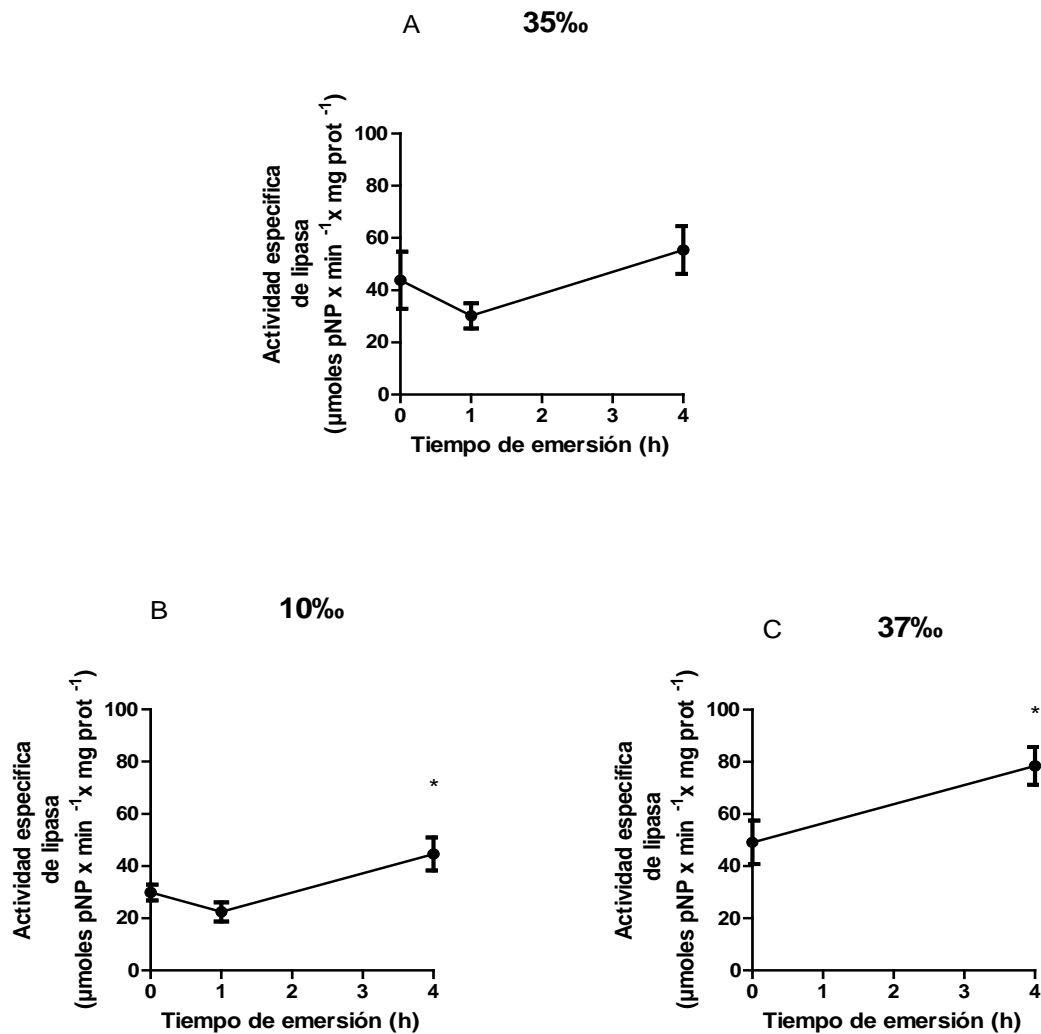


Figura 6.5.- Actividad de lipasa en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. *Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Actividad proteolítica total

En individuos mantenidos a 35‰ salinidad, la actividad proteolítica total fue similar a los distintos tiempos de emersión con respecto al tiempo cero (F: 2,49; p: 0,12) (Figura 6.6A).

En individuos mantenidos a baja (10‰) salinidad, luego de 1 h de emersión la actividad proteolítica total fue similar con respecto al tiempo cero. A las 4 h la actividad fue mayor (alrededor de 41%) (F: 4,64; p: 0,02) (Figura 6.6B).

En individuos mantenidos a alta (37‰) salinidad, la actividad proteolítica total fue similar a las 4 h de exposición a la emersión con respecto al tiempo cero (t :-0,89; p: 0,39) (Figura 6.6C).

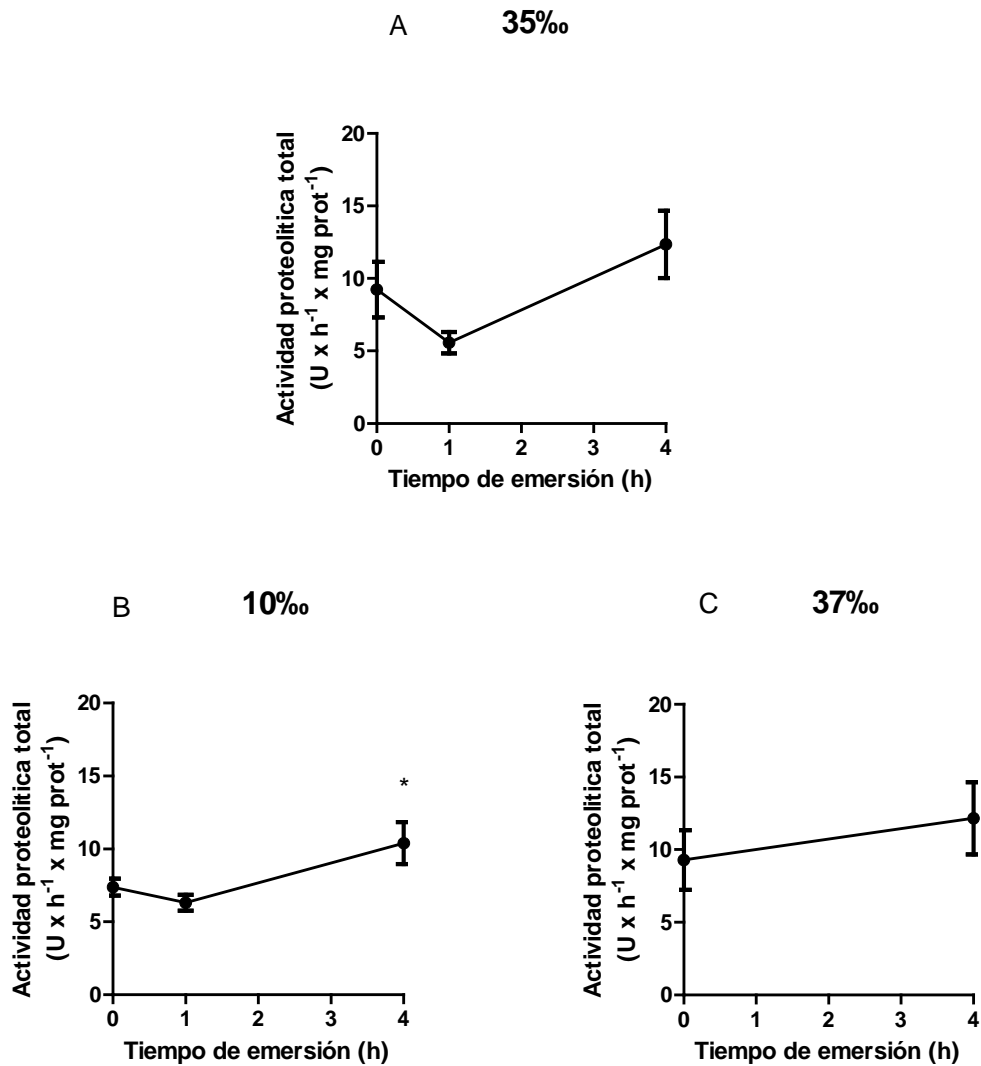


Figura 6.6.- Actividad proteolítica total en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Concentración de glucosa en hemolinfa a distintos tiempos luego de la emersión en baja y alta salinidad

En 35‰ de salinidad, a 1 y 4 h luego de la emersión la concentración de glucosa en hemolinfa fue similar al valor a tiempo cero (F: 1,11; p: 0,35) (Figura 6.7A).

En baja salinidad (10‰), la concentración de glucosa en hemolinfa a 1 h luego de la emersión fue mayor al valor a tiempo cero (alrededor de 145%) y se mantuvo constante a las 4 h (F:5,86; p: 0,01) (Figura 6.7B).

En alta salinidad (37‰), la concentración de glucosa en hemolinfa a las 4 h luego de la emersión fue mayor (alrededor de 155%) con respecto al valor a tiempo cero (t : -2,30; p: 0,05) (Figuras 6.7C).

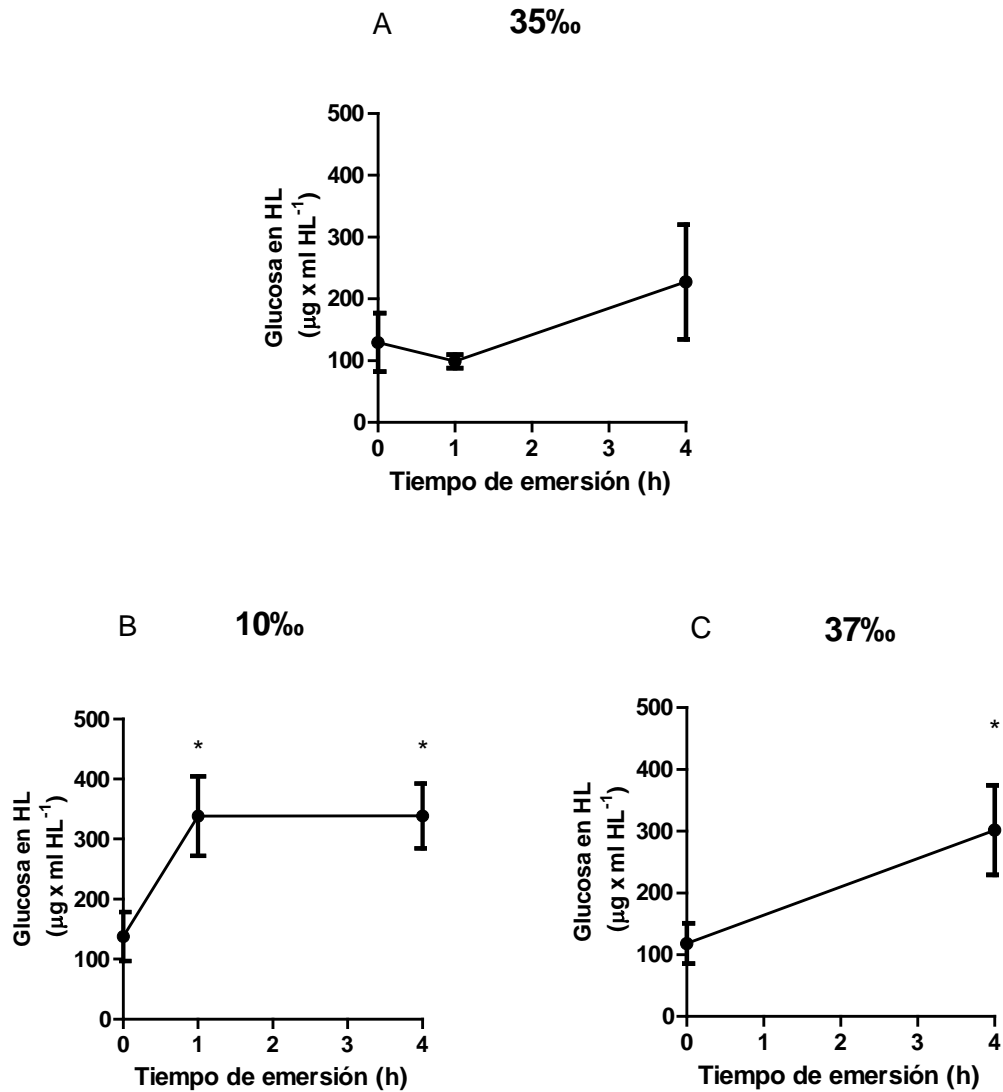


Figura 6.7.- Concentración de glucosa en hemolinfa (HL) a tiempo cero (pre-emersión, $t=0$) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. *Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a $t=0$ ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Concentración de sustratos de energía en hepatopáncreas a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad

Glucógeno

En individuos mantenidos a 35‰ y a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad, la concentración de glucógeno en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos de emersión con respecto al tiempo cero (F: 1,98; p: 0,17) (F: 3,12; p: 0,07) (t : - 0,86; p: 0,41) (Figura 6.8).

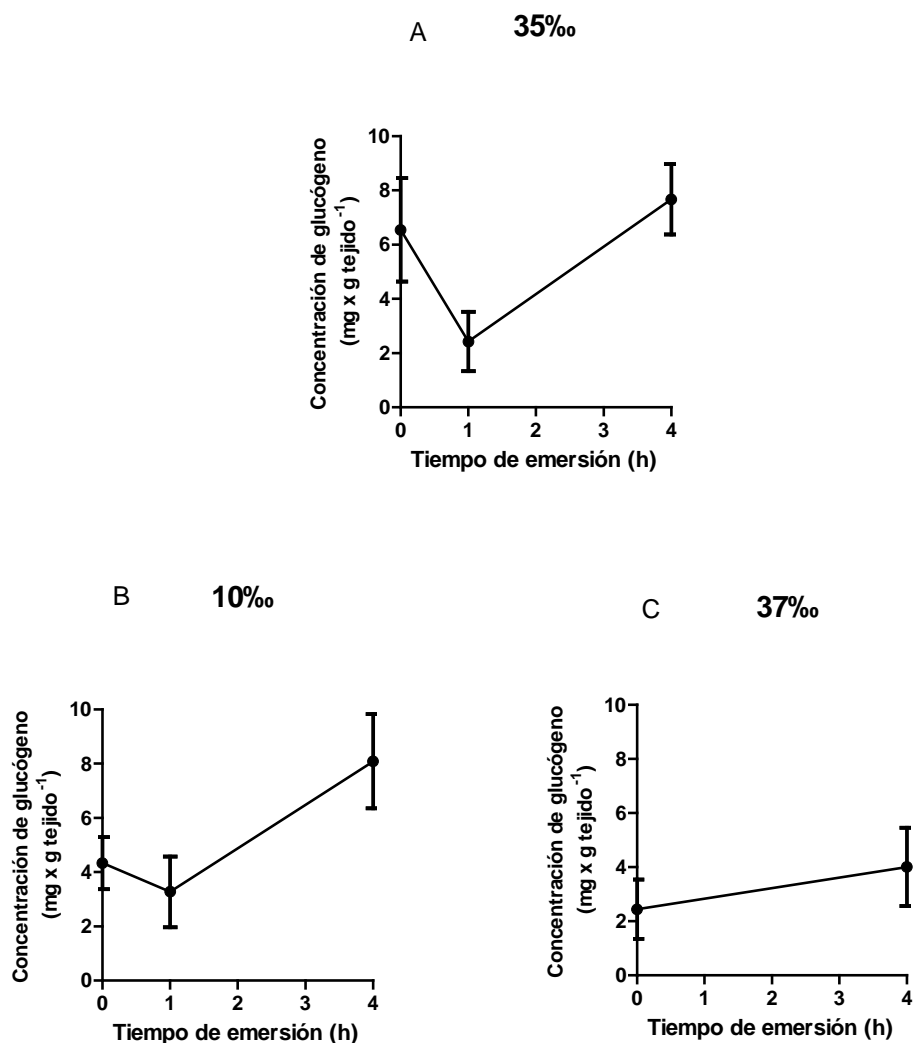


Figura 6.8.- Concentración de glucógeno en hepatopáncreas a tiempo cero (pre-emersión, $t=0$) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En individuos mantenidos a 35‰ y 10‰ de salinidad, la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego de la emersión (F: 1,04; p: 0,37) (F: 0,19; p: 0,82) (Figura 6.9A y B).

En individuos mantenidos a alta salinidad (37‰), la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas fue menor a las 4 h luego de la emersión (alrededor de 14%) (t : 2,46; p: 0,04)(Figura 6.9C).

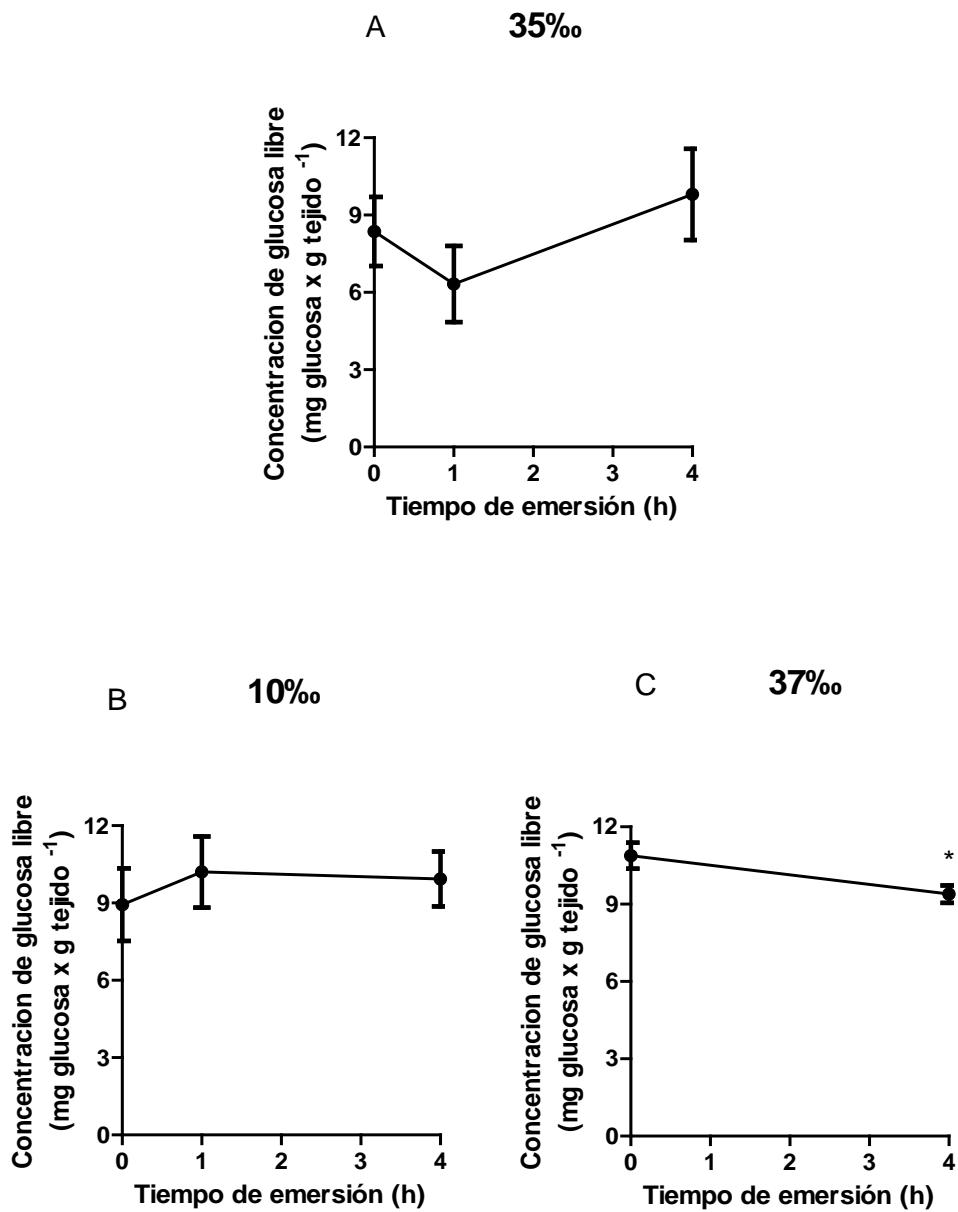


Figura 6.9.- Concentración de glucosa libre en hepatopáncreas a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 (p<0,05). Los valores son las medias ± E.S. para 3-10 individuos.

Triglicéridos (TG)

En individuos expuestos a 35‰ de salinidad, la concentración de triglicéridos fue mayor (alrededor de 91%) a 1 h luego de la emersión con respecto al tiempo cero. A las 4 h disminuyó a valores similares al tiempo cero (F: 0,33; p: 0,012) (Figura 6.10A).

En individuos expuestos a 10‰ de salinidad la concentración de triglicéridos fue mayor (alrededor de 123%) a 1 h luego de la emersión con respecto al tiempo cero. A las 4 h disminuyó a valores similares al tiempo cero (F: 7,22; p: 0,008) (Figura 6.10B).

En individuos expuestos a 37‰ de salinidad, la concentración de triglicéridos a las 4 h fue similar al valor a tiempo cero (t : 0,91; p: 0,38) (Figura 6.10C).

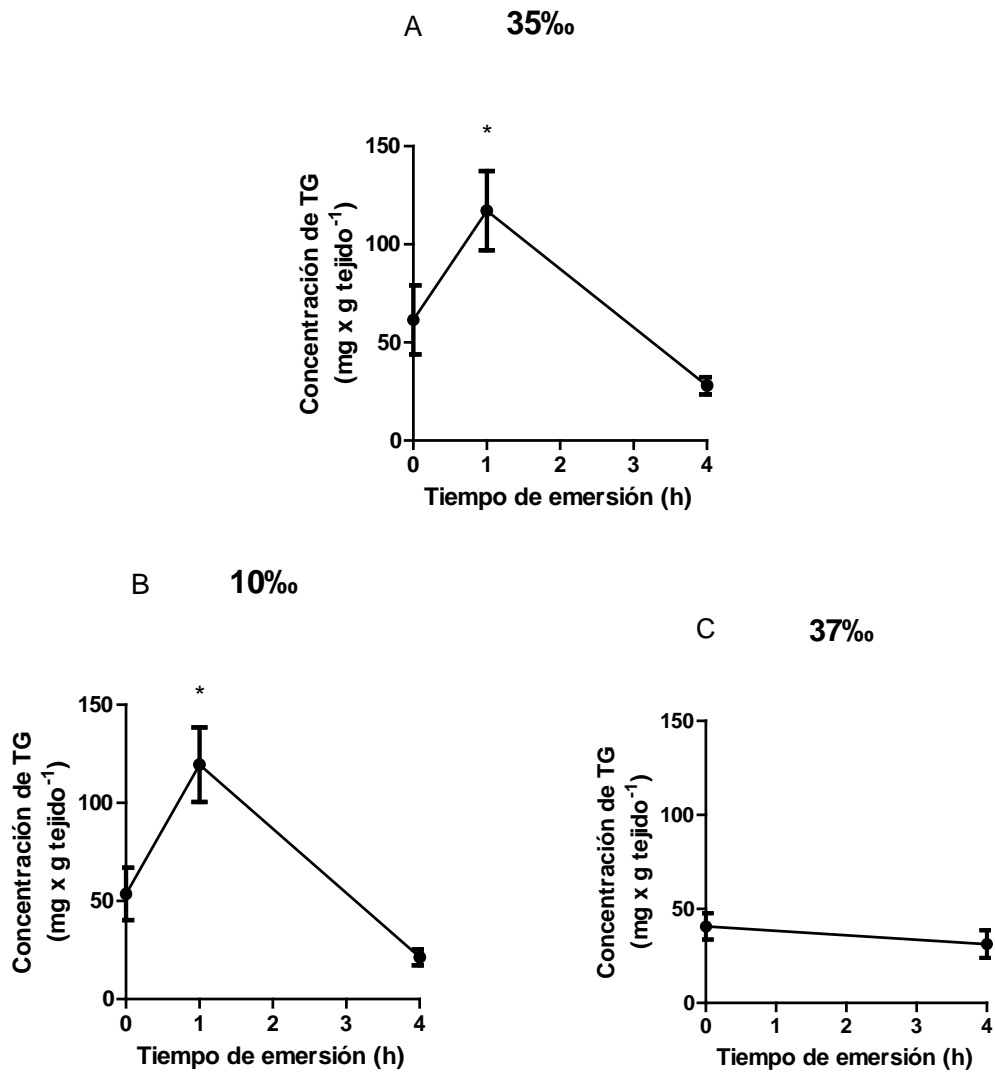


Figura 6.10.- Concentración de triglicéridos (TG) en hepatopáncreas a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-9 individuos.

Proteínas

En individuos expuestos a 35‰ y a baja (10‰) y a alta (37‰) salinidad, la concentración de proteínas en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego de la emersión (F: 3,09; p: 0,07) (F: 4,01; p: 0,04) (t: -1,75; p: 0,13) (Figura 6.11).

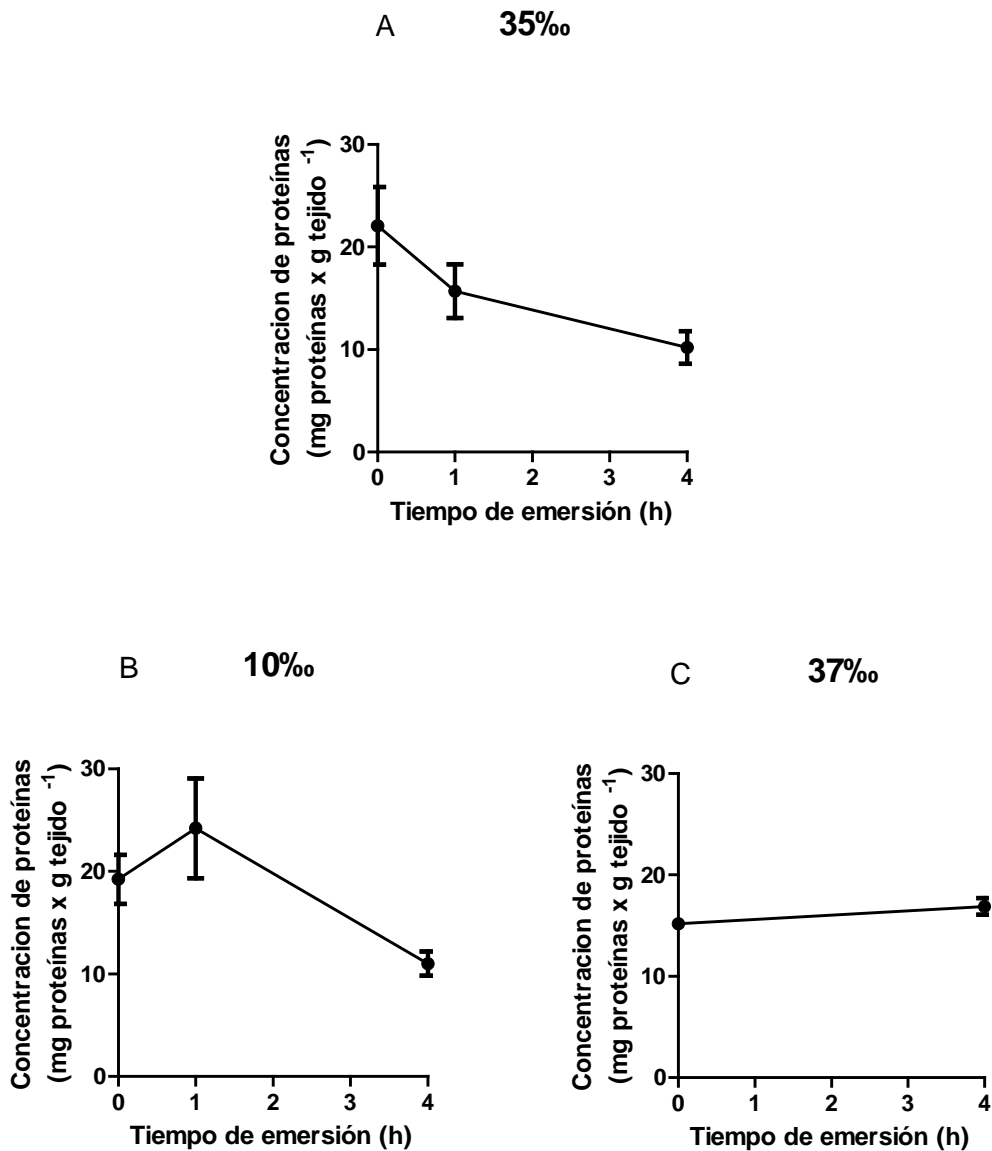


Figura 6.11.- Concentración de proteínas en hepatopáncreas a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Concentración de sustratos de energía en músculo de la quela a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad

Glucógeno

En individuos expuestos a 35‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en músculo de la quela luego de 1 h de emersión fue similar al valor a tiempo cero. A las 4 h la concentración de glucógeno fue mayor (alrededor de 74%) (F: 4,89; p: 0,02) (Figura 6.12A).

En individuos expuestos a 10‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en músculo de la quela fue similar luego de la emersión con respecto al tiempo cero (F: 2,48; p: 0,11) (Figura 6.12B).

En individuos expuestos a 37‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en músculo de la quela a las 4 h luego de la emersión fue mayor (alrededor de 80%) con respecto al tiempo cero (t : -3,72; p: 0,007) (Figura 6.12C).

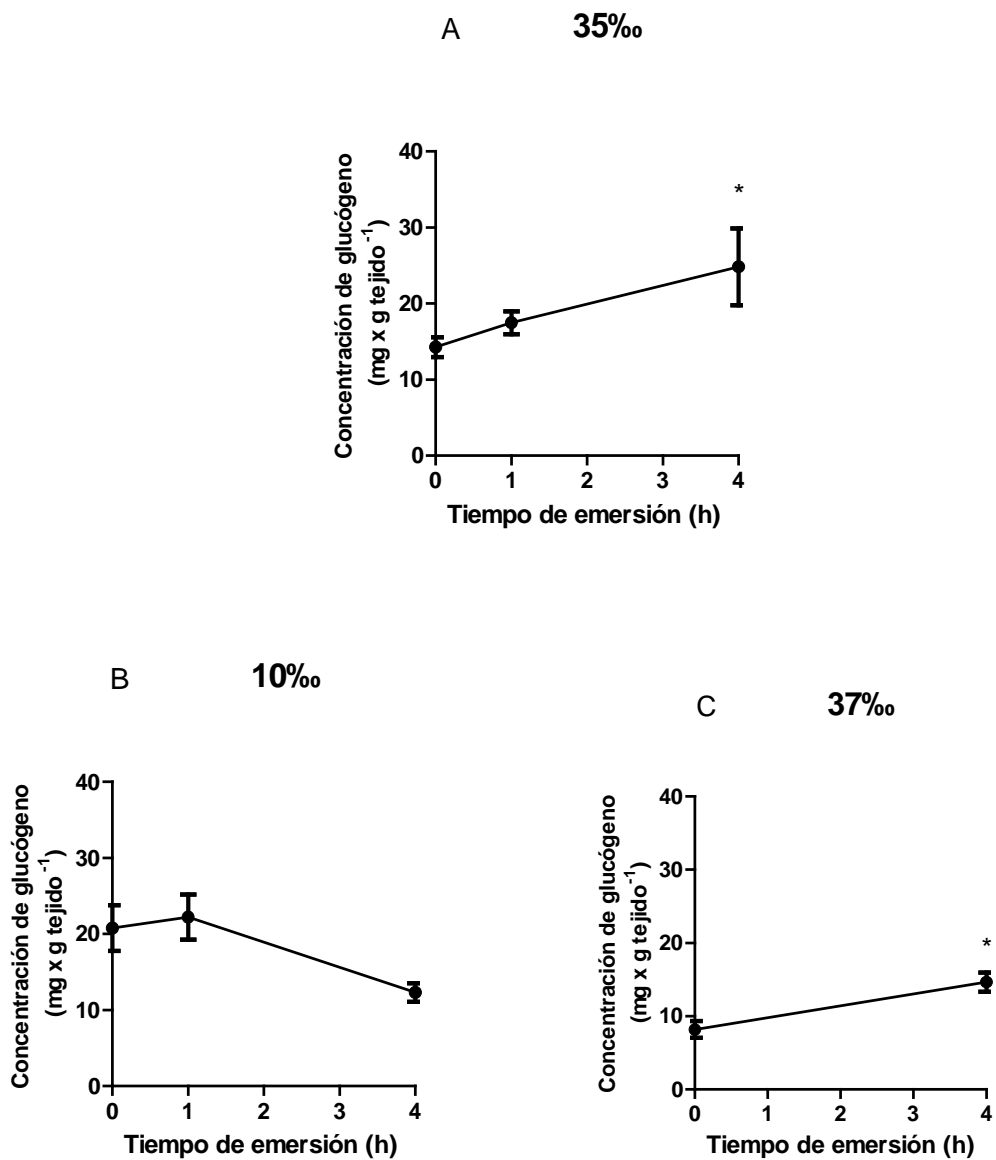


Figura 6.12.- Concentración de glucógeno en músculo de la quela a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En individuos expuestos a 35‰ y a baja (10‰) y alta (37‰) salinidad, la concentración de glucosa libre fue similar a los distintos tiempo de emersión con respecto a tiempo cero (F: 5,15; p: 0,02) (F: 0,86; p: 0,44) (t : -1,92; p: 0,09) (Figura 6.13).

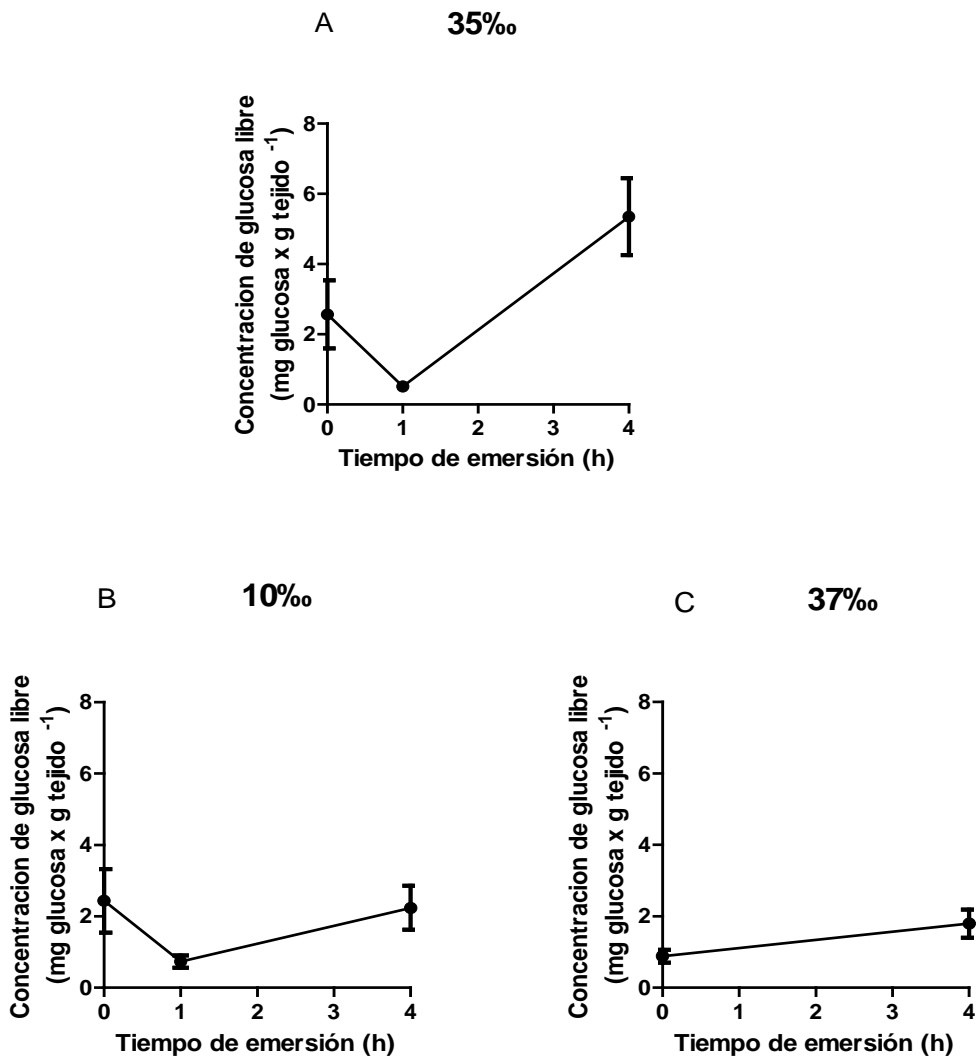


Figura 6.13.- Concentración de glucosa libre en músculo de la quela a tiempo cero (pre-emersión, $t=0$) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Triglicéridos (TG)

No se detectaron TG en el músculo de la quela.

Proteínas

En individuos expuestos a 35‰ y a baja (10‰) y a alta (37‰) salinidad, la concentración de proteínas en hepatopáncreas fue similar a los distintos tiempos luego de la emersión (F: 0,72; p: 0,50) (F: 2,91; p: 0,08) (t : -2,10; p: 0,08) (Figura 6.14).

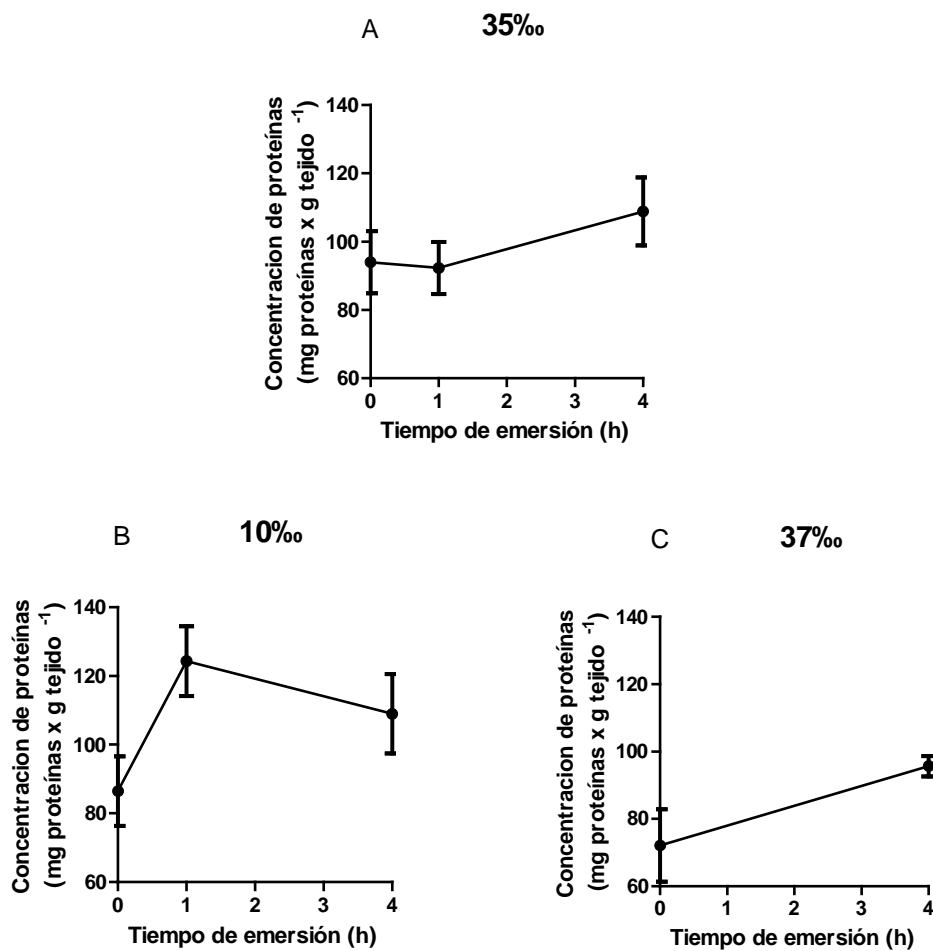


Figura 6.14.- Concentración de proteínas en músculo de la quela a tiempo cero (pre-emersión, $t=0$) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-9 individuos.

Concentración de sustratos de energía en branquias anteriores a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad

Glucógeno

En individuos expuestos a 35‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en branquias anteriores a los distintos tiempos de emersión fue similar con respecto al tiempo cero (F: 0,47; p: 0,63) (Figura 6.15A).

En individuos expuestos a 10‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en branquias anteriores a los distintos tiempos de emersión fue similar con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,17; p: 0,33) (Figura 6.15B).

En individuos expuestos a 37‰ de salinidad, la concentración de glucógeno en branquias anteriores a las 4 hs de exposición a la emersión fue mayor (alrededor de 123%) con respecto al valor a tiempo cero (t :-2,64; p: 0,03) (Figura 6.15C).

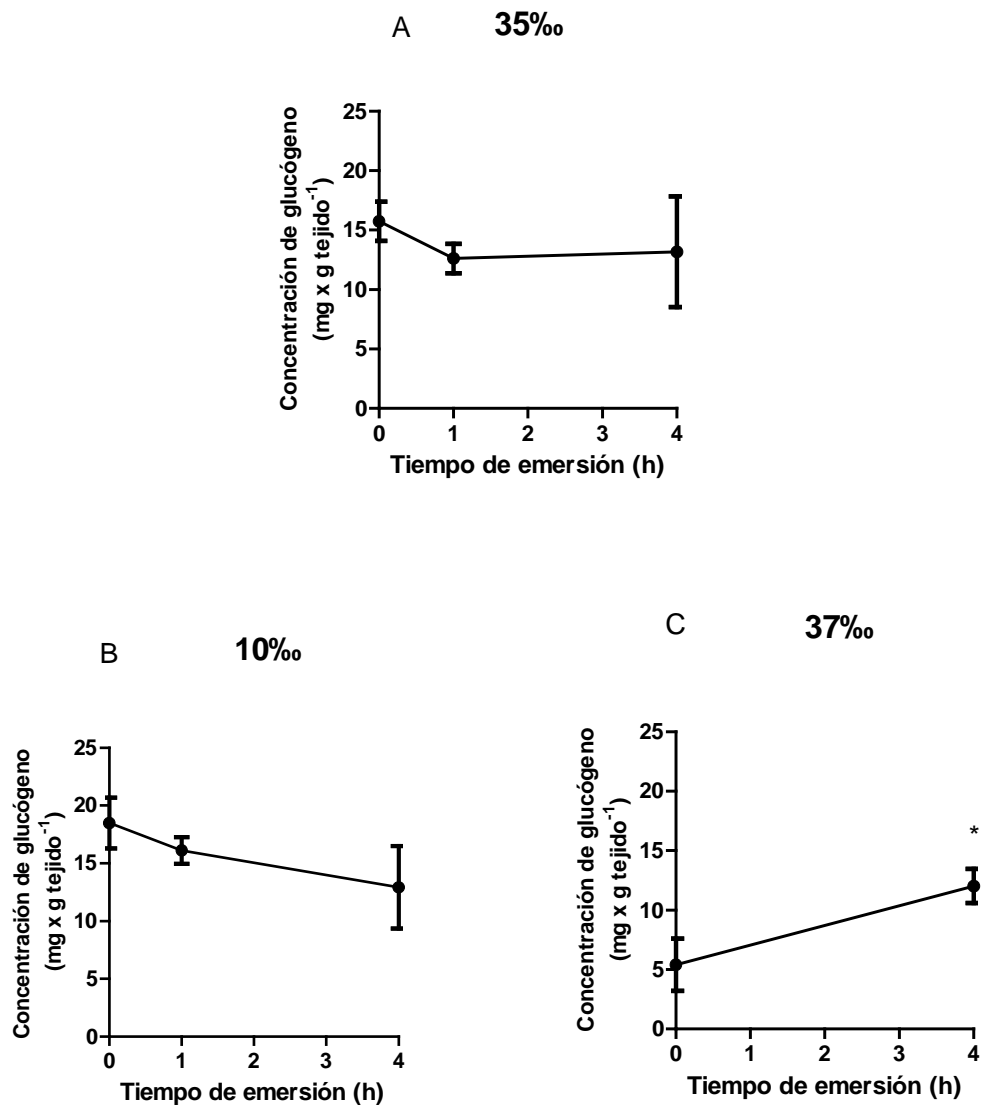


Figura 6.15.- Concentración de glucógeno en branquias anteriores a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Glucosa libre

En individuos expuestos a 35‰ de salinidad, la concentración de glucosa libre en branquias anteriores fue similar luego de 1 h de emersión con respecto al valor de tiempo cero. A las 4 hs la concentración fue mayor (alrededor de 109%) (F: 9,23; p: 0,002) (Figura 6.16A).

En individuos expuestos a 10‰ y 37‰ de salinidad, la concentración de glucosa libre en branquias anteriores a los distintos tiempos de emersión fue similar con respecto al valor a tiempo cero (F: 0,51; p: 0,60) (t : -0,93; p: 0,38) (Figura 6.15B y C).

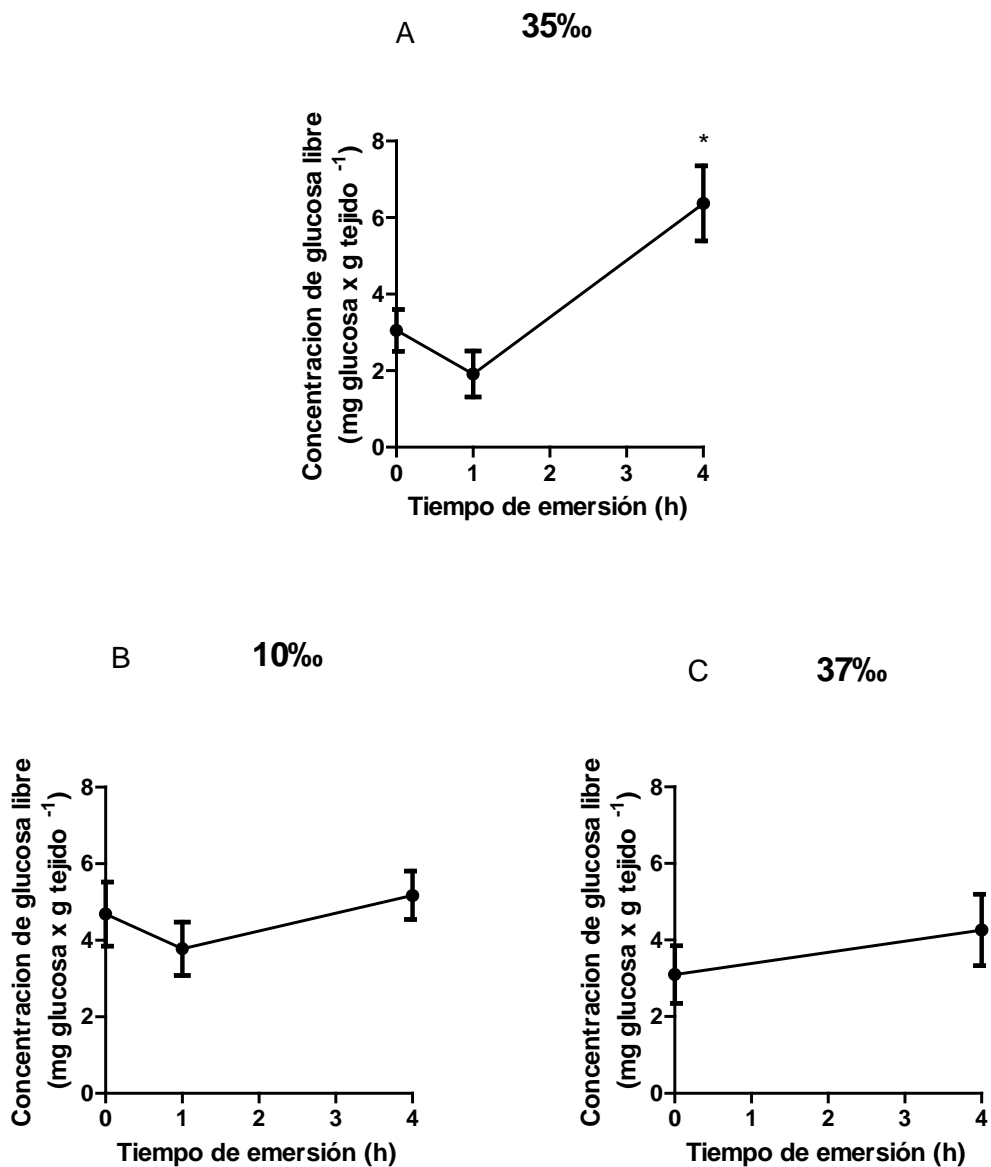


Figura 6.16.- Concentración de glucosa libre en branquias anteriores a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Triglicéridos (TG)

No se detectaron TG en las branquias anteriores.

Proteínas

En individuos expuestos a 35‰ y a baja (10‰) y a alta (37‰) salinidad, la concentración de proteínas en branquias anteriores fue similar a los distintos tiempos luego de la emersión (F: 2.45; p: 0,12) (F: 0,56; p: 0,58) (*t*: 0,05; p: 0,95) (Figura 6.17).

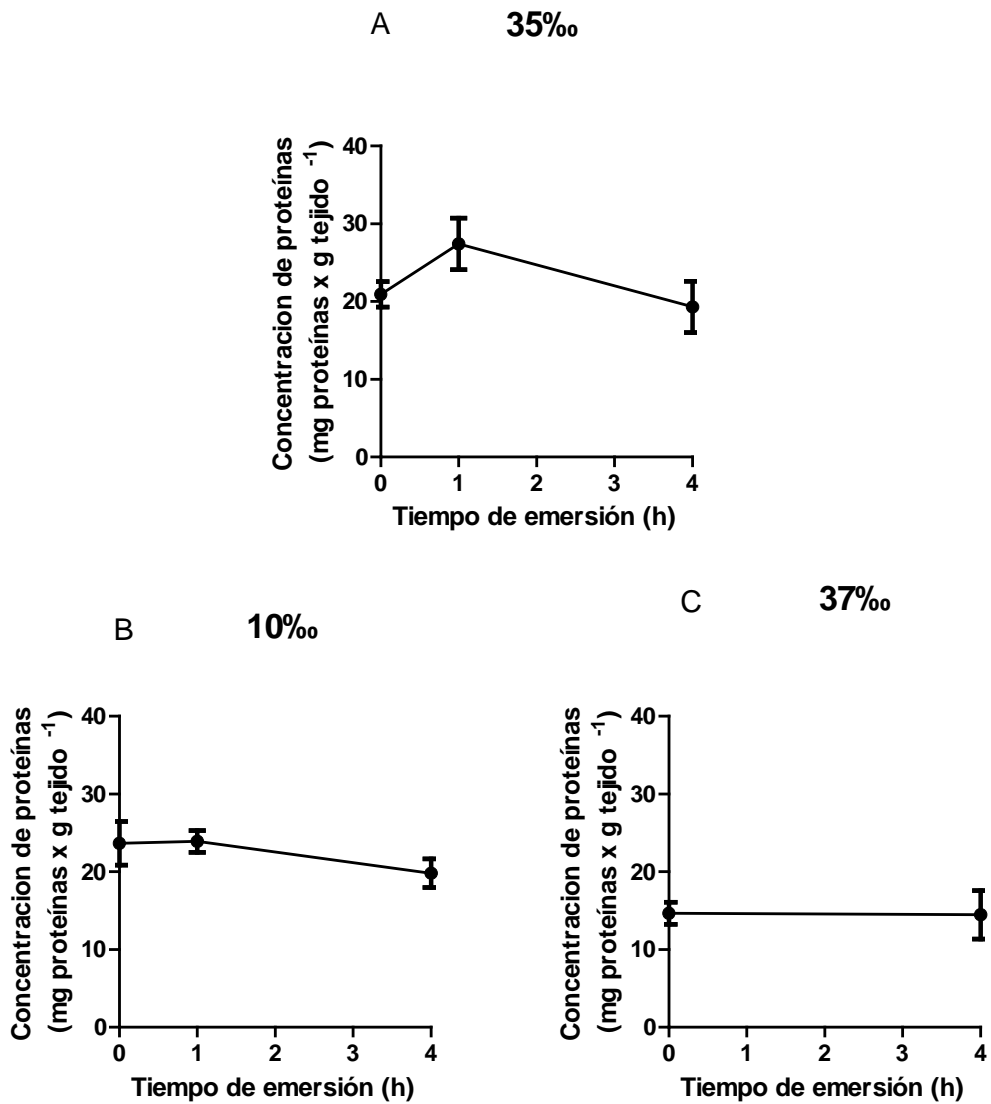


Figura 6.17.- Concentración de proteínas en branquias anteriores a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 4-10 individuos.

Concentración de sustratos de energía en branquias posteriores a distintos tiempos de emersión en baja y alta salinidad

Glucógeno

En individuos expuestos a 35‰ y 10‰ de salinidad, a los distintos tiempos luego de la emersión (1 y 4 h) la concentración de glucógeno en branquias posteriores fue similar con respecto al valor a tiempo cero (F: 1,48; p: 0,25) (F: 1,90; p:0,18) (Figura 6.18A y B)

En individuos expuestos a 37‰ de salinidad, a 4 hs de exposición a la emersión, la concentración de glucógeno en branquias posteriores fue mayor (alrededor de 102%) con respecto al tiempo cero (t :-3,64; p: 0,007) (Figura 6.18C).

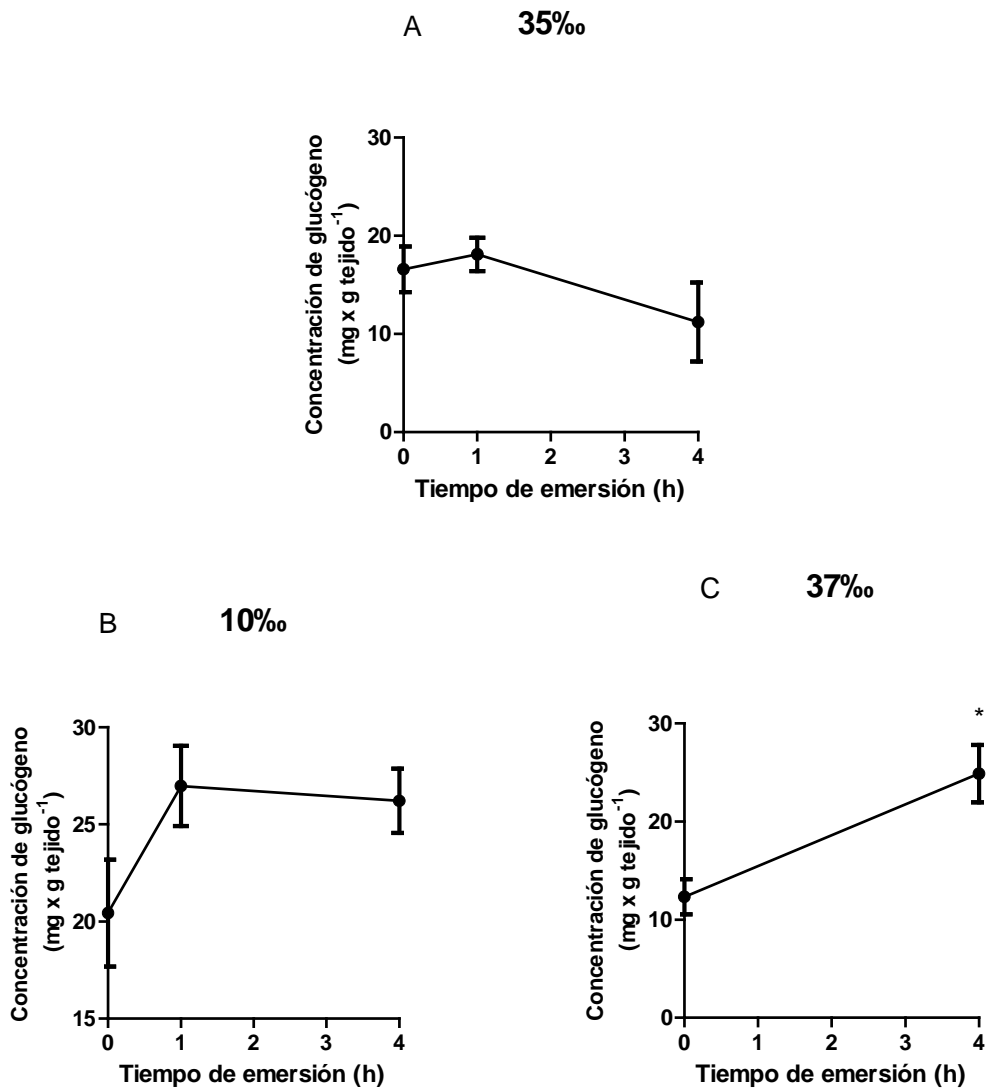


Figura 6.18.- Concentración de glucógeno en branquias posteriores a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 3-9 individuos.

Glucosa libre

En individuos expuestos a 35‰ y 10‰ de salinidad, a los distintos tiempos luego de la emersión (1 y 4 h) la concentración de glucosa libre en branquias posteriores fue similar con respecto al valor a tiempo cero (F: 4,27; p: 0,03) (F: 3,08; p: 0,07) (Figura 6.19A y B)

En individuos expuestos a 37‰ de salinidad, a 4 hs de exposición a la emersión, la concentración de glucosa libre en branquias posteriores fue mayor (alrededor de 66 %) con respecto al tiempo cero (t :-2,50; p: 0,03) (Figura 6.19C).

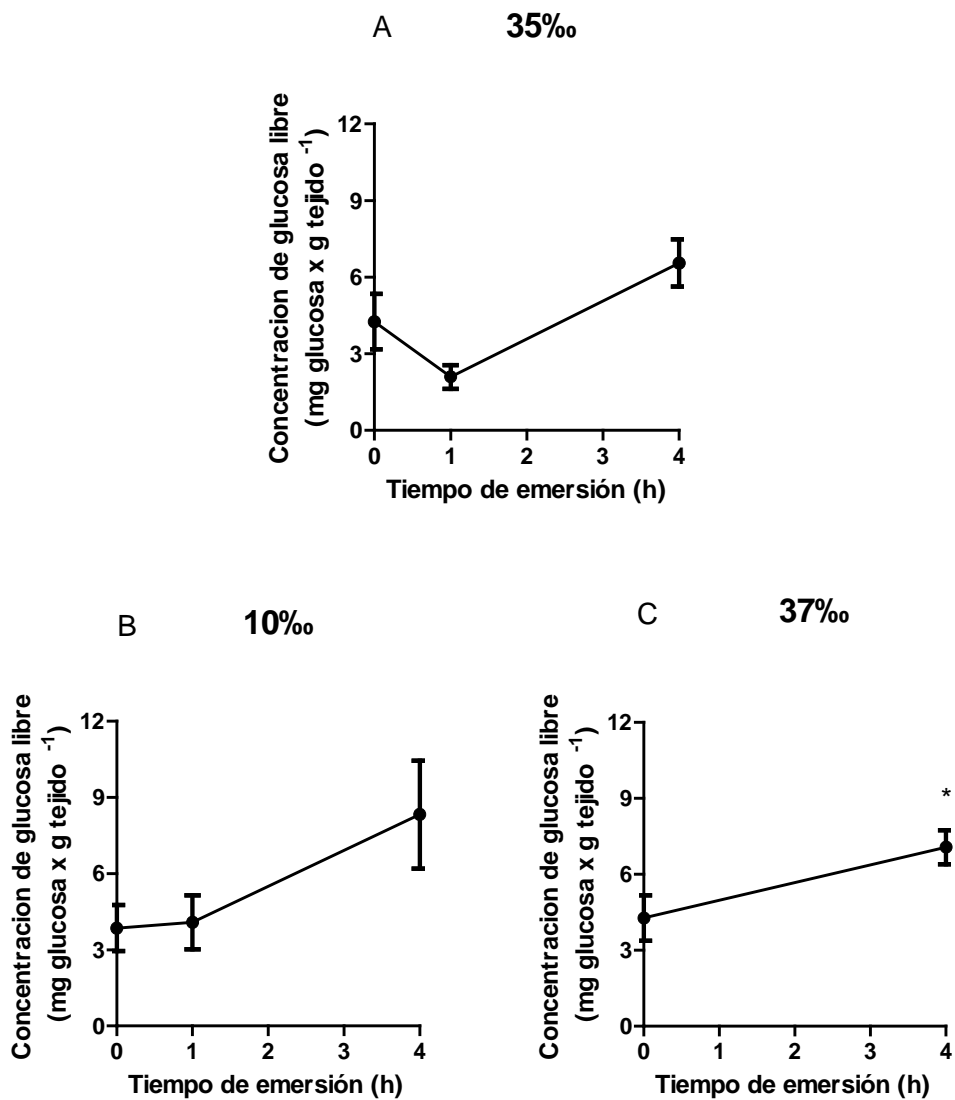


Figura 6.19.- Concentración de glucosa libre en branquias posteriores a tiempo cero (pre-emersión, t=0) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración a t=0 ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 3-10 individuos.

Triglicéridos (TG)

No se detectaron TG en las branquias posteriores.

Proteínas

En individuos expuestos a 35‰ y a baja (10‰) y a alta (37‰) salinidad, la concentración de proteínas en branquias posteriores fue similar a los distintos tiempos luego de la emersión (F: 3,31; p: 0,064) (F: 0,77; p: 0,47) (*t*: -0,94; p: 0,37) (Figura 6.20).

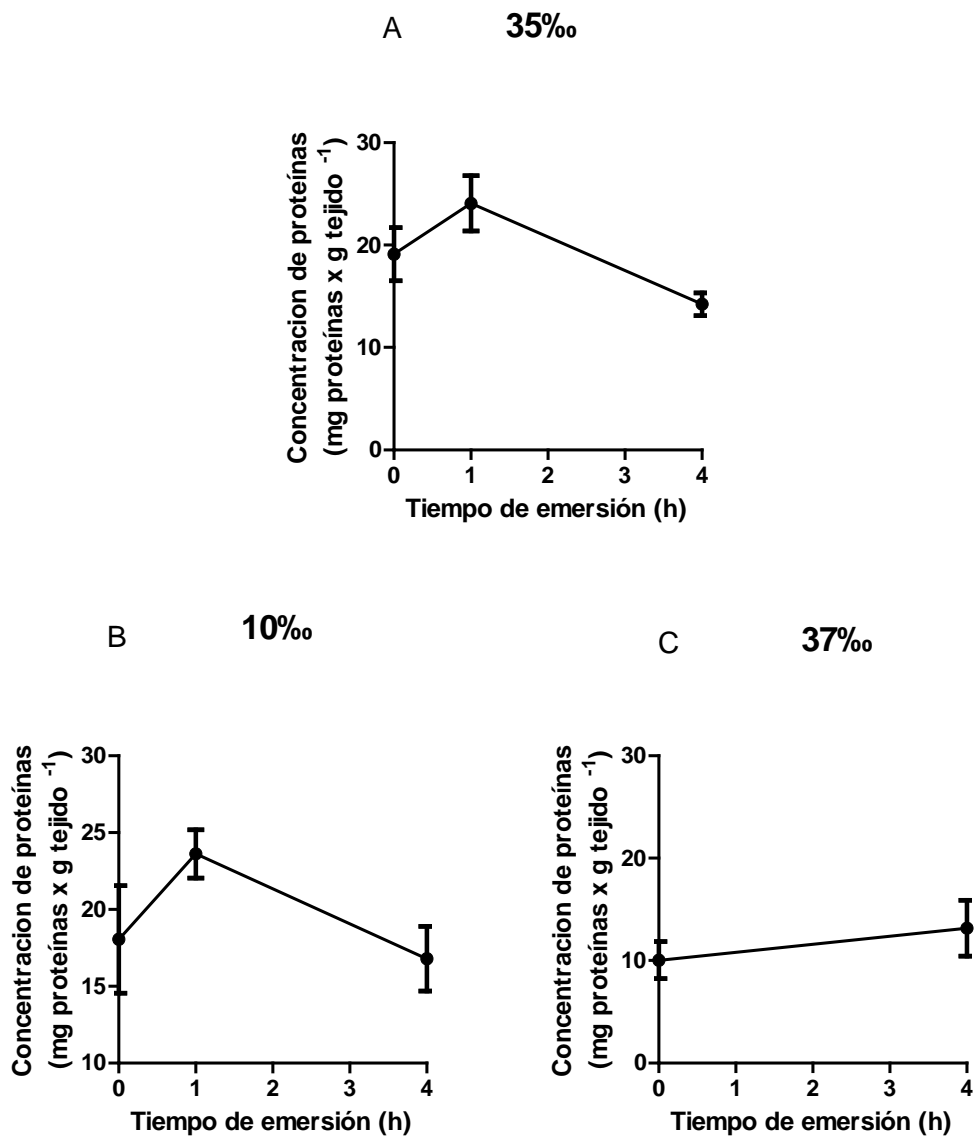


Figura 6.20.- Concentración proteínas en branquias posteriores a tiempo cero (pre-emersión, $t=0$) y a diferentes tiempos luego de la emersión en individuos de *N. granulata* en condiciones post-ingesta, mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación) y en baja (10‰) o alta (37‰) salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 3-10 individuos.

Discusión

Los resultados del presente capítulo muestran que individuos de *Neohelice granulata* expuestos a emersión en condiciones de hiper/hiporregulación exhiben una modulación diferencial post-ingesta de la actividad de sacarasa, lipasa y proteolítica total en hepatopáncreas y en el contenido de glucosa en hemolinfa, glucógeno, glucosa libre y triglicéridos en órganos de reserva, sugiriendo la existencia de ajustes post-prandiales particulares a nivel digestivo y/o metabólico en relación a la emersión en diferentes estados osmorregulatorios.

El hecho que se mantuvieron los valores de osmolalidad de la hemolinfa a los distintos tiempos luego de la emersión, sugiere que variaciones en la concentración total de osmolitos no constituiría un ajuste frente a la emersión. Sin embargo, no podemos descartar la posible existencia de una modulación diferencial de la concentración de iones fuertes (ej. Na^+ y Cl^-), los cuales constituyen los principales osmolitos de la hemolinfa (Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998; Pinoni, 2009). En este contexto, trabajos realizados en individuos de *N. granulata* de otras áreas geográficas (San Clemente del Tuyú; Argentina) (Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998) y en nuestro laboratorio en individuos de la laguna costera de Mar Chiquita (Pinoni, 2009) mostraron un aumento temporal en la diferencia de concentración de iones fuertes en relación a la emersión. En el cangrejo eurihalino *Carcinus maenas* se ha demostrado que la emersión no afecta la concentración osmótica de la hemolinfa (Simonik y Henry, 2014). Por otro lado, en el cangrejo eurihalino *Eurypanopeus depressus* se observó un aumento en la osmolalidad de la hemolinfa en relación a la emersión (Van Horn y Tolley, 2009). Por lo tanto, las respuestas en la concentración osmótica de la hemolinfa a la emersión son especie-específicas.

Como mencionamos anteriormente, en individuos de *N. granulata* se observó la existencia de ajustes en el contenidos de reservas en relación a la emersión (Pinoni, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado en *N. granulata* en particular y en cangrejos osmorreguladores en general, la existencia de una posible modulación post-prandial en diferentes enzimas digestivas en relación a la emersión. Por otro lado, en el cangrejo osmorregulador *Cancer magister* se ha observado una disminución en el procesamiento mecánico de la comida en los pasos iniciales de la digestión durante la emersión (Airriess y McMahon, 1996). El mantenimiento de la actividad de carbohidrasas, lipasa y proteolítica total en hepatopáncreas de *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita luego de la exposición a la emersión en condiciones de osmoconformación (35‰ de salinidad), sugiere el mantenimiento de la capacidad para la digestión de diferentes ítems dietarios. Por otro lado, en individuos de *N. granulata* expuestos a emersión en condición de osmoconformación y privados de alimento, mostraron un incremento en la actividad proteolítica total en hepatopáncreas (Pinoni, 2009), lo que sugiere la existencia de una modulación diferencial de proteasas dependiendo del estado alimentario al momento de la emersión.

En varias especies de crustáceos, los lípidos constituyen una de las fuentes principales de energía para el mantenimiento de varios procesos fisiológicos (Chang y O'Connor, 1983; Sánchez Paz et al., 2007; Vinagre et al., 2007; Vinagre y Chung, 2016; Buckup et al., 2008; Jimenez y Kinsey, 2015; Jahan et al., 2016; Samyappan et al., 2015). Trabajos previos en nuestro laboratorio, mostraron que el hepatopáncreas de *N. granulata* es uno de los sitios principales de almacenamiento y utilización de triglicéridos sugiriendo el rol de este órgano en ajustes en el metabolismo lipídico en relación a diferentes condiciones ambientales y/o fisiológicas (Pinoni et al., 2011, 2013; Michiels, 2015). Los resultados del presente capítulo que muestran el aumento y

posterior disminución en la concentración de triglicéridos sugiere que el hepatopáncreas constituye también un sitio de ajuste del metabolismo lipídico (anabolismo/catabolismo) en relación a la emersión en condiciones de osmorregulación. Las lipasas (también denominadas triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) juegan un papel importante en la degradación de lípidos dietarios como así también en la hidrólisis de triglicéridos de reserva (Casas-Godoy et al., 2012; Michiels et al., 2013, 2015b; Rivera-Pérez et al., 2011a, b; Rivera-Pérez y García-Carreño, 2011; Rivera-Pérez, 2015; Saborowski, 2015). En este contexto, se ha sugerido que la modulación de la actividad intracelular de lipasa en hepatopáncreas de varias especies de crustáceos decápodos estaría relacionada con la modulación del contenido de triglicéridos de reserva en este órgano (Sánchez Paz et al., 2006, 2007; Rivera-Pérez et al., 2011a, b; Rivera-Pérez y García-Carreño, 2011; Rivera-Pérez, 2015; Michiels et al., 2013, 2015b; Michiels, 2015). El aumento inicial (1 h luego de la emersión) observado en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas luego de la emersión en condiciones de osmoconformación en *N. granulata* junto con el hecho que no se observaron cambios en la actividad de lipasa sugiere la existencia de ajustes en procesos de síntesis (lipogénesis) más que una disminución en procesos de degradación (lipólisis). En mamíferos, la lipólisis es un proceso altamente complejo que implica la modulación (activación/inhibición) diferencial (temporal, espacial y por diferentes mensajeros químicos) de la actividad de diferentes lipasas con roles específicos en diferentes pasos del proceso lipolítico (Coleman y Mashek, 2011; Lampidonis et al., 2011; Zechner et al., 2012; Quiroga y Lehner, 2012). En este contexto, la posterior disminución en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas luego de 4 h de emersión, a pesar del mantenimiento de la actividad total de lipasa, podría atribuirse a la existencia de diferentes lipasas en hepatopáncreas y/o a la modulación (ej. disminución) de vías lipogénicas. Sin embargo,

esta idea requiere aún mayor investigación. En hepatopáncreas del cangrejo marino *Portunus trituberculatus* se han identificado varios genes involucrados en la digestión de lípidos (Wang et al., 2014) mientras que en el camarón *P. vanammei* se ha sugerido la existencia de dos clases de lipasas (Rivera-Pérez y García-Carreño, 2011). Por otro lado, el hecho que no se observaron variaciones en la concentración de glucógeno y glucosa libre sugieren que la modulación post-prandial de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono (ej. actividad de carbohidrasas y contenido de glucógeno y/o glucosa libre) en hepatopáncreas no constituiría un ajuste en relación a la emersión en condiciones de osmoconformación en *N. granulata*.

El músculo de la quela y las branquias anteriores y posteriores de *N. granulata* son los sitios principales de almacenamiento y utilización de glucógeno y glucosa libre y el rol de estos órgano en ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono en relación a diferentes condiciones ambientales y/o fisiológicas (Artillo et al., 2008; Pinoni et al., 2011, 2013, capítulo 4 y 5 presente tesis). Los resultados del presente capítulo que muestran el aumento en la concentración de glucógeno podrían sugerir que el músculo de la quela constituye un sitio de ajuste del metabolismo de hidratos de carbono en relación a la emersión en 35‰ de salinidad. Trabajos previos en nuestro laboratorio, mostraron un aumento en la actividad de la Na^+ -ATPasa en músculo de la quela luego de 4 h de emersión en condiciones de osmoconformación lo que sugiere cambios en la demanda de energía metabólica (Pinoni, 2009). Si el aumento en la concentración de glucógeno en músculo de la quela constituye una estrategia que permite la acumulación de esta reserva para su posterior utilización permitiendo sustentar el costo energético metabólico de la actividad de Na^+ -ATPasa requiere mayor investigación. El aumento en la concentración de glucógeno junto con el mantenimiento de la concentración de glucosa libre (sugiere la posible existencia de una modulación de vías gluconeogénicas

para los procesos de síntesis de esta reserva. Por otro lado, hemos demostrado previamente, la participación diferencial de branquias anteriores y/o posteriores en ajustes en relación al metabolismo de hidratos de carbono en respuesta a diferentes factores y/o estados fisiológicos (Pinoni et al., 2011, 2013; capítulos 4 y 5 presente tesis). Este parece también ser el caso para *N. granulata* luego de la emersión en condiciones de osmoconformación ya que solo observamos una variación (aumento) en la glucosa libre en branquias anteriores. Por otro lado, el aumento de los niveles de glucosa libre en branquias anteriores, mientras que se mantuvo constante la concentración de glucógeno, sugiere la existencia de ajustes en procesos de gluconeogénesis. El hecho que no se observaron cambios en la glicemia soporta aún más la idea de ajustes post-prandiales en procesos gluconeogénicos para el mantenimiento y/o aumento de la concentración de glucosa libre en músculo de la quela y branquias anteriores, respectivamente, y no en la captación de glucosa por estos tejidos luego de la emersión en condiciones de osmorregulación en *N. granulata*. En este contexto, estudios realizados en *N. granulata* de otras aéreas geográficas (Rio Grande, Brasil) muestran la síntesis de glucosa a partir de sustratos no glucogénicos (ej. triglicéridos) en músculo y branquias (Vinagre y Da Silva, 2002; Martins et al., 2011).

Contrariamente a lo observado luego de la emersión en condiciones de osmoconformación, se observó una modulación (aumento a las 4h) de la actividad de lipasa y proteolítica total en hepatopáncreas luego de la emersión en condiciones de hiporregulación (10‰ de salinidad), lo que sugiere la existencia de ajustes específicos dependiendo del estado osmorregulatorio en el momento de la emersión. El hecho que resultados previos de nuestro laboratorio muestran una diferente modulación post-prandial de la actividad de lipasa y proteolítica total en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenido a largo plazo en condiciones de hiperregulación (Michiels, 2015), soporta la

idea de la existencia de ajustes diferenciales post-prandiales en relación a la emersión. Similarmente a lo observado en *N. granulata* luego de la emersión en condiciones de osmoconformación, los resultados del presente capítulo muestran la modulación de la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas (aumento seguido de una disminución) luego de la emersión en condiciones de hiperregulación. El hecho que resultados previos de nuestro laboratorio en *N. granulata* muestran una diferente modulación post-prandial de la actividad de lipasa en hepatopáncreas en condiciones de hiperregulación (Michiels, 2015), refuerza aún más la idea de la existencia de ajustes diferenciales post-prandiales en relación a la emersión. Por otro lado, la similitud en el patrón de variaciones en el contenido de triglicéridos en hepatopáncreas luego de la emersión en condiciones de osmoconformación e hiperregulación sugieren ajustes similares en el metabolismo de esta reserva. Sin embargo a diferencia de lo observado en condiciones de osmoconformación, el aumento de la actividad de lipasa a las 4 h a 10‰ de salinidad, sugiere la posible existencia de diferentes mecanismos operando en la regulación del contenido de triglicéridos luego de la emersión en hiperregulación.

Contrariamente a lo observado luego de la emersión en 35‰ de salinidad, el aumento de glucosa hemolinfática luego de la emersión en baja (10‰) salinidad sugiere la existencia de ajustes diferenciales en la glicemia en relación al estado osmorregulatorio. Como mencionamos anteriormente, la glucosa hemolinfática en crustáceos decápodos proviene principalmente de la digestión de sustratos glucogénicos dietarios o de reserva y/o de su absorción en hepatopáncreas, y/o de la degradación de glucógeno en otros sitios de reserva (Verri et al., 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Sánchez-Paz et al., 2006; Buckup et al., 2008; Obi et al., 2011; Dutra et al., 2008; Chung, 2014; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a, b). En este contexto, el aumento observado en la glicemia luego de la emersión en hiperregulación en *N.*

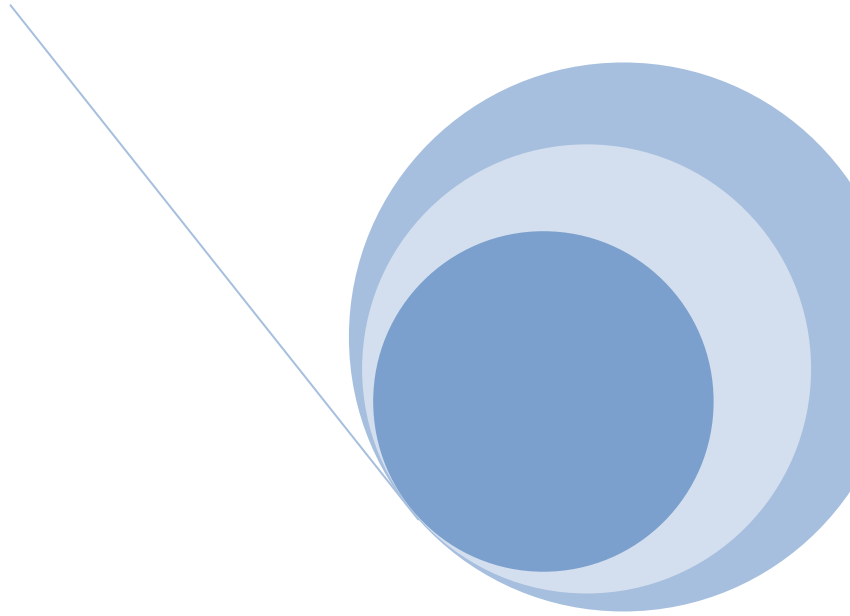
granulata podría indicar la existencia de ajustes en diferentes componentes involucrados en el metabolismo de hidratos de carbono en hepatopáncreas y en otros sitios de reserva principales tales como músculo y branquias. Sin embargo, el hecho que no se observaron variaciones en la actividad de carbohidrasas clave en hepatopáncreas y en la concentración de glucógeno y glucosa libre en músculo de la quela o branquias anteriores y posteriores, sugiere el posible rol de otras potenciales fuentes de glucosa (ej. hemocitos). En varias especies de crustáceos, se ha sugerido que el glucógeno presente en hemocitos puede ser utilizado como fuente de glucosa hemolinfática (Johnston et al., 1973; Chung, 2008).

En individuos de *N. granulata* se observó respuestas diferenciales de la actividad de enzimas digestivas y de reservas de energía en relación a la baja y alta salinidad, sugiriendo la existencia de ajustes diferenciales y específicos en relación a la hiper e hiporregulación (Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013, 2015a; Michiels et al., 2013, 2015a). Los resultados del presente capítulo que muestran la regulación de sacarasa y lipasa luego de la emersión en alta salinidad (37‰ de salinidad; hiporregulación) sugieren la existencia de ajustes post-prandiales específicos en relación al estado hiporregulatorio en el momento de la emersión. En este contexto, contrariamente a lo observado en osmoconformación e hiperregulación se observó un aumento en la actividad de sacarasa, lo que indicaría una modulación diferencial en el metabolismo de hidratos de carbono (ej. metabolismo de glucosa y/o fructosa) luego de la emersión en hiporregulación. La disminución en la concentración de glucosa libre en hepatopáncreas, junto con el aumento en la concentración de glucógeno y/o glucosa libre en músculo de la quela y en branquias anteriores y posteriores permitiría sugerir la existencia de una posible movilización de glucosa desde el hepatopáncreas hacia el músculo y las branquias. El aumento observado en glicemia a las 4 h luego de la

emersión reforzaría esta idea, aunque no podemos descartar la participación de otras fuentes de glucosa (ej. a partir de hemocitos) como sugerimos previamente. Estos resultados, concuerdan con lo sugerido para individuos de *N. granulata* de otras áreas geográficas expuestos a emersión (Schmitt y Santos, 1993). Por otro lado, similarmente a lo observado a 10‰ de salinidad, en condiciones de hiporregulación se observó un aumento en la actividad de lipasa, lo cual sugiere la existencia de ajustes post-prandiales de esta actividad luego de la emersión en diferentes estados osmorregulatorios (hiper/hiporregulación). Sin embargo, contrariamente a lo observado en 35 y 10‰ de salinidad, en alta (37‰) salinidad no se produjeron variaciones en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas, lo que sugiere que la modulación post-prandial de esta reserva no constituiría un ajuste en relación a la emersión en condiciones de hiporregulación. Sin embargo, debido a que se produjo un aumento en la actividad de lipasa en hepatopáncreas luego de 4 h de emersión, no puede descartarse la existencia de ajustes a tiempos más largos en la concentración de triglicéridos.

Por otro lado, la modulación del contenido de proteínas en diferentes órganos de reservas (hepatopáncreas, músculo de la quela y branquias anteriores y posteriores) constituye uno de los ajustes diferenciales frente diferentes factores ambientales y/o fisiológicas de *N. granulata* (Pinoni et al., 2011, 2013; Michiels, 2015). Debido a que la concentración de proteínas no fue afectada en ningún órgano de reserva estudiado luego de la emersión en condiciones de osmoconformación e hiper/hiporregulación (Figuras 6.11, 6.14, 6.17 y 6.20), sugiere que esta reserva no estaría involucrada en ajustes post-prandiales en relación a la emersión en *N. granulata*. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente en nuestro laboratorio en hepatopáncreas de *N. granulata* privados de alimento en relación a la emersión (Pinoni, 2009).

En conclusión, las respuestas de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas y del contenido de diferentes sustratos de reserva frente a la emersión inmediatamente luego de la ingesta de alimento de individuos de *N. granulata*, sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos post-prandiales específicos en relación a la emersión en diferentes estados osmorregulatorios (hiper o hiporregulación). En individuos de *N. granulata* de la zona de San Clemente del Tuyú (pcia. de Buenos aires) se ha sugerido que el control de la diferencia de iones fuertes (diferencia entre la concentración de Na^+ y de Cl^-) en la hemolinfa se realiza por medio de la toma activa de Na^+ a través de las branquias constituyendo un ajuste compensatorio a corto plazo luego de la emersión (Luquet et al., 1998). Como mencionamos anteriormente, la hiper e hiporregulación en *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita en particular y en otras especies estudiadas (ej. *Cyrtograpsus angulatus*) implica una diferente participación y modulación de componentes (ej. diferentes ATPasas) de la maquinaria osmorregulatoria branquial. En este contexto, futuros estudios deberían focalizarse en establecer si las variaciones post-prandiales luego de la emersión en baja y alta salinidad de parámetros digestivos y metabólicos a nivel bioquímico en *N. granulata* están relacionadas con posibles demandas diferenciales de energía metabólica de la emersión y del estado osmorregulatorio.



Capítulo 7:

Estudios sobre el efecto de la salinidad ambiental sobre actividad de carbohidrasas y número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas, glicemia y reservas de glucógeno y glucosa libre en el cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*

Introducción

Cyrtograpsus angulatus es un cangrejo eurihalino que se 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 intermareales, estando expuesto a cambios abruptos, frecuentes y altamente variables en la salinidad ambiental (desde 4 a 40‰ de salinidad) (Anger et al., 1994; Spivak et al., 1994; López Mañanes, et al., 2002; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008; Pinoni, 2009; Michiels et al., 2013, Michiels, 2015; observaciones personales). Diferentes estudios indican que *C. angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita se comporta como omnívoro-detritívoro-carroñero (Spivak, 1997; Botto et al., 2005). En hepatopáncreas de este cangrejo se determinó, la existencia de actividad de diferentes enzimas digestivas (ej. carbohidrasas, lipasa, proteolítica total y proteasas), sugiriendo su capacidad para digerir diferentes ítems dietarios tales como carbohidratos, lípidos y proteínas (Pinoni, 2009; Asaro et al., 2010, 2011b; Michiels et al., 2013; Michiels, 2015). *C. angulatus* exhibe capacidad hiper e hipo-osmorregulatoria (López Mañanes et al., 2002; Pinoni y López Mañanes, 2004; 2008; Pinoni, 2009; Asaro et al., 2012; Michiels et al., 2013). Sin embargo, faltan estudios sobre su comportamiento osmorregulatorio dentro de un amplio rango de salinidad (6-40‰ de salinidad). La adaptación bioquímica a baja salinidad de *C. angulatus* involucra respuestas complejas e integrativas a nivel bioquímico tales como la modulación de diferentes actividades enzimáticas en branquias individuales y en músculo de la quela (Schelich et al., 2001; López Mañanes et al, 2002; Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2005; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008). Además, se observó la modulación diferencial de la actividad de lipasa, proteolítica

total, N-aminopeptidasa (APN) y tripsina en hepatopáncreas y en el contenido de triglicéridos y proteínas de *C. angulatus* en respuesta a baja (10‰) y alta (40‰) salinidad ambiental sugiriendo la existencia de ajustes en el metabolismo de lípidos y proteínas en condiciones de hiper e hiporregulación (Michiels et al., 2013; Michiels, 2015). Como mencionamos anteriormente en la presente tesis, la homeostasis de glucosa en crustáceos decápodos es esencial para el adecuado funcionamiento de distintos procesos fisiológicos. La digestión de diferentes sustratos glucogénicos (ej. almidón, glucógeno y disacáridos) y la absorción de glucosa a través del hepatopáncreas (principal sitio de síntesis de enzimas digestivas y absorción de nutrientes en crustáceos decápodos) constituyen una de las fuentes principales de glucosa hemolinfática (Verri et al., 2001; Lorenzon, 2005; Lorenzon et al., 2005, 2007; Sánchez-Paz et al., 2006; Buckup et al., 2008; Obi et al., 2011; Dutra et al., 2008; Chung, 2014; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016a, b). De esta manera, el nivel de actividad de carbohidrasas clave (ej. α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas juega un rol central en la digestión, absorción y utilización de carbohidratos glucogénicos. Se ha demostrado por análisis por zimograma, la existencia de varias formas de α -amilasa en hepatopáncreas aunque el número de formas presentes parece ser especie-específico (Le Moullac et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Aragón-Axomulco et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016; capítulo 1 presente tesis). Los resultados presentados en el capítulo 3 de la presente tesis en *Neohelice granulata*, constituyen la primer evidencia sobre la existencia de variaciones en el perfil de formas de α -amilasa en respuesta a la salinidad ambiental en cangrejos eurihalinos. En este contexto, los objetivos del presente capítulo fueron:

- a) Determinar la existencia de formas de α -amilasa a través de análisis por zimograma en hepatopáncreas de *C. angulatus* en condiciones de osmoconformación (35‰ de salinidad).
- b) Determinar la osmolalidad en hemolinfa y capacidad osmorregulatoria de *C. angulatus* en baja (6-10‰) y alta (40‰) salinidad.
- c) Estudiar el efecto de baja (6-10‰) y alta (40‰) salinidad sobre la actividad y número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*.
- d) Estudiar el efecto de baja (6-10‰) y alta (40‰) salinidad sobre la actividad de maltasa y sacarasa en hepatopáncreas de *C. angulatus*.
- e) Estudiar el efecto de baja (6-10‰) y alta (40‰) salinidad sobre la concentración de glucosa en hemolinfa, y de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva de *C. angulatus*.

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de los animales

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, se recolectaron de la laguna costera 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 (6-10‰) o agua de mar concentrada (40‰) antes de los experimentos, en condiciones controladas de temperatura (22± 2°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 (proteínas: 43,4 %, lípidos: 12,9%, hidratos de carbono: 21,9%) (0,07 g por individuo) y fueron privados de alimento 24 h antes de los experimentos (Michiels et al., 2013; Asaro et al., 2012). Se utilizó entre 4 a 8 individuos por salinidad.

Osmolalidad de la hemolinfa

La osmolalidad de la hemolinfa se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

Preparación de extractos enzimáticos

La preparación de extractos enzimáticos se realizó según lo descrito en la sección materiales y métodos del capítulo 3.

Determinación de la actividad de enzimas digestivas

La actividad de α -amilasa se determinó como fue descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

La actividad de maltasa y sacarasa se determinó como fue descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 3.

Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección materiales y métodos del capítulo 1.

Análisis por zimograma para la actividad de α -amilasa

El zimograma se realizó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa

La concentración de glucosa en hemolinfa se determinó según lo descrito en materiales y métodos del capítulo 3.

Determinación de la concentración de glucógeno y glucosa libre

La concentración de glucógeno en los órganos de reserva se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 3.

Análisis estadístico

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 y normalidad.

La diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa y medio externo se analizaron con el test paramétrico (t -test) o no paramétrico (Mann-Whitney).

La diferencia entre la capacidad osmorregulatoria entre 6 y 10‰ se analizaron con el test no paramétrico (Mann-Whitney).

Las diferencias en las actividades de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas, concentración de glucosa en hemolinfa, concentración de glucógeno o

glucosa libre en órganos de reserva en relación a la salinidad ambiental, se analizaron utilizando el test paramétrico (One Way ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre las diferentes salinidades se utilizó el test *a posteriori* Holm-Sidak o Dunn.

Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de *Cyrtograpsus*

angulatus

La existencia de diferentes formas de α -amilasa, se realizó un análisis por zimograma de hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos a 35‰ de salinidad (osmoconformación). La figura 7.1 muestra que fueron detectadas al menos 2 bandas con actividad amilolítica con una masa molecular aparente de 31 y 38 kDa. La banda de 31 kDa exhibió la mayor actividad.

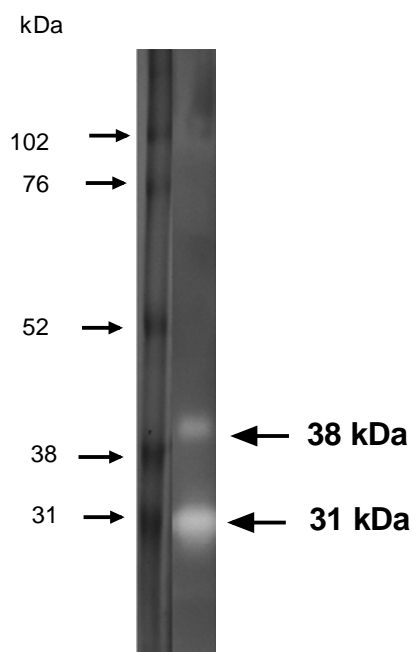


Figura 7.1.- Zimograma de actividad amilolítica en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos a 35‰ de salinidad. Luego de la electroforesis, el gel fue inmerso en solución de almidón (1%) a pH 6,0 por 90 min y luego teñido con solución yodo/KI (10 mM). Las flechas indican las bandas de 31 y 38kDa.

Osmolalidad de la hemolinfa de individuos de *C. angulatus*

En individuos aclimatados a 6 y 10‰ de salinidad, la osmolalidad de la hemolinfa fue alrededor de cuatro a dos veces mayor a la del medio externo, respectivamente (T: 57; p: 0,002) (T: 21; $p \leq 0,001$). La osmolalidad en individuos mantenidos a 35‰ de salinidad fue similar con respecto al medio externo (T: 56; p: 0,181). En 40‰ de salinidad, la osmolalidad de la hemolinfa fue más baja que la del medio externo (t : -4,188; p: 0,002) (Figura 7.2). La capacidad osmorregulatoria fue mayor en 6‰ de salinidad que en 10‰ de salinidad (T: 52; p: 0,029) (Figura 7.2, recuadro).

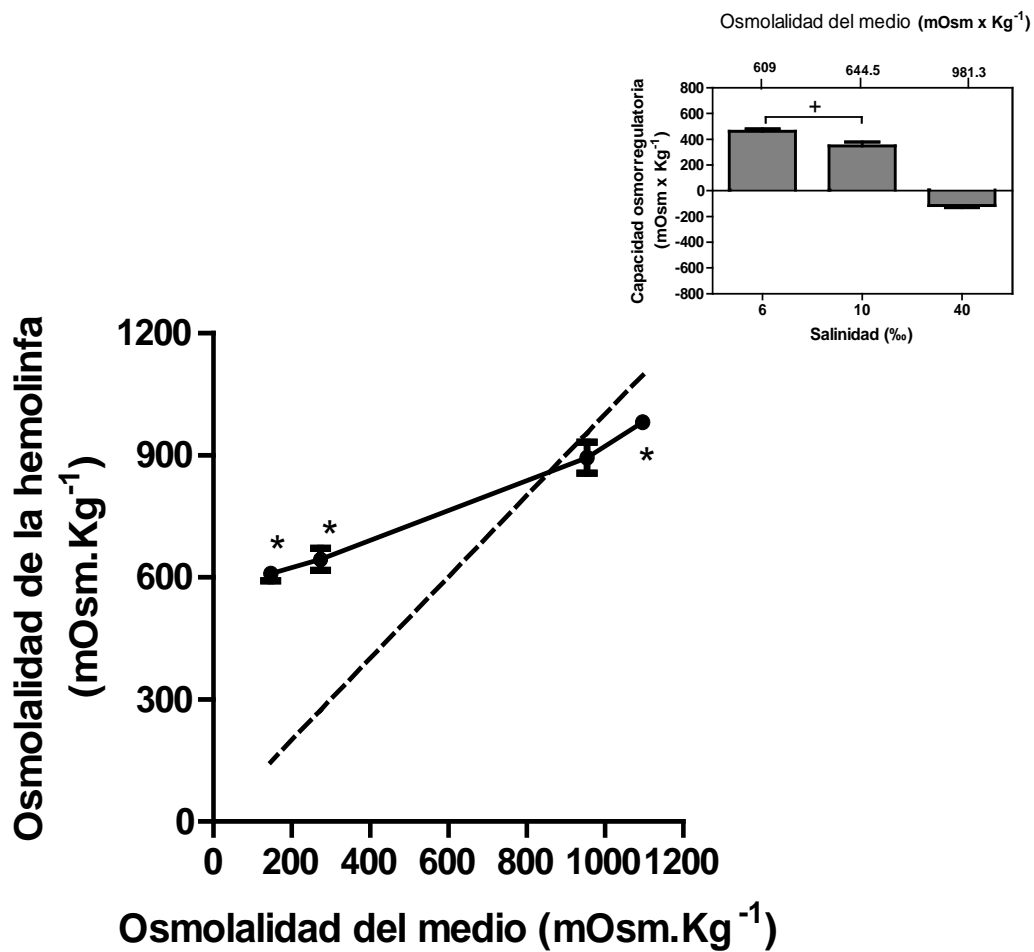


Figura 7.2.- Osmolalidad de la hemolinfa a distintas salinidades en individuos de *C. angulatus*.

* Indica diferencias significativas con respecto al valor del medio externo ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 6-8 individuos. **Recuadro:** capacidad osmorreguladora (diferencias entre la osmolalidad del medio y la osmolalidad de la hemolinfa). + Diferencia significativa ($p < 0,05$).

Actividad y número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* expuestos a baja y alta salinidad

La actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* aclimatados a baja o alta salinidad fue similar con respecto a los individuos mantenidos a 35‰ (F: 0,271; p: 0,845) (Figura 7.3A).

En individuos mantenidos en baja (6 y 10‰) y alta (40‰) salinidad, el análisis por zimograma mostró un patrón similar de bandas que el observado a 35‰. Similarmente a lo observado en 35‰ de salinidad, en individuos de *C. angulatus* mantenidos a baja y alta salinidad, el hepatopáncreas exhibió la banda de 31 kDa con mayor actividad amilolítica (Figura 7.3B).

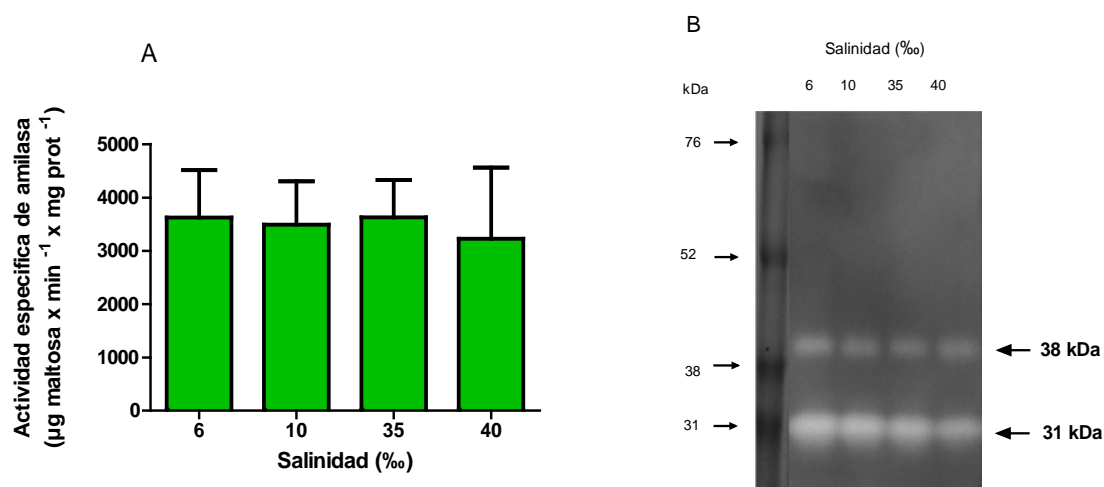


Figura 7.3.- Actividad de α -amilasa (A) y zimograma con actividad amilolítica (B) en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos a distintas salinidades (6-40‰ de salinidad). Las flechas de la derecha indican las bandas de 31 y 38 kDa. Los valores son las medias \pm E.S. para 5 individuos.

Actividad de maltasa y sacarasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* expuestos a baja y alta salinidad

Actividad de maltasa

La actividad de maltasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos en baja o alta salinidad fue similar con respecto a aquellos mantenidos en 35‰ (F: 0,11; p: 0,95) (Figura 7.4).

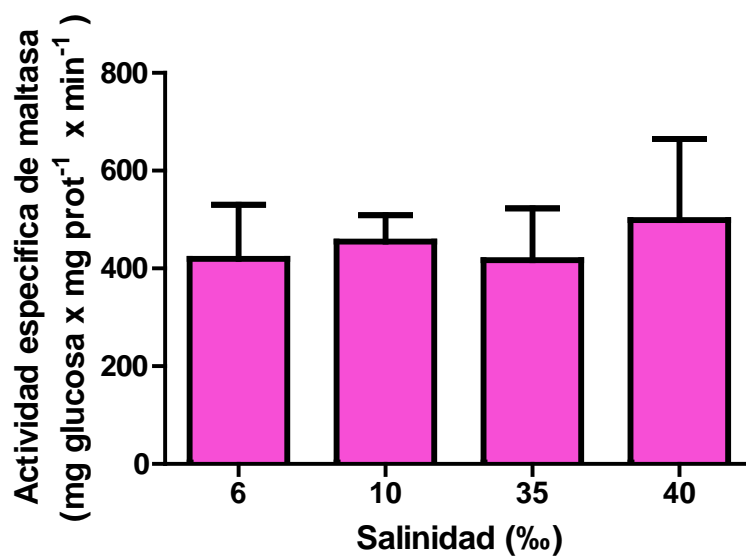


Figura 7.4.- Actividad de maltasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos a distintas salinidades (6-40‰ de salinidad). Los valores son las medias \pm E.S. para 4-6 individuos.

Actividad de sacarasa

La actividad de sacarasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* expuestos a baja o alta salinidad fue similar con respecto a individuos expuestos en 35‰ de salinidad (H: 4,15; p: 0,24) (Figura 7.5).

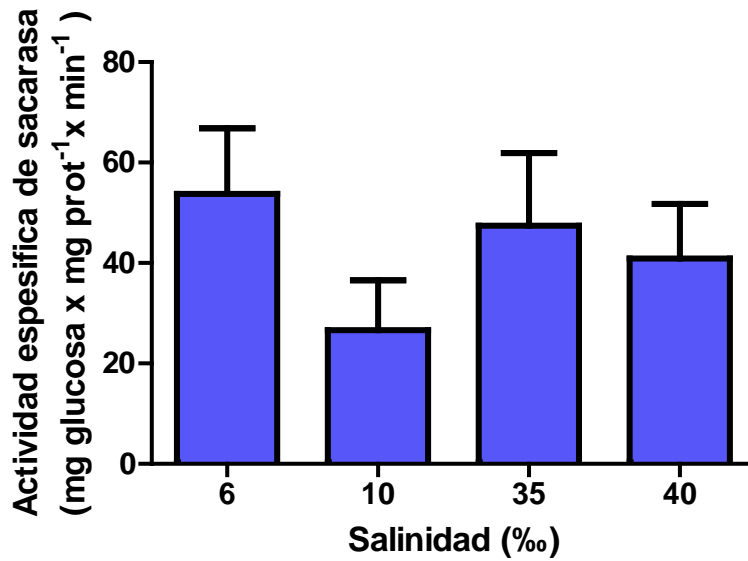


Figura 7.5.- Actividad de sacarasa en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos a distintas salinidades (6-40‰ de salinidad). Los valores son las medias \pm E.S. para 5-7 individuos.

Glucosa en hemolinfa de individuos de *C. angulatus* expuestos a baja y alta salinidad

La concentración de glucosa en hemolinfa de cangrejos mantenidos a baja y alta salinidad fue similar a la de individuos en 35‰ de salinidad (F: 0, 51; p: 0,67) (Figura 7.6).

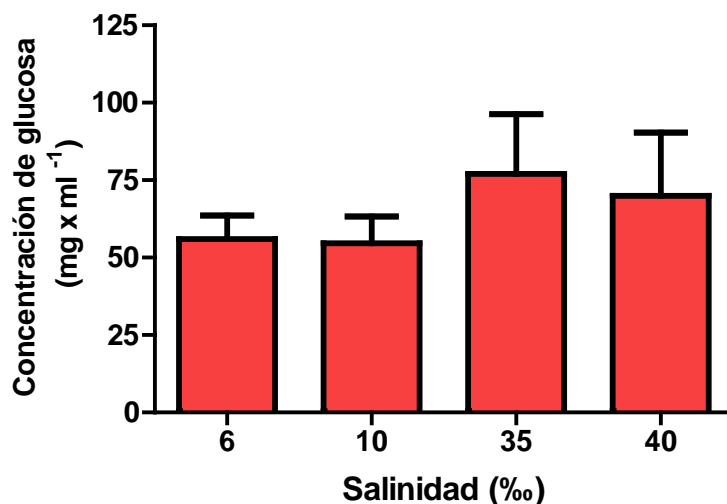


Figura 7.6.- Concentración de glucosa en hemolinfa (HL) en individuos de *C. angulatus* mantenidos a distintas salinidades (6-40‰ de salinidad). Los valores son las medias \pm E.S. para 5-8 individuos.

Glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva de individuos de *C. angulatus* mantenidos a baja y alta salinidad

Glucógeno

La concentración de glucógeno en hepatopáncreas, músculo de la quela y branquias posteriores de cangrejos mantenidos en baja (6 y 10‰) y alta (40‰) salinidad fue similar al correspondiente valor en 35‰ de salinidad (F: 012;p:0,94) (F0,17; p:0,91) (H:0,77;p:0,85) (Figura 7.7).

La concentración de glucógeno en branquias anteriores, fue menor en cangrejos aclimatados a 6 y 40‰ de salinidad, (alrededor de 55 y 77% respectivamente) que en 35‰ de salinidad. En 10‰ de salinidad, la concentración de glucógeno fue similar a la observada en 35‰ de salinidad (F: 15,5; $p \leq 0,001$) (Figura 7.7).

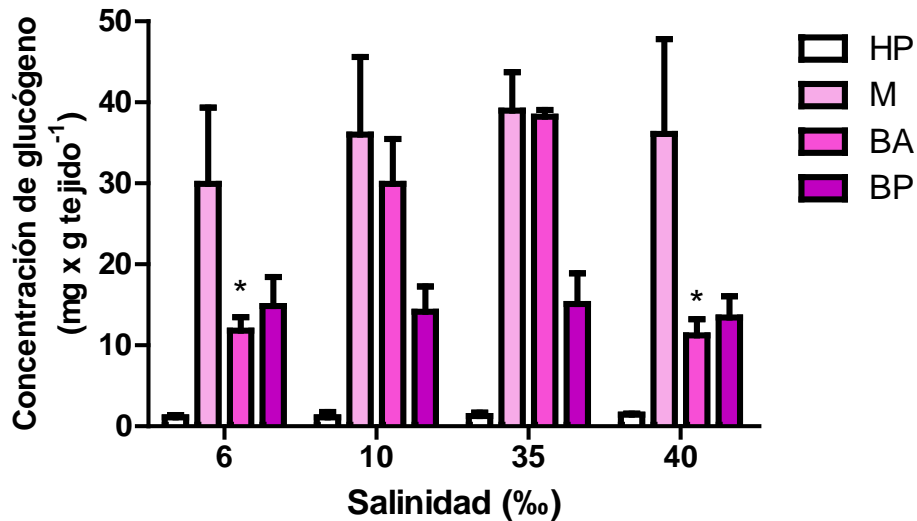


Figura 7.7.- Concentración de glucógeno en hepatopáncreas (HP), músculo de la quela (M), branquias anteriores (BA) y branquias posteriores (BP) en individuos de *C. angulatus* mantenidos a distintas salinidades (6-40‰ de salinidad). Los valores son las medias \pm E.S. para 5-7 individuos. * Significativamente diferente del correspondiente valor a 35‰ de salinidad ($p < 0,05$).

Glucosa libre

La concentración de glucosa libre en hepatopáncreas y branquias anteriores y posteriores no fue afectada por la salinidad (F: 0,96; p: 0,42) (H: 0,78; p: 0,86) (H: 1,94; p: 0,58). Mientras que la concentración de glucosa libre en músculo de la quela fue mayor a 6 y 40‰ de salinidad que a 35‰ de salinidad (H: 8,45; p: 0,03) (Figura 7.8).

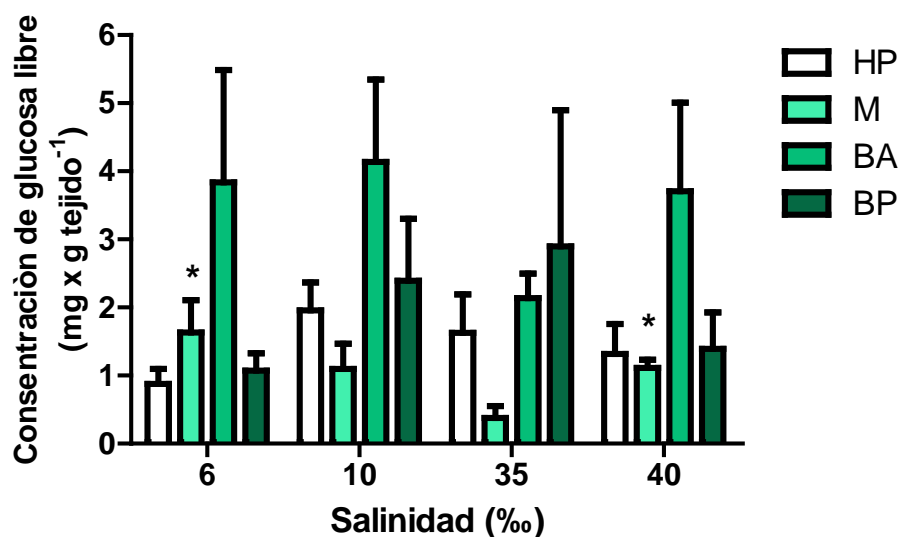


Figura 7.8.- Concentración de glucosa libre en hepatopáncreas (HP), músculo de la quela (M), branquias anteriores (BA) y branquias posteriores (BP) en individuos de *C. angulatus* mantenidos a distintas salinidades (6-40‰ de salinidad). Los valores son las medias \pm E.S. para 5-8 individuos. * Significativamente diferente del correspondiente valor a 35‰ de salinidad ($p < 0,05$).

Discusión

Por medio de análisis por zimograma, se han identificado en hepatopáncreas de diferentes crustáceos decápodos entre 1 y 10 formas de α -amilasa dependiendo de la especie (Van Wormhoudt et al., 1995; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016; capítulo 1 presente tesis). Los resultados del presente capítulo muestran la presencia en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus* en condiciones de osmoconformación (35‰ de salinidad), de dos formas de α -amilasa con una masa molecular aparente de 31 y 38 kDa, siendo la forma de 31 kDa la que presenta mayor actividad. Estos resultados son similares a los encontrados en el cangrejo eurihalino *Carcinus maenas*, en el cual se reportó la

existencia de dos formas de α -amilasa con una masa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa (Van Wormhoudt et al., 1995). Sin embargo, difiere a lo mostrado para *Neohelice granulata*, en el cual observamos cinco formas de α -amilasa con una banda de 29 kDa con mayor actividad amilolítica en condiciones de osmoconformación (capítulo 1 presente tesis). Van Wormhoudt et al., 1995 sugirieron que los crustáceos decápodos con hábito alimentario omnívoro (ej. consumo de detritos, plantas y animales) suelen presentar un alto número de formas de α -amilasa, aunque se han observado algunas excepciones. En este contexto, una de las excepciones podría ser *C. angulatus*, el cual se ha definido como omnívoro-detritívoro-carroñero (Spivak, 1997; Botto et al., 2005). Sin embargo el significado de la presencia de un alto número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas de crustáceos decápodos sigue siendo poco comprendido (Rodríguez-Viera et al., 2016).

Los individuos de *C. angulatus* en la laguna costera de Mar Chiquita se comportan como hiper/hiporreguladores ya que exhiben valores de osmolalidad de la hemolinfa por encima y por debajo de la del medio externo en condiciones de baja (6-10‰) y alta salinidad (40‰), respectivamente, mientras que osmoconforman a 35‰ de salinidad (López Mañanes et al., 2002; Pinoni y López Mañanes, 2004, 2008; Asaro et al., 2012; Michiels et al., 2013; Figura 7.2 presente tesis). Como mencionamos anteriormente, la comparación de los valores de capacidad osmorregulatoria de un individuo sometido a un amplio rango de salinidades permite evaluar la posible performance diferencial dependiendo del tipo y grado de desafío osmótico (es decir, un valor más alto indica una mayor capacidad osmorregulatoria para esa condición) (Charmartier et al., 1989; Lignot et al., 2000; Charmartier y Anger, 2011). En varias especies de cangrejos eurihalinos, la adaptación bioquímica a la salinidad implica distintos cambios a nivel molecular y/o bioquímico que pueden requerir una reorganización metabólica y por ende conducir a

una modificación en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, y/o proteínas (Bianchini et al., 2008; McNamara y Faria, 2012 Romano y Zeng, 2012; Pinoni et al., 2013; Larsen et al., 2014; Michiels, 2015a).

En este contexto, en hepatopáncreas de *C. angulatus* se determinó la modulación diferencial de la actividad de lipasa, proteolítica total y APN en condiciones de osmorregulación, sugiriendo la existencia de ajustes específicos de estas enzimas en relación con el tipo de desafío osmótico (Pinoni, 2009; Michiels et al., 2013; Michiels, 2015). Para incrementar el conocimiento sobre las respuestas a nivel bioquímico y fisiológico de *C. angulatus*, en esta tesis (presente capítulo) se determinó el efecto de baja (6-10‰) y alta salinidad (40‰) sobre la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) y número de formas con actividad amilolítica en hepatopáncreas, la concentración de glucosa en hemolinfa y el contenido de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva de energía para evaluar la posible existencia de ajustes en componentes involucrados en el metabolismo de hidratos de carbono. Los resultados del presente capítulo que muestran el mantenimiento de los valores de glucosa hemolinfática (Figura 7.6) sugiere que la disponibilidad de este metabolito no sería una limitante en individuos de *C. angulatus* en condiciones de hiper/hiporregulación. Como se mencionó anteriormente, la digestión de sustratos glucogénicos (ej. almidón, glucógeno y disacáridos) y la absorción de glucosa a través del hepatopáncreas constituyen una de las fuentes principales de glucosa hemolinfática (Verri et al., 2001; Obi et al., 2011; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016 a). El hecho que la actividad de enzimas clave (ej. α -amilasa, maltasa y sacarasa) para la degradación completa de los principales sustratos glucogénicos se mantuvo en altos niveles en hepatopáncreas sugiere que esta especie es capaz de mantener la capacidad para la digestión de distintos sustratos glucogénicos en baja y alta salinidad. Por otro lado, el

hecho que las actividades de α -amilasa, maltasa y sacarasa en hepatopáncreas no fueron afectadas por la salinidad ambiental, contrariamente a lo observado para la actividad de lipasa, proteolítica total y APN (Michiels et al., 2013; Michiels, 2015) apoya la idea de la existencia de mecanismos de modulación diferenciales y específicos de la actividad de enzimas digestivas en relación a baja y alta salinidad. Se ha observado que individuos de *N. granulata* también exhiben una modulación diferencial de carbohidrasas, lipasa y proteasas en respuesta a distintas condiciones de salinidad (Pinoni et al., 2013, 2015; Michiels et al., 2015a; capítulo 3 de la presente tesis doctoral).

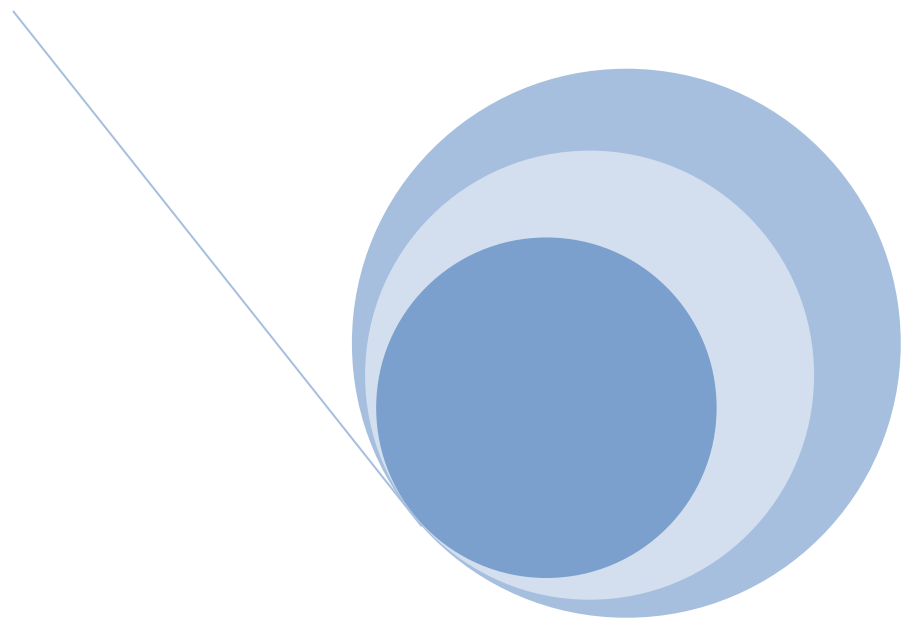
Diferentes trabajos sugieren que el número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas de varios crustáceos puede variar en relación a distintos factores externos e internos (Le Moullec et al., 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; Perera et al., 2008a, b; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Aragón-Axomulco et al., 2012; Rodríguez-Viera et al., 2016; capítulo 3 presente tesis) aunque las respuestas parecen ser especie-específicas. En este contexto, los resultados del presente capítulo que muestran que no existen diferencias en el número de formas de α -amilasa en hepatopáncreas de *C. angulatus* en condiciones de baja y alta salinidad, difiere de lo encontrado para *N. granulata* en baja salinidad (capítulo 3), soportando la idea de variabilidad interespecífica previamente sugerida.

Como hemos mencionado, una de las principales fuente de glucosa hemolinfática proviene del hepatopáncreas en donde se almacena como glucógeno o es sintetizada a través de las vías gluconeogénicas (Verri et al., 2001; Obi et al., 2011, Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016 a, b). El hepatopáncreas de *C. angulatus* exhibió una baja concentración de glucógeno, pero altos niveles de glucosa libre, sugiriendo el rol de este órgano en el metabolismo de hidratos de carbono,

probablemente para mantener un suministro adecuado y sostenido de glucosa. El menor contenido de glucógeno en branquias anteriores en individuos de *C. angulatus* mantenidos a 6 y 40‰ de salinidad, sugiere la utilización de esta reserva en condiciones de hiper e hiporregulación. Sin embargo, dado que no se produjeron cambios a 10‰ de salinidad, las variaciones en la concentración de glucógeno en branquias anteriores parecen depender del grado y/o tipo de desafío hipo-osmótico. En este contexto, se demostró que *C. angulatus* exhibió una mayor capacidad hiperregulatoria a 6‰ de salinidad comparado con 10‰ de salinidad (Figura 7.2, recuadro). Previamente, demostramos que en este cangrejo, las branquias anteriores tienen un rol importante en la adaptación bioquímica a baja salinidad, exhibiendo ajustes bioquímicos diferenciales (ej. actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$) en relación con el grado y/o tipo de desafío hipo-osmótico (López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003, 2004; datos no publicados). Queda por investigar el rol de mensajeros químicos primarios sobre la modulación en el contenido de glucógeno en las branquias anteriores de *C. angulatus* en baja (6‰) o alta (40‰) salinidad. Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio muestran que la dopamina disminuye el contenido de glucógeno en branquias anteriores de *C. angulatus* mantenidos a baja salinidad (datos no publicados). Por otro lado, nuestros resultados no nos permiten establecer si la disminución en el contenido de glucógeno en branquias anteriores (mientras que el contenido de glucosa libre no es afectado) en 6 y 40‰ de salinidad se relaciona con una posible utilización inmediata de glucosa para el mantenimiento de la maquinaria osmorregulatoria (ej. modulación de la actividad de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$). El músculo de la quela constituye un importante sitio de reserva de glucógeno en *C. angulatus*. Dado que el contenido de glucógeno en este tejido no fue afectado por la exposición a las distintas salinidades, podría indicar que no ocurriría una movilización de esta reserva en respuesta a la salinidad ambiental. Esto

concuerda con lo que hemos demostrado en individuos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas de la laguna costera Mar Chiquita (Pinoni et al., 2013). Sin embargo, el incremento en la concentración de glucosa libre en el músculo de la quela a 6 y 40‰ de salinidad sugiere un rol de este tejido en ajustes a nivel bioquímico frente a baja y alta salinidad. La realización de futuros estudios permitirían dilucidar si el distinto contenido de glucosa libre en músculo de la quela en 6 y 40‰ de salinidad (mientras que el contenido de glucógeno no fue afectado) está relacionado con la modulación diferencial de vías gluconeogénicas, lo que podría conducir a la formación de glucosa a partir de otras fuentes y/o a la captación de glucosa a partir de la hemolinfa. La hiper e hiporregulación en cangrejos parecen requerir diferentes mecanismos y ajustes a nivel bioquímico (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng 2012; Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2013, 2015a; presente tesis). Experimentos *in vitro* realizados con secciones en músculo de *N. granulata* de otras áreas geográficas mostraron que el estrés hipo e hiperosmótico induce diferentes ajustes en vías metabólicas (Martins et al., 2011). El hecho que el contenido de glucosa libre en músculo de la quela fue afectado en 6‰ de salinidad pero no en 10‰ apoya aún más la existencia de respuestas diferenciales en función del grado de desafío hipo-osmótico.

Por otro lado, el hecho que el patrón de ajustes en componentes del metabolismo de hidratos de carbono difiere a lo encontrado en trabajos previos de nuestro laboratorio en relación a parámetros del metabolismo lipídico y proteico sugiere la existencia de una reorganización metabólica compleja y además específica de diferentes rutas metabólicas en *C. angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita en relación a la hiper/hiporregulación.



Capítulo 8:

**Estudios de caracterización parcial y modulación
por salinidad ambiental de actividad de
carbohidrasas y tripsina en hepatopáncreas del
cangrejo eurihalino *Uca tangeri***

Introducción

Los cangrejos violinistas (genero *Uca*) están representados por aproximadamente 94 especies de cangrejos semiterrestres intermareales (Rosenberg, 2001; Boa y Guerra-García, 2015). *Uca tangeri* es la única especie de cangrejo violinista que se encuentra en Europa, el cual presenta una distribución geográfica desde el sur de España y Portugal (~ 34 ° S) hasta Angola (~ 16 ° S) a lo largo de toda la costa oeste africana (Rosenberg, 2001; Spivak y Cuesta, 2009; de Gibert et al., 2013, Rodríguez-Tovar et al., 2014; Boa y Guerra-García, 2015). A pesar de su importancia ecológica y económica no se han realizado estudios aún sobre su fisiología digestiva, particularmente sobre la existencia, caracterización bioquímica y modulación de actividad de enzimas digestivas clave en hepatopáncreas. En la zona de planicie de mareas de las marismas del río San Pedro (Bahía de Cádiz, España, 36°23'-37 'N, 6°8'-15'W), los individuos de *U. tangeri* están expuestos a amplios cambios en la salinidad ambiental (González Gordillo et al., 2003). En este contexto, estudios realizados en colaboración entre nuestro laboratorio y el laboratorio de biología y acuicultura (depto. de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, España), demostraron que machos adultos de *U. tangeri* de la Bahía de Cádiz exhiben capacidad hiper/hiporregulatoria y una modulación diferencial de metabolitos y sustratos de reserva en condiciones de baja y alta salinidad en relación a la hiper/hiporregulación (Pinoni et al., 2015b; Pinoni et al., enviado a publicar). Como mencionamos anteriormente, la modulación diferencial de la actividad de diferentes enzimas digestivas en hepatopáncreas constituye uno de los ajustes a nivel bioquímico en relación a la exposición a baja y alta salinidad en cangrejos eurihalinos, aunque las respuestas parecen ser dependientes del tipo y grado de desafío osmótico y/o de la

especie (Asaro et al., 2011a; Romano y Zeng, 2012; Wang et al., 2013; Michiels et al., 2013, 2015a; Pinoni et al., 2013, 2015a, b; presente tesis).

En este contexto, como parte de nuestros estudios integrativos en cangrejos eurihalinos sobre la identificación y caracterización de actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas y su modulación por diferentes factores, el objetivo de este capítulo fue determinar la existencia y características bioquímicas de la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina y su respuesta a baja y alta salinidad ambiental en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *U. tangeri*.

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de los animales

Machos adultos de *Uca tangeri*, se recolectaron durante la marea baja en Rio San Pedro, una entrada poco profunda de la zona del saladar en la costa oriental de la Bahía de Cádiz, España (36°23'-37'N, 6°8'-15'W). La salinidad en esta área varía entre 12 a 46‰ de salinidad, aunque frecuentemente se puede observar valores más altos (55‰) (González Gordillo et al., 2003; de la Paz et al., 2008; Ferrón et al., 2009; Pinoni et al., 2015b). Los individuos se transportaron inmediatamente en recipientes al laboratorio del departamento de biología (Facultad de Ciencias Marinas y Ambientales, Universidad de Cádiz, España). Los individuos de *U. tangeri* se mantuvieron en acuarios a diferentes salinidades: agua de mar diluida (12‰), agua de mar (33‰) o agua de mar concentrada (55‰) por una semana antes de los experimentos en condiciones controladas de temperatura (22±2°C) y fotoperiodo natural (Pinoni et al., 2015b). El agua se aireó, se filtró y se cambio cada dos días para mantener constante los parámetros fisicoquímicos. Los individuos fueron alimentados tres veces por semana

con alimento comercial balanceado (proteínas: 57%, lípidos: 18%, hidratos de carbono: 13,4%) (0,07 g por individuo) y fueron privados de alimento 24 h antes de los experimentos (Pinoni et al., 2015b).

Preparación del hepatopáncreas

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 20 minutos. Posteriormente, se pesaron y se extrajo el hepatopáncreas. Luego de pesar el tejido, se colocó en un Eppendorf, se puso rápidamente en nitrógeno líquido y se liofilizó por 48 h (Advantage 2.0 liofilizador). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de fisiología bioquímica y adaptativa (Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina) para la preparación del tejido, el cual se realizó según lo descrito en la sección materiales y métodos del capítulo 1. Se utilizó entre 5-8 individuos por salinidad.

Determinación de la actividad de enzimas digestivas

La actividad de α -amilasa se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

La actividad de maltasa y sacarasa se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 3.

La actividad de tripsina se determinó según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 4.

Para los experimentos de caracterización de las enzimas digestivas estudiadas (α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina) se utilizaron individuos expuestos a 33‰ de salinidad (condición de osmoconformación, Pinoni et al., 2015b).

Para los estudios de caracterización, la actividad de α -amilasa se determinó como se describió anteriormente pero en presencia de diferentes pHs de la mezcla de reacción (buffer fosfato 50 mM en el rango 5,2-8,0) y temperaturas (4-45°C). Para el estudio de distintas concentraciones de almidón sobre la actividad de α -amilasa se determinó a pH 6,0 a 30°C y en presencia de concentraciones crecientes de sustrato (0,06-18 mg x ml⁻¹) en la mezcla de reacción. La actividad de disacaridasas (maltasa y sacarasa) se determinó como se describió anteriormente pero a diferentes pHs de la mezcla de reacción (buffer maleato en el rango 3,5-8,0) y temperaturas (4-45°C). Para el estudio de distintas concentraciones de sustrato sobre la correspondiente actividad se determinó a pH 6,4 a 30°C y en presencia de concentraciones crecientes de maltosa o sacarosa, según corresponda (0,56-42 mM) en la mezcla de reacción. La actividad de tripsina se determinó como se describió anteriormente a diferentes pHs (4,5-10,0) y temperaturas (4-45°C) de la mezcla de reacción. Para el estudio de distintas concentraciones de BAPNA sobre la actividad de tripsina, se determinó a pH 7,4 a 45°C en presencia de concentraciones crecientes del sustrato (0,083-2,32 mM) en la mezcla de reacción.

Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección materiales y métodos del capítulo 1.

Análisis estadístico

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 y normalidad.

El efecto de diferentes pHs o temperaturas sobre la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* se analizaron utilizando el test paramétrico (One Way ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre los diferentes pHs o temperaturas se utilizó el test *a posteriori* Holm-Sidak o método Dunn. Los resultados del efecto de distintas concentraciones del correspondiente sustrato sobre las actividades enzimáticas se analizaron por medio de un análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 5.1 software). Las curvas que se presentan son las que mejor se ajustan a los datos experimentales. Los valores de Km (constante de Michaelis-Menten) se estimaron a partir de esas curvas.

La diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa y medio externo se analizaron con el test paramétrico (*t*-test) o no paramétrico (Mann-Whitney).

Las diferencias en la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en relación a la salinidad ambiental se analizaron utilizando el test paramétrico (One Way ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para estimar las diferencias entre las diferentes salinidades se utilizó el test *a posteriori* Holm-Sidak o método Dunn.

Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Caracterización parcial de la actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de

Uca. tangeri

La actividad de α -amilasa se determinó dentro del rango de pH de 5,2-8,0. La actividad se mantuvo en un amplio rango de pH (5,2-8,0) (H: 21.53; $p \leq 0,001$) (Figura 8.1).

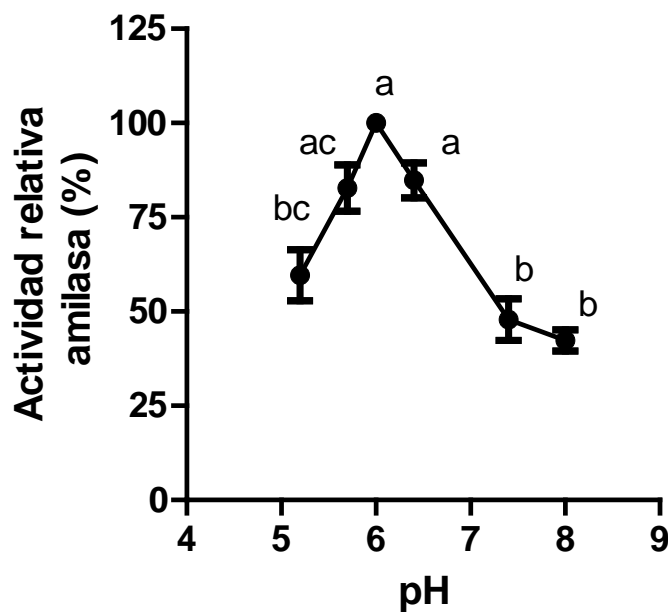


Figura 8.1.- Efecto del pH (5,2-8,0) sobre la actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a 30°C y en presencia de 15 mg x ml⁻¹ de almidón. Los datos de actividad de α -amilasa son representados en relación a la actividad a pH 6,0 (100%; 1388 μ maltosa x min x mg prot⁻¹). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media \pm E.S. para 6 individuos.

La actividad de α -amilasa fue similar dentro de un amplio rango de temperatura, solo observándose una diferencia significativa entre 20 y 30°C (F: 3,01; p: 0,03) (Figura 8.2).

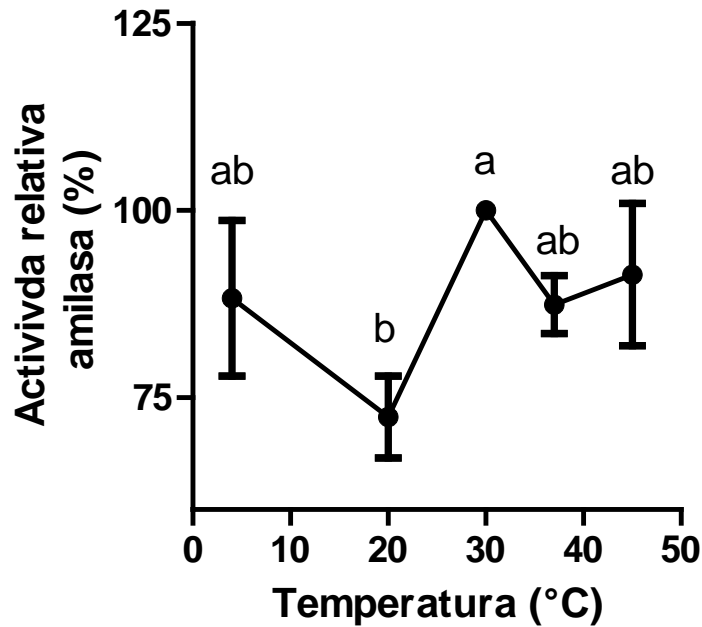


Figura 8.2.- Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 6,0 y en presencia de 15 mg x ml⁻¹ de almidón. Los valores de la actividad de α -amilasa son expresados en relación a la actividad a 30°C (100%; 1556 μ maltosa x min x mg prot⁻¹). Letras distintas indican diferencias significativas entre si Los datos son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

. La actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió una cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 3,81 \pm 0,49$ mg x ml⁻¹) (Figura 8.3).

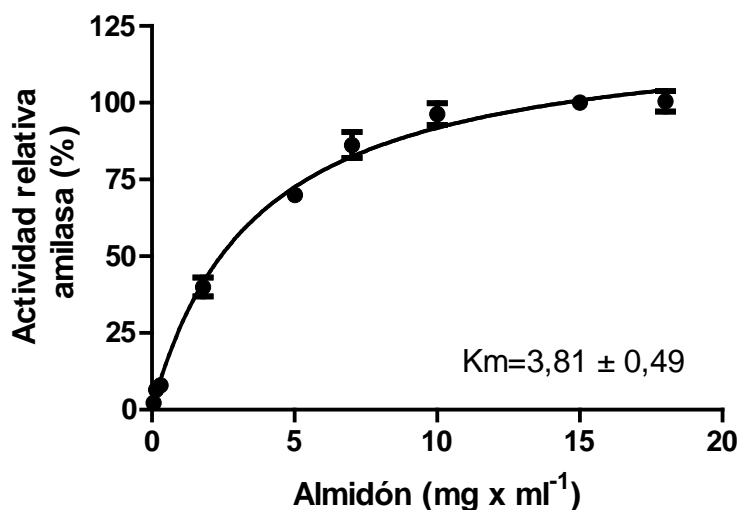


Figura 8.3.- Efecto de concentraciones crecientes de almidón sobre la actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 6,0 y 30°C. Los valores de actividad son expresados en relación al correspondiente actividad en presencia de 15 mg x ml⁻¹ (100%; 1292 μ maltosa x min x mg prot⁻¹). Los datos son la media \pm E.S. para 6 individuos.

Caracterización parcial de la actividad de maltasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*

La actividad de maltasa se determinó dentro del rango de pH de 3,5 a 8,0. La actividad de maltasa se mantuvo en un amplio rango de pHs (3,5 a 8,0) (F: 3,38; p: 0,015) (Figura 8.4).

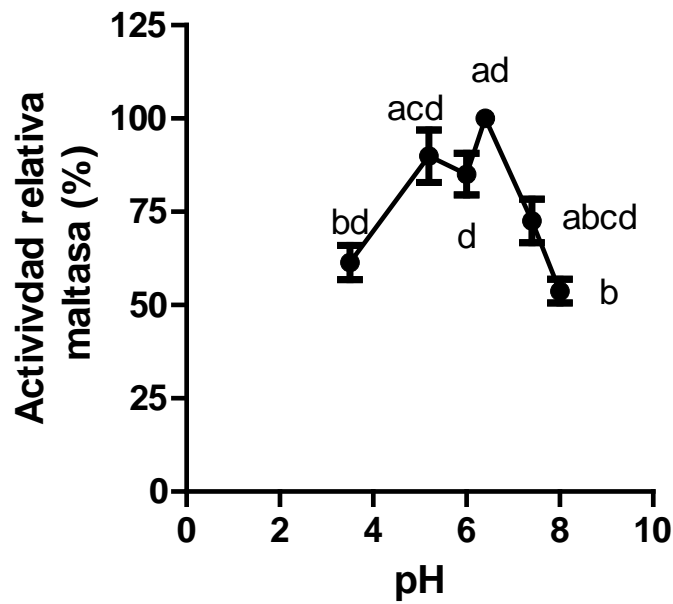


Figura 8.4.- Efecto del pH (3,5-8,0) sobre la actividad de maltasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a 30°C y en presencia de 28 mM de maltosa. Los datos de actividad de maltosa son representados en relación a la actividad a pH 6,4 (100%; 1494,81 μg glucosa \times min \times mg prot^{-1}). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media \pm E.S. para 6 individuos.

La actividad de maltasa fue similar dentro del rango de temperatura de 4-20°C y aumentó a 30°C. A 45°C, la actividad fue de un 25%, menor que la actividad a 30°C (F: 8,39; $p \leq 0,001$) (Figura 8.5).

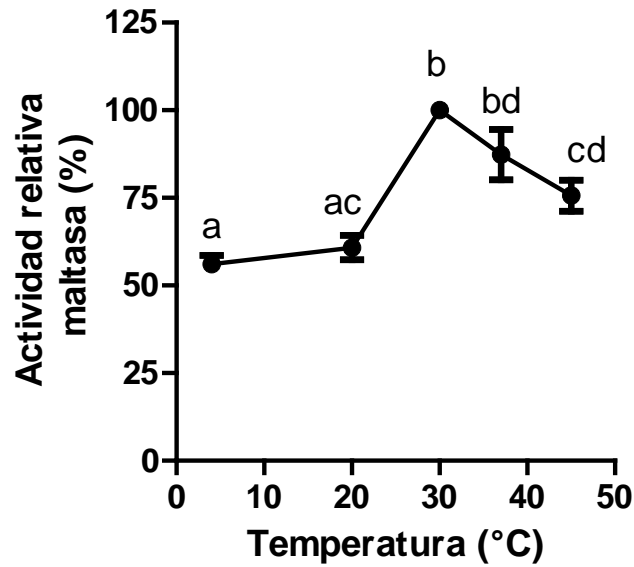


Figura 8.5.- Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de maltasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 6,4 y en presencia de 28 mM de maltosa. Los valores de la actividad de maltasa son expresados en relación a la actividad a 30°C (100%; 1539 μg glucosa x min x mg prot^{-1}). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media \pm E.S. para 5 individuos.

La actividad de maltasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió una cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 5,82 \pm 1,05$ mM) (Figura 8.6)

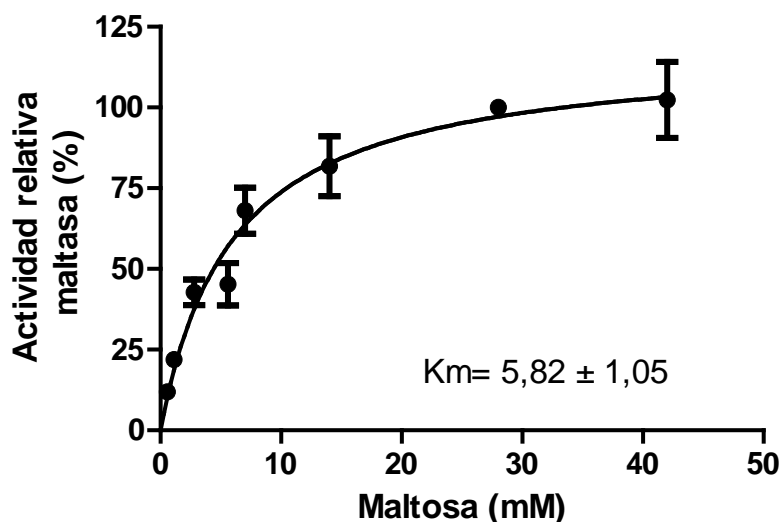


Figura 8.6.- Efecto de concentraciones crecientes de maltosa sobre la actividad de maltasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 6,4 y 30°C. Los valores de actividad de maltasa son expresados en relación al correspondiente actividad en presencia de 28 mM (100%; 1183µg glucosa x min x mg prot⁻¹). Los datos son la media ± E.S. para 5-6 individuos.

Caracterización parcial de la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*

La actividad de sacarasa se determinó dentro del rango de pH de 3,5 a 8,0. La actividad de sacarasa fue similar dentro del rango de pH entre 3,5 a 6,0. La actividad fue máxima a pH 6,4. A pHs 7,4 y 8,0 la actividad disminuyó alrededor de 61% con respecto a la actividad a pH 6,4 (F: 10,09; $p \leq 0,001$) (Figura 8.7).

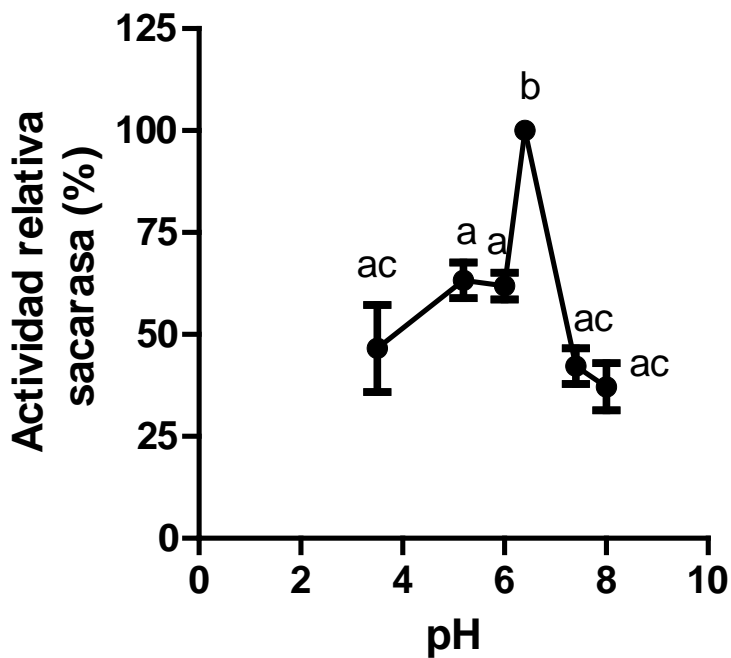


Figura 8.7.- Efecto del pH (3,5-8,0) sobre la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a 30°C y en presencia de 28 mM de sacarosa. Los datos de actividad de sacarasa son representados en relación a la actividad a pH 6,4 (100%; 269 µg glucosa x min x mg prot⁻¹). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media ± E.S. para 5 individuos.

La actividad de sacarasa fue similar dentro del rango de temperatura de 4-20°C. La actividad aumentó a 30°C. Entre 37 y 45°C la actividad fue similar al valor a 30°C (H: 19,04; $p \leq 0,001$) (Figura 8.8).

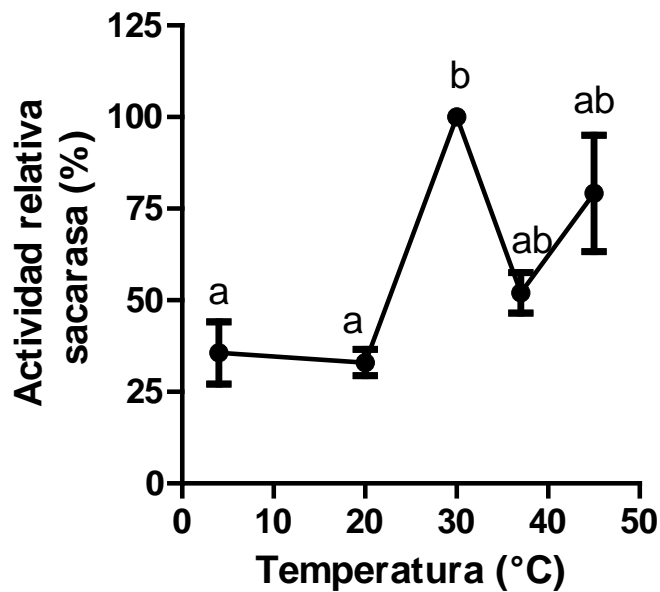


Figura 8.8.- Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 6,4 y en presencia de 28 mM de sacarosa. Los valores de la actividad de sacarasa son expresados en relación a la actividad a 30°C (100%; 274 μg glucosa x min x mg prot⁻¹). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media \pm E.S. para 6 individuos.

. La actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió una cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 8,14 \pm 9,83$ mM) (Figura 8.9).

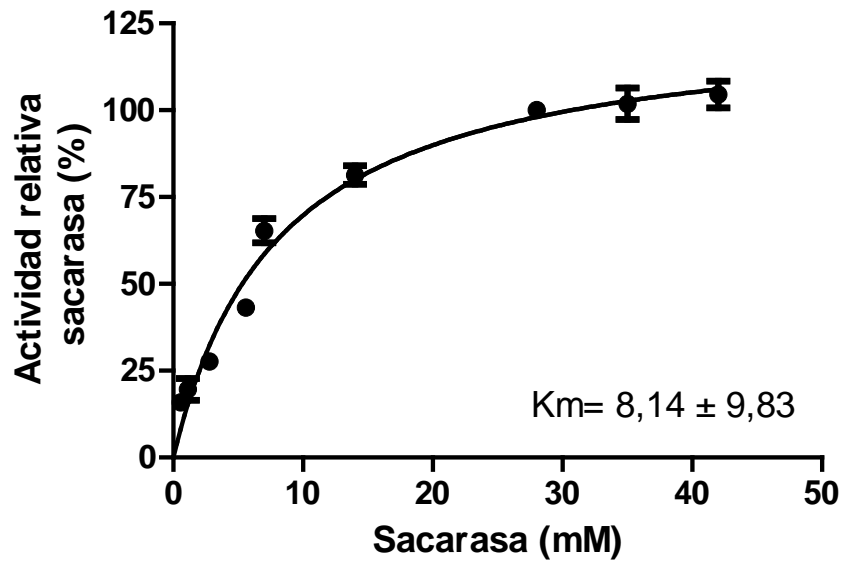


Figura 8.9.- Efecto de concentraciones crecientes de sacarosa sobre la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 6,4 y 30°C. Los valores de actividad de sacarasa son expresados en relación al correspondiente actividad en presencia de 28 mM (100%; 1183 µg glucosa x min x mg prot⁻¹). Los datos son la media ± E.S. para 5- 6 individuos.

Caracterización parcial de la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri*

La actividad de tripsina se determinó dentro del rango de pH de 4,5 a 10,0. A pH 4,5 la actividad fue de aproximadamente un 58% con respecto al valor determinado a 7,4. En el rango de pHs entre 5,2 a 10,0 la actividad fue similar (F: 9,3; p ≤ 0,001) (Figura 8.10).

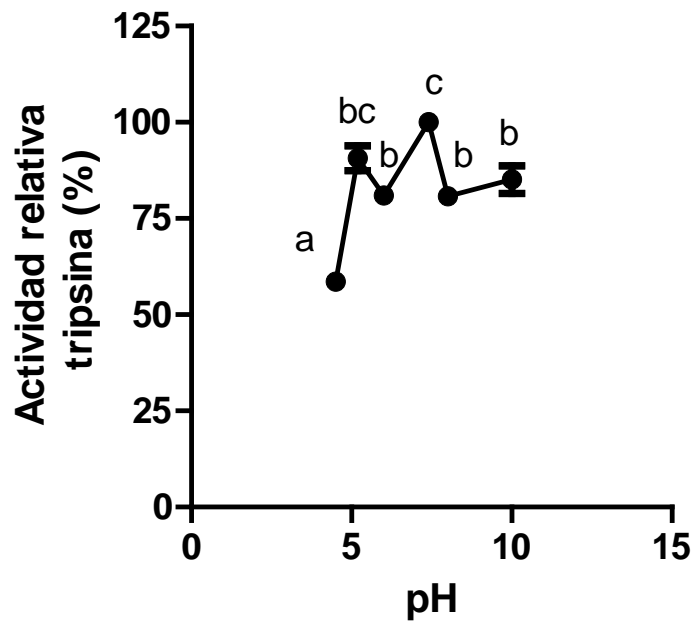


Figura 8.10.- Efecto del pH (4,5-10,0) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a 45°C y en presencia de 1.16 mM de BAPNA. Los datos de actividad de tripsina son representados en relación a la actividad a pH 7,4 (100%; 1,34 $\mu\text{moles} \times \text{min} \times \text{mg} \text{prot}^{-1}$). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media \pm E.S. para 6 individuos.

La actividad de tripsina fue similar dentro del rango de temperatura de 4 a 45°C (F: 2,49; p: 0,069) (Figura 8.11)

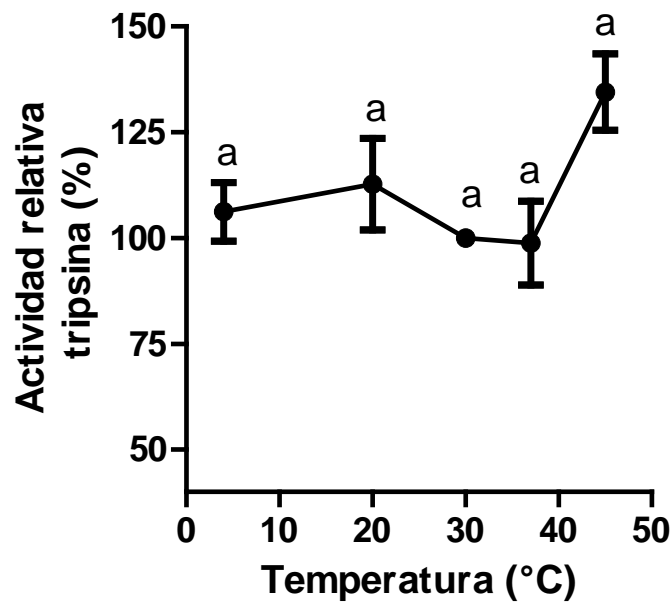


Figura 8.11.- Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 7,4 y en presencia de 1,16 mM de BAPNA. Los valores de la actividad de tripsina son expresados en relación a la actividad a 30°C (100%; 274 μg glucosa x min x mg prot⁻¹). Letras distintas indican diferencias significativas entre si. Los datos son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

La actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió una cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 0,22 \pm 0,4$ mM) (Figura 8.12).

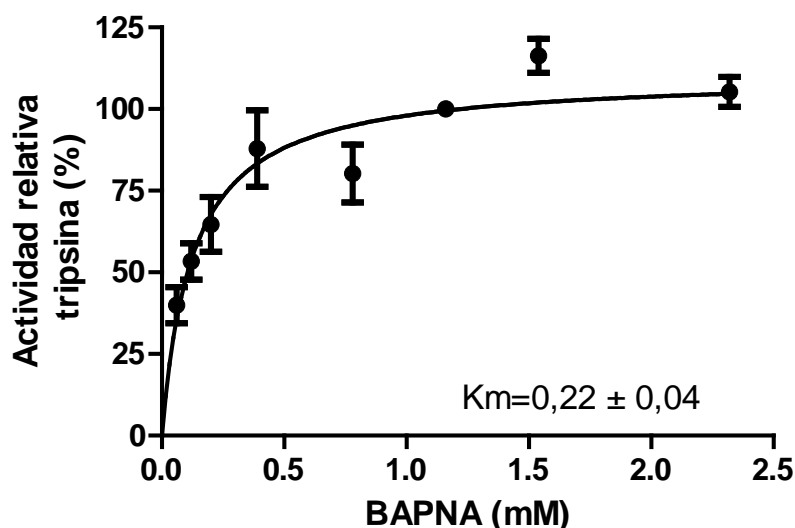


Figura 8.12.- Efecto de concentraciones crecientes de BAPNA sobre la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri*. La actividad se midió a pH 7,4 y 45°C. Los valores de actividad de tripsina son expresados en relación al correspondiente actividad en presencia de 1,16 mM (100%; 1,49 μ moles x min x mg prot⁻¹). Los datos son la media \pm E.S. para 6 individuos.

Efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas de *U. tangeri*

Para determinar el efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri*, los individuos se mantuvieron a 12, 33 y 55‰ de salinidad, salinidades en las cuales este cangrejo hiperregula, osmoconforma e hiporregula, respectivamente (T: 10; p: 0,007) (t : -1,71; p: 0,10) (T: 58; p: 0,004) (T: 58; p: 0,004) (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Osmolalidad (mOm x Kg⁻¹) en medio externo y en hemolínfa de *U. tangeri*.

12‰		33‰		55‰	
Medio	Hemolínfa	Medio	Hemolínfa	Medio	Hemolínfa
287±2,9	681±20*	765± 4,4	695±7	1386±12,30	820±27*

*Significativamente diferente de la correspondiente concentración del medio externo. (p<0,05). Los datos son la media ± S.E. n=7 individuos.

Actividad de α-amilasa

En individuos expuestos a baja salinidad (12‰) la actividad de α-amilasa en hepatopáncreas fue similar a la correspondiente actividad a 33‰ de salinidad. La actividad de α-amilasa en hepatopáncreas de cangrejos expuestos a 55‰ de salinidad fue menor (20%) a la actividad en individuos expuestos a 33‰ de salinidad (F: 3,6; p: 0,04) (Figura 8.13).

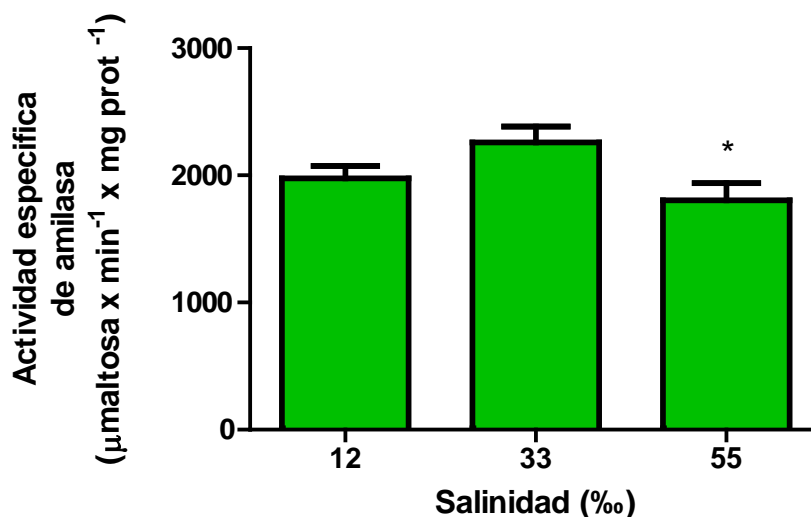


Figura 8.13.- Actividad de α-amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* expuesto a distintas condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 33‰ (p < 0,05). Los datos son las medias ± S.E. para 6-7 individuos.

Actividad de maltasa

En individuos expuestos a baja salinidad (12‰) la actividad de maltasa en hepatopáncreas fue similar a la correspondiente actividad a 33‰ de salinidad. La actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de cangrejos expuestos a 55‰ de salinidad fue menor (35%) a la actividad en individuos expuestos a 33‰ de salinidad (H: 7,35; p: 0,02) (Figura 8.14).

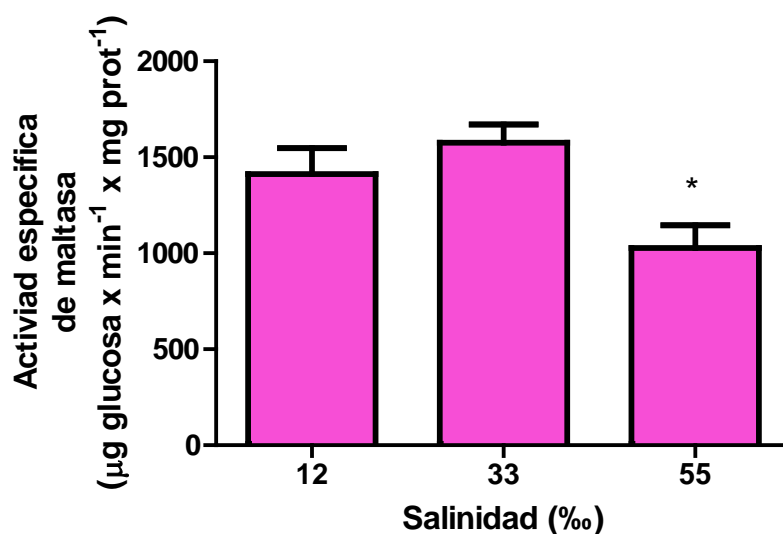


Figura 8.14.- Actividad de maltasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* expuesto a distintas condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 33‰ ($p < 0,05$). Los datos son las medias \pm S.E. para 7-8 individuos.

Actividad de sacarasa

En individuos expuestos a baja salinidad (12‰) la actividad de sacarasa en hepatopáncreas fue similar a la correspondiente actividad a 33‰ de salinidad. La actividad de sacarasa en hepatopáncreas de cangrejos expuestos a 55‰ de salinidad fue menor (32%) a la actividad en individuos expuestos a 33‰ de salinidad (F: 5,76; p: 0,01) (Figura 8.15).

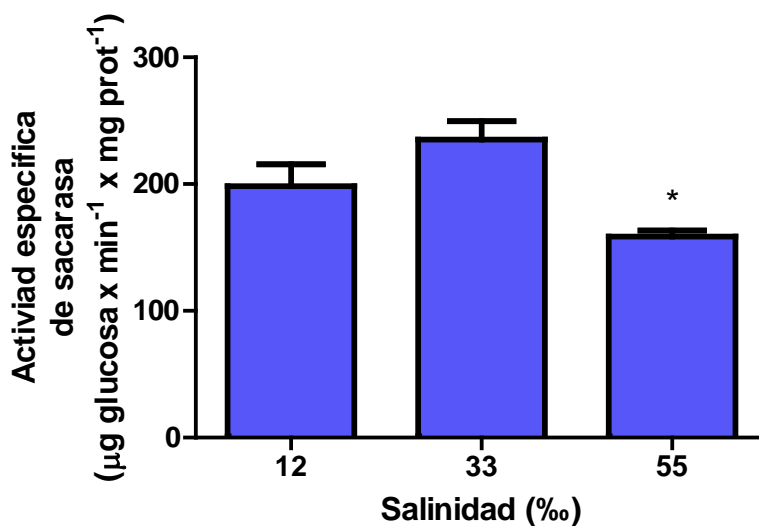


Figura 8.15.- Actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* expuesto a distintas condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 33‰ (p < 0,05). Los datos son las medias ± S.E. para 7-8 individuos.

Actividad de tripsina

En individuos expuestos a baja salinidad (12‰) la actividad de tripsina en hepatopáncreas fue similar a la correspondiente actividad a 33‰ de salinidad. La

actividad de tripsina en hepatopáncreas de cangrejos expuestos a 55‰ de salinidad fue menor (21%) a la actividad en individuos expuestos a 33‰ de salinidad (F: 3,95; p: 0,06) (Figura 8.16).

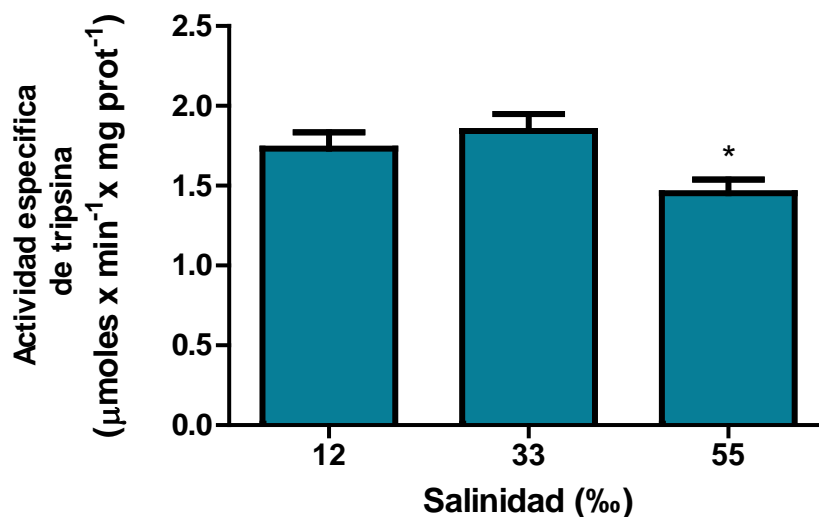


Figura 8.16.- Actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* expuesto a distintas condiciones de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a 33‰ (p < 0,05). Los datos son las medias ± S.E. para 7-8 individuos.

Discusión

Los resultados del presente capítulo constituyen la primer evidencia de la existencia de actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa, sacarasa) y proteasas (tripsina) en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Uca tangeri*. En varios crustáceos decápodos, se ha relacionado la presencia y el nivel de actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas con la naturaleza de los componentes dietarios que pueden ser potencialmente utilizados para los procesos metabólicos (Pavasovic et al., 2004, 2007, Figueiredo y Anderson, 2009; Coccia et al., 2011; Castro et al., 2012; Rivera-Pérez,

2015; Sacristán et al., 2015; Bibo-Verdugo et al., 2016; Rodríguez-Viera et al., 2016). La existencia y nivel de actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas sugiere que este cangrejo exhibe una batería bioquímica adecuada para hidrolizar diferentes sustratos dietarios (ej. almidón, glucógeno, disacáridos y proteínas). Además, la presencia de estas actividades enzimáticas en hepatopáncreas de *U. tangeri* podría relacionarse con la capacidad para degradar sustratos de reserva (ej. glucógeno), como hemos sugerido en trabajos realizados en nuestro laboratorio y en la presente tesis para los cangrejos eurihalinos *Neohelice granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita (Asaro et al., 2010, 2011a, b; Michiels et al., 2013, 2015b, Michiels, 2015; capítulos 1, 2 y 4 presente tesis).

La mayor actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* fue observada dentro del rango de pHs 5,7- 6,4 siendo similar a lo descrito para la actividad de α -amilasa parcialmente purificada de hepatopáncreas de *N. granulata* (pH 6,0) (capítulo 1). Por otro lado, difiere de lo observado en hepatopáncreas de los cangrejos eurihalinos *C. angulatus* y *Scylla serrata* (Asaro et al., 2010; Pavasovic et al., 2004), de los cangrejos violinistas *Uca minax*, *U. pugnax* y *U. pugilator* (Azzalina y Trainer, 1985) y el cangrejo marino *Thalamita crenata* (Van Weel, 1960). La mayor actividad de α -amilasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* a 30°C, fue similar a lo descrito para la actividad de α -amilasa parcialmente purificada de hepatopáncreas de *N. granulata* (capítulo 1 presente tesis), pero difiere de lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *S. serrata* (Pavasovic, 2004). *U. tangeri* de la Bahía de Cádiz está comúnmente expuesto a variaciones diarias y estacionales en la temperatura ambiental (-1°C a 43°C) (Agencia Estatal de Meteorología de España (AEMET): <http://www.aemet.es>). Una alta actividad amilolítica en hepatopáncreas de *U. tangeri* en baja (4°C) y alta (45°C) temperatura podría jugar un rol importante en la

aclimatación térmica de este cangrejo (ej. mantenimiento de la capacidad de hidrólisis en los pasos iniciales de digestión de hidratos de carbono) como hemos sugerido previamente para la actividad de α -amilasa parcialmente purificada en *N. granulata* (capítulo 1 presente tesis). El comportamiento michaeliano de la actividad de α -amilasa en respuesta a varias concentraciones de almidón, está de acuerdo con lo descrito anteriormente para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* (Asaro et al., 2010, 2011a).

El mantenimiento de la actividad de maltasa dentro un amplio rango de pHs, permitiría la hidrólisis de maltosa dietaria aún cuando los valores de pH del hepatopáncreas varien. Este resultado, difiere de lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (Asaro et al., 2011a) pero es similar a lo descrito para *C. angulatus* (Asaro et al., 2010). El aumento de la actividad de maltasa a 30°C en hepatopáncreas de *U. tangeri* está de acuerdo a lo observado para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* (observaciones personales). Contrariamente a lo observado para la actividad de α -amilasa, la actividad de maltasa fue menor a 4°C, lo cual permitiría sugerir que las bajas temperaturas podrían afectar los pasos finales de la hidrólisis de hidratos de carbono. La actividad de maltasa en el hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió un cinética Michaelis–Menten, similarmente a lo descrito para esta actividad en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* (Asaro et al., 2010, 2011a). Nuestros estudios sobre existencia y caracterización bioquímica de sacarasa en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* constituyen los primeros realizados en cangrejos eurihalinos (Asaro et al., 2011a, b). La actividad de sacarasa fue máxima a pH 6,4 (Figura 8.7) y concuerda con lo encontrado para esta actividad en el camarón *Macrobranchium lamarrei* (Saxena y Muethy, 1982), pero difiere a lo observado previamente en nuestro laboratorio en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus*

(Asaro et al., 2011a, b). La mayor actividad de sacarasa detectada dentro del rango de temperatura de 30 a 45°C difiere de lo encontrado para esta actividad en *M. lamarrei* (Saxena y Murthy, 1982). Similarmente a lo observado previamente para la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *N. granulata*, *C. angulatus* y *M. lamarrei* (Asaro et al., 2011a, b; Saxena y Murthy, 1982), la actividad de sacarasa en hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió una cinética de Michaelis–Menten. El mantenimiento de la actividad de tripsina en un amplio rango de pH concuerda a lo encontrado en *N. granulata* y *C. angulatus* (Michiels, 2015). Además, similarmente a lo observado para la actividad de α -amilasa, el mantenimiento de una alta actividad en un amplio rango de temperaturas sugiere el mantenimiento de la capacidad proteolítica a temperaturas extremas como sugerimos previamente para esta actividad en *C. angulatus* (Michiels, 2015). Similarmente a lo que hemos observado en *N. granulata* y *C. angulatus* (Michiels, 2015), la actividad de tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* exhibió una cinética de Michaelis–Menten.

En varias especies de cangrejos eurihalinos, la modulación diferencial de la actividad de diferentes enzimas digestivas en hepatopáncreas constituye uno de los ajustes a nivel bioquímico frente a la exposición a baja y alta salinidad aunque las respuestas parecen ser dependientes del tipo y grado de estrés osmótico y/o de la especie (Asaro et al., 2011a; Romano y Zeng, 2012; Wang et al., 2013; Michiels et al., 2013, 2015a; Pinoni et al., 2013, 2015a, b; presente tesis). En este contexto, en los cangrejos eurihalinos *N. granulata* y *C. angulatus* mostramos la existencia de una modulación diferencial por salinidad ambiental de la expresión y/o actividad de diferentes enzimas digestivas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono (ej. α -amilasa, maltasa y sacarasa) y proteínas (ej. tripsina) en relación al estado osmorregulatorio (Asaro et al., 2011a; Pinoni et al., 2013, 2015a; Michiels et al., 2013, 2015; Michiels,

2015; capítulos 3 a 7 de la presente tesis doctoral). *U. tangeri* de la Bahía de Cádiz se comporta como hiper/hiporregulador, ya que los valores de osmolalidad de hemolinfa son mayores o menores al correspondiente valor del medio externo en individuos mantenidos a 12 y 55‰ de salinidad, respectivamente, mientras que osmoconforma a 33‰ de salinidad (Pinoni et al., 2015b, Tabla 8.1 presente capítulo). Resultados previos en machos adultos de *U. tangeri* de la Bahía de Cádiz (España), mostraron una modulación diferencial de diferentes metabolitos y sustratos de energía sugiriendo ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono y proteínas en relación al estado osmorregulatorio (Pinoni et al., 2015b, Pinoni et al., enviado a publicar). Sin embargo, como mencionamos anteriormente, hasta el momento no hay información sobre la modulación por salinidad ambiental de la actividad de enzimas digestivas clave (ej. carbohidrasas/proteasas) en hepatopáncreas de esta especie. Por lo tanto en este capítulo estudiamos, el efecto de baja y alta salinidad sobre la actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* de la Bahía de Cádiz.

La menor actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas de individuos de *U. tangeri* mantenidos a alta (55‰) salinidad (condición de hiporregulación) sugiere que la modulación de carbohidrasas y proteasas clave constituye uno de los ajustes a nivel bioquímico subyacentes a la hiporregulación. Estos resultados son similares a los observados en el cangrejo *Eriocheir sinensis* (Wang et al., 2013), pero difieren a los que observamos en *N. granulata* y *C. angulatus* (capítulo 3). La disminución de la actividad de carbohidrasas y tripsina en hepatopáncreas y por ende potencialmente en la capacidad digestiva para hidratos de carbono y proteínas podría relacionarse con el mantenimiento de sustratos de reserva en hepatopáncreas en alta salinidad (Pinoni et al., enviado a publicar). Por otro lado, si la disminución en alta salinidad de las actividades enzimáticas estudiadas se debe a una variación en la

expresión de ARNm y/o formas como observamos para α -amilasa y tripsina en *N. granulata* (capítulo 3 presente tesis) y/o a modulación de enzimas pre-existentes en hepatopáncreas de *U. tangeri* requiere mayor investigación.

En hepatopáncreas de *N. granulata* se observó una regulación *in vitro* de N-aminopeptidasa (APN) por dopamina y glucagón (Michiels et al., 2015 a, b) y la regulación *in vivo e in vitro*, de las actividades de lipasa, proteolítica total y tripsina en hepatopáncreas de *C. angulatus* por histamina y serotonina (Michiels et al., enviado a publicar) sugiriendo el rol de diferentes aminas biogénicas como mensajeros químicos primarios para la regulación de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas. En este contexto, futuros estudios deberían focalizarse en establecer si alguno/s de estos mecanismos están involucrados en la disminución de la actividad de carbohidrasas y tripsina en hepatopáncreas de *U. tangeri* en condición de hiporregulación.

La hiper e hiporregulación en cangrejos parecen requerir diferentes mecanismos y ajustes a nivel bioquímico que podrían conducir a una diferente reorganización metabólica (McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng 2012; Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2013, 2015a; presente tesis). Este parece ser también el caso para *U. tangeri* ya que a diferencia de lo observado en alta salinidad (hiporregulación), la exposición a baja salinidad en condiciones de hiperregulación, no afectó la actividad de carbohidrasas y tripsina (Figuras 8.13-8.16), sugiriendo la existencia de ajustes digestivos diferenciales a nivel bioquímico en relación al estado osmorregulatorio. Por otro lado, no podemos descartar la existencia de una modulación cuali/cuantitativa de formas de α -amilasa y tripsina con distinta capacidad hidrolítica posiblemente presentes en hepatopáncreas de *U. tangeri* que permitan mantener la capacidad hidrolítica total como sugerimos previamente para *N. granulata* (capítulo 3).

En resumen, los resultados del presente capítulo constituyen la primer evidencia experimental de la existencia de actividades de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) y proteasas (tripsina) en hepatopáncreas de *U. tangeri* y de su modulación diferencial por baja y alta salinidad ambiental sugiriendo la existencia de ajustes específicos a nivel bioquímico en relación a la hiper/hiporregulación.

Discusión general

El procesamiento y distribución de nutrientes son críticos para la supervivencia de los organismos (Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013). En este contexto, al constituir un paso limitante para la entrada de nutrientes, los procesos digestivos tienen obvias implicancias para todos los procesos fisiológicos (Sabat et al., 1998; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013). La flexibilidad fenotípica, una categoría de plasticidad fenotípica, involucra variaciones reversibles, a distintos niveles, dentro de un individuo, las cuales pueden incrementar las posibilidades de supervivencia de organismos que enfrentan cambios espacio-temporales abruptos y frecuentes en condiciones ambientales clave (Piersma y Drent, 2003; Pfenning et al., 2010; Piersma y van Gills, 2011; Kelly et al., 2012; Buehler et al., 2012; McWilliams y Karasov, 2014; Wright y Turko, 2016). La flexibilidad fenotípica del sistema digestivo (ej. a nivel molecular y bioquímico) puede conducir a cambios compensatorios en la capacidad digestiva en respuesta a condiciones cambiantes del ambiente (del Valle et al., 2004; 2006; Starck y Wang, 2005; del Valle y López Mañanes, 2008, 2011, 2012; Brzek et al., 2011; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; McWilliams y Karasov, 2014; Zhang et al., 2016). Las enzimas digestivas cumplen un rol esencial en los procesos digestivos al ser un nexo entre la digestión y absorción de nutrientes y en muchos casos, estar involucradas en la digestión de sustratos de reserva de energía. En varias especies de vertebrados e invertebrados, la modulación de la actividad de enzimas digestivas constituye uno de los ajustes a nivel bioquímico en respuesta a cambios en factores ambientales clave lo cual se ha sugerido podría incrementar la eficiencia para la digestión de nutrientes y de esta manera contribuir a una mayor asimilación de metabolitos a partir del alimento (Starck y Wang, 2005; Brzek et al., 2011; Karasov et

al., 2011; del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov y Douglas, 2013; McWilliams y Karasov, 2014; Zhang et al., 2016). Sin embargo, estas respuestas parecen variar en relación al tipo y grado de desafío ambiental y de la especie.

En crustáceos decápodos, el hepatopáncreas constituye el sitio principal de síntesis de enzimas digestivas siendo un órgano multifuncional con un rol esencial en la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes (Ceccaldi, 1989; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003; Ong y Johnston, 2006; Zeng et al., 2010; Wang et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Sacristán et al., 2014, 2015; Saborowski, 2015; Bibo-Verdugo et al., 2015, 2016). En este contexto, los estudios sobre identificación y caracterización bioquímica (ej. actividad, número de formas) de enzimas digestivas en hepatopáncreas constituyen un paso primordial para el conocimiento de la fisiología bioquímica digestiva de crustáceos decápodos. Los crustáceos decápodos exhiben un amplio espectro de enzimas digestivas en hepatopáncreas, algunas de las cuales han sido caracterizadas bioquímicamente en algunas especies y se ha demostrado su modulación por factores internos y externos (Blandamer y Beechey, 1966; Mayzaud, 1985; Van weel et al., 1960; Saxena y Murphy, 1982; Dutta et al., 2006; Pavasovic et al., 2007; Perera et al., 2008a; Buarque et al., 2009; Figueiredo y Anderson, 2009; Asaro et al., 2011a; Castro et al., 2012; da Silva et al., 2014; Bibo-Verdugo et al., 2015, 2016; Rodríguez-Viera et al., 2016). El conocimiento sobre existencia, características bioquímicas y modulación de enzimas digestivas en cangrejos eurihalinos es aún escaso y fragmentario (Bladamer y Buchey, 1966; Azzalina y Trainer, 1985; Asaro et al., 2010, 2011a, b; Michiels, 2015; Michiels et al., 2013, 2015a, b). Los cangrejos eurihalinos que habitan la zona intermareal de la laguna costera de Mar Chiquita y la Bahía de Cádiz están expuestos a un ambiente marcadamente heterogéneo, con variaciones frecuentes en la salinidad. Debido a que la modulación de enzimas digestivas constituye uno de los

principales ajustes en relación a variables ambientales clave en varios organismos, resulta evidente la importancia de estudios integrativos sobre la posible modulación diferencial cuali/cuantitativa y/o temporal de enzimas digestivas específicas en hepatopáncreas y del contenido de reservas en diferentes órganos de reserva en relación a diferentes desafíos ambientales en cangrejos eurihalinos intermareales. En este sentido, los resultados de la presente tesis representan un estudio integrativo de caracterización y modulación de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas y de reservas de energía 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, Argentina) y *Uca tangeri* de la Bahía de Cádiz (España).

Las especies *N. granulata* y *C. angulatus* (ambas miembros de la familia Varunidae), son la especies dominantes en la laguna costera de Mar Chiquita. *C. angulatus* se encuentra en la zona inter y submareal, mientras que *N. granulata* habita zonas del intermareal medio. *N. granulata* es una especie semiterrestre y puede experimentar periodos de emersión variables. Por otro lado, *C. angulatus* es omnívora, detritívora y carroñera mientras que *N. granulata* es omnívora-detritívora (Spivak et al., 1994). *Uca tangeri* (familia Ocypodidae) es una especie de cangrejo omnívoro y semiterrestre. En la zonas de planicie de mareas del Rio San Pedro (Bahía de Cádiz) los individuos de *U. cangeri* están expuestos a variaciones en la salinidad y temperatura ambiental. Durante el invierno no se detectaron cangrejos y las cuevas permanecen cerradas durante la marea baja (Boa y Guerra-García, 2015).

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede sugerir que estas especies presentarían ajustes digestivos y metabólicos diferenciales

que serían especies-específicos y estarían en relación con sus hábitats, estilos de vida y hábitos alimentarios particulares. De esta manera, en esta tesis doctoral:

Demostramos por análisis por zimograma la existencia de diferentes formas con actividad amilolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*. Se realizó una purificación parcial de la forma de α -amilasa con mayor actividad (29 kDa), la cual exhibió características bioquímicas que podrían estar relacionadas con el hábito alimentario y condiciones ambientales que experimenta este cangrejo en la zona de planicie de mareas de la laguna costera de Mar Chiquita. La clonación parcial de α -amilasa y la caracterización de su secuencia mostraron que presenta características moleculares similares a otros crustáceos. El análisis filogenético reveló que la α -amilasa de *N. granulata* se encuentra dentro del grupo de los crustáceos. Además, sugerimos la posible existencia de modificaciones post-transcripcionales en α -amilasa de hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1).

Demostramos la existencia de dos isoformas de tripsina (tripsina 1 y 2) en hepatopáncreas de *N. granulata*, las cuales mostraron características comunes a la de otros cangrejos. Por análisis filogenético determinamos que ambas isoformas se encuentran cerca de las secuencias de proteínas de otros cangrejos (Capítulo 2).

Demostramos la modulación diferencial en respuesta a la exposición a largo plazo a baja (10‰) y alta salinidad (37‰) (condiciones de hiper e hiporregulación, respectivamente) de la expresión, número de formas y actividad total de α -amilasa y de la expresión de isoformas y actividad total de tripsina en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo la existencia de ajustes digestivos diferenciales a distintos niveles (molecular/bioquímico) en componentes involucrados en el metabolismo de hidratos de carbono y proteínas en relación al estado osmorregulatorio (Capítulo 3).

Las respuestas diferenciales de la actividad de carbohidrasas (α -amilasa, maltasa y sacarasa) en hepatopáncreas y del contenido de glucógeno y glucosa libre en diferentes órganos de reserva (hepatopáncreas, músculo de la quela, branquias anteriores y posteriores) a distintos tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de *N. granulata* mantenidos a largo plazo a baja (10‰) y alta salinidad (37‰), sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos post-prandiales diferenciales en relación a al estado osmorregulatorio (hiper e hiporregulación) (capítulo 4).

La variación en la actividad de carbohidrasas en hepatopáncreas y en el contenido de glucógeno en branquias posteriores luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad inmediatamente luego de la ingesta de alimento sugieren la existencia de ajustes post-prandiales diferenciales en componentes del metabolismo de hidratos de carbono específicos en relación al cambio en el estado osmorregulatorio (capitulo 5).

Las respuestas de la actividad de enzimas digestivas (carbohidrasas, proteolítica total y lipasa) en hepatopáncreas y del contenido de diferentes sustratos de reserva (glucógeno, triglicéridos y proteínas) frente a la emersión inmediatamente luego de la ingesta de alimento de individuos de *N. granulata* sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos post-prandiales a nivel bioquímico específicos en relación a la emersión en diferentes estados osmorregulatorio (hiper o hiporregulación) (Capitulo 6).

Demostramos la existencia en hepatopáncreas de *C. angulatus* de dos formas con actividad amilolítica. La exposición a largo plazo a baja (6-10‰) y alta (40‰) salinidad (condiciones de hiper e hiporregulación, respectivamente) no afecto el número de formas de α -amilasa o la actividad total de α -amilasa, maltasa y sacarasa soportando la idea que los ajustes en enzimas digestivas en hepatopáncreas serian específicos para diferentes especies de cangrejos eurihalinos. Las variaciones en el contenido de

glucógeno y glucosa libre en músculo de la quela y branquias anteriores sugiere la existencia de ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono en relación al estado osmorregulatorio (Capítulo 7).

En *U. tangeri* demostramos la existencia de actividad de α -amilasa, maltasa, sacarasa y tripsina en hepatopáncreas, las cuales fueron caracterizadas parcialmente. La existencia en hepatopáncreas de estas actividades sugiere la capacidad potencial de este cangrejo para la digestión de diferentes sustratos glucogénicos (ej. almidón, maltosa y sacarosa) y proteicos. Además, demostramos la existencia de modulación diferencial de la actividad de carbohidrasas y tripsina en baja (12‰) y alta (55‰) salinidad (condiciones de hiper e hiporregulación, respectivamente) lo que permitiría sugerir la existencia de ajustes digestivos diferenciales en relación tipo de desafío osmótico.

Conclusión

Los resultados presentados en esta tesis cubren un área de vacancia en el conocimiento de la fisiología digestiva y metabólica y de las estrategias a distintos niveles (ej. molecular, bioquímico y fisiológico) de crustáceos decápodos en general y de cangrejos eurihalinos intermareales en particular en relación a variables ambientales clave. En este contexto, los resultados sugieren la existencia de complejos ajustes digestivos y metabólicos específicos y diferenciales (modulación a distintos niveles de enzimas digestivas y de reservas de energía) en relación a diferentes condiciones y/o variaciones en factores clave.

Por otro lado sienta las bases para la realización de futuros estudios sobre la posible existencia de diferentes vías de regulación que podrían estar involucradas en la modulación a diferentes niveles (molecular, bioquímico) de enzimas digestivas y

sustratos de reserva, como parte de las estrategias a nivel bioquímico fisiológico en cangrejos eurihalinos en relación a variaciones en las condiciones ambientales.



Bibliografía

- ✚ Ahearn G.A., Grover M.L., Dunn R.E. 1985. Glucose transport by lobster hepatopancreatic brush border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 248:R133-R141.
- ✚ Airriess C.N., y McMahon B.R. 1996. Short term emersion affects cardiac function and regional haemolymph distribution in the crab *Cancer magister*. *J. Exp. Biol.* 199:569-578.
- ✚ Al-Wassia A.H., Innes A.J., Whiteley N.M., Taylor E.W. 1989. Aerial and aquatic respiration in the ghost crab *Ocypode saratan*—I. Fine structure of respiratory surfaces, their ventilation and perfusion; oxygen consumption and carbon dioxide production. *Comp. Biochem. Physiol.* 94:755-764.
- ✚ Anger K., Spivak E., Bas C., Ismael D. y Luppi T. 1994. Hatching rhythms and dispersion of decapod crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. *Helgoländer Meeresun.* 48:445-466.
- ✚ Aragón-Axomulco H., Chiappa-Carrara X., Soto L., Cuzon G., Arena L., Maldonado C., Gaxiola G. 2012. Seasonal variability in trypsin and α -amylase activities caused by the molting cycle and feeding habits of juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). *J. Crust. Biol.* 32:89-99.
- ✚ Artillo R., Pinoni S.A., Asaro A., López Mañanes A.A. 2008. Glycogen storage sites in *Chasmagnathus granulatus* upon hyperegulation: differential postingesta response. *Biocell* 32:85.
- ✚ Arturo S.P., Fernando G.C., Jorge H.L., Adriana M.A., Gloria Y.P. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340:184-193.

- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2011a. Amylase, maltase and sucrase activities in hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Brachyura: Varunidae): partial characterization and response to low environmental salinity. *Sci. Mar.* 75:517-524.
- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2011b. Sucrase activity in the hepatopancreas of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*: response to environmental salinity. *Biocell* 35:137.
- ✚ Asaro A., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2012. Responses to salinity in *Cyrtograpsus angulatus*: osmoregulation and energy stores. *Biocell* 36:33.
- ✚ Asaro A., López Mañanes A.A., del Valle J.C. 2010. Amylase and maltase activities in hepatopancreas of *Cyrtograpsus angulatus*: response to environmental salinity. *Biocell* 32:86.
- ✚ Azzalina J.D., y Trainer D.G. 1985. Amylolytic activity in the hepatopancreas of *Uca minax*, *Uca pugnax* and *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82:679-682.
- ✚ Azzopardi E., Lloyd C., Teixeira S.R., Conlan R.S., Whitaker I.S. 2016. Clinical applications of amylase: Novel perspectives. *Surgery* 160:26-37.
- ✚ Balas D., Senegas-Balas F., Pradayrol L., Vayssette J., Bertrand C., Ribet A. 1985. Long-term comparative effect of cholecystokinin and gastrin on mouse stomach, antrum, intestine, and exocrine pancreas. *Am. J. Anat.* 174:27-43.
- ✚ Bas C., Lancia J.P., Luppi T., Méndez-Casariego A., Kittlein M., Spivak E. 2014. Influence of tidal regime, diurnal phase, habitat and season on feeding of an intertidal crab. *Mar. Ecol.* 35:319-331.
- ✚ Beltrame M.O., De Marco S.G., Marcovecchio J.E. 2010. Influences of sex, habitat, and seasonality on heavy-metal concentrations in the burrowing crab

- (*Neohelice granulata*) from a coastal lagoon in Argentina. Arch. Environ. Con. Tox. 58:746-756.
- ✚ Beltrame M.O., De Marco S.G., Marcovecchio J.E. 2011. The burrowing crab *Neohelice granulata* as potential bioindicator of heavy metals in estuarine systems of the Atlantic coast of Argentina. Environ. Monit. Assess. 172:379-389.
 - ✚ Bezerra C.A., Macedo L.L.P., Amorim T.M.L., Santos V.O., Fragoso R.D.R., Lucena W.A., Meneguim A.M., Valencia-Jimenez A., Engler G., Silva M.C.M., Albuquerque E.V.S., Grossi-de-Sa M.F. 2014. Molecular cloning and characterization of an α -amylase cDNA highly expressed in major feeding stages of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. Gene 553:7-16.
 - ✚ 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. Comp. Biochem. Physiol. 151:423-436.
 - ✚ Bibo-Verdugo B., O'Donoghue A. J., Rojo-Arreola L., Craik C.S., García-Carreño F. 2016. Complementary proteomic and biochemical analysis of peptidases in lobster gastric juice uncovers the functional role of individual enzymes in food digestion. Mar. Biotechnol. 18:201-214.
 - ✚ Bibo-Verdugo B., Rojo-Arreola L., Navarrete-Del-Toro M.A., García-Carreño F. 2015. A chymotrypsin from the digestive tract of California spiny lobster, *Panulirus interruptus*: purification and biochemical characterization. Mar. Biotechnol. 17:416-427.
 - ✚ Biesiot P., y Capuzzo J.M. 1990. Changes in the digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 136:107-122.

- ✚ Blandamer A., y Beechey R.B. 1966. The purification and properties of an α -amylase from the hepatopancreas of *Carcinus maenas*, the common shore crab. *Biochim. Biophys Acta* 118:204-206.
- ✚ Boa J.M., y Guerra-García J.M. 2015. Densidad poblacional del cangrejo violinista *Uca tangeri* (Eydoux, 1835) (Brachyura: Ocypodidae) en la costa Atlántica del sur de España. *Chron. Nat.* 5:26-34.
- ✚ Boel E., Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z., Dodson G.G., Jensen V.J., Petersen S.B., Swif H., Thim L., Woldike H.F. 1990. Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochem.* 29:6244-6249.
- ✚ Borowsky R. 1984. Environmental control of amylase phenotype in amphipods of the genus *Gammarus*. *Biol. Bull.* 167:647-657.
- ✚ Bortolus A., e Iribarne O. 1999. Effects of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 178:79-88.
- ✚ Bortolus A., Laterra P., Iribarne O. 2004. Crab-mediated phenotypic changes in *Spartina densiflora*. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 59:97-107.
- ✚ Boschi E.E. 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). *Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)* 6:1-99.
- ✚ Botto F., Valiela I., Iribarne O., Martinetto P., Alberti J. 2005. Impact of burrowing crabs on C and N sources, control and transformations in sediments and food webs of SW Atlantic estuaries. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293:155-164.
- ✚ Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254.

- ✚ Brzęk P., Kohl K. D., Caviedes-Vidal E., Karasov W.H. 2011. Fully reversible phenotypic plasticity of digestive physiology in young house sparrows: lack of long-term effect of early diet composition. *J. Exp. Biol.* 214:2755-2760.
- ✚ 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). *Aquacult. Res.* 40:861-870.
- ✚ Backup L., Dutra B.K., Ribarcki F.P., Fernandes F.A., Noro C.K., Oliveira G.T., Vinagre A.S. 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comp. Biochem. Physiol.* 149:59-67.
- ✚ Buehler D.M., Vézina F., Goymann W., Schwabl I., Versteegh M., Tieleman B.I., Piersma T. 2012. Independence among physiological traits suggests flexibility in the face of ecological demands on phenotypes. *J. Evol. Biol.* 25:1600-1613.
- ✚ Caccia S., Casartelli M., Grimaldi A., Losa E., de Eguileor M., Pennacchio F., Giordana B. 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:R2284-R2291.
- ✚ Cao X., He Y., Hu Y., Zhang X., Wang Y., Zou Z., Chen Y., Blissard G.W., Kanost M.R., Jiang H. 2015. Sequence conservation, phylogenetic relationships, and expression profiles of non digestive serine proteases and serine protease homologs in *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 62:51-63.
- ✚ Carter C.G., y Mente E. 2014. Protein synthesis in crustaceans: a review focused on feeding and nutrition. *Cent. Eur. J. Biol.* 9:1-10.

- ✚ Casas-Godoy L., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G., Marty A. 2012. Lipases: An Overview. En: Sandobal, G. (Ed). Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. Human Press, Springer Science- Bussiness, New York, pp. 3-30.
- ✚ Castro P.F., Freitas Jr A.C., Santana W.M., Costa H.M., Carvalho Jr L.B., Bezerra R.S. 2012. Comparative study of amylases from the midgut gland of three species of penaeid shrimp. J. Crust. Biol. 32:607-613.
- ✚ Ceccaldi H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. Adv. Trop. Aquac. Aquacop-Ifremer, Actes de Colloque 9:243-259.
- ✚ Chang E., y O'Connor J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: Mantell, L.H. (Ed). The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, New York, pp. 263-287.
- ✚ 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 penaeid shrimps. Eur. Aquat. Soc. Spec. Publ. 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. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 396:89-98.
- ✚ Chen L.Q., Cheung L.S., Feng L., Tanner W., Frommer W.B. 2015. Transport of sugars. Annu. Rev. Biochem. 84:865-894.
- ✚ Chevin L.M., y Lande R. 2015. Evolution of environmental cues for phenotypic plasticity. Evolution 69:2767-2775.

- ✚ Chung J.S. 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. *Saline Syst.* 4:1-8.
- ✚ Chung J.S. 2014. An insulin-like growth factor found in hepatopancreas implicates carbohydrate metabolism of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 199:56-64.
- ✚ Clissold F.J., Tedder B.J., Conigrave A.D., Simpson, S.J. 2010. The gastrointestinal tract as a nutrient-balancing organ. *Proc. R. Soc. B* 277:1751-1759.
- ✚ Coccia E., Varricchio E., Paolucci M. 2011. Digestive Enzymes in the Crayfish *Cherax albidus* Polymorphism and Partial Characterization. *International. J. Zool.* 1-9.
- ✚ Coleman R.A., y Mashek D.G. 2011. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem. Rev.* 111:6359-6386.
- ✚ Cournia Z., Allen T.W., Andricioaei I., Antonny B., Baum D., Brannigan G., et al. 2015. Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory. *J. Membr. Biol.* 248:611-640.
- ✚ 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*. *Comp. Biochem. Physiol.* 166:564-570.
- ✚ 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. *J. Comp. Physiol.* 180:189-198.
- ✚ D'Amico S., Gerday C., Feller G. 2000. Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α -amylases. *Gene* 253:95-105.

- ✚ 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*). J. Crust. Biol. 34:189-198.
- ✚ Date K., Satoh A., Iidam K., Ogawa H. 2015. Pancreatic α -Amylase Controls Glucose Assimilation by Duodenal Retrieval through N-Glycan-specific Binding, Endocytosis, and Degradation. J. Biol. Chem. 290:17439-17450.
- ✚ de Gibert J.M., Muñiz F., Belaústegui Z., Hyžný M. 2013. Fossil and modern fiddler crabs (*Uca tangeri*: Ocypodidae) and their burrows from SW Spain: ichnologic and biogeographic implications. J. Crust. Biol. 33:537-551.
- ✚ de la Paz M., Gómez-Parra A., Forja J. 2008. Tidal-to-seasonal variability in the parameters of the carbonate system in a shallow tidal creek influenced by anthropogenic inputs, Rio San Pedro (SW Iberian Peninsula). Cont. Shelf. Res. 28:1394-1404.
- ✚ de Lima T.M., Geihs M.A., Nery L.E. M., Maciel F. E. 2015. Air exposure behavior of the semiterrestrial crab *Neohelice granulata* allows tolerance to severe hypoxia but not prevent oxidative damage due to hypoxia–reoxygenation cycle. Physiol. Behav. 151:97-101.
- ✚ De Witt T.J. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity: tests with predator-induced morphology and life history in a freshwater snail. J. Evol. Biol. 11:465-480.
- ✚ 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. 145:397-405.

- ✚ 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). *Comp. Biochem. Physiol.* 139:503-512.
- ✚ del Valle J.C., Panzeri A.M., López Mañanes A.A. 2012. Efecto de dopamina sobre las reservas de glucógeno en branquias y músculo del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*. XIV jornadas anuales de la sociedad argentina de biología. 2 al 4 de diciembre del 2012, ciudad autónoma de Buenos aires, Argentina.
- ✚ del Valle J.C., y López Mañanes A.A. 2008. Digestive strategies in the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 150:387-394.
- ✚ del Valle J.C., y López Mañanes A.A. 2011. Digestive flexibility in females of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* in their natural habitat. *J. Exp. Zool.* 315:41-148.
- ✚ del Valle J.C., y López Mañanes A.A. 2012. Fisiología integrativa y adaptativa de roedores subterráneos *Ctenomys talarum*: modelo de estudio de cambios plásticos frente a variaciones del ambiente y de demanda energética. LAP Lambert Academic Publishing GmbH&Co.KG (Ed). Editorial Académica Española, España, pp. 51.
- ✚ Delcroix M., Sajid M., Caffrey C.R., Lim K.C., Dvořák J., Hsieh I., McKerrow J.H. 2006. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J. Biol. Chem.* 281:39316-39329.

- ✚ Dendinger J.E., y O'Connor, K.L. 1990. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 95:525-530.
- ✚ Dhital S., Lin A.H.M., Hamaker B.R., Gidley M.J., Muniandy A. 2013. Mammalian mucosal α -glucosidases coordinate with α -amylase in the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis. *PloS one* 8:e62546. doi:10.1371/journal.pone.0062546.
- ✚ 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. Biochem. Molec. Biol.* 35:1005-1020.
- ✚ Diaz-Sotomayor M., Quezada-Calvillo R., Avery S.E., Chacko S.K., Yan L.K., Lin A. H.M., Ao Z.H., Hamaker B.R., Nichols B.L. 2013. Maltase-glucoamylase modulates gluconeogenesis and sucrase-isomaltase dominates starch digestion glucogenesis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 57:704-712.
- ✚ Diniz G.S., Barbarino E., Lourenço S.O. 2012. On the chemical profile of marine organisms from coastal subtropical environments: gross composition and nitrogen-to-protein conversion factors. En: M. Marcelli (Ed). *Oceanography*. InTech, Rijeka, pp. 297-320.
- ✚ Diniz G.S., Barbarino E., Oiano-Neto J., Pacheco S., Lourenço S.O. 2014. Proximate composition of marine invertebrates from tropical coastal waters, with emphasis on the relationship between nitrogen and protein contents/Composición proximal de invertebrados marinos de aguas costeras

- tropicales, con énfasis en la relación entre los contenidos de nitrógeno y proteína. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42:332.
- ✚ Dos Santos E.A., y Colares E.P. 1986. Blood glucose regulation in an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 83:673-675.
 - ✚ Drach P., y Tchernigovtzeff C. 1967. Sur le methode de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie. Milieu.* 18:595-607.
 - ✚ Duka A., y Ahearn G.A. 2014. Comparative cation dependency of sugar transport by crustacean hepatopancreas and intestine. *Biol. open* 3:635-643.
 - ✚ Dutra B.K., Zank C., Silva K.M.D., Conter M.R., Oliveira G.T. 2008. Seasonal variations in the intermediate metabolism of the crayfish *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) in the natural environment and experimental culture. *Iheringia Ser. Zool.* 98:355-361.
 - ✚ Dutta T.K., Jana M., Pahari P.R., Bhattacharya T. 2006. The Effect of temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodiaptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida). *Turk. J. Zool.* 30:187-195.
 - ✚ Elhalem L., y López Mañanes A.A. 2003. Branchial Na⁺-K⁺-ATPase activity of *Cyrtograpsus angulatus* at different salinities. Effect of serotonin. *Biocell* 27:242.
 - ✚ Elhalem L., y López Mañanes A.A. 2004. Na⁺, K⁺-ATPase and ionoregulation in *Cyrtograpsus angulatus* from Mar Chiquita coastal lagoon. *Biocell* 28:226.
 - ✚ Ezquerra J., García-Carreño F.L., Haard N.F. 1997. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Food Biochem.* 21:401-419.

- ✚ Fan L., Wang A., Miao Y., Liao S., Ye C., Lin Q. 2016. Comparative proteomic identification of the hepatopancreas response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 454:27-34.
- ✚ Fanjul E., Grela A., Canepuccia A., Iribarne O. 2008. The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 79:300-306.
- ✚ Ferrón S., Alonso Pérez F., Ortega T., Forja J.M. 2009. Benthic respiration on the on the northeastern shelf of the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 392: 69-80.
- ✚ Figueiredo M.S.R.B., y Anderson A.J. 2009. Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (Paleomonidae, Portunidae and Penaeidae) feeding in the natural habitat. *Aquac. Res.* 40:282-291.
- ✚ Galand G. 1989. Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 94:1-11.
- ✚ 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. *Biocell* 32:63.
- ✚ González-Gordillo J.I., Arias A.M., Rodríguez A., Drake P. 2003. Recruitment patterns of decapod crustacean megalopae in a shallow inlet (SW Spain) related to life history strategies. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 56:593-607.
- ✚ Grossi de Sa M.F., y Chrispeels M.J. 1997. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) alpha-amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:271-281.

- ✚ Halperin J., Ansaldo M., Pellerano G.N., Luquet C.M. 2000. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851—physiological and morphological studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 126:341-349.
- ✚ 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 8:131-140.
- ✚ Havird J.C., Mitchell R.T., Henry R.P., Santos S.R. 2016. Salinity-induced changes in gene expression from anterior and posterior gills of *Callinectes sapidus* (Crustacea: Portunidae) with implications for crustacean ecological genomics. *Comp. Biochem. Physiol.* 19:34-44.
- ✚ Hehemann J.H., Redecke L., Murugaiyan J., von Bergen M., Betzel C., Saborowski R. 2008. Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370:566-571.
- ✚ Henry R.P. 1994. Morphological, behavioral; and physiological characterization of bimodal breathing crustaceans. *Am. Zool.* 34:205-215.
- ✚ Henry R.P., Lucu C., Onken H., Weihrauch D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physiol.* 3:1-33.
- ✚ Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Rofidal V., Egea J.C., Rossignol M., et al. 2005. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics.* 5:4597-4607.
- ✚ Hochachka P.W., y Somero G.N. 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution.* Oxford Univ Press, Oxford, pp. 466.

- ✚ Hochachka, 2005. Adventures in Biochemical Adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* 67:25-37.
- ✚ Hsia C.C., Schmitz A., Lambertz M., Perry S.F., Maina J.N. 2013. Evolution of air breathing: oxygen homeostasis and the transitions from water to land and sky. *Comp. Physiol.* 3:849-915.
- ✚ Inohara E.T.S., Pinto C.B., Model J.F.A., Trapp M., Kucharski L.C., Da Silva R.S.M., Vinagre A.S. 2015. Serotonin effects in the crab *Neohelice granulata*: Possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 185:80-90.
- ✚ Iribarne O., Bortolus A., Botto F. 1997. Between-habitats differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 155:132-145.
- ✚ Iribarne O., Martinetto P., Schwindt E., Botto F., Bortolus A., Borboroglu P.G. 2003. Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 296:167-182.
- ✚ Jabalia N., Mishra P.C., Chaudhary N. 2014. Applications, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. *JANRM* 179-183.
- ✚ Jahan M.T., Tabassum M.K., Sylaja M. 2016. Lipid Profile in the Y-organ of Fresh Water Crab *Barytelphusa guerini*. *IJIR* 2:1352-1354.
- ✚ 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. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 334:1-9.

- ✚ Jain S., Seechurn S., Gupta P., Garg G., Dhamija B., Latha N., YVR K.S. 2015. Effects of Osmolytes on The Structural Stability of Bovine Trypsin: A Brief Review. *J. Pharm. Res.* 9:500-508.
- ✚ Janeček S. 1997. α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67:67-97.
- ✚ Janeček Š., Svensson B., MacGregor E.A. 2014. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.* 71:1149-1170.
- ✚ Janeček Š., y Svensson B. 2016. Amylolytic glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.* 73:2601-2602.
- ✚ Jiang K.J., Zhang F.Y., Zhang D., Tao Q.C., Zhang Y., Pi Y., Qiao Z., Ma L.B. 2011. Identification of a trypsin gene from *Scylla paramamosain* and its expression profiling during larval development. *African J. Agric. Res.* 6:6613-6621.
- ✚ Jimenez A.G., y Kinsey S.T. 2015. Energetics and metabolic regulation. En: Chang, E. y Thiel, M. (Eds). *The Natural History of the Crustacea*. Oxford University Press, Oxford, pp. 391-419.
- ✚ Johnson S., Ewart K., Osborne J., Delage D., Ross N., Murray H. 2002. Molecular cloning of trypsin cDNAs and trypsin gene expression in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasitol. Res.* 88:789-796.
- ✚ Johnston M.A., Elder H.Y., Davies P.S. 1973. Cytology of *Carcinus haemocytes* and their function in carbohydrate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 46:575-574.

- ✚ Karasov W.H., Martínez del Río C., Caviedes-Vidal E. 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annu. Rev. Physiol.* 73:69-93.
- ✚ Karasov W.H., y Douglas A.E. 2013. Comparative digestive physiology. *Compr. Physiol.* 271-283.
- ✚ Karn R.C., Shuldin J.D., Merrit A.D., Newell R.C. 1973. Evidence for post-transcriptional modification of human salivary (amy1) isozymes. *Biochem. Genet.* 10:341-350.
- ✚ Kelly S.A., Panhuis T.M., Stoehr A.M. 2012. Phenotypic plasticity: molecular mechanisms and adaptive significance. *Compr. Physiol.* 2:1417-1439.
- ✚ Klein B., Sellos D., Van Wormhoudt A. 1998. Genomic organization and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene* 216:123-129.
- ✚ Korc M., Owerbach D., Quinto C., Rutter W.J. 1981. Pancreatic islet-acinar cell interaction: amylase messenger RNA levels are determined by insulin. *Science* 213:351-353.
- ✚ Kucharski L.C., Schein V., Capp E., Da Silva R.S.M. 2002. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125:256-263.
- ✚ Kültz D. 2015. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *J. Exp. Boil.* 218:1907-1914.
- ✚ Kumari A., Singh K., Kayastha A.M. 2012. α -Amylase: General Properties, Mechanism and Biotechnological Applications-A Review. *Curr. Biotechnol.* 1:98-107.
- ✚ Kuriki T., e Imanaka T. 1999. The concept of α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* 87:557-65.

- ✚ Lagos M.E., Muñoz J.L., Contreras D.A., Cáceres C.W. 2011. Microhabitat segregation and physiological differences in two species of intertidal porcellanid crabs (Genus *Petrolisthes*) on the southern coast of Chile. *Sci. Mar.* 75:273-278.
- ✚ Lampidonis A.D., Rogdakis E., Voutsinas G.E., Stravopodis D.J. 2011. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene* 477:1-11.
- ✚ Lanaspá M.A., Sánchez-Lozada L.G., Cicerchi C., Li N., Roncal-Jiménez C.A., Ishimoto T., et al. 2012. Uric acid stimulates fructokinase and accelerates fructose metabolism in the development of fatty liver. *PloS one* 7: e47948. doi:10.1371/journal.pone.0047948
- ✚ Lancia J.P., Bas C., Spivak E. 2013. Food manipulation and selection in the omnivorous grapsoid crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Varunidae). *Sci. Mar.* 78:529-536.
- ✚ Larsen E.H., Deaton L.E., Onken H., O'Donnell M., Grosell M., Dantzler W.H., Weihrauch D. 2014. Osmoregulation and Excretion. *Compr Physiol.* 4:405-573.
- ✚ Le Moullac G., Klein B., Sellos D., Van Wormhoudt A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Expl. Mar. Biol. Ecol.* 208:107-125.
- ✚ Lemos D., Ezquerro J.M., García-Carreño F.L. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture* 186:89-105.
- ✚ Leone F.A., Garçon D.P., Lucena M.N., Faleiros R.O., Azevedo S.V., Pinto M.R., McNamara J.C. 2015. Gill-specific (Na^+ , K^+)-ATPase activity and α -subunit mRNA expression during low-salinity acclimation of the ornate blue

- crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* 86:59-67.
- ✚ 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 hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture* 274:80-86.
 - ✚ 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* 191:209-245.
 - ✚ Lignot J.H., y Charmantier G. 2015. Osmoregulation and excretion. En: Chang, E. y Thiel, M. (Eds). *The Natural History of the Crustacea*. Oxford University Press, Oxford, pp. 249-284.
 - ✚ Lin A.H.M., Ao Z., Quezada-Calvillo R., Nichols B.L., Lin C.T., Hamaker B.R. 2014. Branch pattern of starch internal structure influences the glucogenesis by mucosal Nt-maltase-glucoamylase. *Carbohydr. Polym.* 111:33-40.
 - ✚ Lin A.H.M., Hamaker B.R., Nichols B.L. Jr. 2012. Direct starch digestion by sucrase-isomaltase and maltase-glucoamylase. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 55:43-45.
 - ✚ Lin A.H.M., Lee B.H., Chang, W.J. 2016. Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocoll.* 53:163-171.
 - ✚ Livak K.J., y Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.

- ✚ Lombraña M., Suárez P., San Juan F. 2005. Two forms of α -amylase in mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*: Purification and molecular properties of form II. *Comp. Biochem. Physiol.* 142:56-66.
- ✚ López Mañanes A.A., Magnoni L.J., Goldemberg A.L. 2000. Branchial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 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*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 274:75-85.
- ✚ Lorenzon S. 2005. Hyperglycemic stress response in Crustacea. *ISJ* 2:132-141.
- ✚ Lorenzon S., Edomi P., Giulianini P.G., Mettulio R., Ferrero E.A. 2005. Role of biogenic amines and CHH in the crustacean hyperglycemic stress response. *J. Exp. Biol.* 208:3341-3347.
- ✚ Lorenzon S., Giulianini P.G., Martinis M., Ferrero E.A. 2007. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147:94-102.
- ✚ Lu Y., Wang F., Li L., Dong S. 2015. Responses of metabolism and haemolymph ions of swimming crab *Portunus trituberculatus* to thermal stresses: a comparative study between air and water. *Aquacult. Res.* 47:2989-3000.
- ✚ Lu Y., Zhang D., Wang F., Dong S. 2016. Hypothermal effects on survival, energy homeostasis and expression of energy-related genes of swimming crabs *Portunus trituberculatus* during air exposure. *J. Therm. Biol.* 60:33-40.

- ✚ Luppi T., Bas C., Méndez Casariego A., Albano M., Lancia J., Kittlein M., Rosenthal A., Farías N., Spivak E., Iribarne O. 2013. The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (=Chasmagnathus) *granulata*. Helgol. Mar. Res. 67:1-5.
- ✚ Luquet C.M., Cervino C.O., Ansaldo M., Pereyra V.C., Kocmur S., Dezi R.E. 1998. Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. Comp. Biochem. Physiol. 121:385-393.
- ✚ Luquet C.M., y Ansaldo M. 1997. Acid–base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. 117:407-410.
- ✚ Luvizotto-Santos R., Lee J.T., Branco Z.P., Bianchini A., Nery L.E.M. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (crustacean-grapsidae). J. Exp. Zool. 295:200-205.
- ✚ Maciel J.E.S., Souza F., Valle S., Kucharski L.C., da Silva R.S.M. 2008. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. Comp. Biochem. Physiol. 151:61-65.
- ✚ Markweg H., Lang M.S., Wagner F. 1995. Decanoic acid inhibition of lipase from *Acetivibrio* sp. OPA 55. Enz. Microb. Tech. 17:512-516.
- ✚ Martínez-Quintana J.A., Kikuta S., Felix-Portillo M., Peregrino-Uriarte A.B., Yepiz-Plascencia G., 2015. A novel functional glucose transporter in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* –LvGLUT2– is up-regulated during hypoxia in hepatopancreas. Mar. Environ. Res. 112: 61-67.

- ✚ Martínez-Quintana J.A., Peregrino-Uriarte A.B., Gollas-Galvan T., Gomez-Jimenez S., Yepiz-Plascencia G. 2014. The glucose transporter 1–GLUT1–from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia. *Mol. Biol. Rep.* 41:7885-7898.
- ✚ Martínez-Quintana J.A., Valenzuela-Soto E.M., Martínez-Téllez M.A., Peregrino-Uriarte A.B., Gómez-Jiménez S., Kikuta S., Yepiz-Plascencia G. 2016. Functionality of the white shrimp glucose transporter 1: Expression in *Xenopus* oocytes and gene silencing during hypoxia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 474:109-115.
- ✚ 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*. *Comp. Biochem. Physiol.* 158:400-405.
- ✚ Mayzaud O. 1985. The purification and kinetic properties of s-amylase from the copepod *Acartia claus* (giesbrecht, 1889). *Comp. Biochem. Physiol.* 82:725-730.
- ✚ McGaw I J. 2007. Gastric processing and evacuation during emersion in the red rock crab, *Cancer productus*. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 40:117-131.
- ✚ McGaw I.J., y Curtis D.L. 2013. The effect of meal size and body size on specific dynamic action and gastric processing in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 166:414-425.
- ✚ McNamara J.C., y Faria S.C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J. Comp. Physiol.* 182:997-1014.

- ✚ McWilliams S.R., y Karasov W.H. 2014. Spare capacity and phenotypic flexibility in the digestive system of a migratory bird: defining the limits of animal design. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 281:20140308.
- ✚ Mendez Casariego A., Luppi T., Iribarne O., Daleo P. 2011. Increase of organic matter transport between marshes and tidal Xats by the burrowing crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* Dana in SW Atlantic salt marshes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 401:110-117.
- ✚ Méndez E., López Mañanes A.A., Pinoni S.A. 2011. Lipase activity in the hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: short and long term postfeeding response. *Biocell* 35:142.
- ✚ Méndez E., López Mañanes A.A., Pinoni S.A. 2012. Proteolytic activity in hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: response to hyper-regulation and feeding. *Biocell* 36:32.
- ✚ Michiels M.S. 2010. Actividad de lipasa en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*: modulación en relación a estados fisiológicos diferenciales. Tesis de grado. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina.
- ✚ Michiels M.S. 2015. Ffisiología bioquímica digestiva de crustáceos decápodos: estudio integrativo sobre la actividad de enzimas digestivas en cangrejos eurihalinos. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina.
- ✚ 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). *Sci. Mar.* 77:129–136.

- ✚ Michiels M.S., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2015a. Biochemical characteristics and modulation by external and internal factors of aminopeptidase-N activity in the hepatopancreas of a euryhaline burrowing crab. *J. Comp. Physiol.* 185:501-510.
- ✚ Michiels M.S., del Valle J.C., López Mañanes A.A. 2015b. Lipase activity sensitive to dopamine, glucagon and cyclic AMP in the hepatopancreas of the euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). *Crustaceana* 88:51-65.
- ✚ Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- ✚ Mirtschink P., y Krek W. 2016. Hypoxia-driven glycolytic and fructolytic metabolic programs: Pivotal to hypertrophic heart disease. *BBA-Mol. Cell Res.* 1863:1822-1828.
- ✚ Mitchell R.T., y Henry R.P. 2014. Carbonic anhydrase induction in euryhaline crustaceans is rate-limited at the post-transcriptional level. *Comp. Biochem. Physiol.* 169:15-23.
- ✚ Mitra A., y Zaman S. 2016. Adaptation of Marine and Estuarine Organisms. *Basics of Marine and Estuarine Ecology*. Springer, India, pp. 303-330.
- ✚ Moon T.W. 1988. Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.* 66:1059-1068.
- ✚ Moriyasu M., y Mallet P. 1986. Molt stages of the snow crab *Chionoecetes opilio* by observation of morphogenesis of setae on the maxilla. *J. Crust. Biol.* 709-718.

- ✚ Mótyán J.A., 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*, 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. *J. Comp. Physiol.* 178:655-672.
- ✚ Mulukutla B.C., Yongky A., Le T., Mashek D.G., Hu W.S. 2016. Regulation of Glucose Metabolism—A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends in biotechnol.* 4:638-651.
- ✚ Muralisankar T., Bhavan P.S., Radhakrishnan S., Seenivasan C., Manickam N., Srinivasan V. 2014. Dietary supplementation of zinc nanoparticles and its influence on biology, physiology and immune responses of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Trace. Elem. Res.* 160:56-66.
- ✚ Murren C.J., Auld J.R., Callahan H., Ghalambor C.K., Handelsman C.A., Heskell M.A., Kingsolver J.G., Maclean H.J., Masel J., Maughan H., Pfennig D.W., Relyea R.A., Seiter S., Snell-Rood E., Steiner U.K., Schlichting C.D. 2015. Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity* 115:293-301.
- ✚ Nery L.E.M., y Santos E.A. 1993. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 106:747-753.

- ✚ Nikapitiya C., Kim W.S, Park K., Kwak I.S. 2014. Identification of potential markers and sensitive tissues for low or high salinity stress in an intertidal mud crab (*Macrophthalmus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol.* 41:407-416.
- ✚ Obi I.E., Sterling K.M., Ahearn G.A. 2011. Transepithelial D-glucose and D-fructose transport across the American lobster, *Homarus americanus*, intestine. *J. Exp. Biol.* 214:2337-2344.
- ✚ Obi I.E., Sterling K.M., Ahearn G.A. 2013. K⁺-dependent 3H-d-glucose transport by hepatopancreatic brush border membrane vesicles of a marine shrimp. *J. Comp. Physiol.* 183:61-69.
- ✚ Oliveira G.T., Eichler P., Rossi I.C.C., Da Silva R.S.M. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *J. Exp. Zool.* 301:240-248.
- ✚ Oliveira G.T., Fernandes F.A., Bond-Buckup G., Bueno A.A., Da Silva R.S.M. 2003. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglididae). *Mem. Mus. Vic.* 60:59-62.
- ✚ Oliveira G.T., Rossi I.C.C., Da Silva R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and pos-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.*139:335–342.
- ✚ Oliveira G.T., y Da Silva R.S.M. 1997. Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 118:1429-1435.
- ✚ Ong B.L., y Johnston D. 2006. Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *J. shellfish res.* 25:113-121.

- ✚ Page M.J., y Di Cera E. 2008. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65:1220-1236.
- ✚ Pan L., Liu H., Zhao Q. 2014. Effect of salinity on the biosynthesis of amines in *Litopenaeus vannamei* and the expression of gill related ion transporter genes. *J. Ocean U. China* 13:453-459.
- ✚ Pavasovic A., Anderson A.J., Mather P.B., Richardson N.A. 2007. Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Res.* 38:644-652.
- ✚ Pavasovic M., Richardson N.A., Anderson A.J., Mann D., Mather P.B. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture* 242:641-654.
- ✚ Peng T., Wang D., Yu Y., Liu C., Zhu B. 2015. Identification and expression of an ecdysteroid-responsive amylase from red crayfish *Procambarus clarkii*. *Fisheries Sci.* 81:345-352.
- ✚ Penney C.M., Patton R.L., Whiteley N.M., Driedzic W.R., McGaw I.J. 2016. Physiological responses to digestion in low salinity in the crabs *Carcinus maenas* and *Cancer irroratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 191:127-139.
- ✚ Perera E., Moyano F.J., Díaz M., Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Alonso E., Carrillo O., Galich G.S. 2008a. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 150:247-254.
- ✚ Perera E., Moyano F.J., Díaz M., Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Rodríguez-Viera L., Alonso E., Carrillo O., Galich G.S. 2008b. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 151:250-256.

- ✚ Perera E., Moyano F.J., Rodríguez-Viera L., Cervantes A., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M. 2010b. In vitro digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. *Aquaculture* 310:178-185.
- ✚ Perera E., Pons T., Hernández D., Moyano F.J., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M. 2010a. New members of the brachyurins family in lobster include a trypsin-like enzyme with amino acid substitutions in the substrate-binding pocket. *FEBS J.* 277:3489-501.
- ✚ Perera E., Rodríguez-Casariago J., Rodríguez-Viera L., Calero J., Perdomo-Morales R., Mancera J.M. 2012a. Lobster (*Panulirus argus*) hepatopancreatic trypsin isoforms and their digestion efficiency. *Biol. Bull.* 222:158-170.
- ✚ Perera E., Rodríguez-Viera L., Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Moyano F.J., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M. 2015. Trypsin isozymes in the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): from molecules to physiology. *J. Comp. Physiol.* 185:17-35.
- ✚ Perera E., Rodríguez-Viera L., Rodríguez-Casariago J., Fraga I., Carrillo O., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M. 2012b. Dietary protein quality differentially regulates trypsin enzymes at the secretion and transcription levels in the lobster (*Panulirus argus*) by distinct signaling pathways. *J. Exp. Biol.* 215:853-862.
- ✚ Petersen Y.M., Elnif J., Schmidt M., Sangild P.T. 2002. Glucagon-like peptide 2 enhances maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase gene expression and activity in parenterally fed premature neonatal piglets. *Pediatr. Res.* 52:98-503.

- ✚ 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. Ecol. Evol.* 25:459-467.
- ✚ Piersma T., y Drent J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends. Ecol. Evol.* 18:228-233.
- ✚ Piersma T., y van Gils J. 2011. *The Flexible Phenotype: A BodyCentered Integration of Ecology, Physiology and Behaviour.* Oxford University Press, Oxford, pp. 248.
- ✚ Pinoni S.A. 2009. Mecanismos de mantenimiento del medio interno en respuesta a estrés ambiental en crustáceos decápodos de interés regional. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina.
- ✚ 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. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 326:217-226.
- ✚ Pinoni S.A., Iribarne O., López Mañanes A.A. 2011. Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 158:552-559.
- ✚ Pinoni S.A., Jerez Cepa I., Mancera J.M., López Mañanes A.A. 2015b. Respuestas bioquímico-fisiológicas a baja y alta salinidad en cangrejos eurihalinos: patrón osmorregulatorio y ajustes metabólicos en machos y hembras de *Uca Tangeri*. X Encuentro Biólogos En Red, 16 y 17 de Noviembre del 2015, Mar del Plata Argentina.

- ✚ Pinoni S.A., Méndez E., López Mañanes A.A. 2015a. Digestive flexibility in a euryhaline crab from a SW Atlantic coastal lagoon: alkaline phosphatase activity sensitive to salinity in the hepatopáncreas. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 95:1133-1140.
- ✚ Pinoni S.A., Michiels M.S., López Mañanes A.A. 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. *Mar. Biol.* 160:2647-2661.
- ✚ Pinoni S.A., y López Mañanes A.A. 2004. Alkaline phosphatase activity sensitive to environmental salinity and dopamine in muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 307:35-46.
- ✚ Pinoni S.A., y López Mañanes A.A. 2008a. Partial characterization and response under hyperregulating conditions of Na⁺/K⁺-ATPase and levamisole-sensitive alkaline phosphatase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Sci. Mar.* 72:15-24.
- ✚ Pinoni S.A., y López Mañanes A.A. 2008b. ATPase activities in muscle of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus* from Mar Chiquita coastal lagoon: differential response to emersion. *Biocell* 32:133.
- ✚ Pinoni S.A., y 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.
- ✚ Quiroga A.D., y Lehner R. 2012. Liver triacylglycerol lipases. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 1821:762-769.

- ✚ Rawlings N.D. 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In Proteases: Structure and Function. En: Brix, K. y Stöcker, W (Eds). Proteases: structure and function. Springer, Vienna, pp. 1-36.
- ✚ 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*. Aquacul. Res. 47:1251–1259.
- ✚ Rivera-Perez C. 2015. Marine invertebrate lipases: Comparative and functional genomic analysis. Comp. Biochem. Physiol. 15:39-48.
- ✚ Rivera-Perez C., del Toro M., García-Carreño F. 2011a. Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 158:99-105.
- ✚ Rivera-Perez C., Garcia-Carreño F.L., Saborowski R. 2011b. Purification and biochemical characterization of digestive lipase from whiteleg shrimp. Mar. Biotechnol. 13:284-295.
- ✚ Rivera-Perez C., y García-Carreño F. 2011. Effect of fasting on digestive gland lipase transcripts expression in *Penaeus vannamei*. Mar. Genomics 4:273-278.
- ✚ Robertson R.F., Meagor J., Taylor E.W. 2001. Specific dynamic action in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), in relation to acclimation temperature and to the onset of the emersion response. Physiol. Biochem. Zool. 75:350-359.
- ✚ Rodríguez-Tovar F.J., Mayoral E., Santos A. 2014. Influence of physicochemical parameters on burrowing activities of the fiddler crab *Uca tangeri* at the Huelva Coast (Southwest Spain): palaeoichnological implications. Ichnos. 21:147-157.
- ✚ Rodríguez-Viera L., Perera E., Martos-Sitcha J.A., Perdomo-Morales R., Casuso A., Montero-Alejo V., et al. 2016. Molecular, Biochemical, and Dietary

- Regulation Features of α -Amylase in a Carnivorous Crustacean, the Spiny Lobster *Panulirus argus*. PLoS ONE 11(7): e0158919. doi:10.1371/journal.pone.0158919
- ✚ Romano N., y 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.
 - ✚ Rosenberg M.S. 2001. The systematics and taxonomy of fiddler crabs: a phylogeny of the genus *Uca*. *J. Crust. Biol.* 21:839-869.
 - ✚ Rudenskaya G.N., Kislitsin Y.A., Rebrikov D.V. 2004. Collagenolytic serine protease PC and trypsin PC from king crab *Paralithodes camtschaticus*: cDNA cloning and primary structure of the enzymes. *BMC Struct. Biol.* 4:2-10.
 - ✚ Sabat P., Novoa F., Bozinovic F., Martinez del Rio C. 1998. Dietary Flexibility and Intestinal Plasticity in Birds: A Field and Laboratory Study. *Physiol. Biochem. Zool.* 71:226-236.
 - ✚ Saborowski R. 2015. Nutrition and digestion. En: Chang E. y Thiel M. (Eds). *The Natural History of Crustacea, Physiology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 285-319.
 - ✚ Sacristán H.J., Ansaldo M., Franco-Tadic L.M., Gimenez A.V.F., López Greco L.S. 2016. Long-Term Starvation and Posterior Feeding Effects on Biochemical and Physiological Responses of Midgut Gland of *Cherax quadricarinatus* Juveniles (Parastacidae). *PloSone* 11(3): e0150854. doi:10.1371/journal.pone.0150854
 - ✚ Sacristán H.J., Fernández-Giménez, A.V., Chaulet A., Tadic F., Marcelo L., Fenucci J., López Greco L.S. 2015. Effect of different diets on digestive enzyme

- activities, in vitro digestibility, and midgut gland structure in juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Acta Zoologica*. doi: 10.1111/azo.12134.
- ✚ Sacristán H.J., Nolasco-Soria H., Greco, L.S.L. 2014. Effect of attractant stimuli, starvation period and food availability on digestive enzymes in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). *Aquatic. Biol.* 23:87-99.
 - ✚ Sainz J.C., García-Carreño F., Hernández-Cortés P. 2004. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 138:155-162.
 - ✚ Samyappan K., Saravanan R., Vijayakanth T., Prabakaran D. 2015. Impact of unilateral eyestalk ablation on lipid profiles in freshwater female crab *Oziotelphusa senex senex*. *AJST* 6:1474-1478.
 - ✚ Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Hernandez-Lopez 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*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 340:184-193.
 - ✚ Sánchez-Paz A., García-Carreño F.L., Muhlia-Almazán A., Peregrino-Uriarte A.B., Hernandez-Lopez J.Y., Yepiz-Plascencia G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 36:241-249.
 - ✚ Santos E.A., Baldisseroto B., Bianchini A., Colares E.P., Nery L.E.M., Manzoni G.C., 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 88:21-25.
 - ✚ Santos E.A., Baldisseroto B., Blanchini A., Colares E.P., Nery L.E., Manzoni G.C. 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal

- crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 88:21-25.
- ✚ Santos E.A., y Keller R. 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 106:343-347.
 - ✚ Sawant R., y Nagendran S. 2014. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 3:568-579.
 - ✚ Saxena P., y Murthy R.C. 1982. Hepatopancreatic sucrase of *Macrobrachium amarrei* (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)*. 91:33-38.
 - ✚ Schleich C.E., Goldemberg A.L., López Mañanes A.A. 2001. Salinity dependent Na⁺/K⁺-ATPase activity in gills of euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Gene Physiol. Biophys.* 20:255-256.
 - ✚ Schmitt A.C., y Santos E.A. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:329-336.
 - ✚ Schwarzenberger A., Zitt A., Kroth P., Mueller S., Von Elert E. 2010. Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. *BMC Physiol.* 10: 6-20.
 - ✚ Shi X., Ren Q., Zhao X., Wang J. 2009. Expression of four trypsin-like serine proteases from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, as regulated by pathogenic infection. *Comp. Biochem. Physiol.* 153:54-60.
 - ✚ Simonik E., y Henry R.P. 2014. Physiological responses to emersion in the intertidal green crab, *Carcinus maenas* (L.). *Mar. Freshwater Res.* 47:101-115.

- ✚ Simsek M., Quezada-Calvillo R., Ferruzzi M.G., Nichols B.L., Hamaker B.R. 2015. Dietary phenolic compounds selectively inhibit the individual subunits of maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase with the potential of modulating glucose release. *J. Agric. Food Chem.* 63:3873-3879.
- ✚ Singh K., y Kayastha A.M. 2014. α -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. *Food Chem.* 162:1-9.
- ✚ Spivak E. 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Invest. Mar. Valparaíso* 25:105-12.
- ✚ Spivak E. 2010. The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgol. Mar. Res.* 64:149-154.
- ✚ 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.D., y Cuesta J.A. 2009. The effect of salinity on larval development of *Uca tangeri* (Eydoux, 1835) (Brachyura: Ocypodidae) and new findings of the zoeal morphology. *Sci. Mar.* 73:297-305.
- ✚ Starck J.M., y Wang T. 2005. Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates. Enfield, NH: Science Publishers, Inc., Enfield, pp. 425.
- ✚ Sterling K.M., Cheeseman C.I., Ahearn G.A. 2009. Identification of a novel sodium-dependent fructose transport activity in the hepatopancreas of the Atlantic lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 212:1912-1920.
- ✚ Storey K.B. 2004. Biochemical adaptation. En: Storey, K.B. (Ed). *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Wiley-Iiss, Inc., Hoboken, New Jersey, pp.383-413.

- ✚ Strobl S., Maskos K., Betz M., Wiegand G., Huber R., Gomis-Ruth F.X., Glockshuber R. 1998. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 resolution. *J. Mol. Biol.* 278:617-628.
- ✚ Takashima S., y Amano J. 2012. Glycosylation and secretion of human α -amylases. *ABC.* 2:10–19.
- ✚ Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- ✚ Tantikitti C., Chookird D., Phongdara A. 2016. Effects of fishmeal quality on growth performance, protein digestibility and trypsin gene expression in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SJST* 38:73-82.
- ✚ Tiwari S.P., Srivastava R., Singh C.S., Shukla K., Singh R.K., Singh P., Singh R., Singh N.L., Sharma R. 2015. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J. Global Biosc.* 4:1886-1901.
- ✚ Tsiatsiani L., y Heck A.J. 2015. Proteomics beyond trypsin. *FEBS journal* 282:2612-2626.
- ✚ Tsuji A., Nishiyama N., Ohshima M., Maniwa S., Kuwamura S., Shiraishi M., Yuasa K. 2014. Comprehensive enzymatic analysis of the amylolytic system in the digestive fluid of the sea hare, *Aplysia kurodai*: Unique properties of two α -amylases and two α -glucosidases. *FEBS open bio.* 4:560-570.
- ✚ Valle S.C., Eichler P., Maciel J.E., Machado G., Kucharski L.C., Da Silva R.S.M. 2009. Seasonal variation in glucose and neutral amino acid uptake in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 153:252-257.

- ✚ Van Horn J., y Tolley S.G. 2009. Acute response of the estuarine crab *Eurypanopeus depressus* to salinity and desiccation stress. *J. Crust. Biol.* 29:556-561.
- ✚ Van Weel P.B. 1960. On the secretion of digestive enzymes by the marine crab, *Halamita Crenata*. *J. Comp. Physiol.* 43:567-577.
- ✚ Van Wormhoudt A., Bourreau G., Le Moullac G. 1995. Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda: Electrophoretic and immunological studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 23:139-149.
- ✚ Van Wormhoudt A., y Sellos D. 1996. Cloning and sequencing analysis of three amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea decapoda): evolutionary aspects. *J. Mol. Evol.* 42:543-551.
- ✚ Van Wormhoudt A., y Sellos D. 2003. Highly variable polymorphism of the α -amylase gene family in *Litopenaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Mol. Evol.* 57:659-671.
- ✚ Vandermarliere E., Michael M., Lennart M. 2013. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 32:453-465.
- ✚ Verma S., Dixit R., Pandey K.C. 2016. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front. Pharmacol.* 7:107. doi: 10.3389/fphar.2016.00107
- ✚ Verri T., Mandal A., Zilli L., Bossa D., Mandal P.K., Ingrosso L., Zonno V., Viella S., Ahearn G.A., Storelli C. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 130:585–606.
- ✚ Vinagre A.S., Amaral A.P.N., Ribarcki F.P., Silveira E.F., Périco E. 2007. Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comp. Biochem. Physiol.* 146:514-519.

- ✚ Vinagre A.S., y Chung J.S. 2016. Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). *Mar. Biol.* 163:1-11.
- ✚ Vinagre A.S., y Da Silva R.S.M. 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 102:579-583.
- ✚ Vinagre A.S., y Da Silva R.S.M. 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Can. J. Zool.* 80:1413-1421.
- ✚ 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. *Sci. Mar.* 77:323-329.
- ✚ 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): e84921. doi:10.1371/ journal.pone.0084921
- ✚ Wang X., Li E., Chen L. 2016a. A Review of Carbohydrate Nutrition and Metabolism in Crustaceans. *N. Am. J. Aquac.* 78:178-187.
- ✚ Wang X.D., Li E.C., Chen K., Wang S.F., Li T.Y., Xu Yu C.N., Qin J.G., Chen L.Q. 2016b. Response of facilitative glucose transporter 1 to salinity stress and dietary carbohydrate nutrition in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nut.* doi: 10.1111/anu.12364.

- ✚ Whitman D.A., y Agrawal A.A. 2009. What is Phenotypic Plasticity and why is it Important. En: Whitman, D.W. y Ananthkrishna, T.N. (Eds). Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences. Science Publishers, Inc: Enfield, N.H., pp 1-63
- ✚ Wilson-O'Brien A.L., Patron N., Rogers S. 2010. Evolutionary ancestry and novel functions of the mammalian glucose transporter (GLUT) family. BMC Evol. Biol. 10:152.
- ✚ Wright P.A., y Turko A.J. 2016. Amphibious fishes: evolution and phenotypic plasticity. J. Exp. Biol. 219: 2245-2259.
- ✚ Wu H., Xuan R., Li Y., Zhang X., Jing W., Wang L. 2014. Biochemical, histological and ultrastructural alterations of the alimentary system in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* subchronically exposed to cadmium. Ecotoxicology 23:65-75.
- ✚ Xie F., Quana S., Liua D., Maa H., Li F., Zhoub F., Chenb G. 2014. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. Process Biochem. 49:47-53.
- ✚ Zaia D.A.M., Zaia C.T.B.V., Lichtin J. 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Quim. Nova. 21:787-793.
- ✚ Zakowski J.J., y Bruns D.E. 1985. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 21:283-322.
- ✚ Zechner R., Zimmermann R., Eichmann T.O., Kohlwein S.D., Haemmerle G., Lass A., Madeo F. 2012. Fat signals-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. Cell metab. 15:279-291.

- ✚ Zeng H., Ye H., Li S., Wang G., Huang J. 2010. Hepatopancreas cell cultures from mud crab, *Scylla paramamosain*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 46:431-437.
- ✚ Zhang J.Y., Zhao X.Y., Wen J., Tan S., Zhao Z.J. 2016. Plasticity in gastrointestinal morphology and enzyme activity in lactating striped hamsters (*Cricetulus barabensis*). J. Exp. Biol. 219:1327-1336.
- ✚ Zhao F.Q., y Keating A.F. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. Curr. Genomics 8:113-128.