

## Tesis Doctoral

# Efectos de metales pesados sobre la síntesis y secreción hormonal en el cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulatus*, DANA 1851 (Decapoda, Varunidae)

Medesani, Daniel Alberto

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Medesani, Daniel Alberto. (2004). Efectos de metales pesados sobre la síntesis y secreción hormonal en el cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulatus*, DANA 1851 (Decapoda, Varunidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3703\\_Medesani](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3703_Medesani)

**Cita tipo Chicago:**

Medesani, Daniel Alberto. "Efectos de metales pesados sobre la síntesis y secreción hormonal en el cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulatus*, DANA 1851 (Decapoda, Varunidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3703\\_Medesani](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3703_Medesani)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

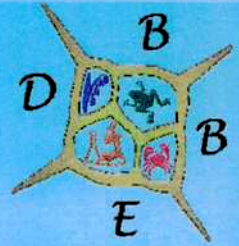


**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Argentina**



**Trabajo de Tesis presentado para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**Efectos de Metales Pesados sobre la Síntesis y  
Secreción Hormonal en el cangrejo de estuario  
*Chasmagnathus granulatus*, DANA 1851  
(Decapoda, Varunidae)**

**Autor: Lic. Daniel Alberto Medesani**

**Director: Dr. Enrique M. Rodríguez**

№3703

**Laboratorio de Fisiología Animal Comparada,  
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental**

**2004**



## RESUMEN

En este trabajo se evaluó en el cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulatus* el posible efecto de los metales pesados cadmio y cobre, a concentraciones subletales, sobre el control hormonal de la glucemia y de la reproducción.

La exposición crónica de cangrejos intactos a ambos metales, provocó un severo y significativo descenso de la glucemia. Se observó una típica relación dosis-respuesta al exponer estos animales a diferentes concentraciones de cadmio y cobre, con una mayor sensibilidad a este último metal. El bajo nivel de glucosa detectado en los animales intactos expuestos, fue similar al registrado en animales ablacionados de sus pedúnculos oculares, lo cual está indicando un posible efecto inhibitorio de ambos metales sobre la secreción y/o síntesis de la hormona hiperglucemiante, CHH, que se produce y secreta en tales pedúnculos. La ausencia de diferencias entre los animales ablacionados controles (sin metal) y ablacionados expuestos a cada metal, está indicando por otra parte que no existe un efecto directo de los tóxicos sobre el nivel basal de glucosa (no regulado por CHH peduncular). Cuando el extracto de pedúnculo ocular de cangrejos previamente expuestos a cadmio o cobre se inyectó en animales intactos, provocó un incremento significativo de la glucemia similar al que provocó la inyección de extractos de animales controles, indicando que no existe un efecto de los tóxicos sobre el contenido de CHH en los pedúnculos oculares, lo que sugiere a su vez que la síntesis hormonal no se veía afectada. Por otra parte, la inyección de CHH purificada de *Cancer pagurus*, sobre animales intactos expuestos crónicamente a los tóxicos, provocó la reversión del efecto hipoglucémico causado por los metales. Los animales expuestos a cadmio alcanzaron un nivel de glucemia elevado y similar al registrado en cangrejos inyectados con CHH pero no expuestos, demostrando que éste metal no interfiere con la interacción hormona-receptor y/o la transducción de la señal hormonal en los tejidos blanco. Los animales expuestos a cobre incrementaron también la glucemia pero alcanzando un nivel similar al medido en cangrejos no expuestos inyectados con solución salina, lo cual indica que el cobre afectaría en alguna medida la interacción hormona-receptor, y/o algún paso en la transducción de la señal hormonal máxima. En consecuencia, los resultados obtenidos en esta primera parte de la Tesis apoyan la Hipótesis de que la hipoglucemia observada en animales intactos por exposición a los metales estudiados, se debe a una inhibición que esos metales ejercen sobre la secreción de CHH por parte del centro neuroendocrino ubicado en los pedúnculos oculares, sumado, para el caso de cobre en particular, a una interferencia con los efectos hormonales a nivel de órganos blanco.

Con respecto a los ensayos sobre el control de la reproducción, se realizaron ensayos *in vivo* (14 días) e *in vitro* (24 horas), con hembras adultas de *C. granulatus*. En los ensayos *in vivo*, no se observaron cambios significativos en el índice gonadosomático (IG) de hembras intactas de sus pedúnculos oculares expuestas a cadmio o cobre, mientras que ambos metales provocaron un descenso significativo en el IG de los cangrejos ablacionados. En función de estos resultados, pusimos a prueba la Hipótesis de que esos metales estén interfiriendo con la vía estimuladora extrapeduncular del crecimiento gonadal. Para esto, se realizaron ensayos *in vitro* coincubando ovario con ganglio torácico, fuente de la hormona estimuladora gonadal; como resultado, no se detectaron diferencias entre los grupos control y expuestos a los metales pesados. Sin embargo, cuando el ovario fue incubado con metil farnesoato o 17-hidroxiprogesterona, ambas hormonas estimuladoras del crecimiento gonadal, la incorporación de leucina tritiada fue significativamente menor en los grupos expuestos, corroborando la Hipótesis planteada en términos de una interferencia de cadmio y cobre con los mecanismos de transducción de tales hormonas estimuladoras a nivel gonadal. Por otro lado, ovarios coincubados con tejido peduncular y expuestos a ambos metales pesados, mostraron una incorporación de leucina tritiada significativamente mayor que en los controles (ovario y pedúnculos, pero sin metales en el medio de incubación), sugiriendo un efecto inhibitorio de los tóxicos ensayados sobre la secreción de la hormona inhibidora gonadal (GIH) desde los pedúnculos oculares. La interferencia de cadmio y cobre con los mecanismos de transducción de GIH a nivel ovárico fue descartada como hipótesis alternativa, ya que el agregado de extracto de pedúnculo ocular al medio de incubación fue capaz de revertir por completo el efecto causado por cada tóxico. Por último, el conjunto de resultados obtenidos *in vitro* con ambos metales, i.e., interferencia con el efecto de hormonas estimuladoras (metil farnesoato y 17-hidroxiprogesterona) e inhibición de la secreción de la hormona inhibidora GIH, permiten explicar el similar crecimiento gonadal observado en animales intactos, entre controles y expuestos a los metales.

**Palabras clave:** cadmio, cobre, disruptores endocrinos, hormonas, glucemia, CHH, reproducción, GIH, cangrejos.

## ABSTRACT

The present study was aimed at studying the effect of chronic exposure to cadmium and copper on hormonal control of CHH-mediated glycemia and of reproduction in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus*.

For both heavy metals assayed, the exposed male intact crabs showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of glycemia, as compared to the intact crabs in clean water. The clear hypoglycemia produced by both cadmium and copper was in fact verified in intact crabs exposed to a wider concentration range. A typical dose-response relationship was observed for both heavy metals; crabs showed a higher sensitivity to copper than to cadmium, according to the concentrations that produced a significant drop of glycemia, with respect to the control. This response was consistent with the lower acute LC50 value for copper than for cadmium, although the difference in the chronic toxicity on glycemia between both heavy metals (a factor of  $\pm 2$ ) was not as high as the difference in lethal acute toxicity (a factor of 5). A slow glucose level in exposed intact crabs is similar to that of the control and heavy metals-exposed eyestalkless crabs. Since no differences ( $p > 0.05$ ) were detected in any case between control and heavy metals-exposed eyestalkless crabs, no direct effect of the assayed pollutants on basal glycemia levels (not regulated by CHH) seems to have occurred. The very significant differences ( $p < 0.01$ ) detected between the group injected with saline solution and the group injected with eyestalk extract from crabs in clean water, clearly show the high hyperglycemic effects of the CHH normally present in the sinus glands of the control animals. The group injected with eyestalk extract from crabs previously exposed to cadmium or copper showed the same level of glycemia as that of the respective groups, indicating that no apparent effect of either cadmium or copper in the content of CHH in the eyestalks seems to have occurred. Although, the hypoglycemia produced by both metals was probably due to inhibition of CHH secretion, any consequent accumulation of this hormone in the sinus gland was not apparent, perhaps there was a compensatory decreased rate of CHH synthesis in the exposed crabs. The regulatory mechanisms of CHH turnover in the neurons that synthesize CHH could also be maintaining a steady state of CHH availability, i.e., reducing synthesis when secretion of the hormone decreases; however, the possibility of some interaction of cadmium or copper with CHH receptors in several tissues should not be discarded for explaining the hypoglycemic responses.

We analyzed the effect of different injected doses of purified CHH of *Cancer pagurus*, onto heavy metals-exposed intact crabs. The injection produced a reversion in the hypoglycemic effect generated when it was previously exposed to the heavy metals. This effect was dose independent. In the cadmium-exposed crabs, a similar glucose level to that of the control crabs also injected with CHH was attained, demonstrating that this heavy metal is not interfering with hormonal reception and/or transduction in the target tissues. In the case of the copper-exposed crabs, the increase of glycemia after CHH injection was less than in the control crabs injected with CHH, suggesting that some interference with hormonal transduction or with the enzymes involved in glucose mobilization could have occurred to some extent.

The effects of cadmium and copper on the hormonal control of ovarian growth were evaluated on the same species, by means of both *in vivo* (14 days exposure) and *in vitro* (24 h) assays. No significant ( $p > 0.05$ ) change of the gonadosomatic index was observed in the *in vivo* assays with intact females exposed to HM, while eyestalk-ablated exposed females showed significantly ( $p < 0.05$ ) lower GSI values than their respective controls. This latter result led us to consider the possibility that the HM interfered with extra-eyestalk hormones. In this sense, no differences were noted between control and HM exposed groups after co-incubating ovary with thoracic ganglion (the source of the gonad stimulating hormone). However, when ovary was incubated with methyl farnesoate or 17-hydroxyprogesterone,  $^3\text{H}$ -leucine incorporation was significantly lower in the HM-exposed groups than in the controls, indicating a possible interference of cadmium and copper with the transduction pathway of those hormones. On the other hand, ovaries co-incubated *in vitro* with eyestalk tissue (ET) and exposed to either HM, showed significantly higher  $^3\text{H}$ -leucine incorporation than did the controls, suggesting an inhibitory effect of the HM on the secretion of the gonad inhibiting hormone (GIH) from the ET. Interference by copper and cadmium with the transduction mechanisms of GIH at the ovarian level does not appear to be a viable hypothesis, because the addition of eyestalk extracts to the incubation medium reversed the effect caused by each HM.

**Key words:** cadmium, copper, endocrine disrupters, hormones, glycemia, CHH, GIH, reproduction, crabs



## **DEDICATORIA ESPECIAL**

*Esta etapa que concluye, comenzó hace algo mas de cinco años.  
Y en ese mismo lapso de tiempo he vivido los momentos mas importantes de mi vida;  
y los he transitado a su lado, conviviendo cada instante y cada paso,  
compartiendo alegrías así como pasajes complicados.  
Y siempre cerca mío, logrando ocupar cada rincón y cada segundo.  
Sin su presencia, hoy muchas cosas no sería:  
ni hombre, ni amigo, ni compañero, pero sobre todo,  
sin ella no hubiera obtenido las dos (por ahora) más bellas estrellas,  
que iluminan nuestro propio cielo.*

**A MI MUJER (Y A MIS DOS LOCOS BAJITOS)**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y especialmente a "Enrique", quien pasados doce años sigue brindándome la posibilidad de crecer en lo profesional; y además, por toda la confianza que deposita en mi, y por esta relación no solo de trabajo sino también de amistad, que se fue afianzando año tras año.

En segunda instancia, a Lauri (o Lolo para unos pocos), con quien he compartido largas jornadas de ensayos in vitro (mucho CHACA – CHACA); y porque espero poder seguir teniéndola cerca, básicamente por que admiro su facilidad y claridad para transmitir conocimientos, porque la respeto y quiero, y además porque me considera su hermano de la ciencia, y eso me llena de satisfacción.

Luego, siguiendo con este punteado individual, a otra vieja compañera de trabajo que poco a poco, RJA tras RJA, se fue convirtiendo en una muy buena amiga. También a vos Pauli, algo lejos ahora pero con todo lo compartido junto a vos muy marcado, recordado y bien guardado.

A todos los compañeros de trabajo del laboratorio 101, que vienen detrás, remando duro. A Vicky, Ale, Vero, Marianito, Anouk, Javier, Fernanda, por lo cotidiano, por tantas mateadas y festejos, pero principalmente por el excelente ambiente laboral que logramos entre todos, acá dá gusto trabajar. También a todos aquellos que por relaciones sentimentales con los arriba nombrados, se han sumado (no pudimos evitarlo) a este maravilloso grupo, y vale la pena nombrarlos: Rulo, Marce y Pablo; y a los que pasaron y dejaron un gratisimo recuerdo: Mariela, Eugenia, Natalia, Jimena.

A los viejos y nuevos muy amigos, amigos, conocidos y vecinos de laboratorio. Ellos son los que me permiten decir que disfruto venir todos los días a la facultad. Y para nombrar a algunos, solamente, por que sino la lista sería (para mi satisfacción) muy extensa, empiezo por el COLO, con quien estos últimos años he tenido una relación mas estrecha. Hemos transpirado juntos varias jornadas, llevando de acá para allá microscopios y lupas, y tratando de resolver dentro de lo posible todo lo que el plantel docente reclamaba (ardua la tarea técnica desempeñada). A Carlitos Luquet y Javier Calcagno, antes excelentes docentes, y hoy grandes amigos y referentes, dos tipasos de aquellos. A Griselda, Martin Ansaldo, Nico; a los miembros del laboratorio de Fisiología de Insectos, Gabo, Ali, Sebas, Romi, Marce; a Walter y su equipo del Campo



*Efectos de metales pesados sobre la síntesis y secreción hormonal... .. Medesani, D.A.*

*Experimental; a los integrantes del Laboratorio de Fisiología del Comportamiento; del laboratorio de Histología, quisiera nombrar a Luisa, Gladysita, el Chango, y del laboratorio de Embriología a Dante, Fabi, Andrea, Paula; a todas las chicas de Limno, y a muchos mas.....*

*A dos profesores de la carrera, el Dr. Claudio Lázzari y la Dra. Nora Ceballos, por su excelencia docente, por su capacidad, y por la calidad personal.*

*A la Universidad de Buenos Aires, por la educación gratuita recibida y por la formación obtenida; y al CONICET por la beca de Formación de Posgrado otorgada.*

*A los Jurados aquí presentes, por la evaluación de este trabajo.*

*A los que continuamente te sacan de apuros administrativos, Claudio, Silvina, Graciélita y Mabel.*

*A mis compañeros y amigos de papi-fútbol y fútbol-once, con quienes he pasado momentos deportivos gloriosos, siempre transpirando la camiseta; entre ellos, Diego, el Mencho, Macaya, Walter, Facu, Sergio, Mariano, Viruta, Fer, José, Capo, y tantos otros.....*

*A los viejos compañeros de facultad que siguieron su carrera profesional en el exterior, pero con quienes, por suerte, se mantiene el gran afecto y la amistad conseguida: Marcelo y La Tana (Italia), Ele (Alemania), Daniela y Fernando (Brasil y Suecia), Fer Unrein (España), Ceci y Fabi (USA), Vale y Paulo (USA); y por lo mismo, a los que aún la están peleando acá: Laura y Pablo (Coghlan), Marito y Mariana (Villa Pueyrredón), Vitu y Roberto (Recoleta), Luiger (Belgrano), Nino (Ramos Mejía).*

*A todos los compañeros docentes de Fisiología Animal Comparada, y a los alumnos que la han cursado en estos últimos tres años, por transformar mi desinterés por la docencia y permitirme descubrir otra cara, otro mundo dentro de un aula o un laboratorio de trabajos prácticos.*

*Y desde un rincón muy interno:*

*A mis Padres, por su amor y su apoyo, por su sencillez. Por la VIDA.*

*A mis tres hermosas e incondicionales Hermanas, siempre dispuestas, siempre presentes.*

*A mi Abuelita querida, INA, por Estar, por preocuparse, por todas sus anécdotas, por lo que me enseña.....y por sus exquisitas comidas y los infaltables regalitos.*

*A mis Tíos Mabel y Jorge, por su cariño y su constante interés por lo que hago.*

*A mis Suegros, por su apoyo irrestricto.....y por varias vacaciones. Y a mis cuñados, Pato, Debbie, Pao, Sebas, por estar cerca.*

*A Bessie, Marco y María, por ser parte de mí, por el AMOR que me brindan, por TODO*

*Y por supuesto debo agradecerles a los Cangrejos, por que desinteresadamente han contribuido al desarrollo de esta Tesis, y por que nunca se han quejado por ser trasladados desde el apacible y reconfortante Cangrejal de Punta Rasa al laboratorio 101. Ellos, obviamente, deben llevarse los aplausos.*



## **INDICE**

	<b>PAG.</b>
<b>CAPITULO I</b>	
Efectos de Metales Pesados sobre la Síntesis y Secreción Hormonal en el cangrejo de estuario <i>Chasmagnathus granulatus</i> (Decapoda, Varunidae)	
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>SECCION I</b>	
a.1. BREVE HISTORIA Y SITUACION ACTUAL DE LA ENDOCRINOLOGIA EN CRUSTACEOS .....	1
a.1.1. ORGANOS NEUROENDOCRINOS, NEUROHORMONAS Y NEUROTRANSMISORES ASOCIADOS. FUNCIONES ESPECIFICAS.....	10
COMPLEJO ORGANO X – GLANDULA DEL SENO.....	10
ORGANO PERICARDICO Y ORGANO POSCOMISURAL.....	15
CEREBRO Y GANGLIO TORACICO.....	16
a.1.2. ORGANOS ENDOCRINOS (NO NERVIOSOS), HORMONAS ASOCIADAS Y FUNCIONES ESPECIFICAS.....	18
ORGANO Y.....	18
GLANDULA ANDROGENICA.....	19
ORGANO MANDIBULAR.....	19
OVARIOS.....	20
<b>SECCION II</b>	
a.2. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. FUNCIONES DE LA CHH.....	22
<b>SECCION III</b>	
a.3. REPRODUCCION EN CRUSTACEOS.....	28
<b>SECCION IV</b>	
a.4. METALES PESADOS. GENERALIDADES.....	33
a.4.1. CADMIO.....	37
a.4.2. COBRE.....	39
a.4.3. EFECTOS DE METALES PESADOS A NIVEL ENDOCRINO.....	41
<b>SECCION V</b>	
a.5. LA ESPECIE EN ESTUDIO Y SU AMBIENTE.....	43
a.5.1. EL PROBLEMA ECOTOXICOLOGICO.....	49

	PAG.
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>51</b>
 <b>CAPITULO II</b>	
<b>EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA GLUCEMIA</b>	
<b>SECCION I. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>52</b>
<b>SECCION II. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>53</b>
<u>Consideraciones Metodológicas Generales:.....</u>	<b>53</b>
A.1.1) Evaluación de la glucemia en animales intactos, a distintas concentraciones de metales pesados.....	<b>54</b>
A.1.2) Evaluación de la glucemia en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados.....	<b>55</b>
A.1.3) Efectos de metales pesados sobre la síntesis de la hormona hiperglucemiante CHH.....	<b>56</b>
A.2) Interferencia de metales pesados sobre la actividad de CHH en órganos blanco.....	<b>58</b>
<b>ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.....</b>	<b>60</b>
 <b>CAPITULO III</b>	
<b>EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION</b>	
<b>SECCION I. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>61</b>
<b>SECCION II. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>62</b>
<b>ENSAYOS <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>62</b>
<u>Consideraciones Metodológicas Generales:.....</u>	<b>62</b>
-Evaluación del crecimiento gonadal en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados.....	<b>65</b>
-Efectos de metales pesados sobre la síntesis de hormonas pedunculares.....	<b>66</b>

	<b>PAG.</b>
<b>ENSAYOS <i>IN VITRO</i></b>	
<u>Consideraciones Metodológicas Generales:</u> .....	<b>67</b>
- Exposición de ovario a distintas concentraciones de los metales pesados utilizados (ensayos previos).....	<b>70</b>
B.1) Efectos de metales pesados sobre la secreción hormonal del ganglio torácico.....	<b>71</b>
B.2) Interferencia de metales pesados con la actividad estimuladora de otras hormonas extrapedunculares,sobre el crecimiento gonadal.....	<b>72</b>
B.3) Efecto de metales pesados sobre la secreción hormonal del pedúnculo ocular. Reversión del efecto por administración de extractos pedunculares.....	<b>73</b>
ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.....	<b>75</b>
 <b>CAPITULO IV</b>	
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>76</b>
<b>EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA GLUCEMIA</b> .....	<b>76</b>
A.1.1) Evaluación de la glucemia en animales intactos, a distintas concentraciones de metales pesados.....	<b>76</b>
A.1.2) Evaluación de la glucemia en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados.....	<b>78</b>
A.1.3) Efectos de metales pesados sobre la síntesis de la hormona hiperglucemiante CHH.....	<b>78</b>
A.2) Interferencia de metales pesados sobre la actividad de CHH en órganos blanco.....	<b>81</b>
 <b>EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION</b> .....	<b>83</b>
<b>ENSAYOS <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>83</b>
- Evaluación del crecimiento gonadal en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados.....	<b>83</b>
<u>Periodo reproductivo. Evaluación del IG</u> .....	<b>83</b>
<u>Periodo reproductivo. Evaluación histológica de ovarios</u> .....	<b>83</b>
<u>Periodo prerreproductivo. Evaluación del IG</u> .....	<b>86</b>
<u>Periodo prerreproductivo. Evaluación histológica de ovarios</u> .....	<b>86</b>

	<b>PAG.</b>
- Efectos de metales pesados sobre la síntesis de hormonas pedunculares.....	<b>88</b>
<u>Periodo reproductivo. Evaluación del IG.....</u>	<b>88</b>
<b>ENSAYOS <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>90</b>
- Puesta a punto de la técnica <i>in vitro</i> .....	<b>90</b>
- Exposición de ovario a distintas concentraciones de los metales pesados utilizados (ensayos previos).....	<b>91</b>
B.1) Efectos de metales pesados sobre la secreción hormonal del ganglio torácico.....	<b>93</b>
B.2) Interferencia de metales pesados con la actividad estimuladora de otras hormonas extrapedunculares, sobre el crecimiento gonadal.....	<b>94</b>
B.3) Efecto de metales pesados sobre la secreción hormonal del pedúnculo ocular. Reversión del efecto por administración de extractos pedunculares.....	<b>96</b>
 <b>CAPITULO V</b>	
<b>DISCUSION.....</b>	<b>99</b>
<b>EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA GLUCEMIA.....</b>	<b>99</b>
- Los metales estudiados causan hipoglucemia dependiente de la concentración de cada metal pesado.....	<b>99</b>
- Hipoglucemia en animales intactos y ablacionados, expuestos a cadmio o cobre.....	<b>99</b>
- Posibles efectos de ambos metales sobre la secreción de CHH.....	<b>100</b>
- Posibles efectos de ambos metales sobre la síntesis de CHH.....	<b>103</b>
- Hipoglucemia versus hiperglucemia por efecto de metales pesados.....	<b>105</b>
- Posible interferencia de ambos metales con la transducción hormonal.....	<b>108</b>
 <b>RESUMEN DE LA DISCUSION. (Sección A).....</b>	<b>110</b>
 <b>EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION.....</b>	<b>112</b>
- Efectos de cadmio y cobre sobre el crecimiento ovárico <i>in vivo</i> .....	<b>112</b>

	<b>PAG.</b>
- Los metales ensayados no afectan la secreción hormonal del ganglio torácico.....	<b>116</b>
- Ambos metales interfieren con el efecto de <i>metil farnesoato</i> y <i>17-hidroxiprogesterona</i> .....	<b>116</b>
- La secreción de GIH se encontraría inhibida por los metales estudiados.....	<b>117</b>
<b>RESUMEN DE LA DISCUSION. (Sección B)</b> .....	<b>119</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	<b>122</b>
<b>CAPITULO VI</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>124</b>



## INDICE DE FIGURAS

	PAG.
<b>FIGURA 1.</b> Sistema neuroendocrino en los pedúnculos oculares (PO): complejo órgano X – glándula del seno, morfología de las neuronas sintetizadoras y secretoras y algunos sitios de acción de las neurohormonas. En el órgano X (OX) se encuentran los somas de las células neurosecretoras, cuyos axones atraviesan la médula terminalis (MT), alcanzando la glándula del seno (GS), órgano neurohemal. A la derecha se amplía la zona de las médulas que componen el tejido nervioso en el PO (LG: lámina ganglionaris; ME: médula externa; MI: médula interna; MT: médula terminalis) (tomado de Welsh y Andrew, 1978; Cooke y Sullivan, 1982).	4
<b>FIGURA 2.</b> Esquema con la ubicación de los órganos endocrinos y neuroendocrinos en una langosta de agua dulce, junto a las hormonas y neurohormonas que secretan (tomado de Spindler <i>et al.</i> , 1997).	6
<b>FIGURA 3.</b> Diagrama del ganglio torácico (TG) y el cerebro (BR) mostrando la posición relativa de éstos respecto del órgano postcomisural (PCO), y la conexión con el órgano pericárdico (PO) en un brachyuro (tomado de Cooke y Sullivan, 1982).	7
<b>FIGURA 4.</b> Imagen satelital que describe la ubicación de la Bahía Samborombón en el sector externo del Estuario del Río de la Plata. La franja roja indica la extensión del “Cangrejal Bonaerense” en la Bahía.	48
<b>FIGURA 5.</b> Imágenes del “Cangrejal Bonaerense”. Sitio de muestreo de la especie <i>Chasmagnathus granulatus</i> , Faro San Antonio, Punta Rasa.	48
<b>FIGURA 6.</b> Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos expuestos a diferentes concentraciones de cadmio (curva dosis-respuesta). Barras verticales: error estándar. Símbolos iguales indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al control (CT). (CT, n = 18; 0,1 mg/L, n = 19; 0,25 mg/L, n = 16; 0,5 mg/L, n = 16).	77
<b>FIGURA 7.</b> Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos expuestos a diferentes concentraciones de cobre (curva dosis-respuesta). Barras verticales: error estándar. Símbolos iguales indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al control (CT). (CT, n = 20; 0,05 mg/L, n = 20; 0,1 mg/L, n = 16; 0,25 mg/L, n = 17).	77
<b>FIGURA 8.</b> Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos (I) y ablacionados (A) de sus pedúnculos oculares, tanto controles (CT) como expuestos a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), (n = 20, por grupo experimental).	79
<b>FIGURA 9.</b> Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos (I) y ablacionados (A) de sus pedúnculos oculares, tanto controles (CT) como expuestos a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), (n = 20, por grupo experimental).	79

**FIGURA 10.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos inyectados con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculos oculares (EPO) proveniente de animales controles (CT) ó expuestos a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental). 80

**FIGURA 11.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos inyectados con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculos oculares (EPO) proveniente de animales controles (CT) ó expuestos a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental). 80

**FIGURA 12.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos intactos controles (CT) ó expuestos de manera crónica a 0,5 mg/L de cadmio (CD), e inyectados con solución salina (SS) ó con distintas dosis de hormona hiperglucemiante de *Cancer pagurus* (H1 = 16 pmoles, H2 = 32 pmoles; H3 = 64 pmoles por cangrejo). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$  por grupo experimental). 82

**FIGURA 13.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos intactos controles (CT) ó expuestos de manera crónica a 0,1 mg/L de cobre (CU), e inyectados con solución salina (SS) ó distintas dosis de hormona hiperglucemiante de *Cancer pagurus* (H1=16pmoles, H2=32pmoles; H3=64pmoles por cangrejo). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental). 82

**FIGURA 14.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el periodo reproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental). 85

**FIGURA 15.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el periodo reproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental). 85

**FIGURA 16.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el periodo pre-reproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental). 87

**FIGURA 17.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el periodo pre-reproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental). 87

**FIGURA 18.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) ó ablacionadas (A) durante período reproductivo, inyectadas con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculo ocular (EPO) proveniente de hembras controles (CT) ó expuestas crónicamente a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

89

**FIGURA 19.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) durante período reproductivo, inyectadas con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculo ocular (EPO) proveniente de hembras controles (CT) ó expuestas crónicamente a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

89

**FIGURA 20.** Puesta a punto de la técnica *in vitro*. Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina (CPM/mg OVARIO) en el total de proteínas ováricas precipitables por ácido tricloroacético (TCA). Los ovarios se incubaron a varios períodos de tiempo (máximo 24 horas) en 2 ml de medio de cultivo M199 conteniendo 3  $\mu\text{Ci}$  del aminoácido radiactivo, a tres temperaturas de ensayo (10, 24 y 30°C).

91

**FIGURA 21.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) co-incubados con músculo (M) de la quela ó ganglio torácico (GT), con el agregado de cadmio (CD) o cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$  por grupo experimental).

93

**FIGURA 22.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) controles (CT) ó co-incubados con 1,5  $\mu\text{M}$  de 17-hidroxiprogesterona (17PG), con el agregado de 0,5 mg/L de cadmio (CD) o 0,1 mg/L de cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

95

**FIGURA 23.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) controles (CT) ó co-incubados con 15  $\mu\text{M}$  de metil farnesoato (MF), con el agregado de 0,5 mg/L de cadmio (CD) o 0,1 mg/L de cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

95

**FIGURA 24.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) co-incubados con tejido muscular (M-CT), tejido peduncular (PO) o tejido peduncular más el agregado de extracto de pedúnculo ocular (EPO) a distintas dosis (1/2, 1 ó 2 equivalentes de pedúnculo ocular), en presencia o ausencia de 0,5 mg/L de cadmio (CD) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

98

**FIGURA 25.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) co-incubados con tejido muscular (M-CT), tejido peduncular (PO) o tejido peduncular más el agregado de extracto de pedúnculo ocular (EPO), a distintas dosis (1/2, 1 ó 2 equivalentes de pedúnculo ocular) en presencia o ausencia de 0,1 mg/L de cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

98

**INDICE DE TABLAS**

	<b>PAG.</b>
<b>Tabla 1.</b> Diámetro oocitario medio ( <b>DO</b> ) y porcentaje de oocitos previtelogénicos y vitelogénicos en hembras intactas ( <b>I</b> ) o ablacionadas ( <b>A</b> ) de los pedúnculos oculares, durante el período reproductivo. <b>ES</b> = error estándar. <b>CT</b> = control, sin tóxico, <b>CD</b> = expuestos a 0,5 mg/L de cadmio, <b>CU</b> = expuestos a 0,1 mg/L de cobre. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo ( $P>0,05$ ), (n = 15 cangrejos por grupo experimental).	<b>84</b>
<b>Tabla 2.</b> Diámetro oocitario medio ( <b>DO</b> ) y porcentaje de oocitos vitelogénicos en hembras intactas ( <b>I</b> ) o ablacionadas ( <b>A</b> ) de los pedúnculos oculares, durante el período pre-reproductivo. <b>ES</b> = error estándar. <b>CT</b> = control, sin tóxico, <b>CD</b> = expuestos a 0,5 mg/L de cadmio, <b>CU</b> = expuestos a 0,1 mg/L de cobre. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo ( $P>0,05$ ), (n = 15 cangrejos por grupo experimental).	<b>88</b>
<b>Tabla 3.</b> Ensayos previos. Curva dosis-respuesta para tres concentraciones de cadmio ( <b>CD1</b> = 0,1 mg/L, <b>CD2</b> = 0,25 mg/L, <b>CD3</b> = 0,5 mg/L), agregadas al medio de incubación junto con el tejido ovárico ( <b>CT</b> ), con y sin músculo ( <b>M</b> ) de la quela, utilizado como tejido control. <b>ES</b> = error estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre los grupos expuestos y el control respectivo, (n = 10 por grupo experimental).	<b>92</b>
<b>Tabla 4.</b> Ensayos previos. Curva dosis-respuesta para tres concentraciones de cobre ( <b>CU1</b> = 0,05 mg/L, <b>CU2</b> = 0,1 mg/L, <b>CU3</b> = 0,5 mg/L), agregadas al medio de incubación junto con el tejido ovárico ( <b>CT</b> ), con y sin músculo ( <b>M</b> ) de la quela, utilizado como tejido control. <b>ES</b> = error estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre los grupos expuestos y el control respectivo, (n = 10 por grupo experimental).	<b>92</b>
<b>Tabla 5.</b> Incorporación de $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) co-incubados con tejido muscular ( <b>M-CT</b> ), tejido peduncular ( <b>PO-CT</b> ) o extracto de pedúnculo ocular ( <b>EPO</b> , 2 equivalentes de pedúnculo). Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ), (n = 10 por grupo experimental).	<b>97</b>

## **ABREVIATURAS**

5-HT: serotonina	Ov: ovario
17PG: 17-hidroxiprogesterona	OX: órgano X
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	OY: órgano Y
BPCH: hormona contrayente de pigmento negro	PO: pedúnculos oculares
BPDH: hormona dispersante de pigmento negro	PMOLES: picomoles
CdCl <sub>2</sub> : cloruro de cadmio	PR: período reproductivo
CHH: hormona hiperglucemiante de crustáceos	PPR: período prereproductivo
CL50: concentración letal 50	RPDH: hormona dispersante de pigmento rojo
CPM: cuentas por minuto	RPM: revoluciones por minuto
CuSO <sub>4</sub> : sulfato de cobre	TCA: ácido tricloroacético
DA: dopamina	V/V: volumen en volumen
DAH: hormona de adaptación a la oscuridad	μCi: microcurie
DNA: ácido desoxiribonucleico	μM: micromolar
EPO: extracto de pedúnculos oculares	
G-6-P: glucosa-6-fosfato	
GIH: hormona inhibidora gonadal	
GMPc: guanosina monofosfato cíclico	
GS: glándula del seno	
GSH: hormona estimuladora gonadal	
GT: ganglio torácico	
LAH: hormona de adaptación a la luz	
mCi: milicurie	
MF: metil farnesoato	
MIH: hormona inhibidora de la muda	
MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular	
M: molar	
N: normal	
NaOH: hidróxido de sodio	
NDH: hormona natriurética	
NMOLES: nanomoles	
OM: órgano mandibular	
OP: órgano pericárdico	
OPC: órgano poscomisural	



**CAPITULO I**

**“Efectos de Metales Pesados sobre la Síntesis y Secreción  
Hormonal en el cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulatus*,  
Dana 1851 (Decapoda, Varunidae)”**

**INTRODUCCION****SECCION I****a.1. BREVE HISTORIA Y SITUACION ACTUAL DE LA ENDOCRINOLOGIA EN CRUSTACEOS.**

Desde que en la década de 1920 aparecen las primeras evidencias de hormonas en crustáceos y hasta la actualidad, los avances que se han producido en la endocrinología de crustáceos han sido enormes. Las investigaciones efectuadas en este área han progresado significativamente con el auxilio de nuevas técnicas que se agregaron a las técnicas endocrinológicas clásicas, como la extirpación y el trasplante de órganos. El uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, ha permitido descubrir la estructura nucleotídica y aminoacídica de varias hormonas; métodos analíticos tales como HPLC, los radioinmunoensayos, la inmunohistoquímica y la secuenciación, contribuyeron inmensamente a enriquecer el conocimiento sobre la naturaleza e identidad de las hormonas de crustáceos, así como los efectos fisiológicos que éstas producen.

Los primeros estudios endocrinológicos en crustáceos se focalizaron en una sustancia circulante en hemolinfa, con efectos aparentes a nivel pigmentario; el cambio de color en los crustáceos parecía estar bajo control hormonal, lo cual llevó a un análisis intensivo de los efectores pigmentarios, cromatóforos y pigmentos retinales, en una variedad de crustáceos,

con el objetivo de determinar el modo de acción de las hormonas que regulan estos efectores, así como la fuente productora de esas hormonas (Koller, 1925, 1928). Perkins (1928), trabajando con el camarón *Palaemonetes vulgaris*, demostró que los cambios de color no estaban controlados por los nervios periféricos que inervan los cromatóforos, sino que el contenido de los pedúnculos oculares inyectado (como extracto) en el camarón era el causante de la concentración pigmentaria observada. Esto llevó al autor mencionado a concluir que los cambios de color en esta especie de crustáceo son provocados por alguna sustancia concentradora de pigmentos transportada en la hemolinfa, y que el pedúnculo ocular era el órgano endocrino que producía esa sustancia.

Mas adelante, entre los años 1940 – 1950, comenzaron varios fisiólogos a preguntarse qué otras funciones además del movimiento pigmentario se encontraban bajo control hormonal, iniciando entonces investigaciones sobre el control endocrino del proceso de muda y del metabolismo de carbohidratos. Durante los diez años siguientes, los estudios estuvieron dirigidos hacia el reconocimiento de los productos de las células neurosecretoras (neurohormonas), y hacia la caracterización funcional de varias glándulas, como el órgano Y o la glándula androgénica.

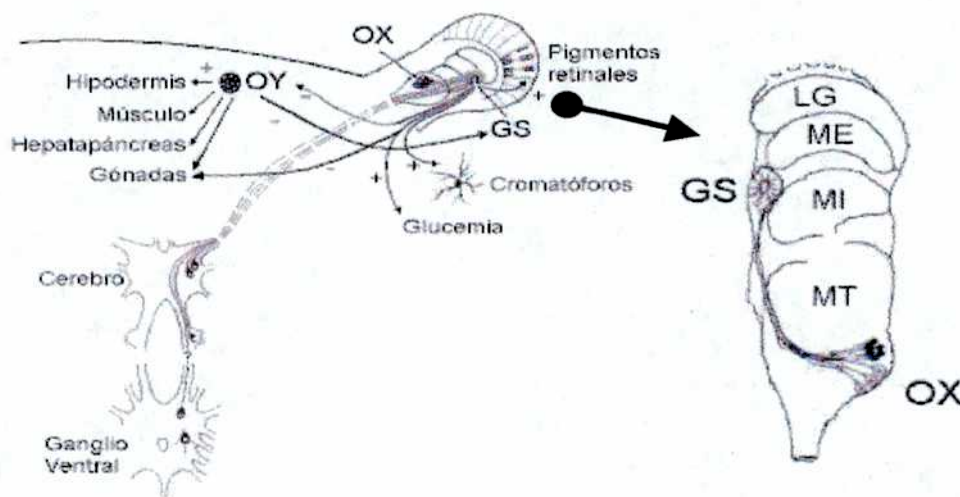
Las glándulas endocrinas de los crustáceos no sólo comprenden las clásicas estructuras de origen epitelial, sino también órganos neuroendocrinos cuyos productos de secreción se originan en neuronas especializadas para la síntesis y secreción a la hemolinfa de mensajeros químicos. En el pedúnculo ocular se encuentra la primera estructura reconocida como glándula endocrina en crustáceos. Koller (1930) trabajando con extractos tanto de ojo como del resto del pedúnculo ocular, observó en el camarón *Crangon crangon* que la concentración del pigmento negro era fuertemente evocada al inyectar el extracto con el resto del pedúnculo, concluyendo que la glándula endocrina que secreta la sustancia concentradora de pigmento se



localizaba en una porción del pedúnculo cercana al ojo. Hanström (1933, 1934) fue el primero en describir la glándula endocrina en los crustáceos superiores, y la denominó *glándula del seno* (GS) por localizarse en una región del pedúnculo con un extenso seno hemolinfático. La mayoría de los crustáceos decápodos pedunculados presentan esta glándula en sus pedúnculos (Fingerman, 1992), sin embargo, en los anomuros con ojos reducidos, la GS sufrió una migración secundaria desde los pedúnculos hacia el cuerpo, quedando directamente conectada con el ganglio supraesofágico y expuesta también a un seno hemolinfático. En los crustáceos con ojos sésiles como los anfípodos y los isópodos, la GS se encuentra localizada cerca de los centros ópticos del protocerebro (Brown, 1939; Hanström, 1939).

Sin embargo, la GS no se encuentra sola en el pedúnculo ocular; los trabajos de Passano (1951) y Bliss (1951) muestran la verdadera naturaleza de esta glándula y descubren que no es lo mismo remover todo el pedúnculo ocular que ablacionar solo la GS. Uno de los ganglios ubicados en el pedúnculo de los crustáceos superiores es la *medulla terminalis*, que posee una serie de cuerpos celulares neurosecretorios formando una estructura mas o menos compacta conocida como **órgano X (OX)**. Actualmente se reconoce a la glándula del seno como un conjunto compacto de terminales axónicos neurosecretorios provenientes principalmente del OX; así, la glándula del seno queda definida como un órgano neurohemal que actúa como reservorio de las neurohormonas que son producidas en los cuerpos o somas del OX, para que estas sean luego secretadas a la hemolinfa (Gabe, 1966; Fingerman y Nagabhushanam, 1992). Se estimó que un 90% de los terminales axónicos que componen la glándula del seno provienen de las neuronas que forman el OX. Debido a estas características estructurales, es común en la literatura el uso del término complejo o sistema neuroendocrino **órgano X – glándula del seno**, en analogía con el complejo hipotálamo - neurohipófisis de vertebrados. Tal complejo neuroendocrino es el principal centro de síntesis, almacenamiento y secreción de neurohormonas en crustáceos, y regula a su vez la actividad de otros centros endocrinos.

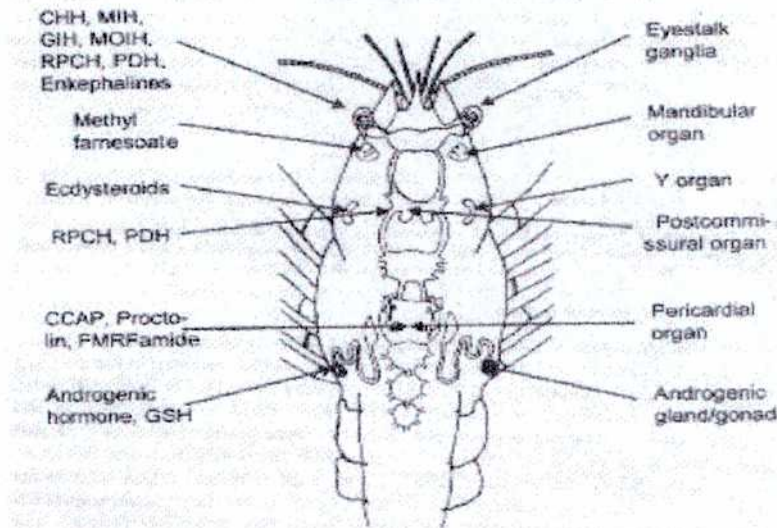
Cada lóbulo óptico de un pedúnculo ocular incluye cuatro ganglios nerviosos, *la lámina ganglionaris, la médula externa, la médula interna y la médula terminalis*, (Passano, 1960; Cooke y Sullivan, 1982; Skinner, 1985); el complejo mencionado está formado por células neurosecretorias cuyos somas se localizan en la *médula terminalis* (OX), mientras que las terminaciones axónicas están ubicadas en torno a un seno hemolinfático localizado en la superficie dorso-lateral, entre la *médula interna y la médula externa* (GS), sumándose aquí terminaciones axónicas provenientes de otras regiones (Passano, 1960). Estas terminaciones axónicas contienen gránulos secretorios, lográndose distinguir siete tipos distintos de gránulos y pudiendo diferenciarse cada terminal por la presencia de alguno de ellos. La excitosis parece ser la principal vía de liberación de los gránulos hacia la hemolinfa (Skinner, 1985; Fingerman, 1992) (*Figura 1*).



**FIGURA 1.** Sistema neuroendocrino en los pedúnculos oculares (PO): complejo órgano X - glándula del seno, morfología de las neuronas sintetizadoras y secretoras y algunos sitios de acción de las neurohormonas. En el órgano X (OX) se encuentran los somas de las células neurosecretoras, cuyos axones atraviesan la médula terminalis (MT), alcanzando la glándula del seno (GS), órgano neurohemal. A la derecha se amplía la zona de las médulas que componen el tejido nervioso en el PO (LG: lámina ganglionaris; ME: médula externa; MI: médula interna; MT: médula terminalis) (tomado de Welsh y Andrew, 1978; Cooke y Sullivan., 1982).

La glándula del seno, como se comentó previamente, fue la primera estructura que mostró poseer funciones endocrinas en los crustáceos. Sin embargo, otra estructura cuya función endocrina fue establecida posteriormente es aquella conocida como *órgano pericárdico* (OP), cuya presencia en crustáceos había sido reportada por Joylet y Viallanes en el año 1893. Este órgano se encuentra ubicado en la cavidad pericárdica, un seno venoso que rodea el corazón, y está formado por haces nerviosos, plexos nerviosos, y terminales axónicos que forman parte de un sistema neuroendocrino liberador de neurohormonas cuyo blanco es el corazón (Alexandrowicz, 1953a, b; Alexandrowicz y Carlisle, 1953). El órgano pericárdico, se sabe que regula la actividad cardíaca en decápodos y estomatópodos, pero además fue encontrado también en anfípodos (Alexandrowicz, 1954) e isópodos (Delaleu, 1970); las hormonas producidas, que son liberadas a la circulación general, incluye aminas biogénicas (serotonina, octopamina, dopamina) y dos o más péptidos cardioexcitatorios (proctolin y péptido insensible a tripsina). En macruros cada OP se origina dorsalmente de cada ganglio torácico, mientras que en braquiuros se originan de regiones homólogas del único ganglio torácico existente, que se encuentra formado por la fusión de todos los ganglios torácicos segmentales distinguibles en un macruro (**Figura 2**).

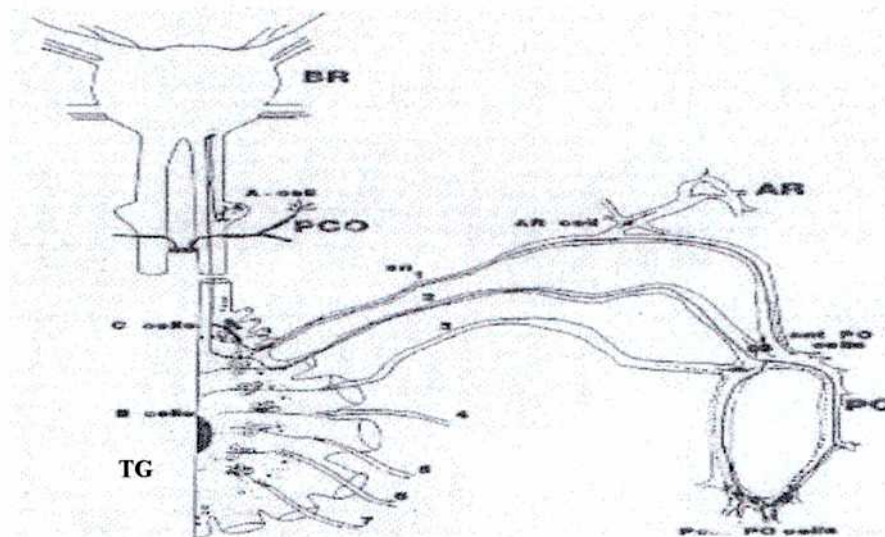
Otra estructura endocrina con características anatómicas similares al órgano pericárdico es el *órgano postcomisural* (OPC), ubicado al igual que aquel en el núcleo corporal, fuera de los pedúnculos oculares. La primer descripción del órgano postcomisural la realizó Knowles, en 1953, trabajando con *Penaeus brasiliensis* y *Palaemon serratus*, y en años posteriores ha sido identificado en varias especies de crustáceos (Carlisle y Knowles, 1959; Maynard, 1961; Fingerman, 1966). Los terminales axónicos neurosecretorios que conforman este órgano provienen de nervios poscomisurales que surgen de la comisura circumesofágica, inmediatamente por detrás del esófago (**Figuras 2,3**).



**FIGURA 2.** Esquema con la ubicación de los órganos endocrinos y neuroendocrinos en una langosta de agua dulce, junto a las hormonas y neurohormonas que secretan (tomado de Spindler *et al.*, 1997).

El *cerebro* y el *ganglio torácico* (GT) de los crustáceos son otras dos regiones donde se encuentran sustancias con actividad neurohormonal. El cerebro o ganglio cerebroide y el ganglio torácico en los decápodos son los dos centros nerviosos principales, compuestos por la fusión de varios pares de ganglios que formaban parte de un cordón nervioso doble de ubicación ventral, con un par de ganglios por segmento corporal. El cerebro se localiza por debajo de la epidermis en la región frontal, entre cada base del par de glándulas antenales y la superficie anterior del estómago, presentando un aspecto estrellado a raíz de los nervios que parten de los bordes laterales. Con respecto al ganglio torácico, este se presenta como una gran masa oval estrellada entre la musculatura torácica de los pereiópodos, en la superficie ventral del tórax. Diez pares de nervios anteriores inervan apéndices bucales (5 pares) y pereiópodos (5 pares). Unos se dirigen a la región frontal del caparazón y la musculatura aductora de la mandíbula; otros penetran en la región articulada de la mandíbula, mientras que otro grupo inerva la musculatura abductora de la mandíbula; los restantes inervan maxilipedios, maxilas (1 y 2) y todos los apéndices locomotores. Hacia la región posterior, del GT parte un nervio abdominal que se dirige a los segmentos abdominales (Bond-Buckup *et al.*, 1991) (**Figura 3**). En trabajos de implantación o de inyección de extractos de cerebro y

ganglio torácico se describen efectos sobre distintos procesos fisiológicos, como por ejemplo la reproducción. Ambos tejidos han sido identificados como fuentes de una hormona estimuladora gonadal (GSH), que en hembras actuaría directamente sobre ovario estimulando la vitelogénesis, pero que en machos no tendría un efecto directo sobre testículos (Otsu, 1963; Gómez y Nayar, 1965; Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Yano, 1992; De Kleijn *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1999).



**FIGURA 3.** Diagrama del ganglio torácico (TG) y el cerebro (BR) mostrando la posición relativa de éstos respecto del órgano poscomisural (PCO), y la conexión con el órgano pericárdico (PO) en un braquiuro (tomado de Cooke y Sullivan, 1982).

Tanto la glándula del seno como los órganos pericárdico y poscomisural son ejemplos de órganos neurohemales, es decir, están formados por terminales axónicas provenientes de células neurosecretoras. Pero además, los crustáceos presentan glándulas endocrinas típicas, no neurales; una de ellas es el *órgano Y* (OY), descubierto por Gabe (1953) en una gran cantidad de crustáceos malacostracos. Es un órgano par de origen ectodérmico muy relacionado anatómicamente con la hipodermis y ubicado en el segmento maxilar de la cabeza (Gabe, 1971), en posición latero-ventral cercano a la línea de inserción del branquiosteguito y ubicado por debajo de la inserción del músculo aductor externo de la mandíbula con el caparazón (Lachaise *et al.*, 1993). Consiste en un sólo tipo celular que cambia de tamaño en

relación con las fases del ciclo de muda, incrementándose al volverse activo durante la premuda (Aoto *et al.*, 1974) (**Figura 2**). Los ecdiesteroides, en particular la hormona ecdisona, son las sustancias producidas en este tejido.

Otra glándula endocrina de origen epitelial es la *glándula androgénica*, exclusiva de los machos. Fue descrita por Cronin por primera vez en 1947 en machos del cangrejo azul *Callinectes sapidus*, como una glándula accesoria sin conductos adherida al vaso deferente, pero fue Charniaux-Cotton (1954) quien le dio su nombre actual (**Figura 2**). Varios trabajos han intentado aislar y caracterizar los productos sintetizados en esta glándula; Laufer y Landau (1991), por ejemplo, demuestran que la glándula androgénica es capaz de sintetizar distintos compuestos que incluyen proteínas y terpenoides.

A cada lado del cefalotórax y muy cercana a la superficie posterior de la porción inferior del apodema, en el que toma inserción el músculo aductor mandibular posterior, se distingue otra glándula endocrina, el *órgano mandibular* (OM), descrito inicialmente por Le Roux (1968). Este órgano ha sido relacionado funcionalmente tanto con el crecimiento como con la reproducción, siendo el metil farnesoato (MF) la principal hormona secretada por el órgano mandibular (Laufer *et al.*, 1987, 1992, 1993; Tamone y Chang, 1993; Homola y Chang, 1997) (**Figura 2**).

Otra importante fuente hormonal en los crustáceos es el *ovario*. Macroscópicamente, los ovarios son estructuras pares, con dos ramas laterales caudales (denominadas oviductos) que se comunican con los receptáculos seminales o espermatecas, también pares, que son consideradas en general dilataciones de los oviductos (Hartnoll, 1968, 1969). Los oviductos pueden eventualmente estar ausentes (Adiyodi y Subramonian, 1983) o presentar variaciones estacionales en su grado de desarrollo. Por ejemplo, en *Inachus phalangium* (Diesel, 1989),

los oviductos se desarrollan ante cada evento de puesta, no siendo por tanto estructuras permanentes. Las espermatecas se abren al exterior mediante un corto canal genital (Hartnoll, 1965), también denominado vagina, localizado en el esterno del sexto segmento torácico (Hartnoll, 1968; Diesel, 1989; Orensanz *et al*, 1995).

En un importante número de crustáceos se ha observado que el ovario experimenta importantes cambios de color y de tamaño conforme progresa el desarrollo oocitario (Sastry, 1983). Distintos autores han determinado diversos estadios de desarrollo oocitario, basándose en el diámetro oocitario, en el color o en el tamaño del ovario (Erdman y Blake, 1988; Hinsch, 1988; Levi y Vacchi, 1988; Kulkarni *et al*, 1991b, entre otros). Sin embargo, es la observación histológica del ovario la que permite identificar con precisión el grado de madurez ovárica, en base a la observación del crecimiento oocitario. Al inicio de la maduración gonadal es posible distinguir, como estratos concéntricos y con un sentido centrífugo de maduración oocitaria, los siguientes morfotipos celulares: centralmente, las oogonias rodeadas por los oocitos en vitelogénesis endógena (primaria o previtelogénesis), y más externamente por los oocitos en vitelogénesis exógena (secundaria) que contactan con la teca ovárica. Estos últimos son de mayor tamaño que los primeros, a expensas del crecimiento citoplasmático debido a la incorporación de vitelo, ya sea como plaquetas ó como corpúsculos vitelinos.

Los primeros trabajos de extirpación e implantación de tejido ovárico fueron realizados con el anfípodo *Orchestia gammarella*; se encontró en las células foliculares del ovario de esta especie una sustancia denominada VSOH (hormona estimuladora de la vitelogénesis ovárica); sin embargo, hasta el momento no ha sido aislada en otros grupos de crustáceos y tampoco se conoce su naturaleza química (Payen, 1986; Van Herp y Payen, 1991). Por otro lado, también en las células foliculares y en los oocitos de un número limitado de especies de

crustáceos, han sido identificados ecdiesteroides (Spindler, 1989; Chang, 1993), aunque tampoco se ha determinado su función específica. En los cangrejos *C. sapidus* y *Uca arcuata* fueron descritas sustancias similares al estradiol y a la progesterona de mamíferos, respectivamente; el estradiol se detectó en hemolinfa, pedúnculos oculares, hepatopáncreas y tejido gonadal (Sasser y Singhas, 1992; Shih y Wang, 1993). Sumado a esto, en ovario y hepatopáncreas de *M. rosebergii* se ha reportado la biosíntesis de la enzima 17-gama-hidroxiesteroide dehidrogenasa, lo que sugiere la presencia de un metabolismo endógeno de esteroides en los langostinos (Ghosh y Ray, 1993) (**Figura 2**).

#### **a.1.1. ORGANOS NEUROENDOCRINOS, NEUROHORMONAS Y NEUROTRANSMISORES ASOCIADOS. FUNCIONES ESPECIFICAS**

##### **COMPLEJO ORGANO X - GLANDULA DEL SENO**

En cuanto a las funciones que desempeñan las hormonas producidas y secretadas por el complejo OX-GS ubicado en los pedúnculos oculares, distintos ensayos de ablación peduncular y posterior reimplantación o inyección de extracto de pedúnculo, han revelado las siguientes: control del movimiento pigmentario, del proceso de muda, de la reproducción, del metabolismo de carbohidratos, de ritmos de actividad y del balance osmótico, entre otras (Quackenbush y Fingerman, 1984, 1985; Keller, 1992; Fingerman, 1997).

El órgano X sintetiza numerosos neuropéptidos, que son primero acumulados en la glándula del seno y luego secretados desde aquí al torrente hemolinfático. Un ejemplo de neuropéptido sintetizado allí es la hormona inhibidora de la muda (MIH), cuyo tejido blanco principal es el órgano Y, impidiendo que se lleve a cabo la muda por inhibición de la síntesis



de ecdisona en este órgano (Passano, 1960). La MIH fue aislada y caracterizada como un péptido en *Ocypode macrocera* (Rao, 1965), luego fue purificada y secuenciada en *Carcinus maenas* (Webster, 1986; Webster y Keller, 1986; Webster y Dirksen, 1991), así como en *Homarus americanus* (Chang *et al.*, 1990) y *C. sapidus* (Lee *et al.*, 1998). Estos neuropéptidos poseen un número (71 – 78) y una secuencia de aminoácidos similares, y lo mismo ocurre al comparar la MIH de diferentes especies con otros neuropéptidos también sintetizados en el OX, como la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) y la hormona inhibidora gonadal (GIH). Todos ellos son agrupados actualmente en la familia de neuropéptidos CHH / MIH / GIH / MOIH, siendo esta última la hormona inhibidora del órgano mandibular (Keller, 1992; Laufer *et al.*, 1994).

La aplicación de diversas técnicas y enfoques han permitido profundizar en el conocimiento sobre las funciones de estas hormonas, su distribución celular, su síntesis y la identificación de las variables internas y externas involucradas en su regulación. En estos últimos años, se ha prestado considerable atención a la identificación de un número cada vez mayor de estos neuropéptidos, caracterizando su estructura química y sus precursores (De Kleijn *et al.*, 1994a, 1994b, 1995; Fingerman, 1997). Luego de la secuenciación de la CHH de *Carcinus maenas* (Kegel *et al.*, 1989), así como de su precursor (Weidenmann *et al.*, 1989), un considerable número de miembros de esta familia de neurohormonas comenzaron a ser caracterizados en distintas especies, detectándose múltiples formas ya sea por la presencia de diferentes genes o por modificaciones postraduccionales (por ej., conversión de los residuos aminoácidos L en D). Todos los miembros de esta familia, además de poseer una cantidad similar de aminoácidos, muestran como característica sobresaliente la ubicación del aminoácido Cys (cisteína) siempre en la misma posición a lo largo de la cadena aminoacídica.

Un estudio comparativo mas detallado permitió subdividir las en dos grupos, el de las CHHs y el de las MIHs/GIHs. El grupo CHHs incluye todas las hormonas hiperglucemiantes

secuenciadas hasta el momento en especies como *C. maenas*, *H. americanus*, *Orconectes limosus*, *Procambarus clarkii*, *Procambarus japonicus*. Pero también incluye la MIH de *H. americanus* (que es idéntica a una isoforma de CHH, la CHH-A encontrada en las otras especies mencionadas) y la MIH de *P. bouvieri* (Kegel *et al.*, 1989, 1991; Chang *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1995). Con respecto al grupo de las MIHs/GIHs, los representantes son la MIH secuenciada en *C. maenas*, *Cancer pagurus*, *P. japonicus* y *P. clarkii*, la GIH secuenciada en *H. americanus*, y las MOIH 1 y 2 de *C. pagurus* (Webster, 1991; Soyez *et al.*, 1991; Wainwright *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Las diferencias estructurales entre los dos grupos mencionados se acentúan al analizar los precursores de cada neurohormona (Klein *et al.*, 1993; De Kleijn *et al.*, 1994a, 1994b; Lee *et al.*, 1995).

Sin embargo, no se observa un correlato claro de tales diferencias a nivel funcional, ya que varios miembros de la familia son neuropéptidos multifuncionales que muestran efectos biológicos cruzados con los de las otras neurohormonas de la familia. Se observó que la isoforma CHH-A de *H. americanus* presentaba un claro efecto hiperglucemiante y tenía además, en la misma especie, una actividad inhibitoria tanto de la muda como del desarrollo gonadal. Un caso opuesto es el de la MIH de *P. bouvieri*, que pertenece al grupo CHHs pero presenta actividad inhibitoria de la muda y no causa ningún efecto hiperglucemiante. Las neurohormonas MOIH 1 y 2 incluidas en el grupo MIHs/GIHs, por ejemplo, tienen únicamente efectos a nivel del órgano mandibular, inhibiendo la síntesis de metil farnesoato en *C. pagurus* (Wainwright *et al.*, 1996); mientras que en *Libinia emarginata* se describen tres isoformas de MOIH que además de presentar efecto sobre el OM tienen una clara actividad hiperglucemiante (Liu *et al.*, 1997). Otros estudios también demuestran el efecto de la hormona hiperglucemiante sobre la reproducción; se ha reportado que la CHH tiene un efecto estimulador sobre el crecimiento de los oocitos de *Palaemonetes varians* (Van Herp, 1992); pero además, se ha detectado la presencia de ARNm codificante de CHH en ganglio torácico

(De Kleijn *et al.*, 1995; De Kleijn y Van Herp, 1998), por lo cuál se ha postulado la posibilidad de que GSH y CHH (alguna de sus isoformas) sean una misma hormona.

Además de los neuropéptidos descritos hasta ahora, el complejo OX-GS sintetiza otras sustancias como por ejemplo las cromatoforinas, factores que regulan el movimiento pigmentario en los cromatóforos y en pigmentos retinales, favoreciendo la dispersión o la concentración de los pigmentos (Rao y Riehm, 1989, 1993; Fingerman, 1997). Son ejemplos de cromatoforinas la hormona concentradora de eritróforos (ECH), las hormonas dispersantes de pigmentos rojo y negro (RPDH y BPDH), el factor concentrador de leucóforos (LCF), y las hormonas de adaptación a la luz o a la oscuridad del pigmento retinal distal (Rao, 1985, 2001). Otro factor, purificado de los pedúnculos oculares de *P. bouvieri*, es la hormona neurodepresora o NDH; la ausencia de pedúnculos generalmente provoca un incremento en la actividad y un descenso de la ritmicidad endógena y de la actividad neural espontánea en los crustáceos (Aréchiga *et al.*, 1974, 1977, 1979; Huberman *et al.*, 1979). También existen endorfinas u opioides en el sistema nervioso de los crustáceos. El primer estudio que demostró la presencia de opioides en crustáceos es del año 1981, cuando Mancillas y colaboradores encontraron en la langosta *Panulirus interruptus* leucina-encefalina-“like”, observando mediante técnicas inmunocitoquímicas inmunoreactividad en células retinulares. Lo mismo se encontró en *C. maenas*, específicamente en glándula del seno, lámina ganglionaris, médulas externa, interna y terminalis. El uso de técnicas de HPLC reveló la presencia de sustancias, que parecen ser metionina-encefalina y leucina-encefalina, en extractos de glándula del seno de *C. maenas*. Fingerman y colaboradores (1985) demostraron por inmunocitoquímica la presencia de leucina y metionina-encefalina-like en el pedúnculo ocular de *U. pugilator*, tanto en células retinulares como en la glándula del seno y la medulla terminalis. Los primeros estudios sobre un posible rol de endorfinas en crustáceos fueron realizados por Maldonado y Miralto en el año 1982, utilizando como especie de estudio a

*Squilla mantis*. Por último, también se han detectado factores que regulan o controlan el crecimiento de los apéndices caminadores y el metabolismo de lípidos (Cooke y Sullivan, 1982).

**Neurotransmisores en el complejo OX-GS:** Se ha realizado un amplio estudio sobre los factores que controlan la liberación de las neurohormonas producidas en este complejo. Se han identificado una serie de neurotransmisores capaces de estimular o inhibir la secreción de las diferentes neurohormonas sintetizadas en el órgano X. Por ejemplo, en la especie *U. pugilator* el neurotransmisor serotonina controla la liberación del RPDH pero no tiene efecto sobre los pigmentos de los cromatóforos negros. La noradrenalina produce dispersión de los pigmentos negros, favoreciendo la liberación de BPDH, pero no interviene en la dinámica de los cromatóforos rojos. Otros neurotransmisores, la dopamina (DA) y la metionina encefalina estimulan la liberación de las hormonas concentradoras de pigmentos rojo y negro (RPCH y BPCH) (Fingerman y Nagabhushanam, 1992; Fingerman *et al.*, 1998). Con referencia a las neurohormonas que controlan la migración del pigmento retinal, LAH y DAH, tanto dopamina como metionina encefalina estarían favoreciendo la liberación de DAH, mientras que noradrenalina haría lo propio con LAH. En particular en *U. Pugilator*, la serotonina no causó variaciones en la movilidad del pigmento retinal distal. Otro proceso regulado por neurohormonas pedunculares, como ser la muda, también se encuentra controlado por agentes químicos que actúan como neurotransmisores. La serotonina (5-HT) interviene en la liberación de la MIH desde la glándula del seno, controlando de esta forma la síntesis y/o secreción de los ecdiesteroides desde el OY (Mattson y Spaziani, 1985). La hormona CHH puede ser tanto estimulada como inhibida por distintos neurotransmisores. En las especies *O. limosus* y *A. leptodactylus*, la serotonina favorece la liberación de CHH, mientras que en *C. maenas* es la dopamina la que cumple esta función. También en esta última especie se comprobó que la leucina encefalina inhibe la liberación de la hormona hiperglucemiante. En

otra especie, *P. clarkii*, el efecto inhibitorio sobre la liberación de CHH está dado tanto por leucina encefalina como por dopamina (Keller y Beyer, 1968; Strolenberg y Van Herp, 1977; Luschen *et al.*, 1993; Sarojini *et al.*, 1995). Con respecto a la hormona inhibidora gonadal (GIH), aún no se ha confirmado qué neurotransmisores controlan su secreción. Sin embargo, estudios recientes realizados *in vitro* aportan fuertes evidencias que indican un papel fisiológico de la dopamina sobre la estimulación de la secreción de GIH (Zapata *et al.*, 2003), apoyando así la hipótesis previa formulada por Fingerman (1997).

## ORGANO PERICARDICO Y ORGANO POSTCOMISURAL

El corazón de los crustáceos está innervado tanto por neuronas excitatorias como inhibitorias. Más aún, las secreciones de los órganos pericárdicos están además involucradas en el control de la amplitud y la frecuencia cardíacas, tal como fue evidenciado por Alexandrowicz y Carlisle (1953), quienes encontraron que los extractos de órgano pericárdico ejercían sobre el corazón tanto efectos ionotrópicos (incremento en la fuerza de contracción), como cronotrópicos (incremento de la frecuencia cardíaca). Estudios posteriores revelaron que tales acciones podían llevarse a cabo por la secreción desde los órganos pericárdicos de dos péptidos. Uno de ellos es la proctolina, un pentapéptido (Stangier *et al.*, 1986), siendo su acción predominantemente ionotrópica. El segundo péptido identificado es el péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP), nonapéptido (Stangier *et al.*, 1987) con efecto marcadamente cronotrópico. El OP produce y secreta también aminas biógenas tales como catecolaminas (dopamina), fenolaminas (octopamina) y serotonina (Atwood, 1982). Los efectos fisiológicos de cada monoamina han sido bien descritos. Por ejemplo, la octopamina tiene un efecto excitatorio sobre el corazón, que es dosis dependiente, ya que a mayor perfusión con esta amina mayor efecto excitatorio. Causa un incremento de AMP cíclico en el

músculo cardíaco, evocando contracción (Kravitz *et al.*, 1980; Sullivan, 1980; Livingstone *et al.*, 1980). Con respecto a la serotonina, también es reconocido su efecto sobre el AMPc, aumentando los niveles de éste, y la acción facilitadora sobre la función neuromuscular; además, se encontró excitación del ganglio cardíaco en una preparación aislada, luego del agregado de serotonina. En *H. americanus*, distintos autores encontraron incrementos en los niveles de AMP cíclico en músculo y ganglio cardíaco (Battelle y Kravitz, 1976; Lemos y Berlind, 1980). Estudios a nivel bioquímico sugieren que la acción facilitadora de serotonina se da por liberación de calcio intracelular en los terminales presinápticos. Poco se sabe sobre el rol de dopamina como neurohormona en crustáceos. Uno de los efectos observados en diferentes especies es el incremento de la perfusión cardíaca, siendo su sitio de acción en el corazón de los decápodos estudiados el ganglio cardíaco.

Al órgano poscomisural se le atribuyen efectos sobre la coloración del cuerpo. Las hormonas secretadas por el OPC actúan sobre efectores pigmentarios tales como cromatóforos y células que contienen pigmentos retinales (Knowles, 1953; Fingerman, 1966).

## CEREBRO Y GANGLIO TORACICO

Se ha observado, mediante ensayos *in vitro*, que el crecimiento ovárico es uno de los principales procesos afectados cuando se coincuban tejido ovárico y extractos de ganglio torácico o cerebro (Otsu, 1963; Gómez y Nayar, 1965; Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Kulkarni *et al.*, 1991a; Yano, 1992). Un neuropéptido denominado hormona estimuladora gonadal (GSH), producido en células neurosecretorias localizadas en cerebro y ganglio torácico, induciría la maduración ovárica (Gabe, 1967). En hembras de *U. pugilator* se observó que la cantidad de GSH en el ganglio torácico estaba correlacionada con la época del

año, incrementándose durante la época reproductiva (Eastman-Reks y Fingerman, 1984); otros ensayos muestran que en el protocerebro del anfipodo *O. gammarella* existe una sustancia comparable, que parece ser determinante en el inicio de la maduración oocitaria (Blanchet-Tournier *et al.*, 1980). Además, se observó que GSH posee actividad biológica interespecífica, ya que extractos de cerebro de langostas marinas inyectados en *P. vannamei* inducían la maduración ovárica (Yano y Wyban, 1992). Esta sustancia fue la segunda neurohormona encontrada en decápodos con funciones reproductivas y sin embargo aún no se ha dilucidado con precisión su identidad. Los resultados obtenidos por De Kleijn y colaboradores (1995) utilizando técnicas de biología molecular, indican que las células neurosecretorias de estos ganglios poseen RNA mensajeros de CHH (hormona hiperglucemiante de crustáceos), neuropéptido cuya síntesis ha sido descrita en el órgano X. Este hallazgo, sumado al efecto estimulador gonadal de una de las isoformas conocidas de CHH (Tensen *et al.*, 1989; Van Herp, 1992, 1998), colocan a la CHH expresada en cerebro y ganglio torácico como candidata a cumplir el rol fisiológico atribuido a GSH.

**Neurotransmisores en cerebro y ganglio torácico:** se identificaron en el cangrejo violinista *U. pugilator* y la langosta *P. clarkii* los neurotransmisores que afectan la secreción de GSH. Estos estudios mostraron que tanto en hembras como en machos de ambas especies, la serotonina disparaba la secreción de GSH, mientras que la dopamina antagonizaba el efecto estimulante de la serotonina (Sarojini *et al.*, 1995; Fingerman, 1998). Este efecto inhibitorio de la dopamina se debió, al menos en parte, a la inhibición de la secreción de GSH, siendo posible además, que la dopamina dispare por otro lado la secreción de GIH desde pedúnculos oculares, tal como se mencionó anteriormente. Además de dopamina, la metionina encefalina también incide sobre la liberación de GSH; se observó en *P. clarkii* que ambos compuestos presentaban un efecto inhibitorio sobre GSH, y que no afectaban directamente las gonadas (Sarojini *et al.*, 1996, 1997).

## a.1.2. ORGANOS ENDOCRINOS (NO NERVIOSOS), HORMONAS ASOCIADAS Y FUNCIONES ESPECIFICAS

### ORGANO Y

Las hormonas liberadas por el OY controlan principalmente los fenómenos relacionados con la muda y la exuviación, influyendo también sobre la regeneración, la reproducción y el metabolismo del calcio. La ecdisona u hormona de la muda es el principal ecdiesteroides activo secretado por el OY, sintetizado a partir de colesterol exógeno (Chang *et al.*, 1976; Chang y O'Connor, 1977; Charmantier-Daures y Charmantier, 1994). Con respecto al rol que desempeñan sobre la reproducción de crustáceos, la  $\alpha$ -ecdisona secretada por los órganos Y que es convertida periféricamente a  $\beta$ -ecdisona (20-hidroxiectdisona), verdadera hormona de la muda (Chang y O'Connor, 1978, 1979), estaría actuando a nivel gonadal. Otros ecdiesteroides aislados de órganos Y (Sedlmeier y Seinsche, 1998) son la 25-deoxiectdisona, la 3-dehidroecdisona y la 3-dehidro-25-deoxiectdisona. En anfípodos e isópodos, los ecdiesteroides parecen ser necesarios para la síntesis exitosa de vitelo (Meusy *et al.*, 1977; Suzuki, 1986), mientras que en decápodos se han encontrado ecdiesteroides en ovario (Lachaise *et al.*, 1992), lo que sugiere que poseen alguna función en la maduración ovárica. En las pocas especies de crustáceos que han sido estudiadas, parece ser muy clara la correlación entre el crecimiento ovárico, el desarrollo embrionario y la concentración de ecdiesteroides hemolinfáticos, observándose cambios pronunciados en los niveles de ecdiesteroides en hemolinfa durante varios procesos asociados con la reproducción (Spindler *et al.*, 1984, 1987; Chan, 1995). Dependiendo de si el animal está invirtiendo energía en mudar o en reproducirse, se expresarían de manera diferencial aquellos genes que son blanco de los ecdiesteroides; durante la época reproductiva se silenciarían genes propios de células



musculares o hipodérmicas involucradas en el proceso de muda, y se activarían los genes ováricos (Spindler *et al.*, 1992; Chan, 1995; Whiteley y El haj, 1997).

## GLANDULA ANDROGENICA

Los trabajos de Charniaux-Cotton (1954) y los estudios ultraestructurales realizados por Taketomi (1986) demostraron la función de esta glándula, revelando que las células que la componen son típicamente secretoras de compuestos proteicos. También se han encontrado terpenoides, como la farnesilacetona (similar al metil farnesoato), pero el rol de estos aún no se ha dilucidado (Laufer y Landau, 1991). Por el contrario, se sabe que las proteínas denominadas AH I y II son sustancias que regulan la normal diferenciación y maduración del sistema reproductor masculino, siendo responsables de la actividad espermatogénica de los testículos; están por otra parte directamente involucradas en la expresión y el mantenimiento de las características sexuales secundarias en los machos.

## ORGANO MANDIBULAR

La secreción endocrina del OM es el metil farnesoato (MF) (Laufer *et al.*, 1987), un sesquiterpenoide que es la forma sin epoxidar de la hormona juvenil III de insectos (JHIII), y que presumiblemente posee idéntica función en los crustáceos (Laufer *et al.*, 1986, 1987). Los órganos mandibulares están negativamente controlados por la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH), secretada por la glándula del seno, que inhibe la síntesis de MF (Liu *et al.*, 1997). Los efectos estimulantes de esta hormona sobre la muda, en términos de incremento en la secreción o síntesis de ecdiesteroides, han sido evaluados tanto *in vivo* como

*in vitro* (Laufer, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002a). Ensayos de implantación de órganos mandibulares de *C. sapidus* en el camarón *Penaeus setiferus* mostraron una estimulación de la síntesis de ecdiesteroides desde los órganos Y del camarón; por otro lado, Tamone y Chang (1993) encontraron que los órganos Y aislados del cangrejo *C. magister* e incubados con MF u órgano mandibular, secretaban más ecdiesteroides que los órganos Y controles.

Se sabe que la ablación de los pedúnculos oculares desencadena una precoz maduración gonadal debido a la ausencia de la hormona inhibidora gonadal (GIH). La misma ablación favorece además el incremento de los niveles circulantes de MF, ya que se elimina la hormona inhibidora del órgano mandibular, MOIH, también producida en los pedúnculos oculares (Laufer *et al.*, 1987; Borst *et al.*, 2001). Hinsch (1980) mostró que los implantes de órgano mandibular estimulaban el desarrollo ovárico en el cangrejo *L. emarginata*, y también las inyecciones de MF han producido efectos estimulantes sobre el ovario en varias especies de crustáceos. Por ejemplo, la administración de MF aceleró el desarrollo ovárico en la langosta *P. clarkii* (Laufer *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002a) y en los cangrejos *Oziotelphusa senex* (Reddy y Ramamurthi, 1998) y *L. emarginata* (Jo *et al.*, 1999). Se ha reportado también en varios estudios la función del MF en machos (Laufer *et al.*, 1992). En particular, los niveles circulantes de MF en *L. emarginata* son elevados en machos sexualmente activos, y reducidos en aquellos machos inactivos.

## OVARIOS

Con respecto al tejido ovárico y las secreciones gonadales, existen algunos trabajos que determinaron efectos de hormonas gonadotróficas y de esteroides gonadales típicos de los vertebrados en la reproducción de crustáceos; ejemplo de ello son los estudios de Donahue

(1948), quién encontró estrógenos en el ovario de la langosta *Panulirus argus* y en los huevos de *H. americanus*. Se han efectuado experimentos *in vivo* utilizando gonadotrofinas de vertebrados con resultados positivos; en uno de ellos se encontró un efecto estimulante de la oogénesis en *C. crangon* por acción de la gonadotrofina coriónica humana (GCH) (Bomirski y Klek-Kawisnka, 1976). Luego, utilizando la misma especie, Zukowska-Arendarczyx (1981) demostró que las hormonas foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), al igual que la GCH, estimulaban el desarrollo ovárico. Previamente, Kulkarni y colaboradores (1979) habían observado que la progesterona provocaba maduración ovárica en el camarón *Parapenaeopsis hardwickii*, mientras que Sarojini y colaboradores (1986) reportaron que tanto el  $17\beta$ -estradiol como la estrona inducían el desarrollo gonadal en el camarón de agua dulce *Macrobrachium lamarrii*. Mas recientemente, estudios realizados con *P. clarkii* indican que la 17-hidroxiprogesterona induce la maduración de los ovarios por estimulación de la vitelogénesis temprana (Rodríguez *et al.*, 2002b). Otros ejemplos de efectos estimulantes de esteroides sexuales sobre el crecimiento gonadal de crustáceos, han sido sumariados por Fingerman y colaboradores (1995).

Es claro que una serie de hormonas se hallan involucradas en el normal funcionamiento del sistema reproductor de machos y hembras; y es relevante obtener mas información y poner a prueba nuevas hipótesis para poder seguir avanzando en la comprensión de las posibles interacciones que existen entre todas esas hormonas. Los ecdiesteroides junto con el MF, la CHH y la GSH, todas ellas hormonas estimulatorias, son objetos indiscutibles de estudio, para mejorar la comprensión de cómo múltiples interacciones hormonales logran coordinar una actividad reproductiva normal.

## SECCION II

### a.2. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. FUNCIONES DE LA CHH

El metabolismo de los carbohidratos, así como el control hormonal de los niveles circulantes de glucosa en hemolinfa, han sido extensivamente estudiados y poseen un lugar de relevancia entre los diferentes temas que abarca la endocrinología de crustáceos. En el año 1944 se descubrió un factor diabetogénico en los pedúnculos oculares de los decápodos; fue Abramowitz quien, trabajando en *C. sapidus*, observó que la ausencia de pedúnculos causaba una clara hipoglucemia, y que ésta podía ser revertida si los animales ablacionados eran inyectados con extracto de pedúnculo ocular. Desde ese momento, el factor hiperglucemiante denominado CHH, es una de las neurohormonas más conocidas, mostrando las siguientes características: es un péptido de 71 a 78 aminoácidos que pesa entre 6000 y 7000 Daltons, su punto isoeléctrico es bajo, es moderadamente hidrofóbico, y es considerado extremadamente específico (Keller, 1992). La CHH presente en decápodos, estomatópodos e isópodos (Keller, 1969; Martin *et al.*, 1984), posee especificidad de especie; por ejemplo, la CHH del cangrejo *C. maenas* no tiene efecto en la langosta de agua dulce *O. limosus*, así como tampoco tiene efecto la CHH del isópodo *Porcellio dilatatus* en el cangrejo violinista *U. pugilator* (Keller, 1969; Leuven *et al.*, 1982). Sin embargo, se han observado efectos hiperglucemiantes en el cangrejo *C. granulatus* luego de la inyección de CHH purificada de *C. maenas* y *O. Limosus* (Nery *et al.*, 1993).

La neurohormona CHH representa el 10% aproximadamente de las proteínas totales en la glándula del seno (Keller y Wunderer, 1978; Keller y Kegel, 1984), que es el tejido con mayor concentración de CHH, habiendo sido detectada además en órgano pericárdico, ganglio torácico, cerebro y hepatopáncreas, pero en niveles mas bajos (Keller *et al.*, 1985). Los principales sitios de acción de la hormona son el músculo y el hepatopáncreas, pero también

las branquias, las gonadas y el tegumento parecen ser tejidos blanco (Sedlmeier, 1987; Keller y Sedlmeier, 1988). Se sabe que la hormona interactúa con receptores de membrana y que se desencadena una cascada de segundos mensajeros, donde interviene principalmente el GMPc. Como resultado, una proteína quinasa fosforilasa es activada y esta a su vez actúa positivamente sobre una enzima fosforilasa, que pasa de su estado inactivo al estado activo; esa enzima (glucógeno-fosforilasa) finalmente hidroliza el glucógeno favoreciendo la escisión de una molécula de glucosa; por otro lado, la quinasa fosforila la enzima glucógeno-sintetasa inactivándola (Sedlmeier y Keller, 1981; Sedlmeier, 1985, 1987; Keller y Sedlmeier, 1988). El estímulo para la liberación de CHH sería un descenso en la disponibilidad o en la captura de glucosa por parte de los tejidos, existiendo también un feedback positivo en condiciones de hiperlactemia, siendo el propio lactato el que estimula la liberación de la hormona; además, niveles elevados de glucosa en hemolinfa regulan negativamente la secreción de CHH, evidenciando un control dual de este sistema (Santos y Keller, 1993a).

La función fisiológica de la CHH podría definirse como el mantenimiento y control de los niveles de glucosa en sangre; el contexto ecofisiológico para la acción de la hormona puede ser una situación de estrés como la emersión o la anoxia, o cambios en la salinidad y la temperatura ambiente, así como el ayuno (Santos y Keller, 1993b; Schmitt y Santos, 1993b; Webster, 1996; Chang *et al.*, 1998, 1999).

Con respecto al efecto de los neurotransmisores reconocidos en crustáceos, se sabe que la serotonina dispara la secreción de CHH en *O. limosus* (Keller y Beyer, 1968). En la langosta de agua dulce, *P. clarkii*, Fingerman (datos inéditos) confirmó esta suposición, mientras que Santos y colaboradores (2001) encontraron, también en *O. limosus*, un aumento en los niveles circulantes de CHH por inyección de fluoxetina, un potenciador de la captación presináptica de serotonina. Sarojini y colaboradores (1995b) encontraron, en la misma especie, que la

dopamina provocaba un efecto opuesto al de serotonina; esto es, la dopamina inducía una respuesta hipoglucémica presumiblemente por inhibición de la secreción de CHH. Se han obtenido evidencias ultraestructurales sobre la actividad estimulante de la serotonina (Strolenberg y Van Herp, 1977). Utilizando la langosta *Astacus leptodactylus*, se encontró que las glándulas del seno de los animales inyectados con serotonina exhibían una mayor exocitosis que los controles, sugiriendo una secreción de CHH incrementada. La exocitosis fue máxima 3 a 4 horas después que el neurotransmisor fuese inyectado, mientras que la glucosa hemolinfática alcanzó un pico entre 4 y 6 horas posinyección. Otros autores han observado efectos directos de serotonina y octopamina sobre la glucemia; Lüschen y colaboradores (1993), trabajando con *C. maenas* encontraron que tanto serotonina como octopamina provocaban hiperglucemia en animales intactos y apedunculados, mientras que dopamina generaba incrementos en la glucemia sólo en los cangrejos intactos, por lo cual la DA actuaría de forma indirecta vía la liberación de CHH.

El nivel de glucosa libre en el interior celular es usualmente muy bajo, encontrándose ésta principalmente fosforilada. Cuando la glucosa atraviesa la membrana plasmática e ingresa al citoplasma, es rápidamente convertida en glucosa-6-fosfato (G-6-P) por una hexoquinasa. La G-6-P puede seguir básicamente tres vías: 1) glucogénesis; 2) glucólisis; 3) vía de las pentosas fosfato. La intensidad con que opere cada una de estas vías se irá ajustando a las necesidades específicas del animal (o de sus tejidos), de tal forma que si es necesario ATP o estructuras carbonadas prevalecerá la glucólisis, mientras que si son abundantes el ATP y la G-6-P, se activará la formación de glucógeno.

Las vías de síntesis y degradación de glucógeno han sido estudiadas en los crustáceos (Keller, 1966; Sedlmeier, 1982), así como el rol fisiológico de la hormona hiperglucemiante (CHH) y su habilidad para regular estas vías. Muchos trabajos muestran un incremento en el

contenido de glucógeno luego de la ablación de los pedúnculos oculares, y un descenso del mismo cuando se inyectan animales intactos con extracto de pedúnculo. Schwabe y colaboradores (1952) trabajando con *Panulirus* encontraron que se incrementaba el contenido de glucógeno en el músculo abdominal y en el tegumento luego de la ablación bilateral; un resultado similar obtuvo Parvathy (1972) al analizar el contenido de glucógeno hepatopancreático en *Ocypode*. En estudios de administración o inyección de extracto de pedúnculos oculares, Keller y Andrew (1973) observaron una caída significativa de glucógeno en músculo y gonadas de *Orconectes* y en branquias y tegumento de *Uca*. Hacia fines de la década de los '80 aparecen los primeros trabajos *in vitro* que reportan la incorporación de glucosa marcada radiactivamente. La metodología correspondiente comprendía la incubación de hepatopáncreas con [<sup>14</sup>C]glucosa con el agregado de CHH purificada al medio de incubación. Como resultado, se observó una disminución en la cantidad de [<sup>14</sup>C]glucosa incorporada a glucógeno y una reducción de glucógeno en el hepatopáncreas (Sedlmeier, 1987). En los '90 se realizan los primeros ensayos tendientes a determinar los tejidos blanco de la CHH mediante la localización de los receptores a esta hormona (Kummer y Keller, 1993; Webster, 1993). En tal sentido, fue Webster quien observó una unión específica significativa de la CHH de *C. maenas* en hepatopáncreas, órganos Y, músculo cardíaco y epidermis. Estudios anteriores, a nivel enzimático, indicaban por ejemplo que la actividad de la enzima glucógeno-sintetasa se incrementaba cuando se ablacionaban los pedúnculos oculares de las especies *O. limosus* y *C. magister*, y que dicho efecto era revertido por inyección de extracto de pedúnculos (Keller, 1966; Ramamurthi *et al.*, 1968; Sedlmeier, 1982). La supuesta modulación por parte de la CHH de la actividad glucógeno-sintetasa ha sido estudiada bajo diferentes condiciones fisiológicas y ambientales, tales como composición de la dieta y ayuno, muda, o cambios en temperatura y salinidad. Así, los niveles hemolinfáticos de CHH en *O. limosus* disminuyen inmediatamente después de alimentarse (Keller y Orth, 1990), y el mismo efecto se observa en *C. maenas* luego de la inyección de

glucosa (Santos y Keller, 1993a). La disminución de CHH favorece la activación de la glucógeno-sintetasa, lo que a su vez produce un aumento en el contenido de glucógeno de diferentes tejidos. Un efecto opuesto se observa cuando se priva de comida a los animales; por ejemplo, luego de seis días de ayuno se produce un incremento en los niveles de CHH en hemolinfa, registrándose una disminución en el contenido de glucógeno en hepatopáncreas, tegumento y músculo abdominal (Sedlmeier, 1987; Keller y Orth, 1990).

Diferentes trabajos han demostrado que también ocurre en crustáceos la vía glucolítica, de degradación de la glucosa (Hochachka *et al.*, 1970; Thabrew *et al.*, 1971; Dendinger y Schatzlein, 1973). La glucólisis es la principal ruta catabólica que sigue la glucosa en el tejido muscular de los crustáceos, pero no pasa lo mismo en otros tejidos (Chang y O'Connor, 1983, review). También se ha visto una correlación entre la producción de lactato y la glucólisis, i.e., cuando se expone al aire a *C. maenas* y *O. limosus* se produce lactato como respuesta a la hipoxia, y se observa una movilización de glucosa a partir de las reservas de glucógeno, dependiente de CHH; como efecto final se produce una elevada tasa de glucólisis (Santos y Keller, 1993b). Se comprobó además que la inyección de glucosa causa, en *C. maenas*, un descenso tanto en los niveles de CHH como en la producción de lactato, lo que sugiere que la CHH posee un efecto modulador de la glucólisis, no solo a través del incremento en la disponibilidad de glucosa, sino también actuando de una forma más directa sobre la vía glucolítica (Santos y Keller, 1993a). La estimulación por CHH de la glucólisis de forma directa no explica sin embargo el efecto hiperglucemiante que se le otorga a esta hormona, e incluso ambos efectos parecen contradictorios. A este respecto, es importante destacar dos aspectos del modo de acción de la CHH. Primero, el incremento de los niveles de glucosa en hemolinfa se produce por el efecto de la hormona sobre una vía diferente a la vía glucolítica, que es la disminución en la utilización o en la captura de glucosa por los tejidos, y una reducción en la formación de glucógeno por inhibición de la glucógeno-sintetasa, y segundo,



solamente cuando la tasa de glucosa movilizada excede la utilización de esta glucosa mediante glucólisis, se observa un efecto hiperglucemiante de la hormona (Hohnke y Scheer, 1970; Keller y Orth, 1990; Santos y Keller, 1993c).

Por otra parte, la CHH ha mostrado ser una hormona multifuncional. Además de su papel en el metabolismo de la glucosa, parece también ser responsable de la captación de agua que ocurre durante el proceso de muda. Esta captación permite el hinchamiento necesario para una ecdisis satisfactoria y el subsiguiente incremento de tamaño luego de la muda. Chung y col. (1999) encontraron en *C. maenas* que durante la premuda tardía y la ecdisis se verificaba un incremento de 100 veces en los niveles de CHH, en comparación con su nivel en intermuda. Sorprendentemente, la fuente de esta CHH no era la glándula del seno, sino que provenía de paraneuronas ubicadas en el tubo digestivo tanto anterior como posterior. Cuando se inyectó CHH exógena justo antes del pico endógeno, se observó un precoz inicio de la captación de agua junto con una ecdisis acelerada. El aumento de la secreción de CHH en asociación con la ecdisis no produjo una marcada hiperglucemia, incrementándose sólo moderadamente los niveles de glucosa hemolinfática. Los trabajos de De Kleijn y Van herp (1998) sobre *H. americanus* demuestran que la CHH posee también actividad estimuladora sobre la reproducción. Existen dos isoformas de CHH en *H. americanus*, CHH-A y CHH-B, y cada una de ellas actúa en determinadas etapas del ciclo reproductivo, favoreciendo la vitelogénesis y la maduración ovárica; según Tensen y col. (1989) y Van Herp (1992), el neuropéptido estimularía la captura de macromoléculas como la vitelogenina por parte del ovario.

## SECCION III

### a.3. REPRODUCCION EN CRUSTACEOS

La inversión energética se canaliza primordialmente hacia dos procesos: reproducción y crecimiento. En los Brachyura, ambos procesos son claramente antagónicos. Así, los individuos reproductores que durante una parte del año invierten energía en reproducirse, el resto del año invierten su capital energético en el crecimiento.

Tanto el crecimiento como la reproducción se encuentran regulados endocrinamente, en particular por hormonas sintetizadas y secretadas en el sistema neuroendocrino órgano X - glándula del seno (Fingerman, 1987). La reproducción en los crustáceos decápodos involucra principalmente dos neurohormonas, una de ellas es la hormona inhibidora gonadal (GIH) sintetizada y secretada por el complejo OX-GS (Panouse, 1943) y la otra es la hormona estimulante gonadal (GSH), hallada en ganglio torácico y cerebro (Otsu, 1963; Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Fingerman, 1997), según se describe en las secciones precedentes. La GIH mantendría un nivel trófico reducido en los oocitos impidiendo la vitelogénesis secundaria, durante la cual la vitelogenina producida en los cuerpos grasos (o hepatopáncreas, dependiendo de la especie) es captada por los oocitos en maduración (Charniaux-Cotton, 1985; Charniaux-Cotton y Payen, 1985, 1988). Jugan (1985) propuso que la GIH competiría con la vitelogenina por los mismos receptores, localizados en la membrana oocitaria; se ha demostrado además una interacción entre la hormona inhibidora y las microvellosidades en la membrana del oocito, sitio donde ocurre la pinocitosis que permite el ingreso de vitelo (Jugan y Soyez, 1985). La GSH en cambio favorecería la incorporación de vitelogenina a las células foliculares oocitarias, beneficiando así el crecimiento gonadal (Adiyodi y Subramonian, 1983). Otsu (1963) fue el primero que sugirió la existencia de este factor estimulante, dado que la ablación de los pedúnculos oculares causaba el crecimiento ovárico en adultos del

cangrejo *Potamon dehaani*, pero no en juveniles; a partir de estos resultados hipotetizó que no sólo era requerida la ausencia de GIH para el crecimiento del ovario, sino también se necesitaría la presencia de una hormona estimulante. Cuando se implantaron ganglios torácicos de adultos en juveniles ablacionados de sus pedúnculos oculares, los ovarios comenzaron a madurar. Estos resultados han sido confirmados en diferentes especies de crustáceos, como *L. emarginata* (Hinsch y Bennet, 1979), *Paratelphusa hydrodromus* (Gómez y Nayar, 1965), *Paratya compressa* (Takayanagi *et al.*, 1986). Por otra parte, los extractos de ganglios torácicos extraídos durante el período reproductivo e inyectados estimulan el crecimiento del ovario en ejemplares intactos y ablacionados del cangrejo *U. pugilator*; mientras que los extractos correspondientes a cangrejos que se encontraban fuera de su período reproductivo eran capaces de inhibir el crecimiento ovárico, según Eastman-Reks y Fingerman (1984). La vitelogénesis secundaria, además de encontrarse bajo el control hormonal de GIH y GSH, estaría siendo regulada por otras sustancias como ecdiesteroides, ciertos esteroides ováricos y el metil farnesoato (Souty-Grosset, 1997).

Barchas y colaboradores (1978) definen a los neuroreguladores como compuestos que funcionan, o bien como neurotransmisores transfiriendo información desde una neurona a su adyacente, o bien como neuromoduladores, amplificando o disminuyendo la actividad de las neuronas. La **serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina)** es una sustancia que ha sido ampliamente reportada en plantas y animales. Diversos investigadores han detectado la presencia de 5-HT en crustáceos mediante la técnica de fluorescencia histoquímica Falck-Hillarp para monoaminas, en pedúnculos oculares, cerebro, conectivo circumesofágico y ganglio torácico (Fingerman y Nagabhushanam, 1997). Richardson y colaboradores (1991) reportaron que las hembras del cangrejo *U. pugilator*, inyectadas con diferentes dosis de 5-HT, presentaban un incremento en su desarrollo ovárico dependiente de la dosis inyectada del neurotransmisor. Cuando se les administraba a dichos cangrejos un factor bloqueante de los

receptores de 5-HT (LY53857), el desarrollo ovárico era menor que en los controles inyectados con solución salina. Estos resultados permiten hipotetizar que existe una 5-HT endógena con efecto estimulante sobre el desarrollo ovárico de *U. pugilator*, a través de un mecanismo indirecto que estaría favoreciendo la liberación de GSH o que impediría la liberación de GIH. En esta misma especie se ha reportado que la serotonina estimularía la secreción de GSH (Kulkarni y Fingerman, 1992), un resultado también observado en *P. clarkii* (Kulkarni *et al.*, 1992; Sarojini *et al.*, 1995b). Consecuentemente, la GSH actuaría estimulando la vitelogénesis y por lo tanto el crecimiento oocitario. En este caso la serotonina cumpliría el rol de neuroregulador, y de hecho ha sido empleado con éxito en estos crustáceos para inducir madurez gonadal; lo mismo ocurre con algunos de los moduladores de 5-HT, como la fenfloramina y la fluoxetina, potenciadores de la acción de 5-HT (Fingerman, 1997).

Con respecto al proceso de vitelogénesis, se sabe que en los decápodos puede involucrar dos etapas: la **vitelogénesis primaria** en la cual la proteína vitelina se sintetiza endogenamente, es decir, en el propio ovario (Charniaux-Cotton, 1985) y la **vitelogénesis secundaria**, caracterizada por el crecimiento sincrónico de los oocitos hasta alcanzar su máximo tamaño, por medio de la incorporación de vitelogenina exógena mediante micropinocitosis. La vitelogenina, producida en hepatopáncreas o tejido adiposo, se encuentra presente únicamente en la hemolinfa de las hembras, y corresponde al precursor de la vitelina oocitaria, siendo su incorporación un requisito esencial para la maduración oocitaria, ya que constituye entre un 60% y un 90% del total de las proteínas oocitarias. El origen exógeno de vitelina (vía precursor) en los crustáceos decápodos es consistente con una serie de evidencias. Primero, mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha detectado inmunoreactividad de vitelina en hepatopáncreas de *L. emarginata* y *C. maenas* (Paulus y Laufer, 1987) y en tejido adiposo subepidérmico de *P. serratus* (Meusy *et al.*, 1983; Tom *et*

*al.*, 1987), lo cual avalaría la implicancia de estos tejidos en la síntesis del vitelo. Otra interpretación a estos resultados, propuesta por Picaud (1980) y Fainzilber y col. (1992), es que estos datos podrían estar relacionados con un rol en la reabsorción de vitelina por parte de estos tejidos. En segundo lugar, se ha identificado vitelogenina en hemolinfa de varios decápodos (Meusy y Payen, 1988); se observan cambios en los niveles del precursor directamente asociados con la maduración ovárica (Byard y Aiken, 1984; Derelle *et al.*, 1986; Okumura *et al.*, 1992). Por último, estudios de ultraestructura muestran la presencia de vesículas pinocitóticas cargadas con vitelo en el oolema, así como sitios específicos de unión de vitelogenina en la membrana de oocitos vitelogénicos en las especies *H. americanus* y *O. limosus* (Charniaux-Cotton, 1980; Laverdure y Soyez, 1988; Jagan y Van Herp, 1989), lo que sugiere una captación de vitelogenina en oocitos mediada por receptor. Sin embargo, también es fuerte la hipótesis de la síntesis ovárica de vitelina, demostrada claramente en varias especies de decápodos, como cangrejos, camarones y langostas de agua dulce (Lui y O'Connor, 1977; Eastman-Reks y Fingerman, 1985; Yano y Chinzei, 1987; Browdy *et al.*, 1990). Lo que no está confirmado aún es que tipo celular es el responsable, aunque las células foliculares (Yano y Chinzei, 1987) son un buen candidato. También se observó, mediante estudios de ultraestructura ovárica, que el propio oocito sería capaz de sintetizar vitelina (Hinsch y Cone, 1969; Lee y Watson, 1995). Existen, además, una serie de trabajos donde se verifica, en peneidos, que ni el hepatopáncreas (Yano y Chinzei, 1987) ni el tejido adiposo (Fainzilber *et al.*, 1992) son una fuente extraovárica de las proteínas del huevo.

En muchos insectos el vitelo se sintetiza en los cuerpos grasos, pero también hay especies que presentan ambos sitios de síntesis de vitelo, el ovario y los cuerpos grasos, y están aquellas donde sólo el ovario se encarga de producir vitelina (Kanost *et al.*, 1990). Es evidente que los artrópodos emplean estrategias múltiples y especie-específicas en la síntesis de las reservas nutricionales del oocito.

Uno de los métodos más efectivos de estudio del estado reproductivo de los invertebrados marinos es la determinación del grado de maduración gonadal (Giese y Pearse, 1974), que puede evaluarse desde el punto de vista macroscópico (color, peso y forma) y/o microscópico (mediante secciones histológicas), pudiéndose realizar observaciones cualitativas y cuantitativas sobre el estado reproductivo del grupo de individuos observados. El Índice Gonadosomático (IG) es uno de los métodos cuantitativos más utilizados para la estimación de la actividad reproductiva en varios grupos de invertebrados (Giese y Pearse, 1974), particularmente en crustáceos (Chu, 1995; Courtney *et al.*, 1995; Tsuchida y Watanabe, 1997). Usualmente se define al IG como la relación porcentual entre el peso gonadal fresco y el peso fresco del animal entero. La determinación del IG permite comparar la condición reproductiva de animales de tallas variables y permite evaluar el incremento relativo de peso ovárico, cuando se realizan por ejemplo ensayos de inducción del crecimiento gonadal en hembras. Dado que el incremento en peso del ovario ocurre por un incremento en el crecimiento oocitario durante la fase de vitelogénesis secundaria, el IG se utiliza como un indicador de madurez ovárica (López Greco *et al.*, 1997).

## SECCION IV

### a.4. METALES PESADOS. GENERALIDADES

Los metales pesados suelen encontrarse en niveles traza en los ambientes naturales, es decir, en concentraciones de 1000 ppb ( $\mu\text{g/l}$ ) o inferiores, pudiendo movilizarse entre los distintos componentes de la ecósfera. Debido a fenómenos naturales y a la actividad humana, pueden ocurrir excesos en los niveles traza de los metales. Una vez que están disponibles en el ambiente, no se movilizan con rapidez ni experimentan detoxificación rápida a través de actividades metabólicas, y por lo tanto, se van acumulando. Las características fisicoquímicas de los diferentes ambientes también influyen; por ejemplo, los ecosistemas marinos son mucho más estables que los ecosistemas de agua dulce o los estuariales, y además son menos susceptibles a la acción antropogénica, siendo muy reducida la movilidad de los contaminantes (Paasivirta, 1991).

La exposición a un metal pesado en muy bajas concentraciones puede generar efectos biológicos nocivos (Rainbow, 1993). Se agrupa a los metales pesados en *esenciales* (como el  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Se}^{++}$  y  $\text{Cu}^{++}$ ), imprescindibles en determinados procesos metabólicos, y *no esenciales* (como el  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$  y  $\text{Pb}^{++}$ ), a los que no poseen función alguna en los procesos metabólicos de los organismos (Viarengo y Nott, 1993, Rainbow, 1993; Nagabhushanam *et al.*, 1998).

Un metal pesado puede ingresar al organismo si se encuentra en una forma biodisponible, que en general suele ser el ión metálico libre. En particular, el medio acuático presenta metales traza en distintos estados (inorgánicos, libres y orgánicos acomplejados a ligandos), cuyas concentraciones relativas se encuentran en un equilibrio dependiente de las características físico-químicas del medio acuático (Jonnalagadda y Prasada Rao, 1993, Rainbow *et al.*, 1993). En el ambiente marino, la forma biodisponible de diferentes metales

pesados se encuentra por lo general en una proporción muy baja respecto de las otras especies químicas. Pero no ocurre lo mismo en los cuerpos de agua dulce, donde los metales pesados se encuentran biodisponibles en mayor grado; esto se debe principalmente a una menor concentración de  $\text{Cl}^-$  presente en este ambiente, el cual actúa como acomplejante o quelante del metal. Con respecto a los quelantes orgánicos, debido a la variabilidad en la cantidad de materia orgánica proveniente tanto de productos de degradación como de desechos de organismos vivos, las concentraciones relativas son más difíciles de predecir en los distintos cuerpos de agua, y en especial en el agua dulce (Ray, 1984; Rainbow, 1993).

En los invertebrados acuáticos, los metales pesados pueden ingresar al organismo por distintos mecanismos, existiendo también diversos patrones de bioacumulación y de regulación de la concentración del metal que involucran, entre otros, a procesos tales como la excreción. Tales mecanismos y patrones dependen, entre otros factores, de la especie animal en estudio (su estadio, sexo, edad), del metal pesado que ingresa y de su concentración y tiempo de exposición, y finalmente de las características físico-químicas del medio externo (Nagabhushanam *et al.*, 1998). La dinámica de un metal pesado en contacto con un organismo presenta tres fases: 1) ingreso del metal, 2) transporte, distribución e inmovilización del metal dentro del organismo, y 3) excreción del metal (que puede o no ocurrir). De la relación entre estos procesos surge el patrón de acumulación del metal pesado en el organismo (Rainbow y Dallinger, 1993).

El sistema respiratorio (branquias) y el sistema digestivo son los principales sitios de ingreso de los metales pesados al organismo, siendo el transporte pasivo, el transporte activo y la pinocitosis alguno de los mecanismos de ingreso involucrados. Por lo general, en los invertebrados marinos, la ruta de acceso de los metales pesados es el transporte pasivo a través de las branquias y del sistema digestivo (Rainbow, 1995). En contraste, la entrada de



los iones principales (como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ) requieren de bombas activas para atravesar la membrana celular (Rainbow, 1995).

Una característica propia de los metales pesados, que los diferencia de los iones principales arriba mencionados, es su elevada afinidad por los grupos sulfidrilo ( $\text{SH}_2$ ) y amino ( $\text{NH}_2$ ) de las proteínas. Los metales disueltos en el medio externo se unen pasivamente a proteínas de transporte en la membrana y por difusión facilitada (pasiva) ingresan a través de ésta a la célula. El flujo de salida de la célula se encuentra limitado por la compartimentalización y por el exceso de sitios de unión no difusibles con alta afinidad a metales pesados (ej. metalotioneínas). Cambios en el número o la afinidad de los transportadores de membrana, así como una variación en la permeabilidad aparente de la membrana por el agua y los electrolitos, son algunos de los mecanismos de control que pueden manifestarse en los invertebrados ante el ingreso de metales pesados al organismo (Wright, 1977a; Chan *et al.*, 1992; Rasmussen y Andersen, 1996). También puede ocurrir el ingreso de metales pesados mediante transporte activo, por medio de ATPasas presentes en la membrana; es inevitable que iones libres de algunos metales pesados sean incorporados por las bombas de transporte que movilizan los principales iones. Esto se debe a que varios metales pesados poseen características químicas similares a las de los iones principales. En los invertebrados de agua dulce, es esperable que el transporte activo de metales pesados tenga un mayor peso que en ambientes marinos, ya que la actividad de las bombas (ATPasas) en la regulación iónica y osmótica en ambientes hiposmóticos se encuentra notoriamente aumentada.

Una vez ingresado al organismo, el metal pesado puede ser acumulado y/o regulada su concentración interna. Las diversas especies utilizan estrategias diferentes, desde regular la concentración del metal a través de la excreción y de los mecanismos de detoxificación hasta

la acumulación neta progresiva. Particularmente, en los invertebrados la regulación de la concentración del metal incorporado es mucho menos común que la acumulación progresiva (Rainbow, 1997); de todos modos, ambas estrategias poseen mecanismos detoxificantes destinados a evitar la posible acción tóxica del metal. Algunos de los mecanismos celulares mas comunes de detoxificación son la unión del metal a metalotioneínas y la formación de gránulos inertes de melanina; de esta manera se remueve el metal y se evita la interacción con posibles blancos intracelulares. Los tejidos u órganos de un mismo organismo alcanzan distintas concentraciones del metal, dependiendo de si éste es esencial o no, de si el tejido u órgano es capaz de regular su concentración o de acumularlo en forma temporaria o permanente, y del metabolismo tisular. En los invertebrados, uno de los órganos especializados en la detoxificación es el hepatopáncreas (Rainbow y Dallinger, 1993). Según Depledge y Rainbow (1990), la regulación de la concentración de un metal pesado en los invertebrados se encontraría en realidad restringida a unos pocos tejidos, mientras que los tejidos restantes serían meramente acumuladores. Como contracara de esto, se ha observado que los animales considerados acumuladores progresivos de metales, poseen ciertos tejidos capaces de regular su contenido en metales (Dallinger, 1993; Hopkin, 1993; Kraak *et al.*, 1993).

Cuando existe una regulación de la concentración interna de los metales pesados, la excreción de estos ocurre a través de las branquias, la orina, las heces o con la exuvia al mudar. Finalmente, la literatura publicada hasta el momento indica que la estrategia de regulación estaría restringida a los metales pesados esenciales y la de acumulación progresiva a los no esenciales (Rainbow y Dallinger, 1993; Rainbow, 1993, 1995).

#### a.4.1. CADMIO

Los metales pesados se consideran contaminantes persistentes, por cuanto no cambian fácilmente para transformarse en sustancias químicas inofensivas. El *cadmio*, al igual que el resto de los metales pesados, no se degrada a sustancias atóxicas una vez que ha ingresado al cuerpo de agua receptor, y por lo tanto se lo considera como un contaminante persistente (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990).

El *cadmio* es un metal no esencial para los organismos, tiene la capacidad de bioacumularse en los tejidos en altas concentraciones, asociándose a proteínas de bajo peso molecular (metalotioneínas) y puede biomagnificarse a través de la cadena trófica (Rainbow, 1988). Puede provenir de industrias galvanoplásticas, textiles, fábricas de polivinilcloruros (PVC), metalurgias, baterías de níquel-cadmio, pinturas y centrales nucleares (Paasivirta, 1991); se lo extrae a partir de minerales de zinc, especialmente sulfuro de zinc, y se lo utiliza a nivel industrial como agente antifricción, antioxidante y en aleaciones. Las descargas y combustión de muchos desechos urbanos e industriales causan emisiones de cadmio que crean una contaminación local o generalizada. En ambientes marinos, el cadmio puede provenir naturalmente de las actividades volcánicas y de erosión, y ser llevado por los vientos al encontrarse adsorbido al polvo (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990; Paasivirta, 1991). La concentración natural de cadmio en el agua de mar oscila entre 0,001 y 1,1 nmol/kg de agua (0,0001-0,1 µg/kg). Se lo encuentra comúnmente formando complejos con el cloro (por ejemplo,  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_3^-$ ), siendo la especie biodisponible la forma iónica libre  $\text{Cd}^{++}$ . El ión cadmio libre puede competir fuertemente con el ión calcio debido a sus similitudes químicas, ya que el  $\text{Cd}^{++}$  presenta un radio atómico (109 pm) semejante al del  $\text{Ca}^{++}$  (114 pm) e igual valencia que éste (Wright, 1977b, 1977c, Rainbow y Dallinger, 1993).

El ingreso de este metal en los crustáceos ocurre principalmente a través de las branquias, tanto por difusión facilitada (pasiva) como por transporte activo (mediante ATPasas), y se distribuye por el organismo circulando en la hemolinfa en competencia con otros cationes (Rainbow y Dallinger, 1993). Una vez ingresado, el cadmio interacciona con proteínas y provoca cambios conformacionales no funcionales o inhibe la actividad de éstas por unión a los puentes disulfuro (Gevondyan y Modyanov, 1994). Se han reportado una gran cantidad de cambios patológicos a nivel celular asociados a la necrosis celular por exposición al cadmio, siendo los más importantes: picnosis nuclear, desorganización mitocondrial, colapso de vesículas de Golgi y fragmentación del retículo endoplasmático (Serfozo, 1993).

Existen antecedentes en crustáceos referidos a la acción del cadmio sobre diversos sistemas, en particular en relación a una gran cantidad de cambios patológicos sobre el sistema nervioso central, el sistema endocrino, la regeneración de apéndices, el metabolismo de carbohidratos, la pigmentación corporal, los pigmentos retinales y la reproducción (Fingerman *et al.*, 1996, 1998). En particular, para distintos órganos endocrinos de crustáceos, se ha reportado una disminución de la síntesis o secreción de sus hormonas por la acción del cadmio y otros metales pesados (Fingerman *et al.*, 1996, Medesani *et al.*, 2001).

#### **a.4.2. COBRE**

El *cobre* es un metal esencial, a diferencia del cadmio, y es uno de los metales traza más abundantes. Se lo utiliza ampliamente en su estado metálico, ya sea en forma pura o en aleaciones. Se lo puede encontrar en concentraciones elevadas en el agua, en los sedimentos, en plantas y animales que habitan áreas cercanas donde existe actividad minera, o uso intensivo de las pellas de cobre en la cría de porcinos, o por la aplicación de fungicidas que contienen este metal. A diferencia del cadmio, no existen evidencias de su biomagnificación a través de la cadena trófica, y por consiguiente, la mayoría de los efectos tóxicos son debidos a la exposición inmediata al metal. Todos los organismos experimentan daños debido a concentraciones excesivas del metal, que pueden ser tan bajas como 0,5 ppm (mg/L) en el caso de las algas, o unas pocas ppm en la mayoría de los peces. En los animales superiores, los daños cerebrales son un rasgo característico del envenenamiento con cobre (Duffus, 1983).

El cobre se encuentra en el agua de mar en concentraciones bajas, oscilando entre 0,05 µg/L (aguas no contaminadas) hasta 810-1000 µg/L (aguas altamente contaminadas) (Department of Energy, USA, 1987). Como contaminante marino tiene gran importancia, dado que la aleación cobre-níquel se emplea para prevenir asentamientos de organismos sésiles; el sulfato de cobre es un importante alguicida de uso generalizado en Acuicultura, tanto para el control de la vegetación acuática como para inducir la muda en camarones y langostinos adultos (Department of Energy, USA, 1987; Scelzo, 1997). Una alta concentración en los ambientes costeros es el resultado de la actividad humana; los organismos acuáticos, en consecuencia, experimentan un contacto directo con esta contaminación, ya que utilizan su medio ambiente como fuente de oxígeno para la respiración, para beber, para el balance osmótico. También la biota acuática utiliza algunos

metales pesados esenciales como minerales traza, tales como el cobre, el zinc y el hierro, que son mantenidos a las muy bajas concentraciones requeridas por el organismo (Depledge y Rainbow, 1990). En particular, el cobre como metal traza esencial se requiere para determinadas funciones metabólicas; existen alrededor de doce proteínas relevantes que requieren de cobre como parte integral de sus estructuras, como por ejemplo la enzima respiratoria citocromo oxidasa (Hassall y Dangerfield, 1990); en los crustáceos, el pigmento respiratorio hemocianina (una de las proteínas mas abundantes) posee como componente de su sitio activo al metal cobre, que funciona como transportador de oxígeno (Dallinger, 1977; Truchot y Rtal, 1998). Sin embargo, metales como cobre y zinc se convierten en agentes tóxicos cuando alcanzan altas concentraciones (Department of Energy, USA, 1987 ; Munshi *et al.*, 1996; Scelzo, 1997; Rainbow y Dallinger, 1993). El cobre es potencialmente muy tóxico si la concentración interna de este metal excede la capacidad de los procesos fisiológico-bioquímicos de detoxificación (Rainbow, 1992). El límite entre el requerimiento y la toxicidad del metal cobre es muy delicado, y depende de una variedad de factores endógenos y exógenos (Weber *et al.*, 1992); y la tolerancia de los animales a los tóxicos varía también según factores endógenos (estadio del ciclo de vida, estado reproductivo y fisiológico) y exógenos tales como la temperatura, la salinidad y el pH (Naimo, 1995).

Existen algunos antecedentes en crustáceos referidos a la acción del cobre sobre varios procesos fisiológicos (Soegianto *et al.*, 1999); por ejemplo, este metal es un potente inhibidor de la actividad enzimática de la *anhidrasa carbónica* (Vitale *et al.*, 1999), causa hiperplasia celular, vacuolización y necrosis en laminillas branquiales (Nonnotte *et al.*, 1993) y además afecta la actividad cardíaca (Depledge, 1984). Sobre el metabolismo de carbohidratos, se ha observado que el cobre provoca una inhibición completa de las hexoquinasas, enzimas que catalizan la fosforilación de la glucosa durante la glucólisis (Agar y Smith, 1973). En cuanto a la reproducción y el desarrollo embrionario, se ha encontrado recientemente una elevada

toxicidad del metal cobre tanto en *C. granulatus* como en otras especies de crustáceos (Amin, 1995; Zapata *et al.*, 2001; López Greco *et al.*, 2001a,b).

#### **a.4.3. EFECTOS DE METALES PESADOS A NIVEL ENDOCRINO**

Los metales pesados pueden ejercer su acción tóxica a nivel de las estructuras celulares, de los tejidos u órganos evidenciándose cambios histopatológicos, sobre el sistema nervioso, sobre los procesos mediados por el sistema endocrino, sobre el comportamiento y en una gran variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos. Entre los procesos regulatorios más afectados por la presencia de metales pesados podemos citar la reproducción y el crecimiento, así como la síntesis y secreción hormonal; además, existe un claro efecto sinérgico entre metales pesados y agentes infecciosos, debido a la supresión de la respuesta inmune ocasionada por la presencia de contaminantes (Cooper, 1997).

Se ha observado que diversos factores de estrés pueden alterar la secreción hormonal en los crustáceos; existen algunos reportes en relación con la secreción de la hormona hiperglucemiante CHH (Fingerman *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996). Al respecto, se ha mencionado que el cadmio aumenta la secreción de CHH, probablemente en forma inespecífica ya que sus niveles también aumentan ante otros estresantes, quizá como respuesta secundaria dentro del síndrome general de adaptación al estrés. En este sentido, merece destacarse que la CHH, al igual que los glucocorticoides en los vertebrados, suministran al organismo el sustrato energético necesario para la defensa contra agentes injuriosos. En efecto, la CHH de crustáceos no sólo aumenta los niveles de glucosa en hemolinfa, sino que también favorecería la utilización de lípidos en ciertas situaciones (Schmitt y Santos, 1993a), que es un efecto típico de los glucocorticoides durante la fase de estrés (Mayer *et al.*, 1992).

Por otro lado, se ha visto que el cadmio podría disminuir la síntesis de CHH en la glándula del seno de manera aparentemente específica (Reddy *et al.*, 1996), lo cual podría esperarse a partir de la inhibición que el metal puede ejercer sobre enzimas involucradas en la vía de síntesis de la hormona. La interacción de los metales pesados con enzimas y proteínas estructurales ha sido ampliamente documentada, incluso en invertebrados (Rainbow y Dallinger, 1993).

Existen escasas evidencias sobre el efecto de estresantes en la secreción de otras hormonas de crustáceos. Weis (1978) reporta efectos de metales pesados sobre la muda y la regeneración de apéndices; trabajos más recientes, muestran estos mismos efectos sobre las especies *U. pugilator*, *U. pugnax* y *U. minax* luego de la exposición a metilmercurio y cadmio, así como atresia ovárica en *P. clarkii* inducida por exposición a naftaleno, el cual estaría inhibiendo en parte la liberación de GSH (Sarojini *et al.*, 1994). Un estudio previo de exposición de *U. pugilator* a naftaleno resultó en la acumulación de material neurosecretorio en el cerebro, que en parte podría tratarse de GSH (Deecaraman y Fingerman, 1985). Todos estos trabajos son muy recientes y sólo comprenden el ensayo de pocos tóxicos sobre un sólo tipo de secreción hormonal. Esos estudios han iniciado, sin embargo, el camino hacia futuros trabajos sobre los metales pesados como disruptores hormonales, cuyo campo de aplicación se enmarca claramente en la problemática ecotoxicológica e incluso tales estudios pueden ser de gran interés para la acuicultura de crustáceos.



## SECCION V

### a.5. LA ESPECIE EN ESTUDIO Y SU AMBIENTE

#### **Ubicación taxonómica de la especie en estudio (*Chasmagnathus granulatus*):**

Subphylum Crustacea, Clase Malacostraca, Subclase Eumalacostraca, Superorden Eucarida, Orden Decapoda, Suborden Pleocyemata, Infraorden Brachyura, Sección Brachyryncha, Superfamilia Grapsoidea, Familia Varunidae (Schubart *et al.*, 2002)

La especie de cangrejo en estudio se distribuye en forma discontinua desde Río de Janeiro, Brasil, hasta el Golfo San Matías en Argentina. Su principal hábitat son los estuarios o albuferas, que comprenden zonas costeras bañadas por aguas de salinidad intermedia debido a la mezcla de agua dulce proveniente del continente y al agua de mar. El **Estuario del Plata**, que comprende gran parte del litoral de la Provincia de Buenos Aires, es un ecosistema de alta productividad; el gradiente de agua salobre y las partículas de sedimento en suspensión, que son arrastradas por los ríos Paraná y Uruguay hasta la zona del Estuario, así como las corrientes de marea, crean un ambiente propicio para el establecimiento de numerosas poblaciones bentónicas (Boschi, 1964, 1988).

La zona de aguas salobres del Estuario del Plata se percibe a partir de aproximadamente la línea imaginaria que une Punta Brava (Uruguay) con Punta Piedras (35°26'S y 57°70'W, Argentina). De hecho, esta línea es considerada como el límite interno del sector externo del Estuario, siendo el límite externo la línea que une Punta Rasa (36°18'S y 56°48'W, Argentina) y Punta del Este (Uruguay).

Este sector externo contiene aguas salobres de variable salinidad según las mareas, los vientos y los aportes de agua dulce de la cuenca. La salinidad del agua del Estuario en esta

zona varía entre 0,5‰ y 30‰, y la superficie ocupada por estas aguas salobres se estima en unos 18.000 km<sup>2</sup>. En su margen derecha se encuentra la **Bahía Samborombón**, que se extiende desde Punta Piedras, al norte, hasta Punta Rasa, al sur (Boschi, 1988) (*Figura 4*). En la zona de Punta Rasa, la salinidad varía entre 10 y 25 ‰ dependiendo de la época del año, el estado de las mareas y los vientos predominantes (Urien, 1972). Varios cursos de agua dulce (naturales y artificiales) desembocan en Bahía Samborombón, entre los que se destacan por su caudal los ríos Salado y Samborombón, y los canales artificiales Nros. 9, 15, 2 y 1 (OEA, 1970).

Las variaciones fisico-químicas ambientales ocurren en el sector externo del Estuario en tiempos relativamente cortos, en comparación con los ambientes marinos que tienden a ser más estables. La magnitud y lo impredecible de tales variaciones, que involucran movimientos de masas de agua, cambios de salinidad, etc., caracterizan a los ambientes estuariales y tienden a limitar el número de especies vegetales y animales capaces de adaptarse a esas rigurosas y fluctuantes condiciones (Costanza *et al.*, 1993). Por estar la Bahía Samborombón localizada en el sector externo del estuario del Plata, recibe una gran influencia mareal (Rossi, 1982; Cousseau, 1985) que incide tanto sobre la dinámica depositaria de los sedimentos acarreados como sobre las variaciones de salinidad (Urien, 1972; Rossi, 1982). Los sedimentos, básicamente arcillosos, al flocular en aguas de salinidad elevada conforman las denominadas “llanuras fangosas” que constituyen el sustrato apto para el asentamiento del cangrejal. Toda la franja costera de esta Bahía se encuentra sujeta a la acción de las mareas; la pleamar introduce agua marina, que ingresa fundamentalmente por el fondo del Estuario, y la bajamar permite la dilución de la salinidad; este movimiento de aguas genera, para muchas de las especies acuáticas, situaciones críticas cuando los niveles de salinidad sobrepasan el umbral de tolerancia (Rossi, 1982). El clima que predomina en la región es templado-húmedo, siendo los valores promedio de temperatura para cada época del año de 18, 12, 17 y 25°C

(otoño, invierno, primavera y verano, respectivamente) (Rossi, 1982). La temperatura media anual es de 14,5°C, siendo la humedad relativa de 85% (Tricart, 1973), y el promedio anual de precipitaciones oscila entre 550-1.000 mm, con picos en marzo y julio-agosto. A lo largo del año predominan los vientos del N, NE y E, y en particular en invierno dominan los del O (Tricart, 1973; Rossi, 1982).

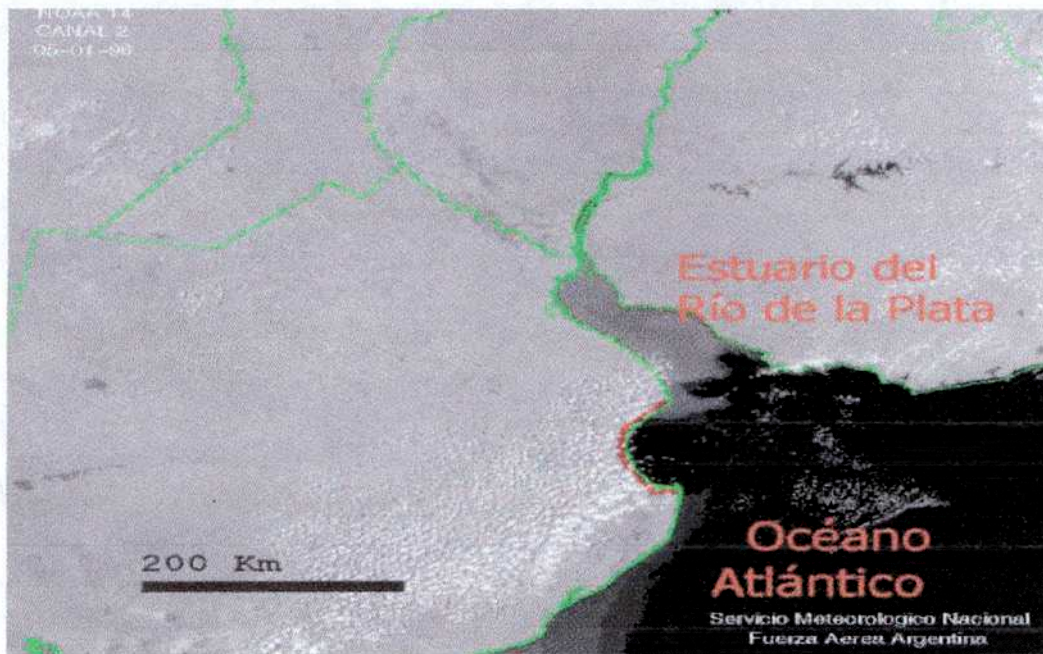
En la Bahía Samborombón ocurre una asociación particular entre las comunidades animales y vegetales, conformándose un ambiente de marjal (Rossi, 1982) que dada la predominancia de las especies de cangrejos que lo habitan, se conoce con el nombre de “Cangrejal Bonaerense” (Boschi, 1964). El cangrejal se extiende a lo largo de los 150 km de costa de la Bahía, y se prolonga además varios kilómetros tierra adentro por los canales de marea (Tricart, 1973) (**Figura 4**). En la bahía, *C. granulatus* es la especie más numerosa y conspicua y por lo tanto de una importancia ecológica relevante dentro de la comunidad del Cangrejal (Boschi, 1964). De esta especie se han llegado a registrar densidades de hasta 105 ejemplares / m<sup>2</sup> (Botto e Irigoyen, 1979); los adultos construyen sus cuevas en el sustrato limo-fangoso característico de los pisos supra y mediolitoral de la Bahía (Botto e Irigoyen, 1979; Rodríguez, 1991). En el supralitoral, *C. granulatus* convive con el cangrejo violinista *Uca uruguayensis*, mientras que en el piso infralitoral del cangrejal habita una especie netamente acuática, el cangrejo *Cyrtograpsus angulatus*. La flora asociada a esta comunidad está representada por especies halófitas; en la zona costera dominan los espartillares formados por *Spartina alterniflora*, y en los bañados y áreas anegadas se encuentran *Spartina densiflora*, *Distichlis spicata* y *Salicornia ambigua* (Botto e Irigoyen, 1979; Rossi, 1982) (**Figura 5**).

La Bahía presenta en su ambiente acuático otras especies animales, principalmente peces, entre los que se destacan *Odontotestes argentinensis* (pejerrey), *Mugil liza* (lisa), *Pogonias*

*chromis* (corvina negra), *Micropogonias opercularis* (corvina rubia), *Macrodon ancylodon* (pescadilla) y *Paralichthys brasiliensis* (lenguado) (Menni, 1983). Además, la zona costera es frecuentada por aves acuáticas tales como el cisne de cuello negro, el ganso blanco y el flamenco, chorlos, becasinas, cachirlas y varias especies de gaviotas. Nutrias, carpinchos, vizcachas y gato montés completan la fauna del lugar (Rossi, 1982). Algo para destacar es la actividad carcinófaga tanto de peces (algunos de importancia pesquera) como de ciertas aves, que predan sobre distintos estadios del ciclo de vida de los crustáceos (Olivier *et al.*, 1972a, 1972b; Menni, 1983). El cangrejo *C. granulatus* ocupa un lugar de suma relevancia en la cadena trófica, ya que transfiere materia y energía desde el ambiente costero semiterrestre donde se alimenta, hacia el ambiente acuático donde forma parte de la dieta de peces y aves. El hábito alimenticio de la especie es omnívoro-detritívoro, con una dieta compuesta por restos de *Spartina spp.*, detrito, microflagelados, foraminíferos, diatomeas, ostrácodos, cianofíceas, insectos y otros crustáceos decápodos; también se ha observado un comportamiento carroñero de *C. granulatus* sobre peces y cangrejos muertos (Botto e Irigoyen, 1979).

La época reproductiva de *C. granulatus* se desarrolla durante los meses de septiembre a marzo (Rodríguez, 1991). Durante el período reproductivo, los adultos se aparean en el ambiente costero. La fecundación es interna, pudiendo la hembra almacenar los espermatozoides hasta el momento de la fecundación. Una vez producida la misma, el desove es retenido en los pleópodos de la hembra hasta la eclosión larval. Las hembras que quedan ovígeras migran al ambiente acuático al acercarse el momento de la eclosión larval, siendo probable que migren a aguas de temperatura y salinidad adecuadas para la eclosión y supervivencia de las larvas, tal como ocurre en otras especies de cangrejos (Cargo, 1958; Wolcott y Wolcott, 1982) y decápodos en general (Sandifer, 1973; Kennedy y Barber, 1981). De hecho, el primer estadio larval de *C. granulatus* (zoea I) presenta la mayor supervivencia a

salinidades altas (no menores a 30‰) y a temperaturas relativamente bajas, no mayores a 20°C (Boschi *et al.*, 1967). La cantidad de huevos maduros desovados y de larvas eclosionadas está en el orden de 30.000 por hembra (Bottto e Irigoyen, 1979; Rodríguez, 1991). Al completarse el desarrollo larval, que comprende cuatro zoeas y una megalopa (Boschi, 1979), se produce el retorno de la megalopa a la costa, donde muda al estadio de cangrejo I (primer estadio juvenil), de acuerdo al patrón descrito para los decápodos semiterrestres (Sastry, 1983). Se produce de esta manera el reclutamiento de los juveniles, que por sucesivas mudas y adquisición de madurez sexual en la llamada “muda puberal” (López *et al.*, 1997), alcanzan la condición de adultos, cerrándose así el ciclo. Dado que el desarrollo embrionario comprende de 24-25 días (López Greco y Rodríguez, 1999) y el desarrollo larval comprende 15 a 20 días (Boschi *et al.*, 1967), la muda de la megalopa a juvenil se verificaría mayormente dentro de la época reproductiva, pudiéndose encontrar en el ambiente costero distintos estadios de juveniles a lo largo del año (Bottto e Irigoyen, 1979). Los cangrejos adultos continúan mudando con una frecuencia anual (López Greco y Rodríguez, 1999), sobre todo los machos, presentando de esta manera una aneudisis no terminal y prolongando así su crecimiento durante toda su vida.



**FIGURA 4.** Imagen satelital que describe la ubicación de la Bahía Samborombón en el sector externo del Estuario del Río de la Plata. La franja roja indica la extensión del “Cangrejal Bonaerense” en la Bahía.



**FIGURA 5.** Imágenes del “Cangrejal Bonaerense”. Sitio de muestreo de la especie *Chasmagnathus granulatus*, en el Faro San Antonio (Punta Rasa) de San Clemente del Tuyú, provincia de Buenos Aires.

### **a.5.1. EL PROBLEMA ECOTOXICOLOGICO**

Tanto el Servicio de Hidrografía Naval Argentina como el Uruguayo realizaron un extenso trabajo de monitoreo en todo el estuario del Plata, cuyos resultados fueron dados a conocer a principios de los años noventa. Este trabajo muestra que la zona de agua más dulce (zona interna e intermedia del estuario) presenta una contaminación más importante en cuanto a metales pesados (cobre, zinc, plomo y cadmio), hidrocarburos (solubles y dispersos) y plaguicidas, que la zona externa del estuario. Esta última zona presenta en general los menores niveles de contaminantes disueltos debido a su dinámica, que conlleva la floculación de sedimentos producida por el ingreso de agua marina y el lixiviado de los sedimentos de fondo, lo que en general produce una baja concentración de metales pesados disueltos, que en cambio pueden encontrarse en concentraciones significativas adsorbidos al sedimento (Boschi, 1988; Villar *et al.*, 1998, 1999; Comisión Administradora del Río de la Plata 1990; Verrengia Guerrero *et al.*, 1993).

En el estudio mencionado, el cadmio superó en el 82 % de las muestras de agua el límite de protección para la vida acuática (0,2 µg/L), si bien los registros de cadmio en el agua del sector externo, donde están comprendidas las aguas de la Bahía Samborombón, indicaron niveles relativamente bajos en relación al resto del estuario (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990). No hay reportes acerca de la concentración de cadmio en sedimentos para la zona externa del Río de la Plata. Sin embargo, para la zona interna se ha reportado, hacia fines de los noventa, la presencia de cadmio en muestras de agua (hasta 2 µg de Cd<sup>++</sup>/L) y adsorbido a material particulado suspendido (<1 µg de Cd<sup>++</sup>/g de peso seco de la muestra) (Villar *et al.*, 1998), así como cadmio adsorbido a sedimentos (hasta 0,08 µg de Cd<sup>++</sup>/g de peso seco de la muestra) (Verrengia Guerrero *et al.*, 1993). Con respecto al cobre, en el 100 %

de las muestras analizadas, el metal superó el límite de protección para la vida acuática (Cuenca del Plata) (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990).

Para la especie en estudio se han realizado en trabajos previos análisis cuantitativos, por espectrofotometría de absorción atómica, de la concentración de cadmio total presente en distintos tejidos, habiéndose probado que los animales capturados en la zona estandarizada de muestreo (Faro San Antonio - Punta Rasa) se encuentran libres del contaminante (Bigi *et al.*, 1996).

Considerando que existe una tendencia general al aumento de la contaminación en todo el estuario del Río de la Plata, adquieren significado ecotoxicológico los estudios en laboratorio sobre toxicidad letal y subletal de contaminantes de probada presencia en el ambiente, sobre todo para una comunidad de organismos autóctonos y de ubicación funcional clave en el ecosistema, como lo es el Cangrejal Bonaerense. Sobre la especie *C. granulatus* se han realizado numerosos trabajos de efecto de contaminantes sobre distintos aspectos de su fisiología (Rodríguez y Pisano, 1993; Rodríguez y Medesani, 1994; Bigi *et al.*, 1996; Carvalho de Castilho, 1996; De Freitas Rebelo, 1996; Rodríguez Moreno *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1999; Kogan *et al.*, 2000; Rebelo *et al.*, 2000; Cahansky, 2001; Ferrer, 2001; López Greco *et al.*, 2001; Medesani *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001; Zapata *et al.*, 2001). En relación a metales pesados, y en particular al cadmio, los adultos de *C. granulatus* han demostrado una resistencia relativamente alta, en comparación con otras especies de crustáceos (Bigi *et al.*, 1996). Esto los convierte en agentes potencialmente peligrosos de transferir residuos de metales acumulados a los niveles tróficos superiores, magnificando el efecto; y además, queda definido un amplio rango de concentraciones para el estudio, en este modelo biológico, de los efectos subletales de los metales pesados.



## HIPOTESIS

*A) Los metales pesados en estudio (cadmio y cobre) provocan, a concentraciones subletales, un descenso en los niveles de glucosa hemolinfática al interferir con el control neuroendocrino de la glucemia.*

*A.1) El efecto de los metales consiste en inhibir la secreción de la hormona CHH, desde los pedúnculos oculares a la hemolinfa y/o en disminuir su síntesis.*

*A.2) Tanto cadmio como cobre interfieren con la actividad de la hormona hiperglucemiante, ya sea por interacción con los receptores de CHH en los órganos blanco, o por interferir con la vía de transducción de la señal hormonal.*

*B) Los metales pesados en estudio (cadmio y cobre) provocan, a concentraciones subletales, una disminución del índice gonadosomático al interferir con el control endocrino del crecimiento ovárico.*

*B.1) Ambos metales disminuyen la secreción de la hormona estimulante del crecimiento gonadal (GSH), desde el ganglio torácico.*

*B.2) Tanto cadmio como cobre interfieren con el efecto de otras hormonas estimulantes del crecimiento ovárico, extrapedunculares, tales como el metil farnesoato y la 17-hidroxiprogesterona.*

*B.3) Ambos metales aumentan la secreción de la hormona inhibidora gonadal (GIH), desde los pedúnculos oculares.*

*HORMONA HIPERGLUCEMIANTE  
DE CRUSTACEOS (CHH)*

*OBJETIVOS PARTICULARES*

*MATERIALES Y METODOS*

CAPITULO II

**EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA  
REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA GLUCEMIA**

**SECCION I. OBJETIVOS PARTICULARES (en correspondencia con las hipótesis planteadas y los experimentos detallados a continuación)**

A.1.1) Evaluar, en animales intactos, el efecto que producen los metales pesados sobre la glucemia, y su dependencia de la concentración aplicada.

A.1.2) Evaluar *in vivo* el efecto de los metales pesados sobre los niveles circulantes de glucosa en hemolinfa de machos adultos de la especie *C. granulatus*, tanto en animales intactos como ablacionados de sus pedúnculos oculares.

A.1.3) Evaluar la posibilidad de que exista una disminución de la síntesis de la hormona (CHH), por efecto de los metales pesados.

A.2) Determinar, mediante la inyección de CHH purificada, si los metales pesados en estudio interfieren con los receptores en los órganos blanco de dicha hormona, o bien interfieren en la vía de transducción de la señal hormonal.

## SECCION II. MATERIALES Y METODOS

### Consideraciones Metodológicas Generales:

Para estos experimentos se utilizaron cangrejos adultos machos recolectados en la playa del Faro San Antonio, límite sur de la Bahía Samborombón (36°18'S, 56°48'W), en los meses de Octubre y Diciembre de los años 1998 y 1999, y en el mes de Julio de 2001. Los cangrejos se trasladaron al laboratorio, donde permanecieron durante un mínimo de 15 días en aclimatación a una temperatura de 20°C ± 1°C, fotoperíodo de 14:10 (luz:oscuridad) horas, en peceras de vidrio con 3 litros de agua salina a 12 ‰, y fueron alimentados *ad libitum* dos veces por semana con alimento balanceado para conejos (Rodríguez *et al.*, 1992), efectuando la renovación del agua luego de 4 horas de iniciada la alimentación. Estas condiciones ambientales fueron las mismas que se mantuvieron luego, durante todos los ensayos de exposición crónica a ambos metales.

Finalizada la etapa de aclimatación los animales se asignaron a cada grupo experimental, en una pecera de vidrio con aireación continua conteniendo 5 litros de agua salina 12 ‰ limpia (grupo **control**), o agua salina con una concentración conocida del tóxico utilizado (grupo **expuesto**). Esa cantidad de agua por pecera permite cubrir totalmente a los animales, impidiendo que estos tengan contacto con el ambiente aéreo, de manera de minimizar el efecto de la emersión sobre la variable fisiológica a medir. En todos los casos, el agua salina fue preparada con sales para agua de mar artificial (Marinemix HW, Alemania) y declorinizada en tanques de agua.

### **A.1.1) Evaluación de la glucemia en animales intactos, a distintas concentraciones de metales pesados**

En este primer ensayo se utilizaron animales con un ancho medio de caparazón de  $29,04 \pm 0,12$  mm (n=142), conformando los siguientes grupos experimentales:

#### **Grupos Experimentales (TX = cadmio o cobre)**

**CT:** animales intactos en agua salina (n = 38)

**TX1:** animales intactos expuestos a (C1) (n = 39)

**TX2:** animales intactos expuestos a (C2) (n = 32)

**TX3:** animales intactos expuestos a (C3) (n = 33)

Para cada metal, (C1) (C2) y (C3) representan en orden creciente las tres concentraciones testeadas, que fueron: **0,1; 0,25; 0,5 mg/L** para cadmio, a partir de una solución stock de 1 g/L, y **0,05; 0,1; 0,25 mg/L** para cobre, a partir de una solución madre de cobre de 0,5 g/L. La exposición a los tóxicos fue crónica, de 14 días de duración, y a continuación se tomaron muestras de hemolinfa (200  $\mu$ l) con jeringa de 1 ml y aguja 27G, del 4<sup>to</sup> o 5<sup>to</sup> par de pereiópodos.

El contenido de glucosa en las muestras de hemolinfa se determinó mediante el método de la glucosa oxidasa (kit de Wiener Lab). Para esto, a 20  $\mu$ l de cada muestra se le agregaron 2 ml de reactivo de color del kit mencionado. Las muestras fueron luego incubadas durante 20 minutos en baño termostático a 37°C y a continuación se midió la absorbancia de cada una con espectrofotómetro UV/VIS (YASCO) a 505 nm. Los valores de absorbancia fueron luego transformados a miligramos (mg) de glucosa utilizando una curva estándar, y los resultados se expresaron por cada 100 ml de hemolinfa.

A partir de los resultados obtenidos en este ensayo, se seleccionaron para los ensayos siguientes (A.1.2., A.1.3. y A.2) una concentración de cadmio de 0,5 mg/L y una concentración de cobre de 0,1 mg/L, teniendo en cuenta tanto la hipoglucemia significativa que ambas concentraciones provocan, como el hecho de que éstas representan la misma fracción (1/50) de la CL50 aguda determinada en la especie en estudio (Bigi *et al.*, 1996; López Greco *et al.*, 2001).

### **A.1.2) Evaluación de la glucemia en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados**

Los animales utilizados en este segundo ensayo, recolectados en los meses de Octubre y Diciembre, registraron un ancho medio de caparazón de  $28,96 \pm 0,11$  mm (n=155), y fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales:

#### **Grupos Experimentales (TX = cadmio o cobre)**

**I-CT:** animales intactos en agua salina (n = 40)

**I-TX:** animales intactos expuestos al tóxico (n = 40)

**A-CT:** animales ablacionados en agua salina (n = 40)

**A-TX:** animales ablacionados expuestos al tóxico (n = 35)

Estos ensayos también fueron de exposición crónica a los metales ensayados, con una duración de dos semanas. Transcurrida esta etapa, a todos los animales de cada grupo experimental se les extrajo una muestra de hemolinfa (200 µl) de la articulación del 4<sup>to</sup> o 5<sup>to</sup> par de pereiópodos, utilizando una jeringa de 1 ml con aguja 27G. Posteriormente, todas estas muestras fueron analizadas para determinar el contenido de glucosa, utilizando el kit de

glucemia enzimática (Wiener Lab.) mencionado en el punto A.1.1), siguiendo el mismo protocolo de medición espectrofotométrica, así como la expresión de los resultados.

**Preparación de soluciones madre:** A partir de  $\text{CdCl}_2$  pro-análisis (p.a.), se preparó una solución madre de  $\text{Cd}^{++}$  de 2 g/L; se tomó una alícuota de 250  $\mu\text{l}$  por litro de agua, que fue agregada al medio salino de la pecera correspondiente (grupos expuestos) a fin de lograr la concentración deseada de 0,5 mg/L de cadmio. Con respecto al metal cobre, a partir de una solución p.a. de  $\text{CuSO}_4$  se obtuvo una solución stock de 0,5 g/L; se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  por litro de agua, la cual fue agregada a la pecera correspondiente a fin de lograr la concentración deseada de 0,1 mg/L de cobre.

**Ablación de los pedúnculos oculares:** Se aplicó una técnica quirúrgica simple; utilizando tijera de cirugía y previa crioanestesia del animal, se ablacionó cada pedúnculo ocular desde su base y se termocauterizó la herida. Se dejó transcurrir 48 horas entre la ablación de los pedúnculos de cada animal.

### **A.1.3) Efectos de metales pesados sobre la síntesis de la hormona hipergluceante CHH**

Los animales utilizados en este tercer ensayo presentaron un ancho medio de caparazón de  $28,96 \pm 0,11$  mm (n=155). Los grupos experimentales quedaron determinados de la siguiente forma:

**Grupos Experimentales (TX = cadmio o cobre)****Serie 1**

**CT:** animales intactos en agua salina (n = 30)

**TX:** animales intactos expuestos al tóxico (n = 40)

**Serie 2 (n = 15 / grupo)**

**SS:** animales intactos inyectados con solución salina de crustáceos

**EPO-CT:** animales intactos inyectados con extracto de PO del grupo **CT (serie 1)**

**EPO-TX:** animales intactos inyectados con extracto de PO del grupo **TX (serie 1)**

La **serie 1** contó con grupos experimentales crónicamente expuestos (dos semanas), que fueron utilizados al finalizar tal exposición para preparar los extractos de pedúnculos oculares que luego fueron inyectados en los animales de los grupos experimentales de la **segunda serie**, los cuáles en todo momento se mantuvieron en medio limpio. A todos los animales de los grupos experimentales de la **serie 2** se les extrajo, 60 minutos después de la inyección (tiempo suficiente para obtener una respuesta hiperglucémica en *C. granulatus* luego de administrar CHH, Nery *et al.*, 1993), una muestra de hemolinfa (200  $\mu$ l) de la articulación del 4<sup>to</sup> o 5<sup>to</sup> par de pereiópodos utilizando una jeringa de 1 ml con aguja 27G. Las muestras, a continuación, fueron analizadas para determinar el contenido de glucosa de acuerdo con el protocolo descrito en **A.1.1**).

Los grupos experimentales de la **serie 2** recibieron una dosis única (volumen de inyección = 50  $\mu$ l) de extracto de pedúnculo ocular o de solución salina de crustáceos (Cooke *et al.*, 1977), según correspondiese, en la base del 4<sup>to</sup> o 5<sup>to</sup> par de pereiópodos mediante jeringa de 1 ml con aguja 27G. El volumen inyectado contenía 0,5 equivalentes de pedúnculo ocular (un



equivalente corresponde al contenido de 1 pedúnculo). Los animales del grupo SS recibieron 50  $\mu$ l de solución salina, representando un control de inyección.

La preparación de las soluciones madre y la concentración utilizada de ambos metales, así como el procedimiento de ablación, siguieron el mismo protocolo descrito en **A.1.2)**.

**Preparación de los extractos de pedúnculo ocular:** Con los pedúnculos oculares provenientes de los animales de cada grupo experimental de la **serie 1**, se prepararon los extractos de PO que luego fueron inyectados en los grupos de la **serie 2**. Los PO se colocaron en una caja de petri de 6 mm de diámetro con un determinado volumen de solución salina para crustáceos; con bisturí se cortaron en pequeños trozos y se transfirieron a un homogeneizador de vidrio, donde fueron homogeneizados utilizando un émbolo con punta de teflón. Los homogenatos obtenidos fueron colocados en tubos eppendorf de 2 ml y centrifugados a 10.000g (10 minutos a 4°C) en centrífuga de mesada marca Eppendorf (5415D); el pellet se descartó y cada sobrenadante, que representa un extracto crudo del contenido peduncular, fue almacenado en un tubo eppendorf y colocado en freezer -20°C hasta su utilización.

## **A.2) Interferencia de metales pesados sobre la actividad de CHH en órganos blanco**

Los animales utilizados en este cuarto ensayo, con un ancho medio de caparazón de 29,47  $\pm$  0,33 mm (n=94) y un peso fresco promedio de 17,49  $\pm$  0,41 gramos (n=94), fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales:

**Exposición previa.** Se utilizaron en todos los casos cangrejos intactos.

**CT:** cangrejos en agua salina (controles) (n = 20)

**CD:** cangrejos expuestos a  $\text{Cd}^{++}$  (n = 40)

**CU:** cangrejos expuestos a  $\text{Cu}^{++}$  (n = 40)

Los animales expuestos recibieron la respectiva concentración de cada metal en el agua de dilución (0,5 mg/L de cadmio; 0,1 mg/L de cobre), a partir de una solución madre concentrada del metal correspondiente. El tiempo de exposición fue de dos semanas (14 días).

Concluida la fase de exposición, se pesó cada animal en balanza de precisión OHAUS Analytical Standard (0,1 mg), se midió su ancho de caparazón con calibre Vernier (precisión 0,02 mm) y se lo inyectó con solución salina (SS) o con una dosis conocida de hormona hiperglucemiante purificada de *Cancer pagurus* (donación del Dr. S.G. Webster). El volumen de inyección fue de 50  $\mu\text{l}$ , el cual se aplicó en la articulación del caparazón con la base del 4° o 5° par de pereiópodos, utilizando jeringa de 1 ml con aguja 27G, quedando conformados los siguientes grupos experimentales (en todos los casos se utilizaron cangrejos intactos):

**Grupos Experimentales (n = 10 / grupo) (TX = cadmio o cobre)**

**CT-SS** – cangrejos controles inyectados con solución salina para crustáceos

**CT-H2** – cangrejos controles inyectados con CHH (H2)

**TX-SS** – cangrejos expuestos a  $\text{Cd}^{++}$  o  $\text{Cu}^{++}$  e inyectados con solución salina para crustáceos

**TX-H1** - cangrejos expuestos a  $\text{Cd}^{++}$  o  $\text{Cu}^{++}$  e inyectados con CHH (H1)

**TX-H2** - cangrejos expuestos a  $\text{Cd}^{++}$  o  $\text{Cu}^{++}$  e inyectados con CHH (H2)

**TX-H3** - cangrejos expuestos a  $\text{Cd}^{++}$  o  $\text{Cu}^{++}$  e inyectados con CHH (H3)

Las dosis de CHH inyectadas fueron: H1=16 pmoles/cangrejo, H2=32 pmoles/cangrejo, H3=64 pmoles/cangrejo. La concentración inicial de CHH purificada de *Cancer pagurus* fue de 7,5 nmoles en 2,5 ml de solución salina de crustáceos y ácido acético 2 M, en relación 1:1. Luego de la inyección, los animales se sumergieron completamente en peceras con agua salina limpia. Transcurridos 60 minutos de la inyección, a cada animal se le extrajo una muestra de hemolinfa (200  $\mu$ l) de la articulación del 4<sup>to</sup> o 5<sup>to</sup> par de pereiópodos utilizando jeringa de 1 ml (aguja 27G). La glucemia se determinó mediante el procedimiento descrito en los ensayos anteriores.

## **ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS**

Para cada metal ensayado, los resultados obtenidos en las secciones **A.1.1** y **A.1.3** fueron analizados mediante ANOVA de un factor (tratamiento); mientras que los resultados de la sección **A.1.2** fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores (tratamiento y ablación), que también se utilizó para analizar los resultados de la sección **A.2** (factores: tratamiento e inyección). En todos los casos se efectuaron comparaciones planeadas (con respecto al control correspondiente), utilizando un nivel de confianza del 95% (Sokal y Rohlf, 1981). Se verificó la homogeneidad de varianza y la distribución normal; en caso de no cumplirse alguno de estos supuestos, se aplicó la transformación más adecuada.

*HORMONAS REPRODUCTIVAS*

*(GIH, GSH, 17PG, MF)*

*OBJETIVOS PARTICULARES*

*MATERIALES Y METODOS*

## CAPITULO III

### EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION

#### SECCION I. OBJETIVOS PARTICULARES (en correspondencia con las hipótesis planteadas y los experimentos detallados a continuación)

##### Objetivos relacionados con la Hipótesis B)

- Evaluar *in vivo* el efecto de cadmio y cobre sobre el crecimiento gonadal de hembras de la especie *C. granulatus*, durante los períodos reproductivo y prereproductivo, tanto en animales intactos como ablacionados de sus pedúnculos oculares.
- Evaluar *in vivo* la posibilidad de que exista una disminución en la síntesis de hormonas reproductivas pedunculares, por efecto de los metales pesados.
- Determinar, mediante ensayos *in vitro*, el efecto de los metales pesados sobre la secreción y/o sobre el modo de acción de las hormonas reproductivas, coincubando ovario con distintos órganos neuroendocrinos u hormonas, según se menciona a continuación:

**B.1)** Estudiar el efecto de los metales pesados sobre la secreción hormonal del ganglio torácico, coincubado con ovario.

**B.2)** Analizar la función de otras hormonas extrapedunculares (metil farnesoato y 17-hidroxiprogesterona) como estimulantes del crecimiento gonadal, determinando si los metales pesados alteran los efectos de ambas hormonas presentes en el medio de incubación.

**B.3)** Examinar el efecto de los metales pesados sobre la secreción hormonal del pedúnculo ocular, coincubado con ovario, descartando además la posible interferencia de los metales en la unión de la hormona a sus receptores y/o con el proceso de transducción subsiguiente.

**SECCION II. MATERIALES Y METODOS****ENSAYOS *IN VIVO***Consideraciones Metodológicas Generales:

Se recolectaron hembras adultas de la especie *C. granulatus* en la playa del Faro San Antonio, límite sur de la Bahía Samborombón (36°18'S, 56°48'W), en los meses de Febrero y Julio de los años 1999, 2000 y 2001. Las hembras se mantuvieron en laboratorio durante 21 días en aclimatación, previo al inicio de los ensayos, a una temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 14:10 horas (luz:oscuridad), salinidad del agua 12‰, y alimentación *ad libitum* dos veces por semana con alimento balanceado para conejos complementado con hígado de pollo. Estas condiciones fueron también mantenidas durante todos los ensayos realizados. Las hembras capturadas durante el período reproductivo fueron trasladadas al laboratorio en estado de ovigeras, para poder utilizarlas en los ensayos como hembras posovigeras con un crecimiento gonadal similar, lo más sincrónico posible. Por lo tanto, los grupos experimentales contaron con hembras con ovarios en incipiente remaduración, cuyo desove eclosionó previamente y sincrónicamente en laboratorio. Con respecto a las hembras capturadas durante el período prereproductivo, se sabía por estudios previos realizados en esta especie (López Greco y Rodríguez, 1999) que se encontraban en un estado avanzado de crecimiento ovárico, con ovarios en una activa vitelogénesis exógena (tal como fuera definida por Charniaux-Cotton y Payen, 1988). El ancho de caparazón promedio de las hembras utilizadas en estos ensayos fue de  $26,54 \pm 0,19$  mm, siendo el peso fresco promedio de  $9,55 \pm 0,31$  gramos (n = 560).

Se dispuso a los animales en una serie de grupos experimentales, dentro de peceras de vidrio conteniendo 3 litros de agua salina limpia (grupo **control**) o agua salina con una

determinada concentración del metal en ensayo (grupo **expuesto**), manteniendo una aireación continua artificial por medio de aireadores eléctricos. Los ensayos fueron de exposición crónica a cada metal (14 días), realizando la renovación de soluciones dos veces por semana luego de la alimentación. Las concentraciones de los metales ensayados fueron de 0,1 mg/L de  $\text{Cu}^{++}$ , como  $\text{CuSO}_4$  p.a., y 0,5 mg/L de  $\text{Cd}^{++}$ , como  $\text{CdCl}_2$  p.a., siendo ambas 50 veces menores a la concentración letal 50 (CL50) de 96 horas, obtenidas para la especie en estudio (Bigi *et al.*, 1996, López Greco *et al.*, 2001). Se prepararon soluciones madres de ambos metales; para el cobre, a partir de una solución madre de 0,5 g/L se tomó alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  por litro de agua salina contenida en la pecera. Para el metal cadmio se preparó una solución madre de 1 g/L, tomando alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  por litro de agua salina.

**Ablación de los pedúnculos oculares:** Para formar los grupos experimentales con hembras ablacionadas de sus pedúnculos oculares, previo al inicio del ensayo se aplicó una técnica quirúrgica simple, utilizando tijera de cirugía y anestesiando al animal en agua helada por 5 minutos; se ablacionó cada pedúnculo ocular desde su base, y se termocauterizó la herida, dejando transcurrir 48 horas entre la ablación de ambos pedúnculos de cada animal.

Se analizó, en todos los casos, el Índice Gonadosomático (IG) relativizando el peso fresco del ovario al peso fresco del animal, y el Diámetro Oocitario (DO) por observación microscópica, en ovarios de hembras expuestas a los metales cadmio y cobre en ambos períodos (reproductivo (**PR**) y prereproductivo (**PPR**)).

(IG): (peso fresco ovárico en función del peso fresco corporal) x 100

(DO): (diámetro mayor + diámetro menor) / 2

**Descripción del Procesamiento Histológico:** se efectuó un análisis del grado de crecimiento gonadal, utilizando una escala cualitativa que comprendió las categorías principales de 1) vitelogénesis primaria y 2) vitelogénesis secundaria. Para ello, las gonadas una vez extraídas y fijadas en líquido de Bouin durante 4 horas a temperatura ambiente, fueron secuencialmente deshidratadas colocándolas en etanol 70% v/v (20 minutos), etanol 90% v/v (20 minutos), etanol 96% v/v (20 minutos), etanol 96%:butanol (1:1 v/v, 30 minutos), butanol (30 minutos). Las piezas fueron finalmente incluidas en paraplast, cortadas en secciones de 5  $\mu$ m de espesor con micrótopo (MICROM HM 350), coloreadas con hematoxilina-eosina y montadas finalmente en portaobjetos esmerilados con bálsamo de Canadá.

Se cuantificó el tipo y porcentaje de oocitos presentes en los cortes, siguiendo la metodología utilizada en trabajos previos (López Greco, 1997). Se seleccionaron tres preparados por cada ejemplar, de cortes realizados a distintos niveles del ovario, midiendo en cada preparado el diámetro oocitario (DO) con microscopio binocular Carl Zeiss (modelo 63129, con ocular micrométrico 1/100 mm) en un total de 30 oocitos de cada categoría oocitaria arriba mencionada. Se calculó el diámetro oocitario medio considerando todos los DO obtenidos para cada grupo experimental. El porcentaje de cada tipo oocitario (previtelogénico / vitelogénico) se calculó a partir del mismo material histológico.



**- Evaluación del crecimiento gonadal en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados**

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

**Grupos Experimentales (n = 15 / grupo) (TX = cadmio o cobre)**

**I-CT:** cangrejos intactos control, en agua salina limpia

**I-TX:** cangrejos intactos, expuestos a cadmio o cobre

**A-CT:** cangrejos ablacionados de sus PO, en agua salina limpia

**A-TX:** cangrejos ablacionados de sus PO, expuestos a cadmio o cobre

Los animales de los cuatro grupos experimentales, transcurridas las dos semanas de exposición, se pesaron en balanza de precisión OHAUS Analytical Standard (0,1 mg), se tomó como medida de referencia el ancho de caparazón con calibre Vernier (150 x 0,02 mm), y a continuación se realizó una rápida disección de los ovarios. Para esto, se anestesió a los animales colocándolos en agua helada por 5 minutos, luego se levantó el caparazón tomándolo desde los laterales posteriores, despegándolo del resto del cuerpo por una sutura posterior ubicada en el primer segmento del pleon. Una vez expuestos los tejidos y vísceras, se extirparon los ovarios por completo con pinza de disección, se los montó en papel de aluminio y se midió el peso fresco. A continuación fueron fijados en solución de Bouin por 4 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron luego transferidas a etanol 70% (v/v), donde se preservaron hasta su posterior procesamiento histológico.

**- Efectos de metales pesados sobre la síntesis de hormonas pedunculares**

Para este ensayo, se utilizaron dos series experimentales. Una primera serie contó con grupos experimentales expuestos durante dos semanas, que fueron utilizados al finalizar la exposición para la preparación de extractos de pedúnculos oculares (EPO); estos extractos fueron inyectados en los animales de los grupos experimentales de la segunda serie, los cuales se mantuvieron en medio limpio durante otras dos semanas. En el transcurso de este último período, a todos los animales de la segunda serie se los inyectó una vez cada dos (2) días con 50 µl de EPO o solución salina (SS) para crustáceos (Cooke *et al.*, 1977), según protocolo de ensayo (ver abajo). La inyección se efectuó en la articulación del 4<sup>to</sup> o 5<sup>to</sup> par de pereiópodos utilizando una jeringa de 1 ml con aguja 27G.

**Grupos Experimentales (TX = cadmio o cobre)****Serie 1 (n = 40 / grupo)**

**CT:** cangrejos intactos, en agua salina limpia

**TX:** cangrejos intactos, expuestos al metal pesado correspondiente

**Serie 2 (n = 15 / grupo)**

**I-SS:** animales intactos inyectados con solución salina de crustáceos

**A-SS:** animales ablacionados inyectados con solución salina de crustáceos

**A-EPO-CT:** animales ablacionados inyectados con extracto de PO del grupo **CT (serie 1)**

**A-EPO-TX:** animales ablacionados inyectados con extracto de PO del grupo **TX (serie 1)**

A todos los animales de los grupos experimentales de la segunda serie, transcurridas las dos semanas del ensayo, se les extirparon los ovarios según procedimiento detallado en la sección anterior, y se utilizaron las mismas técnicas arriba descritas para medir los parámetros IG y DO (índice gonadosomático y diámetro oocitario, respectivamente).

ENSAYOS *IN VITRO*Consideraciones Metodológicas Generales:

Las hembras adultas utilizadas en estos ensayos fueron recolectadas en la playa del Faro San Antonio de la Bahía Samborombón en los meses de Febrero y Julio de los años 2000, 2001, 2002 y en Julio de 2003. Los animales se mantuvieron en laboratorio durante 21 días en aclimatación, previo al inicio de los ensayos, bajo las mismas condiciones detalladas en los ensayos *in vivo*.

Se utilizaron 10 hembras por grupo experimental, con un similar crecimiento gonadal; para ello se aplicó un criterio colorimétrico de madurez ovárica, determinado previamente para la especie en estudio (López Greco y Rodríguez, 1999). Los ovarios en la categoría colorimétrica TN (transparente-naranja) o N (naranja) fueron utilizados para los ensayos *in vitro*, mientras que aquellos que se encontraban en categorías posteriores, de mayor grado de crecimiento gonadal, fueron descartados. La coloración nos indica el estado vitelogénico del ovario, siendo TN y N categorías asociadas a una vitelogénesis temprana o primaria activa, con oocitos produciendo vitelo.

**Puesta a punto de la Técnica *in vitro*:** para poder determinar la temperatura y el tiempo óptimos de incubación del tejido ovárico en las hembras de *C. granulatus*, ovarios en vitelogénesis temprana fueron disecados, separados en porciones de 5-6 mm de longitud y colocados en viales con 2 ml de medio de cultivo M199 a pH 7,4 y 3  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -leucina. Evaluamos la incorporación del aminoácido radiactivo al contenido total de proteínas ácidas precipitables del ovario, a tres temperaturas (10, 24 y 30°C) y a cinco tiempos de incubación (2, 4, 8, 12 y 24 hs), basándonos en la metodología utilizada por Eastman-Reks y Fingerman

(1985) y por Kulkarni *et al.* (1991a), quienes estudiaron la síntesis proteica en ovario de *U. pugilator* y *P. clarkii*, respectivamente.

**En función de los resultados obtenidos en la puesta a punto de la técnica (Figura 20. Resultados), todos los ensayos *in vitro* realizados se efectuaron como se describe a continuación:**

**Descripción de la Técnica *in vitro* aplicada:** Los ensayos fueron realizados para evaluar la incorporación del isótopo radiactivo  $^3\text{H}$ -leucina a proteínas precipitables con ácido tricloroacético (TCA), en piezas de ovario aisladas de acuerdo a la metodología descrita por Kulkarni y colaboradores (1991a), como método directo de cuantificación del desarrollo oocitario.

Se disecó el ovario de cada animal, se lo cortó en pequeñas piezas (aproximadamente 1x 0,5 cm), y se colocó luego cada pieza en viales estériles de 10 ml, con 2 ml de medio de cultivo M199, enriquecido con L-glutamina y sales de Earle (Sigma Chemical Co.) y disuelto en solución salina para crustáceos (Cooke *et al.*, 1977), modificada para compensar las sales ya presentes en el medio de cultivo. Además, según trabajos previos (Sarojini *et al.*, 1995b; Rodríguez *et al.*, 2000), se agregaron 6 mg de penicilina-G por cada 100 ml de Medio 199 para prevenir el crecimiento de bacterias, y se ajustó el pH del medio de cultivo a 7,4 con 0,5 N de NaOH.

Junto con el trozo de ovario se incubó un tejido endocrino (ganglio torácico: GT ó pedúnculo ocular: PO), un tejido utilizado como control de tejido (músculo de la quela), o una alícuota de una alguna hormona (metil farnesoato: MF ó 17-hidroxiprogesterona: 17PG), según se detalla en cada ensayo. A todos los viales se les agregó una alícuota de 30  $\mu\text{l}$  de una

solución stock de 4,5-<sup>3</sup>H leucina (dilución 1:10 de 1 mCi/ml [37 MBq/ml] NEN Life Science, Inc.), con una actividad final en cada vial de 3 µCi. Además, se colocó en el medio de incubación una pequeña alícuota de solución madre de cada metal ensayado (grupos **expuestos**) o bien una alícuota de igual volumen de solución salina (grupo **control**). Los viales fueron incubados durante 24 horas en oscuridad total en un baño termostático Vicking (modelo Dubnoff) a una temperatura de 24°C y en agitación constante (50-60 rpm).

Al término del período de incubación, los ovarios fueron procesados según la metodología usada en estudios previos (Eastman-Reks y Fingerman, 1985): cada pieza ovárica fue retirada del medio de incubación y colocada en 2 ml de TCA 10% frío; luego fue secada con papel Tissue y pesada en balanza de precisión OHAUS Analytical Standard (0,1 mg). A continuación se transfirió cada muestra a un homogeneizador de vidrio / teflón y se la homogeneizó en frío. Cada homogenato obtenido se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml de capacidad, centrifugándolo a 5.000g durante 10 minutos a 4°C en centrifuga de mesada Eppendorf (5415D). El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 2 ml de TCA 10% frío, repitiéndose la centrifugación previa. Posteriormente, cada muestra fue filtrada en un aparato de vidrio de filtración al vacío Sartorius (modelo 16306/16315), colocado sobre kitasato de vidrio de 250 ml y conectado a una trampa de vacío de acero inoxidable. En el portafiltro Sartorius se colocó una membrana Millipore (GSWP 02500) de nitrocelulosa (0,22 µm de porosidad) que permitió retener las proteínas ováricas precipitadas con TCA.

Una vez filtrada la muestra, se realizaron tres lavados sucesivos agregando 1 ml de TCA, luego se retiró el filtro y se lo colocó en un tubo vial estéril dejándolo secar al aire por 1 hora. Transcurrido este tiempo, a cada vial se le agregaron 2 ml de solución centelladora (OPTIPHASE Hi Safe 2, Perkin Elmer Inc.) y se dejaron todas las muestras *over night* en heladera a 4°C. Finalmente se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H- leucina colocando los viales

en un contador de líquido de centelleo Beckman LS 230 (error < 10%), que permitió cuantificar las CPM (cuentas por minuto) incorporadas a cada muestra; estos datos fueron expresados por miligramo de ovario (CPM / mg Ovario).

**- Exposición de ovario a distintas concentraciones de los metales pesados utilizados (ensayos previos)**

Primera serie

Para determinar la curva dosis - respuesta de los metales sobre el tejido ovárico aislado, se probaron inicialmente tres concentraciones de cadmio y de cobre en el medio de incubación. Las concentraciones ensayadas para cada metal fueron: **0,1; 0,25; 0,5 mg/L** de cadmio (CD) y **0,05; 0,1; 0,25 mg/L** de cobre (CU), identificadas como C1, C2, C3, respectivamente.

**Grupos Experimentales (n = 10 / grupo) (TX = cadmio o cobre)**

**CT:** pieza de ovario en M199 limpio (control)

**TX1:** pieza de ovario en M199 + alícuota de cadmio o cobre (C1)

**TX2:** pieza de ovario en M199 + alícuota de cadmio o cobre (C2)

**TX3:** pieza de ovario en M199 + alícuota de cadmio o cobre (C3)

Segunda serie

Por otra parte, se coincubó ovario con músculo de la quela a las tres concentraciones de cadmio y cobre ensayadas previamente. Este experimento se efectuó para determinar si el tejido muscular interfiere o no con la incorporación de leucina por parte del ovario, a fin de validar la utilización de músculo como control de tejido, en los ensayos *in vitro* posteriores. Los estudios realizados en otras especies de crustáceos demuestran que la actividad del tejido

muscular incubado *in vitro* es baja, con una leve incorporación de radiactividad a las proteínas sintetizadas *de novo* (Lee y Watson, 1995). Es por ello que se lo suele utilizar como control de tejido cuando se evalúa el efecto de coincubar algún órgano endocrino o neuroendocrino con ovario.

### **Grupos Experimentales (n = 10 / grupo) (TX = cadmio o cobre)**

**M-CT:** pieza de ovario y músculo en M199 limpio

**TX1:** pieza de ovario y músculo en M199 + alícuota de cadmio o cobre (C1)

**TX2:** pieza de ovario y músculo en M199 + alícuota de cadmio o cobre (C2)

**TX3:** pieza de ovario y músculo en M199 + alícuota de cadmio o cobre (C3)

### **B.1) Efectos de metales pesados sobre la secreción hormonal del ganglio torácico**

Los ensayos *in vitro* previos nos permitieron establecer la concentración de cadmio y cobre a utilizar en los siguientes ensayos, seleccionando finalmente las mismas que fueron utilizadas en los ensayos *in vivo* (cadmio: 0,5 mg/L; cobre: 0,1 mg/L).

En este ensayo se analizó el efecto de cadmio y cobre sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-leucina a ovarios coincubados con un tejido neuroendocrino involucrado en la estimulación del crecimiento gonadal. Cada pieza ovárica fue coincubada con ganglio torácico (GT) o con una porción de músculo de la quela (control de tejido) de tamaño similar al GT.

**Grupos Experimentales (n = 10 / grupo) (TX = cadmio o cobre)**

**M-CT:** pieza ovárica + músculo, en M199 limpio

**M-TX:** pieza ovárica + músculo, en M199 + alícuota de cadmio o cobre

**GT-CT:** pieza ovárica + GT, en M199 limpio

**GT-TX:** pieza ovárica + GT, en M199 + alícuota de cadmio o cobre

**B.2) Interferencia de metales pesados con la actividad estimuladora de otras hormonas extrapedunculares, sobre el crecimiento gonadal**

A continuación, se determinó el efecto de los metales cadmio y cobre sobre otras hormonas extrapedunculares que regulan positivamente el crecimiento gonadal en los crustáceos. Se incubó el tejido ovárico con metil farnesoato (**MF**), hormona producida en el órgano mandibular, y con 17-hidroxiprogesterona (**17PG**), esteroide que es sintetizado por el propio ovario; las piezas ováricas y pequeñas alícuotas (< 20 µl) de 17-hidroxiprogesterona (Sigma Chemical Co.) ó metil farnesoato (suministrado por el Dr. Hans Laufer) fueron agregadas al medio de cultivo, según el siguiente diseño experimental:

**Grupos Experimentales (n = 10 / grupo) (TX = cadmio o cobre)**

**CT:** pieza ovárica + vehículo, en M199 limpio

**17PG:** pieza ovárica + 17-hidroxiprogesterona, en M199 limpio

**17PG-TX:** pieza ovárica + 17-hidroxiprogesterona, en M199 + alícuota de cadmio o cobre

**MF:** pieza ovárica + metil farnesoato, en M199 limpio

**MF-TX:** pieza ovárica + metil farnesoato, en M199 + alícuota de cadmio o cobre



Las dosis de 17-hidroxiprogesterona y de metil farnesoato fueron 1,5 y 15  $\mu\text{M}$  respectivamente, similares a las utilizadas en estudios previos *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2002a). El etanol absoluto (p.a., 99% pureza) fue utilizado como vehículo para disolver ambas hormonas, alcanzando una concentración final en el tubo vial de 9,4  $\mu\text{l/ml}$ .

**MF (metil farnesoato)**

PM: 250,4

Solución stock: 2 mg / 5 ml

Alicuota / tubo: 15  $\mu\text{l}$ Concentración en cada tubo: 15  $\mu\text{M}$ **17PG (17-hidroxiprogesterona)**

PM: 330,5

Sol. stock (SIGMA H5752): 1,98 mg

Alicuota / tubo: 15  $\mu\text{l}$ Concentración en cada tubo: 1,5  $\mu\text{M}$ **B.3) Efecto de metales pesados sobre la secreción hormonal del pedúnculo ocular.****Reversión del efecto por administración de extractos pedunculares**

Los ensayos *in vivo* mostraron un efecto significativo sobre los cangrejos ablacionados, causado por los metales pesados ensayados, que no se observó en los cangrejos intactos expuestos. Para poder explicar estos resultados nos propusimos desarrollar ensayos *in vitro* utilizando ovarios expuestos a cadmio y cobre, en presencia de tejido peduncular en el medio de cultivo, y determinar si existe interferencia de los tóxicos con la secreción hormonal desde los pedúnculos oculares. Esta interferencia fue evaluada a dos niveles:

- a) Como inhibición de la secreción de GIH.
- b) Como un bloqueo de los receptores de la hormona o de la vía de transducción de la señal hormonal.

En primer lugar, se midió la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a piezas ováricas coincubadas con pedúnculo ocular (PO) o con extracto de pedúnculo ocular (EPO) en medio limpio, para

probar la efectividad inhibitoria de este tejido sobre el crecimiento gonadal. En cuanto al extracto de PO, se utilizó una dosis equivalente al contenido de dos pedúnculos oculares (EPO(2)), coincubando la pieza ovárica con una alícuota de extracto de 100 µl, en medio de cultivo M199; de manera similar a los ensayos *in vitro* precedentes, se utilizó como control de tejido músculo de la quela de tamaño similar al PO.

**Grupos Experimentales (n = 10 / grupo)**

**(Serie control, en M199 limpio)**

**M-CT:** pieza ovárica + músculo

**PO-CT:** pieza ovárica + (1) pedúnculo ocular

**EPO(2):** pieza ovárica + 100 µl de extracto de pedúnculo ocular

A continuación, se evaluó el efecto de los metales pesados sobre el pedúnculo ocular, y la capacidad de los extractos de pedúnculo ocular para revertir esos efectos. Se coincubó cada pieza ovárica con un PO y alícuotas de los metales ensayados, y se probaron tres diluciones de EPO, quedando determinados los siguientes grupos experimentales:

**Grupos Experimentales (n = 10 / grupo)**

**(Serie expuestos a metales pesados, TX = cadmio o cobre)**

**M-CT:** pieza ovárica + músculo

**PO-CT:** pieza ovárica + (1) pedúnculo ocular

**PO-TX:** pieza ovárica + (1) PO + alícuota de  $Cd^{++}$  o  $Cu^{++}$

**PO-EPO(1/2)-TX:** pieza ovárica + (1) PO + alícuota de  $Cd^{++}$  o  $Cu^{++}$  + (0,5) equivalentes PO

**PO-EPO(1)-TX:** pieza ovárica + (1) PO + alícuota de  $Cd^{++}$  o  $Cu^{++}$  + (1) equivalente PO

**PO-EPO(2)-TX:** pieza ovárica + (1) PO + alícuota de  $Cd^{++}$  o  $Cu^{++}$  + (2) equivalentes PO

Los extractos se obtuvieron homogeneizando un determinado número de PO en 1 ml de solución salina de crustáceos (Cooke *et al.*, 1977), según la concentración de extracto que se deseaba obtener. En un homogeneizador de vidrio / teflón se prepararon los homogenatos, que fueron centrifugados durante 10 minutos a 10.000g en centrífuga Eppendorf (5415D) a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos en alícuotas de 500 µl a tubos eppendorf de 2 ml y colocados en freezer – 20°C hasta su utilización. Las tres dosis de extracto ensayadas fueron equivalentes al contenido de medio pedúnculo ocular (EPO1/2), 1 pedúnculo ocular (EPO1) y 2 pedúnculos oculares (EPO2).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

**Ensayos *in vivo* sobre Hormonas Reproductivas:** Para comparar el índice gonadosomático (IG) de los grupos experimentales (sección B), se utilizó un ANOVA de dos factores (tratamiento y ablación experimental), efectuando comparaciones planeadas de los tratamientos con el control correspondiente. El grado de confianza se fijó en un 95%, y se analizó la homogeneidad de varianza y la distribución normal de los datos. El diámetro oocitario (DO) de los diferentes grupos experimentales fue analizado con el mismo test estadístico (Sokal y Rohlf, 1981).

**Ensayos *in vitro* sobre Hormonas Reproductivas:** Los resultados obtenidos (secciones B.1, B.2, B.3) fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas de un factor (tratamiento), de acuerdo con el diseño experimental descrito en la Sección Materiales y Métodos. El grado de confianza establecido fue del 95%, y se determinó la distribución normal de los datos y la homogeneidad de varianza (Sokal y Rohlf, 1981).

## *RESULTADOS*

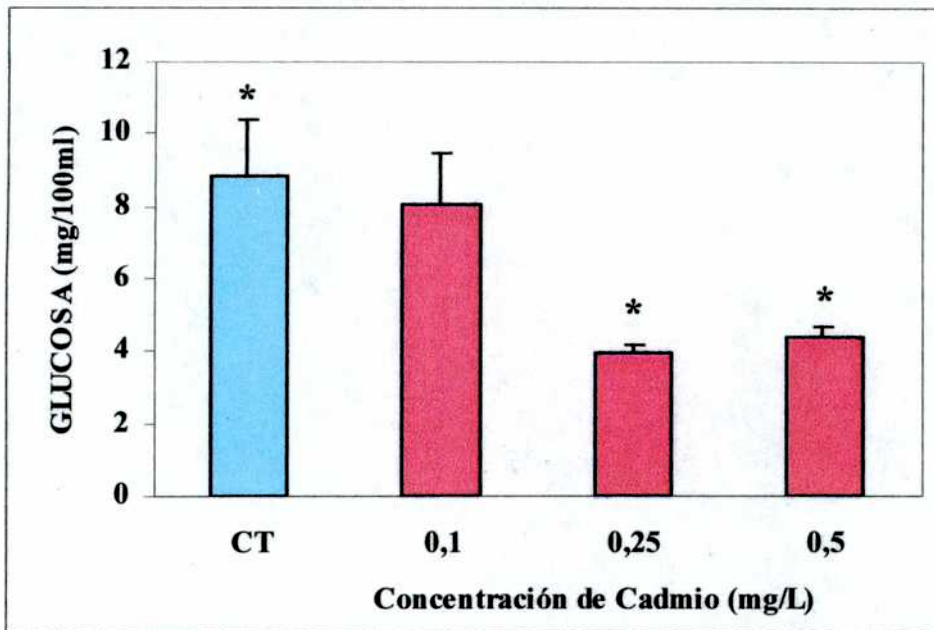
## CAPITULO IV

### RESULTADOS

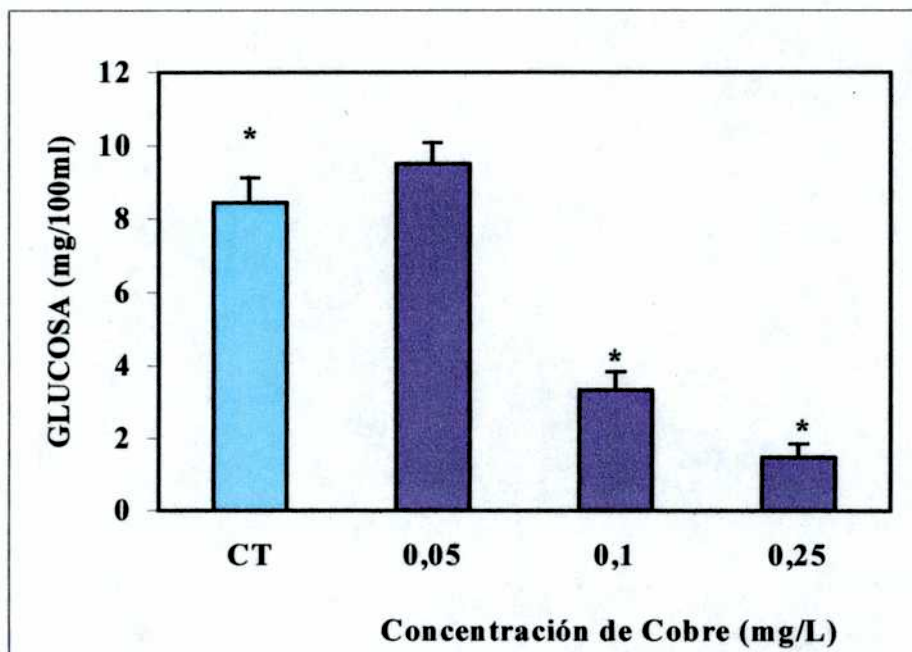
#### EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA GLUCEMIA

##### **A.1.1) Evaluación de la glucemia en animales intactos, a distintas concentraciones de metales pesados**

Los resultados de este primer ensayo verificaron en cangrejos intactos el efecto hipoglucemiante de ambos metales, por un lado, y permitieron evidenciar una típica relación dosis-respuesta, por otro. Para ambos metales, la concentración más baja ensayada no causó efecto hipoglucémico alguno, al no diferir significativamente ( $P>0,05$ ) el nivel de glucosa en la hemolinfa de los cangrejos expuestos con el nivel determinado en el grupo control. La exposición a 0,1 mg/L de cobre o cadmio mostró efectos diferentes según el metal, ya que a esta concentración de cadmio aún no se observa descenso en la glucemia, mientras que los animales expuestos a cobre se manifiestan claramente hipoglucémicos, difiriendo significativamente ( $P<0,05$ ) del grupo control. Las concentraciones de cadmio 0,25 y 0,5 mg/L, así como la concentración de cobre 0,25 mg/L provocaron un descenso significativo de la glucemia (*Figuras 6, 7*). En función de estos resultados, decidimos continuar exponiendo a los animales en los sucesivos experimentos a las concentraciones subletales de 0,5 mg/L y 0,1 mg/L de cadmio y cobre, respectivamente, teniendo en cuenta además que tales concentraciones representan unidades tóxicas similares para cada metal (1/50 de las respectivas CL50 agudas), según se comentara en Materiales y Métodos.



**FIGURA 6.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos expuestos a diferentes concentraciones de cadmio (curva dosis-respuesta). Barras verticales: error estándar. Símbolos iguales indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al control (CT). (CT, n = 18; 0,1 mg/L, n = 19; 0,25 mg/L, n = 16; 0,5 mg/L, n = 16).



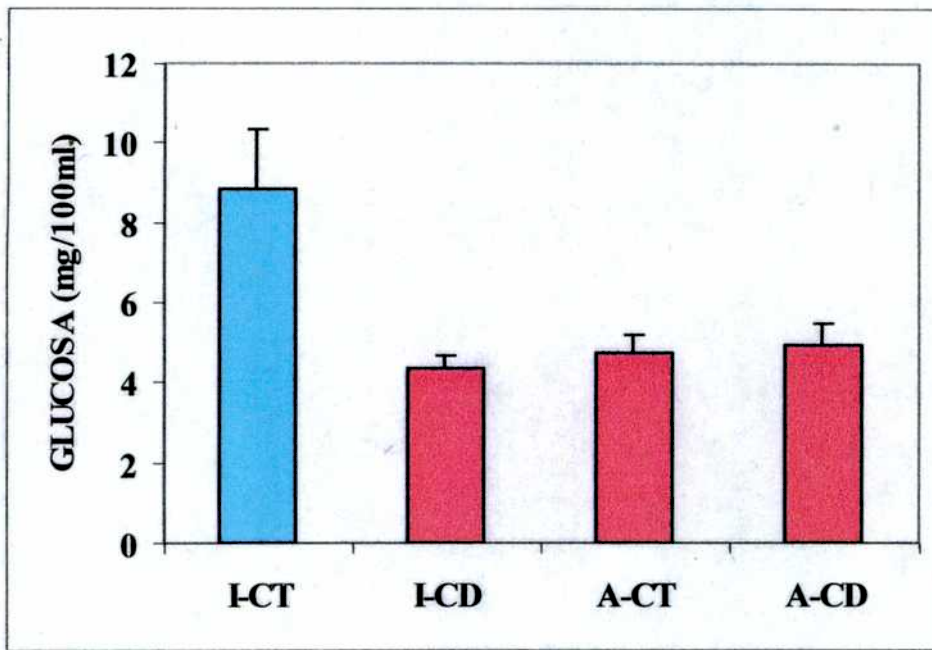
**FIGURA 7.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos expuestos a diferentes concentraciones de cobre (curva dosis-respuesta). Barras verticales: error estándar. Símbolos iguales indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al control (CT). (CT, n = 20; 0,05 mg/L, n = 20; 0,1 mg/L, n = 16; 0,25 mg/L, n = 17).

### **A.1.2) Evaluación de la glucemia en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados**

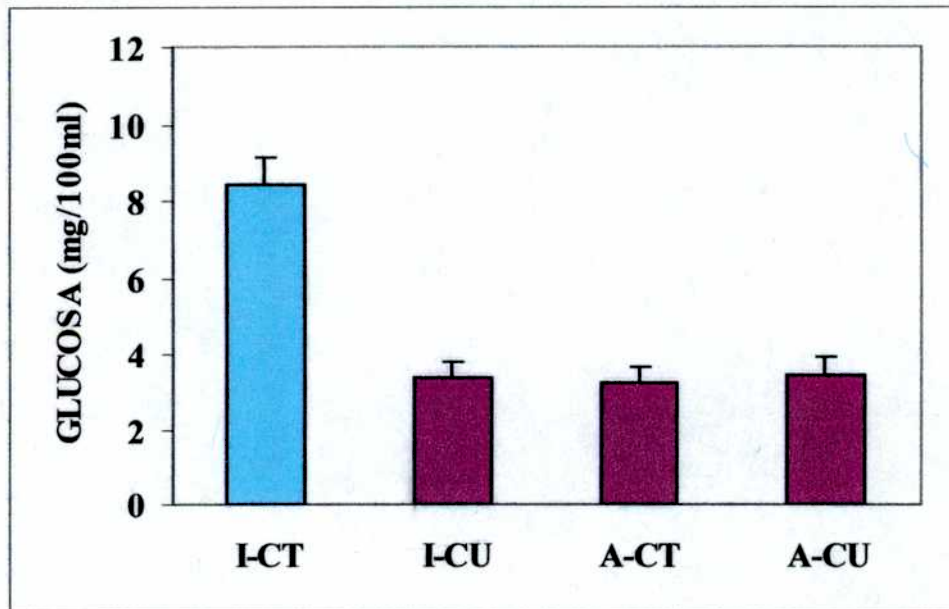
La exposición de cangrejos intactos a concentraciones subletales de cadmio y cobre (0,5 y 0,1 mg/L, respectivamente) causó sobre el nivel de glucosa circulante en hemolinfa un efecto similar al causado por la ablación de pedúnculos oculares. La glucemia registrada en animales intactos expuestos (**I-CD, I-CU**) fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) a la registrada en los cangrejos intactos no expuestos a los metales (**I-CT**), repitiendo el resultado obtenido en el primer ensayo (**A.1.1**). Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos ablacionados expuestos a cadmio o cobre (**A-CD** ó **A-CU**), con respecto al control ablacionado (**A-CT**). Finalmente, los animales intactos expuestos (**I-CD, I-CU**) evidenciaron un nivel de glucosa en hemolinfa estadísticamente similar ( $P > 0,05$ ) al medido en los cangrejos ablacionados de sus pedúnculos oculares (grupos **A-CT, A-CD** y **A-CU**). El descenso de la glucemia detectado en los cangrejos intactos expuestos y en los cangrejos ablacionados (controles y expuestos) fue de un 50 a 60 % con respecto al nivel de glucosa de los intactos controles (**I-CT**) (*Figuras 8,9*).

### **A.1.3) Efectos de metales pesados sobre la síntesis de la hormona hiperglucemiante CHH**

En estos ensayos, observamos un aumento significativo ( $P < 0,01$ ) de la glucemia en los grupos **EPO-CT** y **EPO-TX**, en comparación con el grupo control inyectado con solución salina (**SS**). La inyección de los extractos de pedúnculo ocular provenientes tanto de cangrejos mantenidos en agua salina limpia (**EPO-CT**) como de cangrejos expuestos a los metales (**EPO-TX**), causó una respuesta hiperglucemiante en los animales inyectados mantenidos en medio limpio, en los cuáles se midió un nivel de glucosa en hemolinfa 8 a 9 veces superior al determinado en el grupo control de inyección **SS** (*Figuras 10,11*).

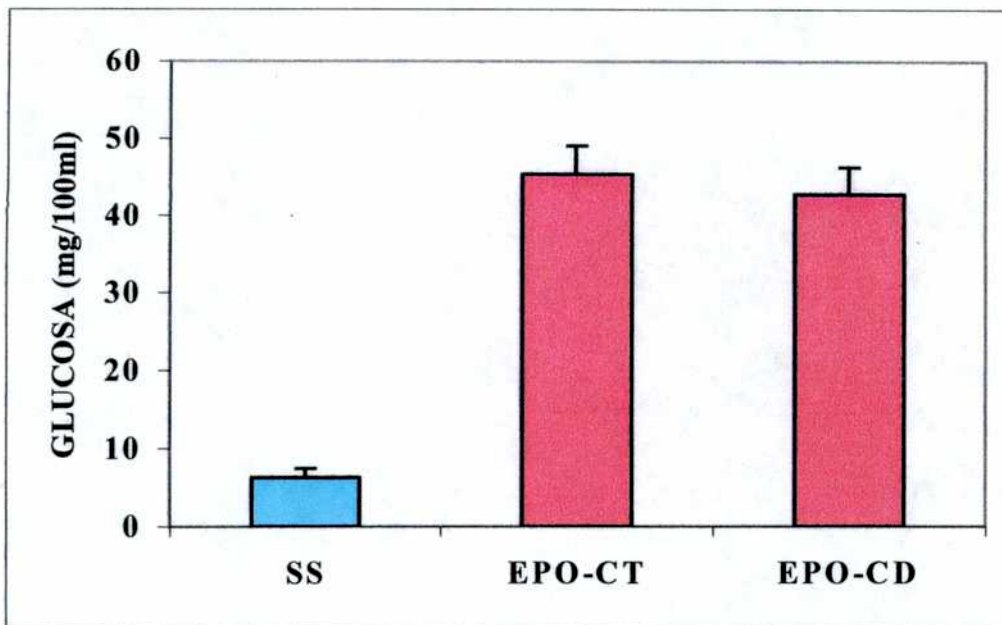


**FIGURA 8.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos (I) y ablacionados (A) de sus pedúnculos oculares, tanto controles (CT) como expuestos a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 20$ , por grupo experimental).

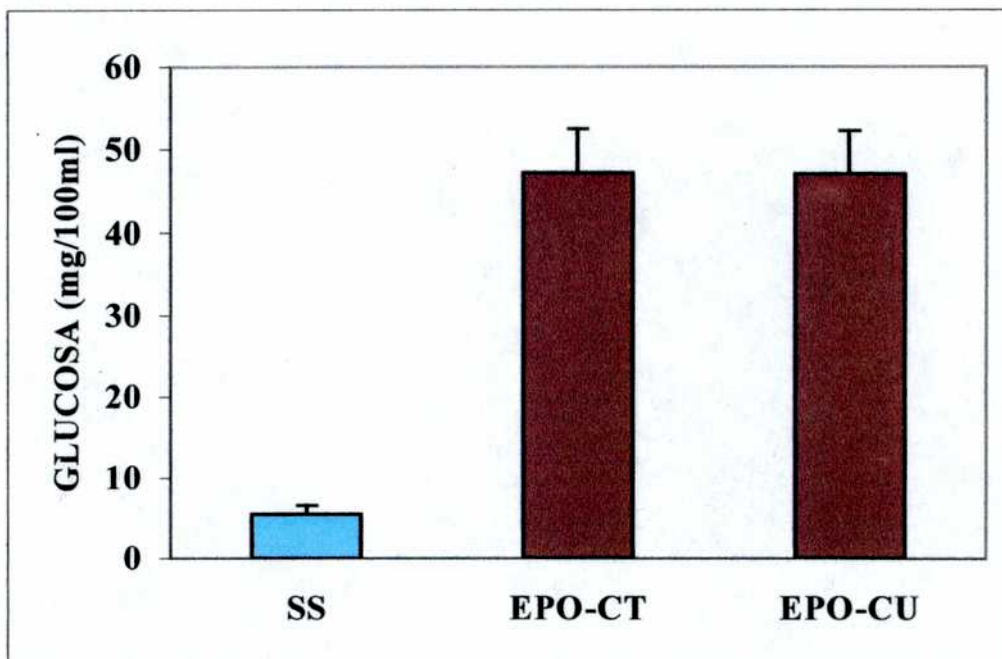


**FIGURA 9.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos (I) y ablacionados (A) de sus pedúnculos oculares, tanto controles (CT) como expuestos a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), (I-CT, I-CU, A-CT,  $n = 20$ ; A-CU,  $n = 15$ ).





**FIGURA 10.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos inyectados con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculos oculares (EPO) proveniente de animales controles (CT) ó expuestos a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental).



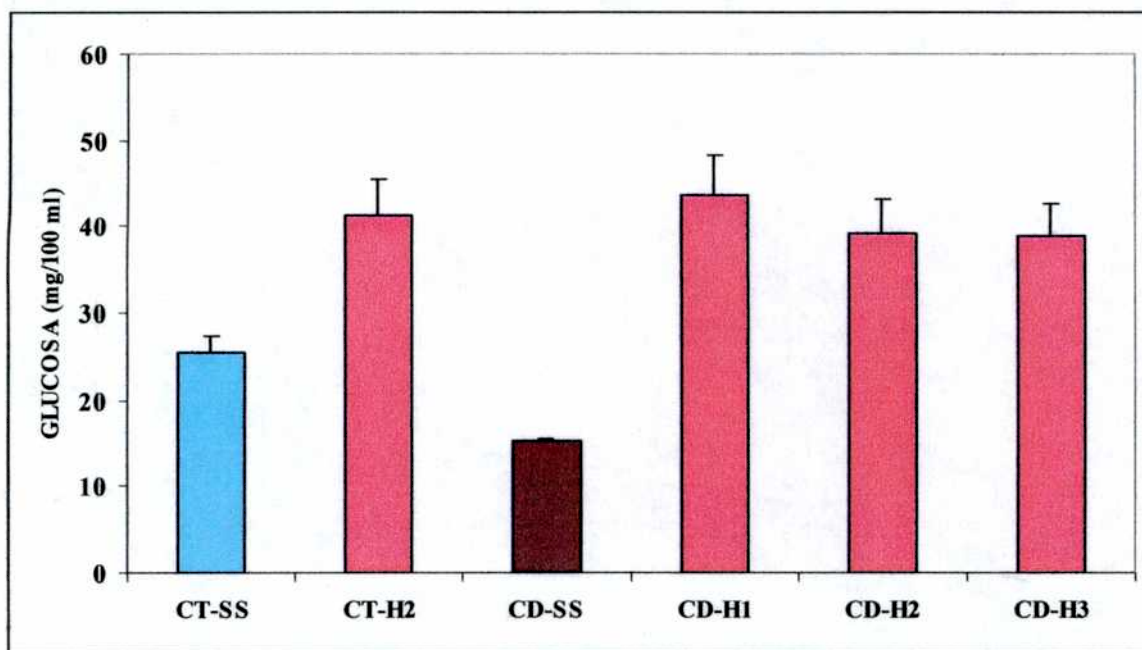
**FIGURA 11.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos machos intactos inyectados con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculos oculares (EPO) proveniente de animales controles (CT) ó expuestos a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental).

## **A.2) Interferencia de metales pesados sobre la actividad de CHH en órganos blanco**

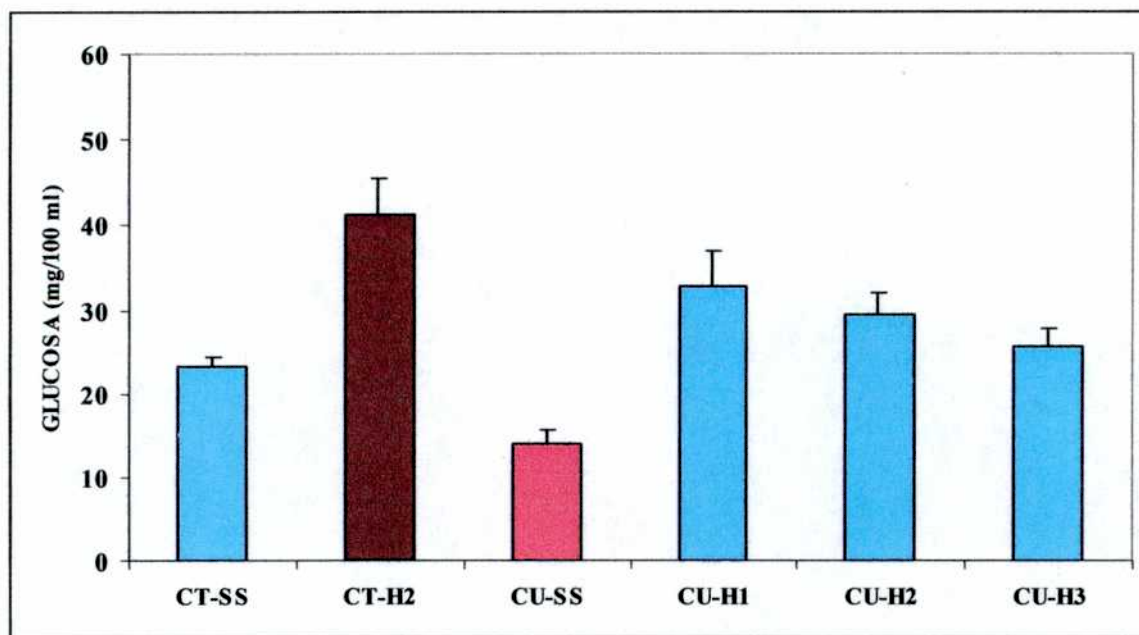
Los niveles de glucosa medidos en los animales intactos expuestos a los metales cadmio y cobre e inyectados con solución salina (TX-SS) mostraron, como era esperable, una marcada hipoglucemia hemolinfática por la exposición crónica a los tóxicos, en comparación con la glucemia del grupo control, inyectado también con salina (CT-SS). Los cangrejos controles inyectados con una dosis de 32 pmoles de CHH (CT-H2) evidenciaron un incremento de la glucemia del 62 % con respecto al grupo inyectado con solución salina (CT-SS), siendo este aumento significativo ( $P < 0,05$ ). Por otro lado, los animales previamente expuestos a cadmio y cobre e inyectados con diferentes dosis de CHH de *Cancer pagurus* (grupos TX-H1, TX-H2 y TX-H3) respondieron también positivamente a la hormona, si bien la glucemia alcanzó diferentes niveles de acuerdo con el metal ensayado, según se detalla a continuación..

Al inyectar las diferentes dosis de CHH en los grupos expuestos previamente a cadmio (CD-H1, CD-H2 y CD-H3), se produjo un incremento de la glucemia de entre 53 y 72 %, nivel que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) al medido en el grupo control inyectado con salina (CT-SS) y que no difirió significativamente ( $P > 0,05$ ) de la glucemia observada en el grupo control inyectado con hormona (CT-H2) (*Figura 12*).

Con respecto al cobre, las tres dosis inyectadas en los grupos expuestos previamente a este metal produjeron un nivel de glucosa en hemolinfa que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) al nivel medido en el grupo CU-SS, estadísticamente similar ( $P > 0,05$ ) al del control de inyección CT-SS, y significativamente menor ( $P > 0,05$ ) al detectado en el control inyectado con hormona, CT-H2 (*Figura 13*).



**FIGURA 12.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos intactos controles (CT) ó expuestos de manera crónica a 0,5 mg/L de cadmio (CD), e inyectados con solución salina (SS) ó con distintas dosis de hormona hiperglucemiante purificada de *Cancer pagurus* (H1=16 pmoles, H2=32 pmoles; H3=64 pmoles por cangrejo). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$  por grupo experimental).



**FIGURA 13.** Nivel medio de glucosa hemolinfática (mg/100ml) en cangrejos intactos controles (CT) ó expuestos de manera crónica a 0,1 mg/L de cobre (CU), e inyectados con solución salina (SS) ó con distintas dosis de hormona hiperglucemiante purificada de *Cancer pagurus* (H1=16 pmoles, H2=32 pmoles; H3= 64pmoles por cangrejo). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

**EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA  
REGULACION ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION**

**ENSAYOS *IN VIVO***

**- Evaluación del crecimiento gonadal en animales intactos y ablacionados, expuestos a metales pesados**

Período reproductivo. Evaluación del IG

Al analizar el índice gonadosomático obtenido para los cuatro grupos experimentales definidos (según se especifica en Materiales y Métodos), observamos por un lado, que el IG de los grupos I-CT e I-TX no diferían significativamente ( $P > 0,05$ ) entre sí, mientras que las hembras del grupo A-CT alcanzaron un IG medio significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) al medido en las hembras intactas control (I-CT); este último resultado demuestra el efecto inductor de la ablación sobre el crecimiento ovárico. Por otra parte, el índice gonadosomático medio del grupo A-TX fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que el correspondiente al grupo A-CT (*Figuras 14,15*).

Período reproductivo. Evaluación histológica de ovarios

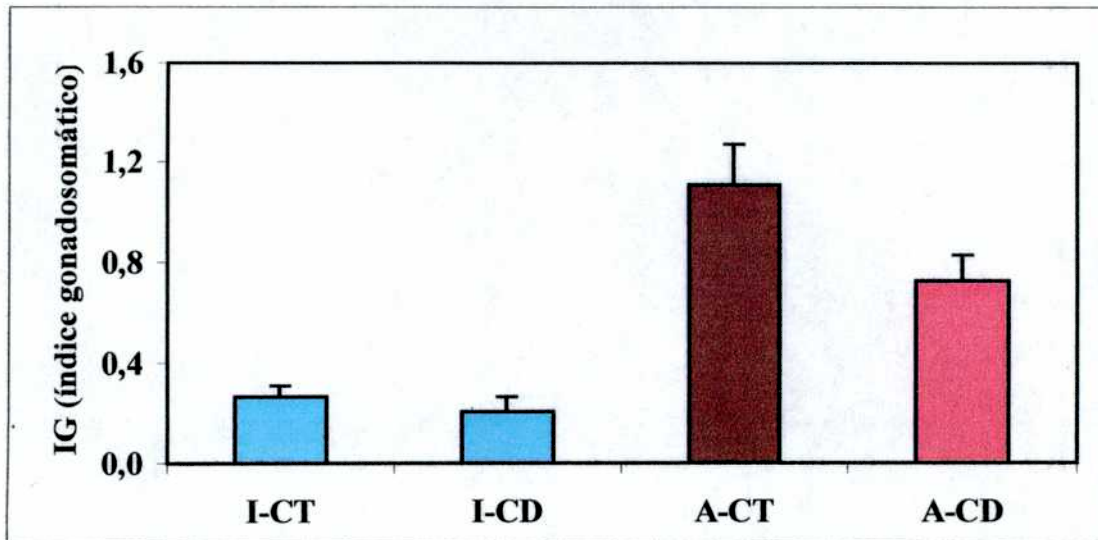
Los ovarios de hembras intactas, tanto controles como expuestas a los tóxicos (I-CT, I-TX), presentaron oocitos en la categoría de vitelogénesis primaria (oocitos previtelogénicos) casi con exclusividad, ya que los oocitos vitelogénicos fueron escasos. Entre el 97 y el 100 % de los oocitos contados en muestras representativas de los cortes histológicos eran previtelogénicos. Por el contrario, en ambos grupos ablacionados (A-CT, A-TX) se observó

claramente el efecto estimulador que produce la ablación sobre el crecimiento ovárico, encontrándose tanto oocitos en vitelogénesis primaria (previtelogénicos) como en vitelogénesis secundaria (vitelogénicos), modificándose notoriamente el porcentaje de cada tipo de oocito. La presencia de oocitos previtelogénicos descendió bruscamente, representando ahora entre un 34 y un 38 % del total de oocitos contados.

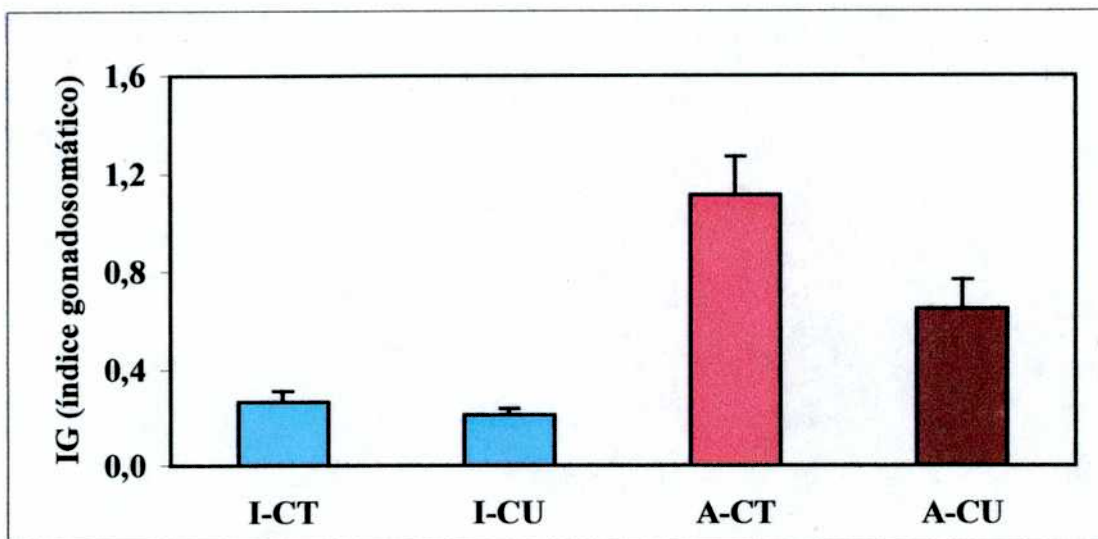
Al comparar los diámetros medios de los oocitos previtelogénicos entre los grupos intactos (I-CT, I-TX), ablacionados (A-CT, A-TX) y entre los controles intactos y ablacionados (I-CT, A-CT) no surgieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ); pero cuando se compararon los diámetros medios de oocitos vitelogénicos entre los grupos ablacionados (A-CT, A-TX), observamos que los oocitos vitelogénicos de hembras ablacionadas control presentaban un DO significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) al medido en hembras ablacionadas expuestas a cadmio o cobre (*Tabla 1*).

GRUPOS EXP.	DO (mm)	ES	COMPARACION ESTADISTICA	Tipo de Oocito	Porcentaje (%)
I-CT	0,0501	0,0021	A	Previtelogénico	96,90
I-CD	0,0555	0,0032			99,80
I-CU	0,0503	0,0009			100,00
I-CT	0,1024	0,0005	B	Vitelogénico	3,10
I-CD	0,0985	0,0005			0,20
I-CU	0,0914	0,0005			0,10
A-CT	0,0607	0,0021	A	Previtelogénico	38,50
A-CD	0,0582	0,0015			44,46
A-CU	0,0589	0,0010			34,54
A-CT	0,1292	0,0025	B	Vitelogénico	61,50
A-CD	0,1019	0,0030			55,54
A-CU	0,1115	0,0030			65,46

**Tabla 1.** Diámetro oocitario medio (DO) y porcentaje de oocitos previtelogénicos y vitelogénicos en hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el período reproductivo. ES = error estándar. CT = control, sin tóxico, CD = expuestos a 0,5 mg/L de cadmio, CU = expuestos a 0,1 mg/L de cobre. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo ( $P > 0,05$ ), (n = 15 cangrejos por grupo experimental).



**FIGURA 14.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el período reproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental).



**FIGURA 15.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el período reproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental).

Período prereproductivo. Evaluación del IG

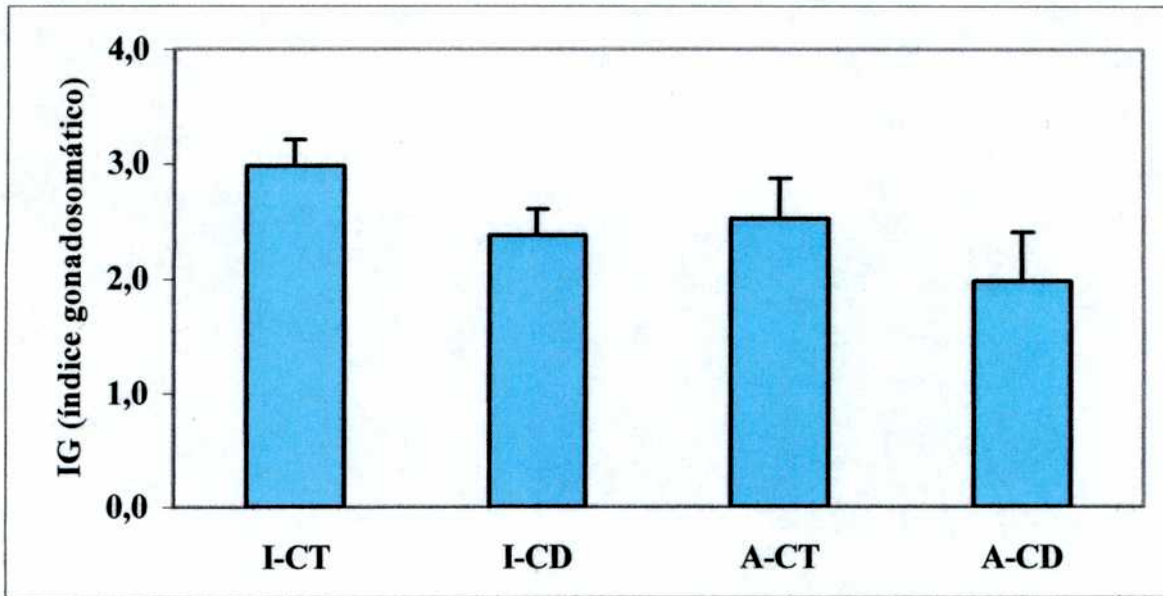
Los ensayos realizados en época prereproductiva, con hembras no ovígeras, nos permitieron observar que no existe un efecto del cadmio sobre el desarrollo gonadal durante este período, así como tampoco un efecto de la ablación de los pedúnculos oculares. Los ovarios de las hembras pertenecientes a los distintos grupos experimentales estaban avanzados en su desarrollo, apreciándose una tendencia en los grupos expuestos intacto y ablacionado al descenso del IG, en comparación con el control respectivo, si bien tal diferencia no alcanzó a ser significativa ( $P > 0,05$ ) (*Figura 16*).

Con respecto a la exposición a cobre, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los IG de los grupos intactos (I-CT, I-TX), mientras que el IG fue significativamente ( $P < 0,05$ ) menor en las hembras ablacionadas expuestas a cobre (A-TX) con respecto al alcanzado por el grupo ablacionado control (A-CT) (*Figura 17*).

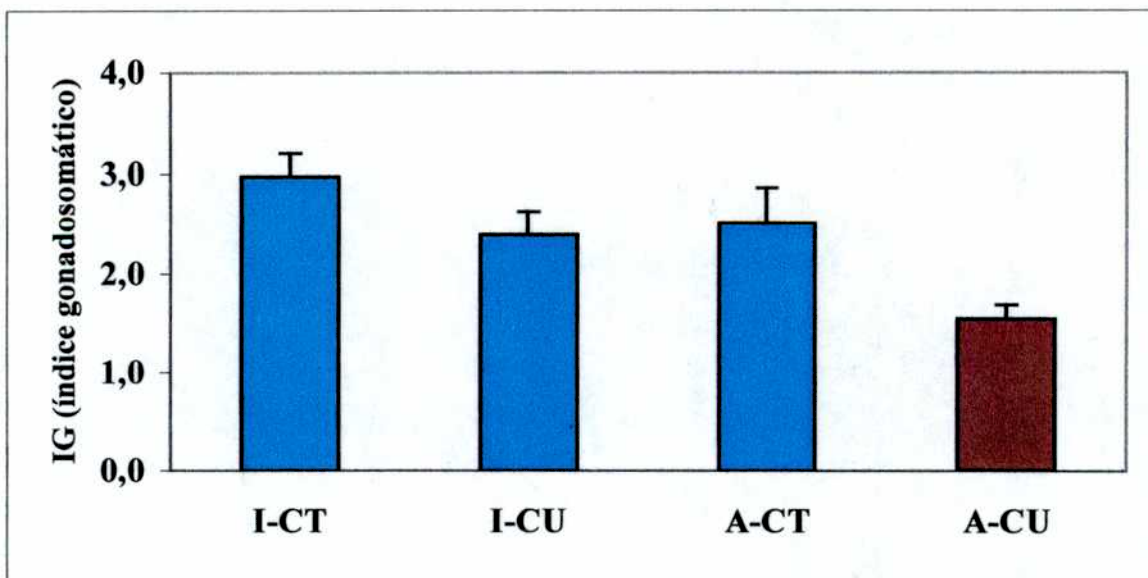
Período prereproductivo. Evaluación histológica de ovarios

Los ovarios de hembras intactas y ablacionadas, tanto controles como expuestas a los tóxicos, presentaron oocitos en las categorías de vitelogénesis primaria (previtelogénicos) y secundaria (vitelogénicos), representando estos últimos entre un 70 y un 80 % del total de oocitos contados. Se midieron únicamente los oocitos vitelogénicos, teniendo en cuenta que durante el período reproductivo solamente estos habían arrojado diferencias significativas. El DO de estos oocitos fue similar en todos los grupos ensayados, sin diferencias significativas entre ellos (*Tabla 2*). Se observó también en este análisis una tendencia en los ovarios tratados con cadmio o cobre al descenso en el diámetro oocitario, tanto en hembras intactas

como ablacionadas, pero en ningún caso surgieron diferencias significativas con los controles respectivos.



**FIGURA 16.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el período prereproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental).



**FIGURA 17.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el período prereproductivo, tanto controles (CT) como expuestas crónicamente a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$ , por grupo experimental).



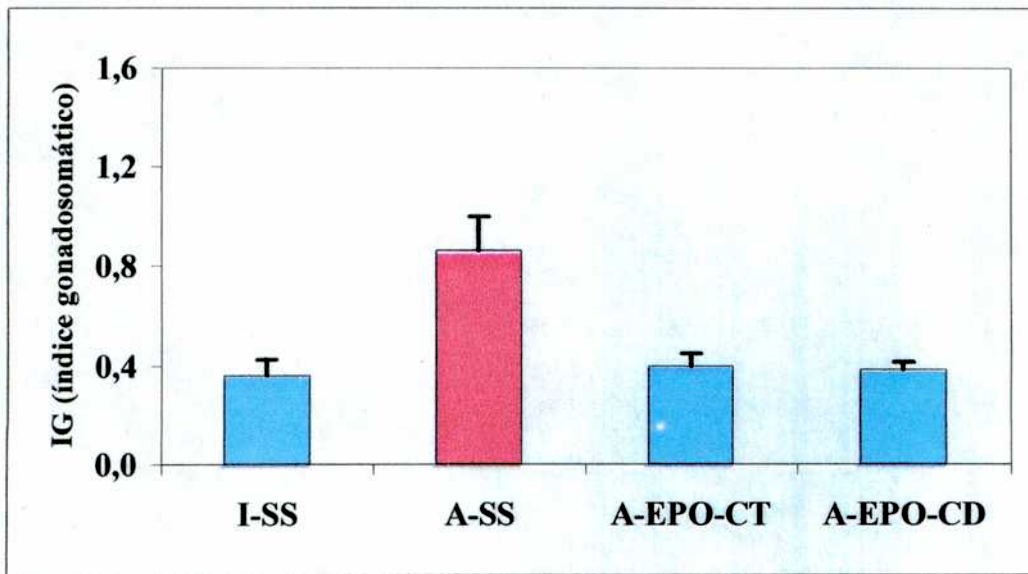
GRUPOS EXP.	DO (mm)	ES	COMPARACION ESTADISTICA	Porcentaje(%)
CT – I	0,1802	0,0262	A	69,03
CD – I	0,1553	0,0092	A	79,13
CU – I	0,1424	0,0185	A	81,8
CT – A	0,1726	0,0157	A	76,38
CD – A	0,1751	0,0162	A	76,58
CU – A	0,1414	0,0091	B	69,06

**Tabla 2.** Diámetro oocitario medio (DO) y porcentaje de oocitos vitelogénicos en hembras intactas (I) o ablacionadas (A) de los pedúnculos oculares, durante el período prereproductivo. ES = error estándar. CT = control, sin tóxico, CD = expuestos a 0,5 mg/L de cadmio, CU = expuestos a 0,1 mg/L de cobre. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo ( $P > 0,05$ ), ( $n = 15$  cangrejos por grupo experimental).

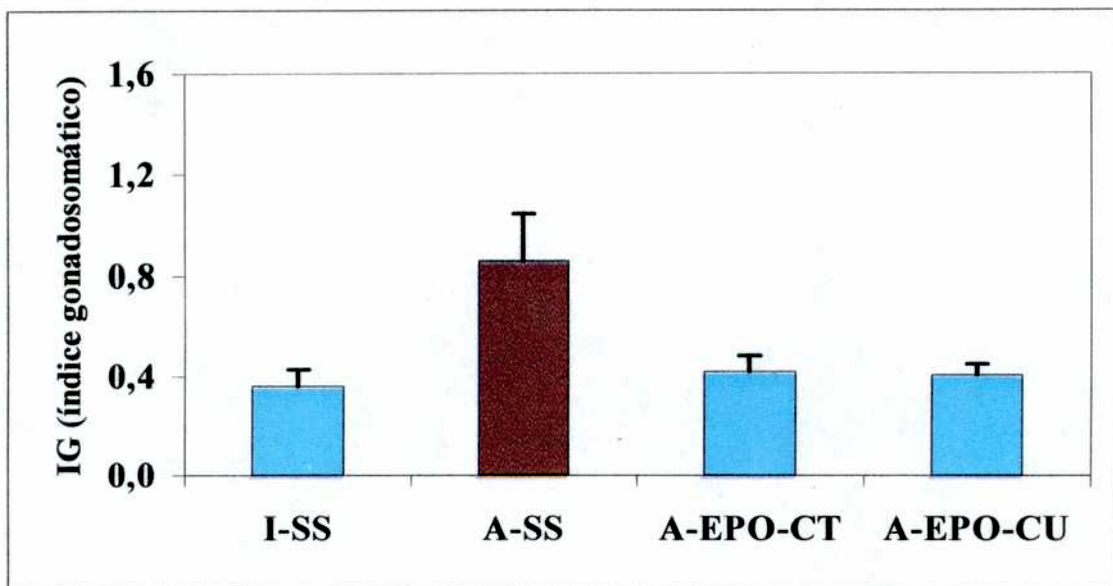
### **- Efectos de metales pesados sobre la síntesis de hormonas pedunculares**

#### Período reproductivo. Evaluación del IG

Al analizar el efecto de los metales a nivel síntesis hormonal, encontramos que las hembras ablacionadas inyectadas con extracto de pedúnculo ocular (EPO) mostraron un decremento significativo ( $P < 0,05$ ) del IG, independientemente de la procedencia del extracto; tanto las hembras inyectadas con EPO de animales control (A-EPO-CT), como las inyectadas con EPO de cangrejos previamente expuestos a cadmio o cobre (A-EPO-TX), mostraron un índice gonadosomático deprimido y en un nivel similar al medido en el grupo control (I-SS), es decir, animales intactos de sus pedúnculos oculares que fueron inyectados con solución salina. Con respecto al grupo de animales ablacionados e inyectados con solución salina (A-SS), nuevamente se observó el efecto estimulador de la ablación, con un índice gonadosomático medio en este grupo experimental significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) al medido en el control I-SS (*Figuras 18,19*).



**FIGURA 18.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) ó ablacionadas (A) durante el período reproductivo, inyectadas con solución salina (SS) o bien con extracto de pedúnculo ocular (EPO) proveniente de hembras controles (CT) ó expuestas crónicamente a 0,5 mg/L de cadmio (CD). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).



**FIGURA 19.** Índice gonadosomático medio de hembras intactas (I) o ablacionadas (A) durante el período reproductivo, inyectadas con solución salina (SS) ó bien con extracto de pedúnculo ocular (EPO) proveniente de hembras controles (CT) ó expuestas crónicamente a 0,1 mg/L de cobre (CU). Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

## ENSAYOS *IN VITRO*

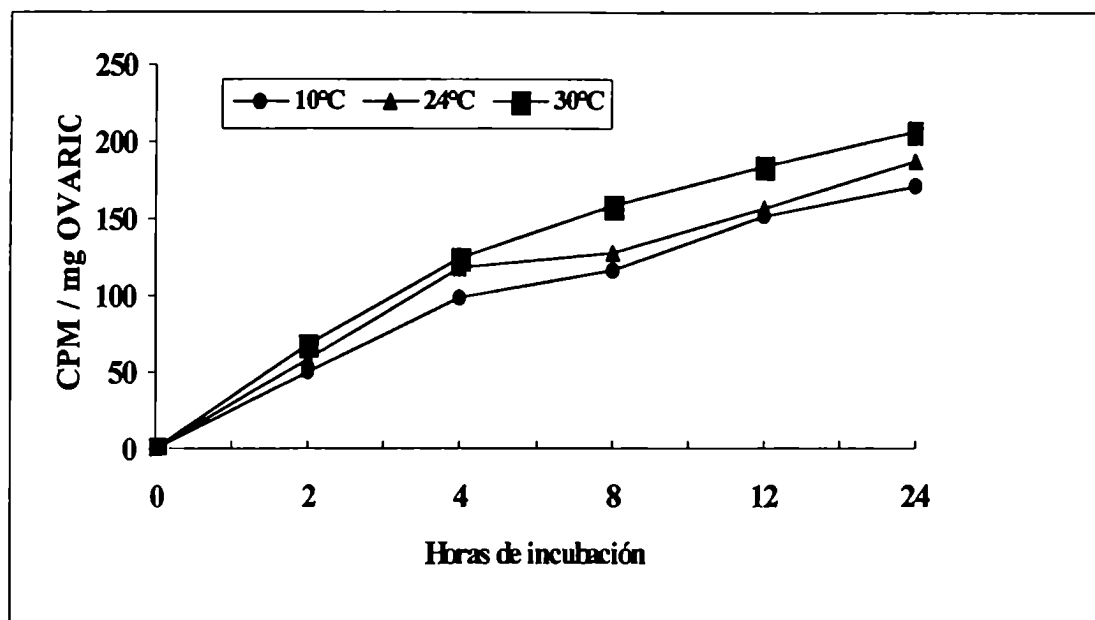
### - Puesta a punto de la técnica *in vitro*

Se pusieron en marcha tres ensayos en paralelo, utilizando tres temperaturas (10°, 24° y 30°C) y varios tiempos de incubación (2, 4, 8, 12, 24 hs); de esta manera, se determinaron las condiciones óptimas para realizar el cultivo *in vitro* de ovarios de *C. granulatus*. No encontramos diferencias significativas entre las curvas obtenidas, indicando que a cualquiera de las temperaturas de incubación probadas se podía llevar a cabo el ensayo *in vitro*. Con respecto a los distintos tiempos de incubación, se pudo observar que la incorporación de <sup>3</sup>H-leucina se incrementaba con el tiempo, con un máximo a las 24 horas (*Figura 20*).

La incubación de porciones de tejido ovárico en vitelogénesis temprana, en presencia de <sup>3</sup>H-leucina, a una temperatura de 24°C y durante 24 horas, mostró una incorporación lineal del aminoácido radiactivo al contenido proteico sintetizado *de novo* y precipitado con TCA, con un coeficiente de correlación de 0,9328. Esto demuestra que los oocitos se mantienen intactos y viables *in vitro*, en el medio de incubación utilizado, durante las 24 horas de duración del ensayo. Para corroborar el estado del tejido, luego de la incubación se tomaron al azar muestras de ovario para realizar histología y determinar bajo microscopio la integridad del tejido. La observación de esos preparados histológicos brindaron información adicional, encontrándose oocitos normales, con integridad de membrana y color.

A partir de estos resultados, estandarizamos el ensayo *in vitro* de incubación de piezas ováricas, manteniendo una temperatura de incubación constante en 24°C y un tiempo de incubación de 24 horas, condiciones bajo las cuáles la <sup>3</sup>H-leucina captada representa el 1% del

total del aminoácido disponible. La baja tasa de incorporación está directamente relacionada con el proceso de acumulación de vitelo en los oocitos, el cual requiere en *C. granulatus*, *in vivo*, de aproximadamente 2 meses en condiciones de laboratorio.



**FIGURA 20.** Puesta a punto de la técnica *in vitro*. Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina (CPM/mg OVARIO) en el total de proteínas ováricas precipitables por ácido tricloroacético (TCA). Los ovarios se incubaron a varios períodos de tiempo (máximo 24 horas) en 2 ml de medio de cultivo M199 conteniendo 3  $\mu\text{Ci}$  del aminoácido radiactivo, a tres temperaturas de ensayo (10, 24 y 30°C).

#### - Exposición de ovario a distintas concentraciones de los metales pesados utilizados (ensayos previos)

Las tres concentraciones de cadmio y cobre ensayadas no presentaron efecto sobre el tejido ovárico, ya sea incubado sólo o con músculo de la quela; no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos expuestos y el control en ausencia de músculo en el medio de incubación, así como tampoco la hubo cuando se agregó músculo como control de tejido. La incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina alcanzó niveles similares en los cuatro grupos experimentales, con una incorporación media en cada grupo control con músculo (M-CT) de 99,30 y 89,40 CPM / mg de ovario; mientras que la incorporación de leucina a ovario es algo

superior (132,57 y 127,25 CPM / mg de ovario) cuando no está presente el músculo (CT), aunque tales diferencias entre ambos controles no fueron significativas ( $P > 0,05$ ). Así, la incorporación de leucina al ovario es independiente de la presencia de músculo en el medio de incubación, lo cual garantiza su utilización como control de tejido (*Tablas 3,4*).

GRUPOS EXP.	CPM / mg Ov	ES	COMPARACION ESTADISTICA
CT	132,57	16,13	A
CD1	122,30	28,99	A
CD2	120,69	25,16	A
CD3	116,07	33,82	A
M	99,30	18,50	A
CD1	96,67	19,68	A
CD2	87,74	19,22	A
CD3	90,88	18,27	A

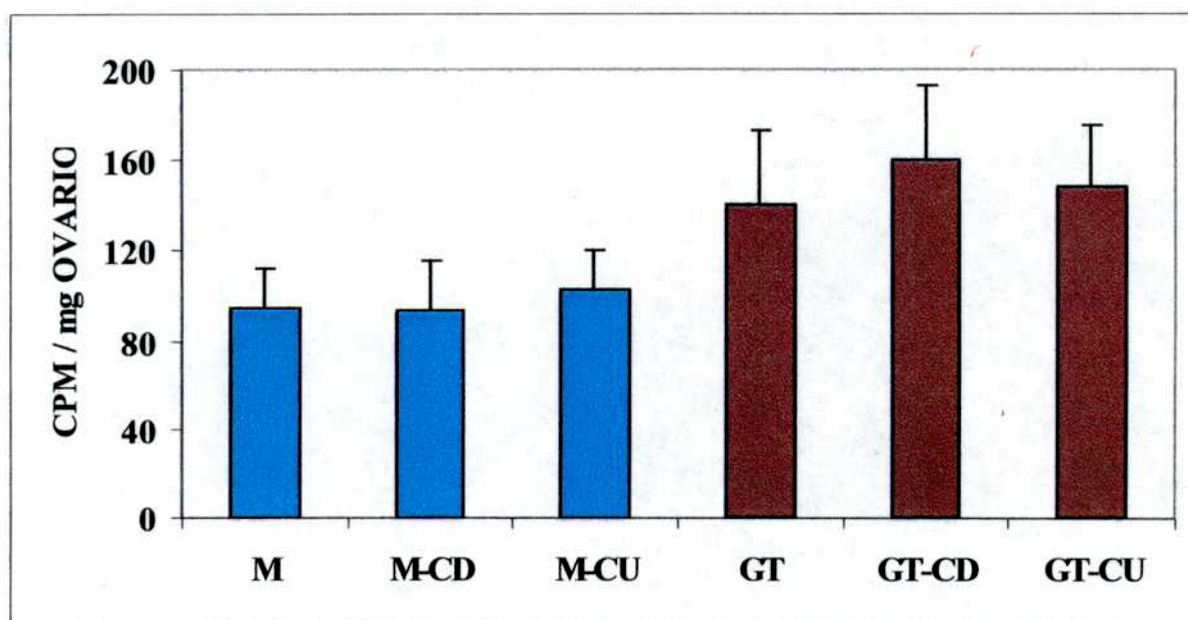
**Tabla 3.** Ensayos previos. Curva dosis-respuesta para tres concentraciones de cadmio (CD1 = 0,1 mg/L, CD2 = 0,25 mg/L, CD3 = 0,5 mg/L), agregadas al medio de incubación junto con el tejido ovárico (CT), con y sin músculo (M) de la quela, utilizado como tejido control. ES = error estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos expuestos y el control respectivo, (n = 10 por grupo experimental).

GRUPOS EXP.	CPM / mg Ov	ES	COMPARACION ESTADISTICA
CT	127,25	15,63	A
CU1	117,94	29,19	A
CU2	104,89	21,63	A
CU3	101,40	23,82	A
M-CT	89,40	20,33	A
CU1	83,10	10,34	A
CU2	76,92	15,92	A
CU3	84,06	20,32	A

**Tabla 4.** Ensayos previos. Curva dosis-respuesta para tres concentraciones de cobre (CU1 = 0,05 mg/L, CU2 = 0,1 mg/L, CU3 = 0,5 mg/L), agregadas al medio de incubación junto con el tejido ovárico (CT), con y sin músculo (M) de la quela, utilizado como tejido control. ES = error estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos expuestos y el control respectivo, (n = 10 por grupo experimental).

**B.1) Efectos de metales pesados sobre la secreción hormonal del ganglio torácico**

El ganglio torácico incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) la incorporación de leucina al ovario; cuando ambos tejidos fueron co-incubados (GT-CT), el ovario presentó un 48,38 % más de radiactividad, frente al nivel de CPM medido en el grupo control (M-CT). No encontramos diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios incubados con músculo, en presencia o ausencia del metal en el medio de cultivo (M-CT, M-TX). Cuando analizamos el efecto de los metales sobre la actividad del GT, no observamos diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre el grupo GT-CT y los grupos expuestos a cadmio y cobre (GT-TX) (*Figura 21*); es decir que ni cadmio ni cobre, a las concentraciones ensayadas, fueron capaces de contrarrestar la potente estimulación del crecimiento gonadal generada por el ganglio torácico.

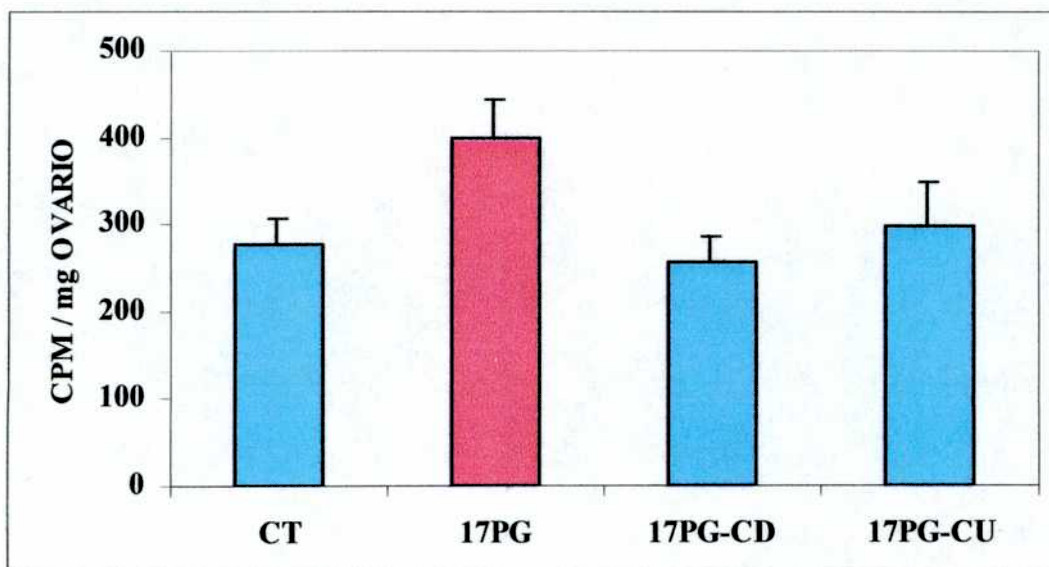


**FIGURA 21.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) co-incubados con músculo (M) de la quela ó ganglio torácico (GT), con el agregado de cadmio (CD) o cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$  por grupo experimental).

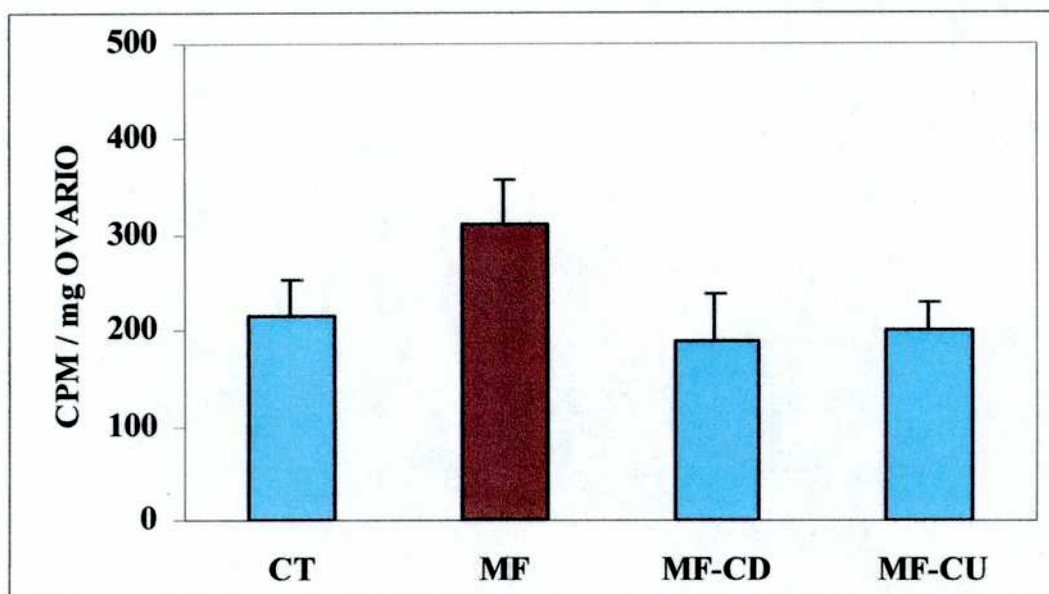
## **B.2) Interferencia de metales pesados con la actividad estimuladora de otras hormonas extrapedunculares, sobre el crecimiento gonadal**

En cuanto a los ensayos con hormonas estimuladoras del desarrollo ovárico sintetizadas en otros tejidos, encontramos un efecto significativo de los metales pesados. Al incubar ovario con una alícuota de 17-hidroxiprogesterona, aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) el nivel de radiactividad en ovario; la cantidad de leucina incorporada fue un 45 % mayor en el grupo 17PG con respecto al control (CT). Este efecto potenciador del esteroide fue drásticamente disminuido cuando en el medio de incubación se colocó una alícuota de cadmio o cobre, obteniendo en los grupos expuestos (17PG-TX) niveles de leucina similares al control (CT) (*Figura 22*).

Los mismos resultados se observaron cuando la hormona utilizada fue metil farnesoato (MF). El MF también incrementó significativamente la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a las proteínas ováricas, elevando un 43,8 % la radiactividad medida en el grupo MF comparado con el control CT; mientras que, tanto cadmio como cobre al ser agregados al medio de cultivo contrarrestaron el efecto estimulador del sesquiterpenoide (*Figura 23*).



**FIGURA 22.** Incorporación de <sup>3</sup>H-leucina a ovarios (CPM/mg) controles (CT) ó coincubados con 1,5 μM de 17-hidroxiprogesterona (17PG), con el agregado de 0,5 mg/L de cadmio (CD) o 0,1 mg/L de cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), (n = 10, por grupo experimental).



**FIGURA 23.** Incorporación de <sup>3</sup>H-leucina a ovarios (CPM/mg) controles (CT) ó coincubados con 15 μM de metil farnesoato (MF), con el agregado de 0,5 mg/L de cadmio (CD) o 0,1 mg/L de cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), (n = 10, por grupo experimental).



**B.3) Efecto de metales pesados sobre la secreción hormonal del pedúnculo ocular.****Reversión del efecto por administración de extractos pedunculares**

Cuando en el medio de incubación se colocó tejido peduncular (PO-CT), la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina por el ovario disminuyó de manera significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al grupo control sin pedúnculo (M-CT); en los ovarios incubados con pedúnculo ocular se redujo en un 46% la incorporación del aminoácido radiactivo a las proteínas ováricas. Lo mismo ocurrió al colocar en el medio de cultivo una alícuota de extracto de pedúnculo ocular equivalente al contenido de dos PO; en este caso, la incorporación descendió un 41% en el grupo EPO(2) con respecto al nivel de radiactividad medido en el grupo control M-CT (*Tabla 5*).

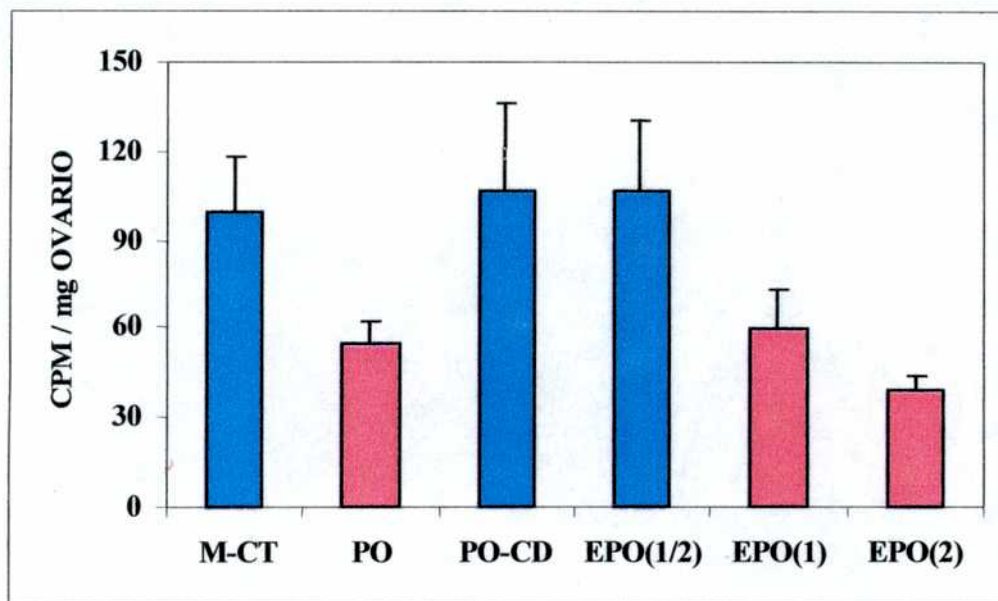
Si en el medio de cultivo se coloca una alícuota de metal (cadmio o cobre), los ovarios coincubados con PO (PO-TX) presentan niveles de radiactividad similares al grupo control M-CT ( $P > 0,05$ ). Esto manifiesta que, a las concentraciones ensayadas, el cadmio y el cobre provocaron un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina, en presencia de pedúnculo ocular; la presencia del metal en el medio de incubación contrarrestaría el efecto inhibitorio ejercido por el tejido peduncular sobre la gonada (*Figuras 24,25*).

Se determinó si este efecto de los metales, sobre la función inhibitoria del desarrollo gonadal que ejerce el tejido peduncular, operaba sobre la secreción de GIH o bien sobre los receptores y/o la transducción de la señal hormonal en ovario. Para ello, réplicas del grupo experimental PO-TX fueron tratadas con distintas dosis de extracto de pedúnculo ocular (EPO), colocando una alícuota en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos pueden observarse en las *Figuras 24 y 25*, donde se aprecia una clara reversión del efecto provocado por los metales. Cuando ovario y pedúnculo ocular fueron expuestos a cadmio, la menor dosis

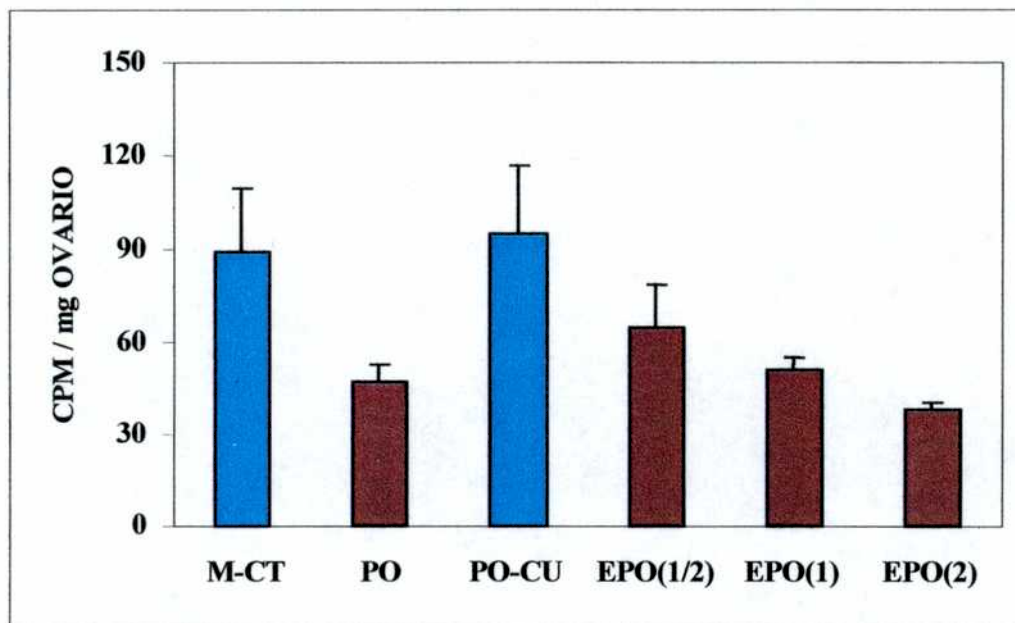
de EPO utilizada no tuvo efecto; sin embargo, los EPO equivalentes al contenido de uno y dos pedúnculos oculares revirtieron por completo el efecto de cadmio, reduciéndose la incorporación de radiactivo al ovario de manera significativa ( $P < 0,05$ ), y observándose un nivel de leucina similar o algo menor al medido en el grupo PO-CT (*Figura 24*). En el ensayo de exposición a cobre, las tres dosis de EPO lograron revertir el efecto del metal, disminuyendo significativamente ( $P < 0,05$ ) la incorporación de radiactivo al ovario (*Figura 25*).

GRUPOS EXP.	CPM / mg Ov	ES	COMPARACION ESTADISTICA
M-CT	94,35	19,42	A
PO-CT	50,97	6,17	B
EPO(2)	55,24	8,48	B

**Tabla 5.** Incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a ovarios (CPM/mg) coincubados con tejido muscular (M-CT), tejido peduncular (PO) o extracto de pedúnculo ocular (EPO, 2 equivalentes de pedúnculo). Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$  por grupo experimental).



**FIGURA 24.** Incorporación de <sup>3</sup>H-leucina a ovarios (CPM/mg) coincubados con tejido muscular (M-CT), tejido peduncular (PO) o tejido peduncular más el agregado de extracto de pedúnculo ocular (EPO) a distintas dosis (1/2, 1 ó 2 equivalentes de pedúnculo ocular), en presencia o ausencia de 0,5 mg/L de cadmio (CD) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).



**FIGURA 25.** Incorporación de <sup>3</sup>H-leucina a ovarios (CPM/mg) coincubados con tejido muscular (M-CT), tejido peduncular (PO) o tejido peduncular más el agregado de extracto de pedúnculo ocular (EPO), a distintas dosis (1/2, 1 ó 2 equivalentes de pedúnculo ocular) en presencia o ausencia de 0,1 mg/L de cobre (CU) en el medio de cultivo. Barras verticales: error estándar. Colores iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), ( $n = 10$ , por grupo experimental).

*DISCUSSION*

## CAPITULO V

### DISCUSION

#### EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA GLUCEMIA

- **Los metales estudiados causan una hipoglucemia dependiente de la concentración de cada metal pesado**

En los animales intactos expuestos tanto a cadmio como a cobre, se registró a ciertas concentraciones subletales ensayadas un claro efecto hipoglucémico, en comparación con los animales intactos controles. Se puede inferir de la curva dosis-respuesta obtenida (*Figuras 6,7. Resultados*), que los animales son más sensibles al metal cobre que al cadmio. Para producir el mismo descenso en el nivel de glucosa hemolinfática, es necesario exponer a los cangrejos a una concentración de cadmio aproximadamente dos veces superior a la de cobre, algo consistente en virtud de la menor CL50 aguda para cobre obtenida en esta especie (López *et al.*, 2001). Esta diferencia entre ambos metales puede deberse a mecanismos no regulables de acumulación de cadmio, pudiendo ocurrir un continuo incremento en la acumulación del metal en el organismo a medida que aumenta el tiempo de exposición al cadmio (Rainbow y Dallinger, 1993).

- **Hipoglucemia en animales intactos y ablacionados, expuestos a cadmio o cobre**

La hipoglucemia registrada en los animales intactos expuestos a ambos metales, fue similar a la registrada en los cangrejos ablacionados de sus pedúnculos oculares, tanto

controles como expuestos (**Figuras 8,9. Resultados**). Podemos, sobre esta base, sugerir que la secreción de la hormona hiperglucemiante CHH, por parte de los pedúnculos oculares, estaría disminuyendo drásticamente por efecto de los metales ensayados, y en consecuencia descenderían sus niveles en hemolinfa provocando la hipoglucemia observada. De manera no excluyente, es posible que los metales estudiados interfirieran con uno o más pasos en la transducción de la señal hormonal, a nivel de sus órganos blanco. La corroboración o refutación de estas hipótesis se discute en la secciones siguientes.

- **Posibles efectos de ambos metales sobre la secreción de CHH**

Diferentes trabajos aportan resultados sobre el efecto de contaminantes orgánicos e inorgánicos sobre el sistema neuroendocrino, y en particular sobre los neurotransmisores y neuroreguladores involucrados. El cadmio y el naftaleno, por ejemplo, han mostrado tener efecto sobre la dispersión de pigmentos y la adaptación a la luz, procesos que son regulados por factores neuroendocrinos sintetizados y secretados en los pedúnculos oculares. En tales trabajos, se observó una inhibición en la liberación del neurotransmisor noradrenalina, que en condiciones normales estimula la secreción de un factor dispersante de pigmentos negros (BPDH) y de un factor de adaptación a la luz (LAH) (Fingerman *et al.*, 1981; Staub y Fingerman, 1984 a,b; Reddy y Fingerman, 1995). Otro metal pesado como el mercurio mostró también un efecto sobre la liberación de neurotransmisores; en *P. clarkii* la exposición a este metal provocó una inhibición de la actividad estimuladora que produce la serotonina sobre las hormonas que regulan la maduración ovárica (Reddy *et al.*, 1997).

La hipoglucemia detectada en los animales intactos expuestos a los metales consistió en un nivel de glucosa similar al medido en cangrejos ablacionados, tanto expuestos a los

metales como controles (en medio limpio). Esta suerte de “ablación química”, ejercida tanto por cadmio como por cobre, estaría sugiriendo fuertemente que la secreción de CHH peduncular estaría prácticamente suprimida por ambos metales estudiados. La carencia de pedúnculos oculares en estos cangrejos no impide, sin embargo, que se mantenga un determinado nivel de glucosa, lo cual está indicando que existiría algún mecanismo extrapeduncular alternativo que puede regular la glucemia, aunque manteniéndola en niveles más bajos. Al respecto, estudios realizados con las aminas biógenas que en varias especies de crustáceos estimulan la liberación de CHH (Keller y Beyer, 1968; Strolenberg y Van Herp, 1977; Fingerman *et al.*, 1994), muestran un efecto directo sobre el incremento de glucosa en hemolinfa, causando hiperglucemia en animales con o sin pedúnculos oculares; la inyección de serotonina u octopamina provocó una marcada hiperglucemia en cangrejos apedunculados de la especie *C. maenas* (Bauchan y Mengeot, 1966; Lüschen *et al.*, 1993).

Por otra parte, la hormona hiperglucemiante ha sido detectada mediante inmunohistoquímica en otros tejidos; por ejemplo, en el sistema nervioso ventral de *H. americanus* se determinó la presencia de RNA mensajero de CHH, en particular a nivel ganglio torácico (Aiken y Waddy, 1980; De Kleijn *et al.*, 1995; De Kleijn y Van Herp, 1998), mientras que en *C. maenas* se encontró esta hormona a nivel del órgano pericárdico, mediante estudios inmunocitoquímicos y radioinmunológicos, aunque en bajas concentraciones en comparación con los niveles medidos en glándula del seno (Keller *et al.*, 1985). Dado que no se detectó en ningún caso diferencias entre los cangrejos ablacionados controles (medio limpio) y expuestos a los metales, concluimos que cualquiera sea el mecanismo de regulación de los niveles de CHH extrapeduncular, estos no se ven afectados por los metales ensayados.

Uno de los principales conceptos en endocrinología es la regulación por retroalimentación negativa (“feedback”); este mecanismo permite mantener los niveles

hormonales en un rango de concentraciones necesario para que las funciones biológicas sean óptimas. Cualquier alteración del mecanismo de feedback puede provocar modificaciones en la homeostasis del sistema endocrino, modificando en consecuencia los niveles fisiológicos normales de las hormonas. Estudios realizados por Santos y Keller (1993a) demuestran que los niveles circulantes de la hormona hiperglucemiante, liberada desde la glándula del seno, se encuentran regulados por un sistema de control dual en el cual intervienen la glucosa y el lactato. Un elevado nivel de glucosa en hemolinfa, mediante un feedback negativo, provocaría el descenso en la secreción hormonal (Glowik *et al.*, 1997), mientras que el lactato estimularía la liberación de CHH mediante un feedback positivo.

Cuando los animales son sometidos a condiciones ambientales estresantes, pueden evidenciarse cambios en la integridad del organismo a nivel estructural y funcional (Blanck *et al.*, 1988); la respuesta adaptativa del organismo es la obtención de la energía necesaria para preservar su funcionamiento dentro de los límites homeostáticos apropiados (Giesy, 1988). El sistema neuroendocrino procura en primera instancia que el organismo mantenga su homeostasis, descargando factores hormonales que regulan un número de funciones que le permiten al animal responder al estrés (Munck *et al.*, 1984). La CHH, como los glucocorticoides en mamíferos, cumple este rol disminuyendo la captura o la utilización de glucosa por los tejidos, o movilizándolo a partir de las reservas (glucógeno), incrementando así la glucemia y la disponibilidad de este metabolito para obtener energía. En determinadas condiciones como la hipoxia o la anoxia, también el lactato, producto de la glucólisis, se ve incrementado (Chang y O'Connor, 1983; Santos *et al.*, 1988; Webster, 1996). En este estudio, los animales expuestos a los metales se encuentran claramente bajo una situación de estrés, y sin embargo luego de la exposición crónica se observó en ellos una marcada hipoglucemia; se podría pensar entonces en una disrupción por parte de los metales de los mecanismos de retroalimentación, en particular sobre el feedback positivo que puede



ejercer el lactato. Sin embargo, en trabajos previos realizados sobre la especie en estudio, donde los animales fueron expuestos crónicamente a diferentes concentraciones de cadmio, los niveles de lactato medidos no difirieron significativamente de los determinados en los animales no expuestos (Rodríguez *et al.*, 2001).

- **Posibles efectos de ambos metales sobre la síntesis de CHH**

La inyección de extracto de pedúnculo ocular de animales mantenidos 14 días en agua salina tuvo un potente efecto hiperglucemiante en los animales inyectados, lo cual nos está indicando que en dicho extracto se encuentra presente y funcional la hormona CHH (*Figuras 10,11. Resultados*). Además, pudimos observar que la exposición previa (dos semanas) de cangrejos a cualquiera de los metales pesados ensayados no alteró la producción de la hormona hiperglucemiante en los pedúnculos oculares (PO), ya que los extractos de PO obtenidos de estos animales también causaron una fuerte hiperglucemia en los animales inyectados, alcanzando niveles similares de glucosa en hemolinfa. En consecuencia podemos afirmar que, en función de los resultados obtenidos hasta aquí, no existiría un efecto aparente de los metales pesados ensayados sobre la síntesis de esta hormona; la cantidad de CHH en cada extracto sería equivalente, por ende, en las células neurosecretoras del órgano X se seguiría produciendo CHH y almacenándose en la glándula del seno. Si los metales causaran una inhibición de la síntesis hormonal, hubiésemos esperado niveles menores de glucemia en los animales inyectados con extracto proveniente de cangrejos expuestos. Al no observarse esto, es muy probable que los metales estén generando hipoglucemia por alteración en la secreción de CHH a hemolinfa.

Sin embargo, si es cierta la hipótesis de que los metales pesados ensayados inhiben la secreción de CHH peduncular y no inhiben la síntesis de la misma hormona, cabría esperar una acumulación neta de la neurohormona en el tejido neurohemal; entonces, los extractos obtenidos de animales expuestos a cadmio o cobre deberían causar un efecto hiperglucemiante algo mayor sobre los animales inyectados, comparado con el incremento en la glucemia que causa la inyección de extracto de cangrejos no expuestos. No se observó en nuestros ensayos una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de glucosa en hemolinfa de animales inyectados con extracto de cangrejos expuestos a cadmio o cobre y los niveles de glucemia del grupo control, por lo cuál no podemos afirmar que exista una acumulación anormal de CHH en los pedúnculos oculares de los animales expuestos.

Ante la evidencia mencionada, es plausible la posibilidad de una cierta inhibición de la síntesis de CHH por parte de los metales ensayados. Trabajos realizados con la especie *U. pugilator* reportan una inhibición en la síntesis de esta hormona por exposición a cadmio (Reddy *et al.*, 1996), resultado que se ha repetido con otras neurohormonas pedunculares, como por ejemplo aquellas relacionadas con la dispersión de pigmentos (Reddy *et al.*, 1997).

Sin embargo, una explicación alternativa a ésta es que exista un decremento compensatorio de la síntesis de CHH en los cangrejos expuestos. Lo que podría estar ocurriendo en la especie que estudiamos es que el mecanismo que regula el recambio (“turnover”) de CHH en las neuronas que sintetizan esta hormona (de modo de mantener un estado estacionario en la disponibilidad de CHH), estuviese disminuyendo la síntesis por procesos autoregulatorios cuando decrece la secreción de CHH por efecto de ambos metales, con lo cual no ocurriría una acumulación neta de la hormona en la glándula del seno.

- **Hipoglucemia versus hiperglucemia por efecto de metales pesados**

Se ha reportado en otras especies de crustáceos expuestas a metales pesados un cuadro de hiperglucemia, en contraposición a lo observado en el presente trabajo. Así, los estudios de Reddy y colaboradores (1994) sobre *P. clarkii* indican que una exposición aguda (72 horas) a cadmio provoca hiperglucemia en animales intactos, mientras que en *U. pugilator* observan similares resultados (Reddy *et al.*, 1996) pero luego de una exposición crónica (10 días); atribuyen este efecto del metal a una probable descarga excesiva de serotonina por parte de las neuronas serotoninérgicas que a su vez estimulan a neuronas secretoras de CHH que se dirigen hacia la glándula del seno, el órgano neurohemal donde se secreta esta hormona. Por otra parte, proponen que el cadmio afecta la síntesis hormonal, ya que observaron que los extractos de pedúnculo ocular de animales expuestos, inyectados en animales controles, provocaban una glucemia mucho menor que los extractos provenientes de animales no expuestos. En relación con esto último, la inactivación de enzimas responsables de la síntesis proteica es un efecto ampliamente reportado para los metales pesados (Hidalgo *et al.*, 1976; Beattie *et al.*, 1987; Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*, 1990).

En otro estudio (Lorenzon *et al.*, 2000), se analizó en la especie *Palaemon elegans* el nivel de glucemia luego de la exposición aguda (24 horas) a diferentes concentraciones de varios metales, encontrándose que las mayores concentraciones de cadmio (> 2 mg/L) no produjeron hiperglucemia, pero las intermedias ensayadas (0,2 a 1,0 mg/L) sí elevaban la glucosa en hemolinfa. Con respecto al cobre, observaron que las mayores concentraciones ensayadas (> 1 mg/L) fueron las que tuvieron efecto hiperglucémico, en condiciones de exposición aguda. Estos autores proponen que estas diferentes respuestas ante un metal esencial como el cobre y uno no esencial como el cadmio, se relacionan con el rol fisiológico

del cobre en los crustáceos y con mecanismos de depuración más eficientes, en comparación con el cadmio.

Trabajos previos sobre la especie en estudio, *C. granulatus*, mostraron efectos del cadmio similares a los reportados en *P. elegans* durante una exposición aguda. Así, Bigi (1996) encontró que la menor concentración de cadmio utilizada (0,4 mg/L) producía hiperglucemia luego de 96 horas de exposición, mientras que concentraciones mayores (1,6 y 6,3 mg/L) no diferían significativamente del control, para el mismo tiempo de exposición. Por el contrario, la exposición crónica (14 días) a la cual fue sometido *C. granulatus* durante el presente estudio, provocó una marcada hipoglucemia a una concentración de 0,5 mg/L, muy similar a la que había producido hiperglucemia en condiciones de exposición aguda.

Esta aparente contradicción entre las respuestas hiper e hipoglucémicas producidas por un mismo metal, que incluso se han verificado en la misma especie en estudio para el caso del cadmio, no resulta tal si nos ubicamos en el contexto del síndrome general de adaptación, es decir, el conjunto de respuestas asociadas a un cuadro de estrés. En este sentido, la hiperglucemia es una respuesta subletal típica de los organismos acuáticos a la presencia de metales pesados (Haux *et al.*, 1986) y compuestos orgánicos (Nagabushanam *et al.*, 1979; Deecaraman y Fingerman, 1985; Reddy *et al.*, 1996), pero también se incrementa la glucemia por aumento de la temperatura, por cambios en el contenido de oxígeno (hipoxia), o variaciones en el pH (Chang *et al.*, 1998, 1999), lo cual demuestra que ésta es una respuesta aguda generalizada e inespecífica ya que diferentes estímulos, que actúan como estresantes, logran una misma respuesta de adaptación al estrés (Mayer *et al.*, 1992). Tal respuesta inespecífica estaría explicando la hiperglucemia producida por metales pesados, tanto en *C. granulatus* como en las otras especies arriba mencionadas.

Por el contrario, la hipoglucemia detectada en *C. granulatus* luego de una exposición crónica parece ser un efecto específico de los metales pesados ensayados. Probablemente el primer mecanismo que se dispara ante una situación de estrés ambiental sea una descarga aguda de CHH, con el incremento posterior y transitorio de glucosa, pero una exposición prolongada a los metales utilizados podría desencadenar cambios más profundos que afecten de manera directa y específica, por ejemplo, la regulación neuroendocrina de la glucemia.

Otra posibilidad es que los mecanismos involucrados en la secreción de CHH no sean los mismos en las diferentes especies de crustáceos. En este sentido, existen algunos reportes que indican que, a diferencia de lo descrito por Reddy y col. (1994) para *P. clarkii*, los neuromoduladores o neurotransmisores que regulan la secreción de CHH podrían ser otros. Así, Lüschen y colaboradores (1993) aportan evidencias sobre la posibilidad de que la dopamina estimule, en el cangrejo *C. maenas*, la secreción de CHH peduncular. Es posible entonces que la dopamina esté también comprometida en *C. granulatus* como neurotransmisor que ejerce un efecto hiperglucémico, desencadenando la liberación desde la glándula del seno de la hormona hiperglucemiante. Bajo esta hipótesis, de existir neuronas dopaminérgicas en la glándula del seno que estimulen a las neuronas que secretan CHH, podría ser factible que los metales afecten la interacción entre la dopamina como neurotransmisor y tales neuronas secretoras de CHH, en términos de inhibir la exocitosis del neurotransmisor hacia el espacio sináptico y/o algún paso en los mecanismos de transducción asociados a la unión del neurotransmisor con su receptor postsináptico.

- **Posible interferencia de ambos metales con la transducción hormonal**

Hemos planteado como hipótesis que la hipoglucemia producida por ambos metales se debe probablemente a la inhibición de la secreción de la hormona hiperglucemiante CHH desde el tejido neurohemal glándula del seno. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos ensayos no son suficientes para validar completamente esa hipótesis, ya que no permiten descartar que la hipoglucemia se produzca como consecuencia de la posible interacción de cadmio y cobre con receptores de CHH en alguno de los tejidos blanco de la hormona (sugerido por Reddy *et al.*, 1994), o la alteración de algún paso específico en la vía de transducción de la señal hormonal. Esta posibilidad ha sido puesta a prueba mediante los ensayos que se describen en la Sección II. A.2 (Materiales y Métodos, Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos).

En primer lugar, se pudo comprobar que en los animales expuestos previamente a cadmio existe una respuesta hiperglucémica significativa luego de la inyección de CHH purificada (**Figura 12. Resultados**). La inyección hormonal revirtió por completo la hipoglucemia causada en *C. granulatus*, y elevó la glucemia en los cangrejos expuestos hasta valores similares a los medidos en los cangrejos controles inyectados con CHH. Esto demuestra que el metal no altera de manera significativa ningún mecanismo de transducción a nivel tejidos blanco de la hormona, permitiéndole al animal incrementar la glucosa en hemolinfa como respuesta al estímulo hormonal exógeno. Los receptores en los tejidos blanco de la hormona se encuentran entonces funcionales, así como los mecanismos de transducción subsecuentes. De esta manera, una de las probables causas de la hipoglucemia observada por exposición a cadmio, como podía ser la alteración de la unión entre la hormona y su receptor, o la transducción de la señal, queda en principio descartada.

La respuesta a la inyección hormonal de los animales tratados con cobre difirió sin embargo de la observada en aquellos expuestos a cadmio. La hipoglucemia provocada por cobre también logró ser revertida por la inyección hormonal, aunque la glucosa en la hemolinfa de estos animales solo alcanzó niveles similares a los detectados en aquellos cangrejos controles no inyectados con CHH (*Figura 13. Resultados*). Ni siquiera la mayor dosis de CHH (64 pmoles/cangrejo) inyectada permitió elevar la glucemia mas allá de lo que representa el nivel de glucosa en hemolinfa de cangrejos en condiciones normales. Por lo tanto, es probable que la exposición al cobre esté afectando a nivel tejido blanco de la hormona alguno de los pasos en la transducción de la señal hormonal, o el reconocimiento hormona / receptor de membrana. Sin embargo, dado que la respuesta de los animales inyectados con las tres dosis de CHH exógena fue similar y máxima, es posible que el cobre esté afectando sólo la fracción de los receptores a CHH que participa en la respuesta a niveles saturantes de la hormona, pero no bloquearía la respuesta en el rango fisiológico normal.

Existen estudios que demuestran el efecto de cobre sobre varias enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos; Agar y Smith (1973) observaron que el metal cobre era capaz de disminuir la actividad enzimática de hexoquinasas involucradas en la vía glucolítica. Teniendo en cuenta que en la lisis del glucógeno participan quinasas que activan enzimas que a su vez hidrolizan el glucógeno, favoreciendo la liberación de glucosa de estas reservas e incrementando así la glucemia, la presencia del metal cobre podría estar incidiendo en esta vía metabólica alterando la funcionalidad de esas enzimas quinasas, y en consecuencia, impidiendo el incremento de los niveles de glucosa en hemolinfa. Considerando también la actividad de las quinasas, se sabe que en músculo estas enzimas dependen del calcio disponible, ya que poseen una subunidad de calmodulina acoplada a su estructura proteica. La unión de calcio a la calmodulina provoca un cambio conformacional que activa la enzima, y de esta forma la quinasa puede fosforilar las enzimas glucógeno-fosforilasa y glucógeno-

sintetasa (Keller y Sedlmeier, 1988) activando e inactivándolas, respectivamente. La alteración por parte del cobre de los niveles de calcio disponible en músculo, o su interferencia directa o indirecta sobre la calmodulina podrían ser vías alternativas de inhibición de las quinasas en músculo.

### **RESUMEN DE LA DISCUSION. (Sección A)**

El conjunto de resultados obtenidos en esta primera parte de la Tesis, indica que el cadmio actúa sobre el centro neuroendocrino ubicado en los pedúnculos oculares (corroboración de la **Hipótesis A.1**). Si bien la CHH circulante en hemolinfa no ha sido medida directamente, toda la evidencia disponible indica que el cadmio está causando hipoglucemia al disminuir los niveles circulantes de la hormona. Este descenso parece deberse más a una inhibición de la secreción hormonal que a una inhibición de su biosíntesis, si bien no es posible descartar que esta última posibilidad se verifique en cierto grado. Desde el punto de vista mecanístico, el cadmio podría estar alterando la actividad de enzimas que actúan sobre el precursor hormonal, o sobre los procesos de incorporación de la hormona a las vesículas de secreción en el tejido neurohemal, o sobre el mecanismo de liberación de esas vesículas. Por otra parte, el cadmio podría ejercer un efecto inhibitorio sobre ciertas aminos biógenas que a nivel complejo órgano X- glándula del seno serían capaces a su vez de regular la liberación de diferentes factores neuroendocrinos, entre ellos la hormona hiperglucemiante. Se ha verificado, además, que la presencia de cadmio no afecta la interacción hormona / receptor en los tejidos blanco de CHH y/o la vía de transducción del efecto hormonal (refutación de la **Hipótesis A.2**).



Para el caso del cobre, la evidencia obtenida también indica un efecto significativo sobre el centro secretor de CHH, ubicado en los pedúnculos oculares (corroboración de la **Hipótesis A.1**). La inyección hormonal también modifica el efecto hipoglucemiante del cobre, generando un incremento significativo de la glucemia. Sin embargo, y a diferencia de lo obtenido con cadmio, este incremento fue menor al observado en los cangrejos control inyectados con las mismas dosis de hormona, lo cual nos está sugiriendo que el cobre podría afectar, además de los mecanismos relacionados con la secreción hormonal, la disponibilidad máxima de receptores a CHH o la transducción de la señal hormonal en los tejidos blanco, como ser músculo, hepatopáncreas, gonadas. Se sabe que la CHH cumple su función hiperglucemiante estimulando la degradación e inhibiendo la síntesis de glucógeno, o modificando la disponibilidad o captura de carbohidratos por varios tejidos. Es posible entonces que el efecto hipoglucémico generado por el cobre se deba, además, a la interferencia de este metal sobre enzimas involucradas en alguna de esas vías metabólicas, en particular las enzimas quinasas que cumplen un rol relevante en la cascada de segundos mensajeros que se desencadena por acción de la hormona (corroboración de la **Hipótesis A.2**).

## EVALUACION DEL EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA REPRODUCCION

- Efectos de cadmio y cobre sobre el crecimiento ovárico *in vivo*

El estudio de la secreción de hormonas reproductivas mostró que los metales ensayados no parecen tener efecto sobre el control negativo del crecimiento gonadal, ejercido por factores inhibitorios presentes en los pedúnculos oculares (PO); el índice gonadosomático (IG) medido en las hembras intactas expuestas no difirió significativamente del registrado en hembras no expuestas. Por el contrario, en aquellos animales que fueron previamente ablacionados de sus PO, la exposición a los tóxicos causó un descenso significativo del IG en comparación con las hembras ablacionadas en medio limpio. El hecho de no haber encontrado diferencias entre los grupos intactos por un lado, y sí haber observado cambios significativos en el IG del grupo apedunculado expuesto (***Figuras 14,15,16,17. Resultados***) está indicando que:

a) Los metales podrían tener o bien un efecto directo sobre el ovario, o bien podrían interferir con el control neuroendocrino extrapeduncular de la reproducción (Hipótesis B, B.1 y B.2 planteadas inicialmente).

b) Los tóxicos ensayados, de corroborarse alguna o ambas de las Hipótesis mencionadas, podrían estar inhibiendo al mismo tiempo, en los animales intactos, la secreción de GIH (refutación de la Hipótesis B.3), lo que explicaría la ausencia de diferencias significativas entre los grupos intactos expuestos y controles.

En relación con el punto a), para determinar a que nivel los metales estaban afectando el crecimiento ovárico, se complementaron los ensayos *in vivo* con experimentos *in vitro*. Lo primero que encontramos fue que la exposición de ovario a distintas concentraciones de los metales pesados utilizados, no tiene un efecto directo sobre este tejido (**Tablas 3,4. Resultados**); los ovarios incubados con o sin una alícuota del metal en el medio de cultivo incorporaron niveles similares del aminoácido radiactivo. La presencia en el medio de incubación de músculo de la quela no afecta tampoco la capacidad del ovario para incorporar leucina, aunque se advierte un leve descenso producto de la actividad propia del músculo, el cual también sintetiza proteínas *de novo*.

Queda entonces planteada la otra posibilidad, es decir la interferencia de los metales ensayados con el control endocrino de la reproducción (Hipótesis B.1, B.2). Una primera hormona que podría ser blanco de los metales pesados es el factor estimulante gonadal GSH, cuya síntesis y secreción se produce en el cerebro y el ganglio torácico de los crustáceos superiores. A este respecto, varios trabajos han demostrado que esta neurohormona peptídica favorece el crecimiento ovárico (Kulkarni *et al.*, 1991a; Yano, 1992; Yano y Wyban, 1992; Sarojini *et al.*, 1995b; Fingerman, 1997). Una de las funciones descritas para GSH es la de favorecer la captura de macromoléculas, como la vitelogenina, por parte del ovario (Jugan y Soyez, 1985); los niveles incrementados de la hormona estimulante permitirían que los oocitos previtelogénicos incorporen las proteínas necesarias para formar el vitelo, dando inicio a la segunda fase de la vitelogénesis.

Además de GSH, existen otras hormonas reproductivas que estimulan el crecimiento ovárico y que podrían también ser blanco de los metales; es el caso del metil farnesoato, producido en el órgano mandibular, el cuál cumple un importante papel en la regulación de la reproducción de crustáceos (Laufer *et al.*, 1993). Se ha visto que los niveles de MF en

hemolinfa alcanzan un máximo cuando los oocitos se encuentran en plena vitelogénesis secundaria, acumulando las proteínas del huevo (Sagi *et al.*, 1991; Wilder *et al.*, 1995; Wainwright *et al.*, 1996); también se observó que este compuesto, *in vitro*, logra incrementar el diámetro oocitario (Tsukimura y Kamemoto, 1991), e *in vivo*, el índice gonadosomático (Rodríguez *et al.*, 2002a).

Los esteroides ováricos son la otra fuente estimuladora gonadal importante descrita hasta el momento en crustáceos. Se los ha podido detectar por ejemplo en ovario de *P. monodon*, *H. americanus*, y *P. fissurus* (Lisk, 1961; Jeng *et al.*, 1978; Fairs *et al.*, 1990), así como en hepatopáncreas y circulando en hemolinfa. Se sugiere que estos compuestos regulan la vitelogénesis, puesto que los niveles detectados en hemolinfa, ovario y hepatopáncreas se relacionan positivamente con los niveles circulantes de vitelogenina y con los estadios del ciclo reproductivo (Couch *et al.*, 1987; Quintio *et al.*, 1994). Entre las hormonas esteroideas reconocidas en invertebrados con una función reproductiva, se pueden citar al 17 beta-estradiol, la progesterona, la pregnenolona, la testosterona, el estradiol y el estrógeno (Fingerman *et al.*, 1995).

Ensayos realizados en la especie *P. clarkii* con mercurio y cadmio, evidencian efectos directos sobre el tejido ovárico; el mercurio en particular inhibiría la síntesis proteica general del ovario, y además impediría la actividad estimuladora de GSH sobre este tejido. Mientras que tanto cadmio como mercurio afectarían la secreción de GSH desde cerebro (Reddy *et al.*, 1997). También se ha observado que la exposición a cadmio reduce la concentración de lipovitelinas en oocitos del cangrejo azul *C. sapidus* (Lee y Noone, 1995; Lee *et al.*, 1996); algunos estudios recientes también sugieren la interferencia de metales pesados con la secreción de hormonas involucradas en la reproducción y el crecimiento, como ser el MF (Laufer *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2000). Y otros trabajos demuestran el efecto de

contaminantes como el zinc y el cadmio sobre el metabolismo de esteroides y los niveles circulantes (Voogt *et al.*, 1987). En nuestra especie, *C. granulatus*, el descenso significativo del índice gonadosomático en hembras ablacionadas expuestas podría ser consecuencia, por ejemplo, de una menor incorporación de proteínas y lípidos a los oocitos; la hormona GSH, capaz de regular este mecanismo de maduración gonadal podría verse afectada, así como también cualquiera de los otros factores estimulantes (MF y esteroides) que actúan de manera directa o indirecta sobre el ovario. En las secciones siguientes se discutirán estas alternativas.

Cabe destacar también que en nuestro trabajo evaluamos a nivel histológico los ovarios de todos los grupos experimentales de los ensayos *in vivo*. Encontramos diferencias significativas al comparar el diámetro de los oocitos vitelogénicos en los grupos ablacionados, control y expuestos a los metales, siendo menor el diámetro en el grupo expuesto; casualmente, estos mismos grupos son los que difirieron al analizar el índice gonadosomático. Estos resultados estarían apoyando la suposición de un efecto de los metales sobre la incorporación de lipoproteínas a los oocitos durante la vitelogénesis secundaria, lo cual queda reflejado en un reducido diámetro de los oocitos y como consecuencia en un menor peso del ovario (y concomitantemente del IG).

Con respecto al punto b), infinidad de trabajos han demostrado la actividad inhibidora de factores presentes en los pedúnculos oculares. La hormona inhibidora gonadal GIH ha sido caracterizada y secuenciada en varias especies de crustáceos, y además se ha propuesto su modo de acción. Jagan (1985) demostró que la hormona interacciona con microvellosidades en la membrana oocitaria, sitio donde ocurriría por pinocitosis la incorporación de vitelogenina durante la vitelogénesis secundaria. Según este autor, la hormona competiría con la lipoproteína por el mismo sitio de unión al receptor.

- **Los metales ensayados no afectan la secreción hormonal del ganglio torácico**

Evaluamos *in vitro* el efecto de cadmio y cobre sobre GSH, hormona estimuladora gonadal, una de las candidatas a ser blanco de los metales pesados, en función de los resultados de los ensayos *in vivo*. El crecimiento ovárico *in vitro* fue significativamente incrementado cuando se colocó en el medio de cultivo ganglio torácico; este tejido, sitio de síntesis de la GSH, aumentó la incorporación de leucina al ovario, lo cual verifica el efecto estimulante de esta hormona sobre la síntesis proteica. El tratamiento con los tóxicos no incidió sobre la estimulación observada; la presencia de cadmio o cobre en el medio de incubación no interfirió con la potenciación provocada por el ganglio torácico sobre el tejido ovárico (**Figura 21. Resultados**). En consecuencia, queda determinado que la función estimuladora del ganglio torácico no está siendo alterada por los tóxicos.

- **Ambos metales interfieren con el efecto de metil farnesoato y 17-hidroxiprogesterona.**

Los otros dos factores que regulan positivamente la reproducción, 17-hidroxiprogesterona (17PG) y metil farnesoato (MF), fueron incubados en dosis fisiológicas con tejido ovárico. Ambas hormonas mostraron un efecto potenciador del crecimiento ovárico, ya que se elevó de manera significativa la cantidad de radiactividad incorporada cuando las hormonas se encontraban presentes en el medio de cultivo. A diferencia de lo observado con ganglio torácico, en estos ensayos *in vitro* el agregado de cadmio o cobre interfirió con la estimulación hormonal; el agregado del metal al medio frenó por completo el significativo incremento en la incorporación de leucina observado en los grupos no expuestos, manteniendo la radiactividad detectada en ovario en un nivel similar al registrado en ovario incubado solo (control) (**Figuras 22,23. Resultados**). Los metales alteran de alguna

manera la actividad de estas dos hormonas; una posibilidad es que los iones se acoplen a alguna región de la hormona provocando cambios en su conformación, lo cual podría impedir que la hormona atravesara la membrana del oocito, o que ésta pueda unirse a su receptor intracelular, evitando así la transducción de la señal.

No hemos determinado con exactitud cual es el mecanismo por el cual los metales cadmio y cobre interfieren con el efecto de las hormonas estimuladoras del crecimiento gonadal 17PG y MF; lo que sí queda demostrado es que los metales son capaces de actuar diferencialmente en función de los patrones de transducción de cada hormona, puesto que GSH es un factor peptídico que actúa vía un receptor de membrana, y tanto la 17PG como el MF son hormonas lipofílicas que atraviesan la membrana celular, interaccionando con receptores citoplasmáticos o nucleares.

El efecto *in vitro* de los metales sobre esta vía estimuladora del crecimiento ovárico refuerza los resultados obtenidos *in vivo*, sobre los animales apedunculados, y nos permite validar la Hipótesis B.2 planteada inicialmente.

- **La secreción de GIH se encontraría inhibida por los metales estudiados**

La incubación de ovario junto al tejido peduncular (PO) entero, o con alícuotas de extracto de pedúnculo ocular (EPO), demostró que los PO contienen un factor que es secretado al medio de incubación (o agregado directamente con el extracto) e impide la incorporación de <sup>3</sup>H-leucina al tejido gonadal (*Figuras 24,25. Resultados*). La radiactividad asociada al ovario disminuyó significativamente en presencia de un pedúnculo ocular o de una alícuota de EPO equivalente al contenido de dos PO. Estos resultados nos permiten por un lado, validar la

técnica de homogeneización de PO utilizada, y además demostrar que el tejido peduncular en las condiciones *in vitro* establecidas, se encuentra activo y secretando un factor hormonal inhibitorio al medio de cultivo.

Por otro lado, los experimentos *in vitro* corroboran que los metales pesados son capaces de interferir con la actividad de los PO; cuando cadmio y cobre se adicionan al medio de cultivo, se revierte por completo el descenso en la captación de leucina observado en ovarios coincubados con PO (**Figuras 24,25. Resultados**). Los tóxicos estarían actuando de forma directa sobre la secreción del factor inhibitorio (GIH), disminuyendo la cantidad de hormona liberada al medio de cultivo y en consecuencia, reduciendo la inhibición sobre el ovario.

Otra posibilidad, sin embargo, es que los metales actúen sobre el tejido ovárico, interfiriendo con los receptores que reconocen a GIH o impidiendo la transducción de la señal hormonal. Para evaluar tal posibilidad, se incubaron viales conteniendo ovario, PO, una alícuota del metal y diferentes dosis de extracto de pedúnculo ocular. Se produjo una significativa reversión del efecto de los metales pesados, encontrándose una relación dosis-dependiente, donde a mayor concentración de extracto se observó una menor incorporación de leucina al ovario (**Figuras 24,25. Resultados**). Esto nos indica que los tóxicos no provocan un efecto irreversible sobre ovario, es decir, no bloquean los receptores a GIH en la membrana oocitaria, ni alteran la vía de transducción de la señal. Es evidente que el efecto de cadmio y cobre recae sobre la secreción de la hormona GIH, inhibiéndola.

Tal reducción en la liberación de GIH podría deberse, al igual que para el caso de CHH, a una inhibición de los mecanismos de secreción (a nivel de la unión a la membrana del terminal axónico de las vesículas que contienen a la hormona y/o de la secreción de los



neurotransmisores que a su vez estimulan a las células neurosecretoras) o bien a una disminución de la síntesis de GIH. Con respecto a esta última posibilidad, los resultados obtenidos mostraron (**Figuras 18,19. Resultados**) que ninguno de los metales pesados parece disminuir la síntesis de factores pedunculares con función inhibitoria gonadal. Los extractos de pedúnculo ocular, provenientes tanto de hembras expuestas como no expuestas a los metales, e inyectados en hembras controles previamente ablacionadas, produjeron una inhibición significativa del crecimiento ovárico, disminuyendo drásticamente el IG en comparación con el grupo ablacionado control, inyectado con solución salina. Ambos extractos mencionados causaron además un efecto de similar magnitud, indicando que no se modifica la síntesis del factor inhibitorio gonadal luego de la exposición crónica a los metales.

Si bien existe algún antecedente que indica que el cadmio podría inhibir el crecimiento ovárico mediante la estimulación de la secreción de GIH (Rodríguez *et al.*, 2000, en el cangrejo *U. pugilator*), los resultados sobre *C. granulatus* obtenidos en el presente estudio aportan un mayor cúmulo de evidencias, sobre la base de todos los ensayos realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, que indican un efecto inhibitorio de ambos metales ensayados sobre la secreción de GIH. La corroboración definitiva de tal inhibición requerirá sin embargo de un método analítico adecuado para medir los niveles circulantes de la hormona, que al igual que para el caso de CHH, no se encuentra disponible al presente.

## **RESUMEN DE LA DISCUSION. (Sección B)**

El conjunto de resultados obtenidos en esta segunda y última parte de la Tesis indican que tanto cadmio como cobre interfieren con el efecto de factores hormonales extrapedunculares

estimuladores del crecimiento gonadal, pudiendo inhibir además la secreción de factores inhibitorios desde los pedúnculos oculares.

Los metales cadmio y cobre provocan *in vivo* un descenso significativo en el índice gonadosomático de animales ablacionados de los pedúnculos oculares (lo que indica una interferencia con hormonas extrapedunculares estimuladoras), pero no en el IG de animales intactos (lo cuál sugiere un efecto inhibitorio simultáneo sobre la secreción de GIH peduncular).

Tanto la secreción como la síntesis de varias hormonas podrían verse afectadas, así como los mecanismos que éstas desencadenan a nivel tejido blanco; no hemos realizado mediciones *in vivo* de los niveles circulantes de hormonas tales como GSH, metil farnesoato o esteroides ováricos, como paso alternativo para determinar por ejemplo si existen variaciones en la secreción de alguna de ellas; pero sí hemos puesto a punto una técnica *in vitro* que nos permitió por un lado establecer qué hormonas son afectadas por los metales, y por otro, generar nuevas hipótesis sobre qué mecanismos o procesos estarían siendo afectados.

En primer lugar, confirmamos que los metales no tienen un efecto directo sobre el ovario; la actividad de los oocitos no se modifica por el agregado del tóxico en el medio de incubación. Luego, se determinó que a nivel del ganglio torácico, fuente productora de una hormona estimuladora gonadal (GSH), ninguno de los tóxicos produce efecto. La síntesis proteica en ovario se vio favorecida por la presencia de ganglio torácico, tanto en presencia como en ausencia de cadmio y cobre, por lo cual se verifica que la función de GSH no es interferida por los tóxicos (refutación de la **Hipótesis B.1**). Por el contrario, la estimulación gonadal *in vitro* vía metil farnesoato o 17-hidroxiprogesterona es inhibida completamente por ambos metales (corroboración de la **Hipótesis B.2**). Posiblemente, esta disrupción endocrina

causada por ambos metales se deba a la alteración de mecanismos intracelulares, ya que a diferencia de GSH, tanto el MF como la 17PG son hormonas lipofílicas que atraviesan la membrana celular y son reconocidas por receptores intracelulares, siendo el complejo hormona / receptor intracelular el que interactúa posteriormente a nivel nuclear con el DNA.

Finalmente, determinamos *in vitro* que tanto cadmio como cobre contrarrestan el efecto inhibitorio que genera la incubación de ovario con pedúnculo ocular; y que el mecanismo que utilizan los metales no está relacionado con la interferencia de los receptores a GIH en el oocito, ni con la transducción de la señal hormonal. Los metales pesados probablemente causen la inhibición de la secreción de la hormona GIH desde el tejido peduncular (refutación de la Hipótesis B.3).

*CONCLUSIONES*

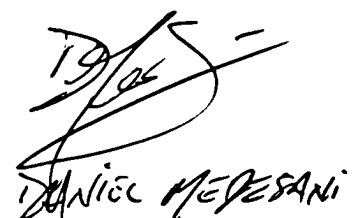
## CONCLUSIONES FINALES

- ✱ **Los metales cadmio y cobre, a las concentraciones subletales ensayadas, actúan como disruptores neuroendocrinos sobre la regulación de la glucemia y del crecimiento gonadal en el cangrejo *C. granulatus*.**
  
- ✱ Ambos metales ensayados estarían inhibiendo la secreción de la hormona hiperglucemiante (CHH), a nivel de los pedúnculos oculares (glándula del seno).
  
- ✱ Tal inhibición posiblemente se deba: a una disminución en la descarga (desde las neuronas presinápticas) de los neurotransmisores que regulan la liberación de CHH en la glándula del seno; a una interferencia con la transducción de esta señal en las neuronas neurosecretoras, o bien, a una inhibición de las enzimas que regulan el procesamiento del precursor hormonal y su posterior almacenamiento en vesículas secretorias.
  
- ✱ No existen evidencias concluyentes que indiquen que los metales inhiben la síntesis de CHH. Es posible sin embargo que ocurra un mecanismo compensatorio, por el cual el propio sistema neuroendocrino regularía la síntesis de CHH, disminuyéndola, en respuesta al descenso en la secreción hormonal causado por los tóxicos.
  
- ✱ El metal cadmio no interfiere con los mecanismos de transducción de la hormona CHH en órganos blanco. Por el contrario, el metal cobre podría interferir en alguna medida con la disponibilidad de receptores a CHH y/o con algún paso en la cascada de segundos mensajeros que desencadena la hormona, a nivel órganos blanco. Es probable que las enzimas fosforilasas quinasas sean inhibidas por este metal en la especie estudiada, provocando un descenso en su actividad, y en consecuencia, impidiendo la degradación de las reservas (glucógeno).

- \* El crecimiento gonadal es afectado indirectamente por los metales pesados, ya que no se observó, *in vitro*, un efecto directo de éstos sobre el ovario.
  
- \* Los metales ensayados no provocaron, *in vitro*, cambios significativos sobre la estimulación ovárica que secreta el ganglio torácico, productor de la hormona GSH.
  
- \* La estimulación del crecimiento gonadal ejercida por otras hormonas extrapedunculares, tales como 17-hidroxiprogesterona y metil farnesoato, sintetizadas en ovario y órgano mandibular respectivamente, es inhibida *in vitro* por la exposición a cadmio y cobre. Algún paso de la transducción de la señal hormonal es probablemente afectado por los tóxicos. En concordancia con esto, se observó *in vivo* un descenso del índice gonadosomático en animales ablacionados de pedúnculos y expuestos a los metales estudiados.
  
- \* *In vitro*, la inhibición gonadal ejercida por los pedúnculos oculares mediante la secreción de GIH (hormona inhibidora gonadal) es contrarrestada por la exposición a los metales, que estarían inhibiendo su secreción. Los metales ensayados no interfieren con los receptores a GIH en ovario, y tampoco actúan sobre la transducción subsiguiente de la señal, ya que el agregado de extractos de pedúnculos oculares (conteniendo GIH) revierte por completo el efecto de los tóxicos.



Dr. Enrique M. Rodriguez



*BIBLIOGRAFIA*

**CAPITULO VI****BIBLIOGRAFIA**

Abramowitz, A.A., Hisaw, F.L. y D.N. Papandrea, 1944. The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *Biol. Bull.*, 86: 1-5.

Adiyodi, R.G. y T. Subramonian, 1983. Arthropoda-Crustacea. En: *Reproductive Biology of Invertebrates*. Adiyodi, K.G. y Adiyodi, R.G. (eds.), Wiley, Chichester, Vol. 1, pp. 443-495.

Aiken, D.E. y S.L. Waddy, 1980. Reproductive Biology. En: *The Biology and Management of Lobsters. Physiology and Behavior*. J.S. Cobb y B.F. Philips (eds.), Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 215-276.

Alexandrowicz, J.S. 1953a. Nervous organs in the pericardial cavity of the decapod Crustacea. *J. Mar. Assoc. U.K.*, 31: 563-580.

Alexandrowicz, J.S. 1953b. Notes of the nervous system in the Stomatopoda. II. The system of dorsal trunks, III. Small nerve cells in motor nerves. *Publicazioni della Staziones Zoologica di Napoli*, 24: 29-45.

Alexandrowicz, J.S. 1954. Innervation of and amphipod heart. *J. Mar. Assoc. U.K.*, 33: 109-119.

Alexandrowicz, J.S. y D.B. Carlisle, 1953. Some experiments on the function of the pericardial organs in Crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 32: 175-192.

Amín, O.A. 1995. Toxicidad para invertebrados marinos de algunos metales pesados detectados en la zona costera próxima a Ushuaia, Tierra del Fuego. Tesis Doctoral. FCEyN, Universidad de Buenos Aires, pp. 33-50.



Aoto, T., Kamiguchi, Y. y S. Hisano, 1974. Histological and ultrastructural studies on the Y organ and the mandibular organ of the freshwater prawn, *Palaemon paucidens*, with special reference to their relation with the molting cycle. J. Fac. Sci., Hokkaido University Seires VI, Zool., 19: 295-308.

Aréchiga, H., Huberman, A. y E. Naylor, 1974. Hormonal modulation of circadian neural activity in *Carcinus maenas* (L.). Proc. R. Soc. Lond., 187(B): 299-313.

Aréchiga, H., Huberman, A. y A., Martínez-Palomo, 1977. Release of the neurodepressing hormone from the crustacean sinus gland. Brain Res., 128: 93-108.

Aréchiga, H., Cabrera-Peralta, C. y A. Huberman, 1979. Functional characterization of the neurodepressing hormone in the crayfish. J. Neurobiol., 10: 409-422.

Atwood, H.L. 1982. Synapses and neurotransmitters. En: The Biology of Crustacea. Bliss, D.E. Atwood, H.L. y D.C. Sandeman (eds.), Academic Press, New York, Vol. 3, pp. 105-150.

Barchas, J.D., Akil, H., Elliott, G.R., Holman, R.B. y S.J. Watson, 1978. Behavioral neurochemistry: neuroregulators and behavioral states. Sci., 200: 964-973.

Battelle, B.A. y E.A. Kravitz, 1976. Effects of octopamine and other amines on cAMP levels in lobster tissues. Neurosci. Abstr., 2: 774.

Bauchau, A.G. y J.C. Mengeot, 1966. Serotonine et glycémie chez les crustacés. Experientia, 22: 238-239.

Beattie, J.H., Marion, M. y F. Denizeau, 1987. The modulation by metallothionein of cadmium-induced cytotoxicity in primary rat hepatocyte cultures. Toxicol., 44: 329-339.

Bigi, R. 1996. Efectos del cadmio sobre la fisiología branquial de *Chasmagnathus granulata* (Decápoda, Brachyura). Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, 87 pp.

Bigi, R., Verrengia-Guerrero, N., Rodríguez, E.M., Kesten, E. y D.A. Medesani, 1996. Acute lethal toxicity and bioaccumulation of cadmium in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Intern. Conf. Poll. Proc. Coas. Environ. J. Marcovecchio (ed.), pp. 292-295.

Blanchet-Tournier, M.F., Meusy, J.J. y H. Junéra, 1980. Mue et vitellogenèse chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas). Etude des effets de la destruction de la région antéro-médiane du protocérébron sur la synthèse de la vitellogénine. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 291(D): 829-832.

Blanck, H., Wängberg, S-A. y S. Molander, 1988. Pollution-induced community tolerance new ecotoxicological tool. En: Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals. J. Cairns, J.R. Pratt (eds.), Philadelphia P.A.: American Society for testing and Materials, ASTM STP, 988: 219-230.

Bliss, D.E. 1951. Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. Anat. Rec., 111: 502-503.

Bomirski, A. y E. Kleck-Kawinska, 1976. Stimulation of oogenesis in the sand shrimp, *Crangon crangon*, by a human gonadotropin. Gen. Comp. Endocrinol., 30: 239-242.

Bond-Buckup, G., Ferreira Fontoura, N., Possa Marroni, N. y L.C. Kucharski, 1991. O Caranguejo: Manual para o ensino prático em zoología. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 71 pp.

Borst, D.W., Ogan, J., Tsukimura, B., Claerhout, T. y K.C. Holford, 2001. Regulation of the crustacean mandibular organ. Amer. Zool., 41: 430-441.

Boschi, E.E., 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense. Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata), Vol. 164, 34 pp.

Boschi, E.E., Scelzo, M.A. y B. Goldstein, 1967. Desarrollo larval de dos especies de crustáceos decápodos en el laboratorio, *Phacycheles haige* Rodríguez da Costa (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae). Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata), 12: 1-44.

- Boschi, E.E. 1979. Geografic distribution of argentinian marine decapod crustaceans. Bull. Biol. Soc. Wash., 3: 134-143.
- Boschi, E.E. 1988. El cangrejal del litoral bonaerense. Taller sobre Cangrejos y Cangrejales. Asociación Argentina de Ciencias Naturales. Resúmenes inéditos.
- Botto, J.L. y H.R. Irigoyen, 1979. Biología de la comunidad del cangrejal. I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo estuarino *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, provincia de Buenos Aires. Memorias de Seminario sobre Ecología bentónica y sedimentación de la plataforma continental del Atlántico Sur. UNESCO: 161-169.
- Brown, F.A. Jr. y O. Cunningham, 1939. Influence of the sinus gland of crustaceans on normal viability and ecdysis. Biol. Bull., 77: 104-114.
- Browdy C.L., Fainzilber, M., Tom, M., Loga, Y. y E. Lubzens, 1990. Vitellin synthesis in relation to oogenesis in *in vitro* incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). J. Exp. Zool., 255: 205-215.
- Byard, E.H. y D.E. Aiken, 1984. The relationship between molting, reproduction, and a hemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*. Comp. Biochem. Physiol., 77(A): 749-757.
- Cahansky, A. 2001. Efectos del mercurio sobre el desarrollo embrionario y la eclosión larval de *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Tesis de Licenciatura. Universidad Maimónides, 49 pp.
- Cargo, D.G. 1958. The migration of adult female blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun, in Chincoteague bay and adjacent waters. J. Mar. Res., 16: 180-191.
- Carlisle, D.B. y F.G.W. Knowles, 1959. Endocrine Control in Crustaceans. Cambridge University Press, Cambridge.

Carvalho de Castilho, P., Martins, I.A. y A. Bianchini, 2001. Gill  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 256: 215-227.

Chan, H.M., Bjerregard, P., Rainbow, P.S. y M.H. Depledge, 1992. Uptake of zinc and cadmium by two populations of shore crabs *Carcinus maenas* at different salinities. Mar. Ecol. Prog. Ser., 86: 91-97.

Chan, S. 1995. Possible roles of 20-hydroxiecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol., 112(C): 51-59.

Chang, E., Sage, B.A. y J.D. O'Connor, 1976. The qualitative and quantitative determinations of ecdysones in tissues of the crab, *Pachygrapsus crassipes*, following molt induction. Gen. Comp. Endocrinol., 30: 21-33.

Chang, E.S. y J.D. O'Connor, 1977. Secretion of  $\alpha$ -ecdysone by crab Y-organs *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 74: 615-618.

Chang, E.S. y J.D. O'Connor, 1978. *In vitro* secretion and hydroxylation of  $\alpha$ -ecdysone as a function of the crustacean molt cycle. Gen. Comp. Endocrinol., 36: 151-160.

Chang, E. y J.D. O'Connor, 1979. Arthropod molting hormones. En: Methods of hormone radioimmunoassay. B.M. Jaffe y H.R. Behrman (eds.), 2<sup>o</sup> edition, Academic Press, New York, pp. 797-814.

Chang, E.S. y J.D. O'Connor, 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: The Biology of Crustacea. Bliss, D.E. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 5, pp. 263-289.

Chang, E.S., Prestwich, G.D. y M.J. Bruce, 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 171: 818-826.

Chang, E.S. 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction: Insects and crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 161-180.

Chang, E.S., Keller, R. y S.A. Chang, 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 111: 359-366.

Chang, E.S., Chang, S.A., Beltz, B.S. y E.A. Kravitz, 1999. Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *J. Comp. Neurol.*, 414: 50-56.

Charniaux-Cotton, H. 1954. Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) et déterminisme des caractères sexuels secondaires: premiers résultats. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris*, 239: 780-782.

Charniaux-Cotton, H. 1980. Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans, description of vitellogenesis and of its endocrine control. *Int. J. Invert. Reprod.*, pp. 177-186.

Charniaux-Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *Amer. Zool.*, 25: 197-206.

Charniaux-Cotton, H. y G. Payen, 1985. Sexual differentiation. En: *The Biology of Crustacea*. D.E. Bliss y Mantel, L.H. (eds.), Academic Press, Orlando, Florida, Vol. 9, pp. 217-299.

Charniaux-Cotton, H., y G. Payen, 1988. Crustacean Reproduction. En: H. Laufer and R.C.G. Downer (eds.), *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, New York: Alan R. Liss, 279-303.

Chu, K.H. 1995. Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang Estuary, China. *J. Crust. Biol.*, 15(2): 214-219.

Chung, J.S., Dircksen, H. y S.G. Webster, 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 96: 13103-13107.

Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990. Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata. Informe de Avance 1989. ISBN N° 950-99583-0-1, Buenos Aires, 422 pp.

Cooke, I.M., Haylett, B.A. y T.M. Weatherby, 1977. Electrically elicited neurosecretory and electrical response of the isolated crab sinus gland in normal and reduced calcium salines. J. Exp. Biol., 101: 125-149.

Cooke, I.M. y R.E. Sullivan, 1982. Hormones and neurosecretion. En: The Biology of Crustacea. D.E. Bliss, H.L. Atwood y Sandeman, D.C. (eds.), Neurobiology: Structure and Function. Academic Press, New York, Vol. 3, pp. 205-290.

Cooper, R.T. 1997. Mangal-associated Brachyura (Ocypodidae, Grapsidae, Portunidae, Majidae, Xanthidae and Leucosidae) from the north-eastern coastal island of Abu Dhabi, United Arab Emirates. Crustaceana, 70(2): 155-179.

Costanza, R., Kemp, W.M. y W.R. Boynton, 1993. Predictability, scale and biodiversity in coastal and estuarine ecosystems: Implications for management. AMBIO, 22: 88-96.

Couch, E.F., Hagino, N. Y J.W. Lee, 1987. Changes in the estradiol and progesterone immunoreactivities in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. Comp. Biochem. Physiol., 87: 765-770.

Courtney, A.J., Montgomery, S.S., Die, D.J., Andrew, N.L., Cosgrove, M.G. y C. Blount, 1995. Maturation in the female eastern king prawn *Penaeus plebejus* from coastal waters of eastern Australia, and considerations for quantifying egg production in penaeid prawns. Mar. Biol., 122: 547-556.

Cousseau, M.B. 1985. Los peces del Río de la Plata y de su frente marítimo. En: Ecología de peces en estuarios y lagunas costeras. A. Yeñez Arancibia (ed.). UNAM, 24: 534-575.

Cronin, L.E. 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Morphol., 81: 209-239.

Dallinger, R. 1977. The flow of copper through a terrestrial food chain. III. Selection of an optimum copper diet by isopods. Oecologia (Berlin), 30: 273-277.

Dallinger, R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. En: Ecotoxicology of metals in Invertebrates. Dallinger, R. y P.S. Rainbow (eds.), SETAC, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 245-289.

Deccaraman, M. y M. Fingerman, 1985. Changes in neurosecretory cells of the brain of the fiddler crab *Uca pugilator*, induced by exposure to the water soluble fraction of South Louisiana crude oil or its toxic aromatic components. J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol., 5: 89-96.

De Freitas Rebelo, M. 1996. Caracterização de efeitos letais e subletais da exposição aguda à amônia em *Chasmagnathus granulata* (Decapoda-Grapsiade) Dana 1851. Tesis de Maestrado, Universidade do Rio Grande, 98 pp.

De Kleijn, D.P.V., Jansen, K.P.C, Martens. G.J.M. y F. Van Herp, 1994a. Cloning and expression of two crustaceans hyperglycemic hormone (CHH) mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. Eur. J. Biochem., 224: 623-629.

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

De Kleijn, D.P.V., De Leeuw, E.P.H., Van Den Berg, M.C., Martens, G.J.M. y F. Van Herp, 1995. Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. Bioch. Biophys. Acta, 1260: 62-66.

De Kleijn, D.P.V. y F. Van Herp, 1998. Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. Invert. Reprod. Develop., 33: 263-272.

Delaleu, J.C. 1970. Le système nerveux intrapericardique et ses relations avec le système nerveux central chez trois oniscoides: *Porcellio dilatatus* (B), *Helleria brevicornis* (E.), et *Ligia oceanica* (L.). Bulletin de la Société Zoologique de France, 95: 201-210.

Dendinger, J.E. y F.C. Schatzlein, 1973. Carbohydrate metabolism in the striped shore crab, *Pachygrapsus crassipes*. II. Glycolitic rates of muscle, gill and hepatopancreas. Com. Biochem. Physiol., 46B: 699-708.

Department of Energy, USA, 1987. Physiological responses of marine organisms to environmental stresses. DOE/ER nº 0317, Washington DC.

Depledge, M.H. 1984. Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* L.) exposed to heavy metal pollution. Comp. Biochem. Physiol., 78(C): 445-459.

Depledge, M.H. y P.S. Rainbow, 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 97(C): 1-7.

Derelle, E., Grosclaude, J., Meusy, J.J., Junera, H. y M. Martin, 1986. ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody. Comp. Biochem. Physiol., 85(B): 1-4.

Diesel, R. 1989. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): Observations on sperm transfer, sperm storage and spawning. J. Crust. Biol., 9(2): 266-277.

Donahue, J.K. 1948. Fluorimetric and biological determination of estrogens in the eggs of the American lobster (*Homarus americanus*). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69: 179-181.

Duffus, J.H., 1983. Environmental Toxicology. Arnold E. (Publishers) Ltd., London, 173 pp.

Eastman-Reks, S. y M. Fingerman, 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol., 79A: 679-684.



Eastman-Reks, S. y M. Fingerman, 1985. In vitro synthesis by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. J. Exp. Zool., 233: 111-1116.

Erdman, R.B. y N.J. Blake, 1988. Reproductive ecology of female golden crabs, *Geryon fenneri* Manning and Holthuis, from southeastern Florida. J. Crust. Biol., 8(3): 401-408.

Fainzilber, M., Tom, M., Shafir, S., Applebaum, S.W. y E. Lubzens, 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp ? Biol. Bull., 183 : 233-241.

Fairs, N.J., Quinlan, P.T. y L.J. Goad, 1990. Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. Aquaculture, 89: 83-99.

Ferrer, LD., 2001. Estudio de diversos metales pesados en sedimentos del estuario de Bahía Blanca y sus efectos tóxicos sobre el cangrejo *Chasmagnathus granulata*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Argentina, 213 pp.

Fingerman, M. 1966. Neurosecretory control of pigmentary effectors in crustaceans. Amer. Zool., 6: 169-179.

Fingerman, M., Hanumante, M.M., Fingerman, S.W. y D.C. Reinschmidt, 1981. Effects of norepinephrine and norepinephrine agonists and antagonists on melanophores of the fiddler crab, *Uca pugilator*. J. Crust. Biol., 1: 16-27.

Fingerman, M., Hanumante, M.M., Kulkarni, G.K., Ikeda, R. y L.L. Vacca, 1985. Localization of substance P-like, leucine enkephalin-like, methionine enkephalin-like, and FMRFamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Cell. Tiss. Res., 241: 473-477.

Fingerman, M. 1987. "The Endocrine Mechanisms of Crustaceans". J. Crust. Biol., 7:1-24.

Fingerman, M. y R. Nagabhushanam, 1992. Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. Mini Review. Comp. Biochem. Physiol., 102C: 343-352.

Fingerman, M., Nagabhushanan, R., Sarojini, R. y P.S. Reddy, 1994. Biogenic amines in crustaceans: Identification, localization and roles. *J. Crust. Biol.*, 14: 413-437.

Fingerman, M. 1995. Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. *Am. Zool.*, 35: 68-78.

Fingerman, M., Devi, M., Reddy, P.S. y R. Katyayani, 1996. Impact of heavy metal exposure on the nervous system and endocrine-mediated processes in crustaceans. *Zool. Stud.*, 35: 1-8.

Fingerman, M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invert. Reprod. Dev.* 31, 47-54.

Fingerman, M., Jackson, N.C. y R. Nagabhushanam, 1998. Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comp. Bioch. Physiol.*, 120(C): 343-350.

Flik, G., Van de Winkel, J.G.J., Pärt, P., Wendelaar Bonga, S.E. y R.A.C. Lock. 1987. Calmodulin mediated cadmium inhibition of phosphodiesterase activity *in vitro*. *Arch. Toxicol.*, 59: 353-359.

Gabe, M. 1953. Sur l'existence, chez quelques Crustacés Malacostracés, d'un organe comparable à la glande de la mue des Insectes. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris*, 237: 1111-1113.

Gabe, M., 1966. Neurosecretion. Pergamon Press, Oxford, 872 pp.

Gabe, M., 1967. Neurosecrétion. Gauthier-Villars, Paris.

Gabe, M. 1971. Données histologiques sur le glomus coxal (Massif préglomulaire) glande de mue possible des Scorpions. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie et Biologie Animale, Série 12, Zoologie*, 13: 609-622.

Gevondyan, N.M. y N.N. Modyanov, 1994. Approaches to disulfide bonds identification in the Na,K-ATPase alpha-subunit. En: The Sodium Pump: Structure, mechanism, hormonal control and its role in disease. Bamberg, E. y W. Schoner (eds.), New York, pp. 374-376.

Ghosh, D. y A.K. Ray, 1993. 17-gama-hydroxisteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Relation to ovarian condition and estrogen treatment. Gen. Comp. Endocrinol., 89: 248-254.

Giese, A.C. y J.S. Pearse, 1974. Introduction: General Principles. En: Reproduction of Marine Invertebrates. Giese, A.C. y J.S. Pearse (eds.), Vol. 1: 1-49.

Giesy, J.P. 1988. Phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): relationship with condition factor and blood cortisol. Comp. Biochem. Physiol., 90(A): 367-377.

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

Gómez, R. y K.K. Nayar, 1965. Certain endocrine influences in the reproduction of the crab *Parathelphusa hydrodromous*. Zool. Jahrb., Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere, 71: 694-701.

Hanström, B. 1933. Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem des Crustaceen. II. Zoologische Jahrbücher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere, 56: 387-520.

Hanström, B. 1934. Über das Organ X, eine inkretorische Gehirndrüse der Crustaceen. Psychiatria et Neurobiologia, 38: 405-419.

Hanström, B. 1939. Hormones in Invertebrates. Oxford University Press, London and New York.

Hartnoll, R.G. 1965. Notes on the marine grapsid crabs of Jamaica. Proc. R. Soc 176(2): 113-147.

Hartnoll, R.G. 1968. Morphology of the genital ducts in female crabs. J. Linn. Soc. (Zool.), 47(312): 279-300.

Hartnoll, R.G. 1969. Mating in the Brachyura. Crustaceana 16: 161-181.

Hassall, M. y M. Dangerfield, 1990. Density-dependent processes in the population dynamics of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidae). J. Anim. Ecol., 59: 941.

Haux, C., Larsson, A., Lithner, G. y M. Sjöbeck, 1986. A field study of physiological effects on fish in lead-contaminated lakes. Environ. Toxicol. Chem., 5: 283-288.

Hidalgo, H.A., Koppa, V. y S.E. Bryan, 1976. Effect of cadmium on RNA-polymerase and protein synthesis in rat liver. FEBS letters, 64: 159-162.

Hinsch, G.W. y M.V. Cone, 1969. Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab *Libinia emarginata*. J. Cell. Biol., 40: 336-342

Hinsch, G.W. y D.C. Bennet, 1979. Vitellogenesis stimulated by thoracic ganglion implants into destalked immature spider crab, *Libinia emarginata*. Tissue & Cell, 11: 345-351.

Hinsch, G.W. 1980. Effect of mandibular organ implants upon spider crab ovary. Transactions of the American Microscopical Society, 99: 317-322.

Hinsch, G.W. 1988. Morphology of the reproductive tract and seasonality of reproduction in the golden crab *Geryon fenneri* from the eastern Gulf of Florida. J. Crust. Biol., 8(2): 254-261.

Hochachka, P.W., Somero, G.N., Schneider, D.E. y J.M. Freed, 1970. The organization and control of metabolism in the crustacean gill. Comp. Biochem. Physiol., 33: 529-548.

Hohnke, L. y B.J. Scheer, 1970. Carbohydrate metabolism in crustaceans. En: Chemical Zoology Part V. Florkin, M. y Scheer, B.J., (eds.), Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 147-166.

Homola, E. y E.S. Chang, 1997. Methyl farnesate: crustacean juvenile hormone in search of functions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B: 347-356.

Hopkin, S.P. 1993. Deficiency and excess of copper in terrestrial isopods. En: *Ecotoxicology of metals in Invertebrates*. Dallinger, R. y P.S. Rainbow (eds.), SETAC, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 359-382.

Huberman, A., Aréchiga, H., Cimet, A., de la Rosa, J. y C. Aramburo, 1979. Isolation and purification of a neurodepressing hormone from the eyestalk of *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Eur. J. Biochem.*, 99: 203-208.

Jeng, S.S., Wan, W.C. y C.F. Chang, 1978. Existence of an estrogen-like compound in the ovary of the shrimp *Parapenaeus fissurus*. *Gen. Comp. Endocr.*, 36: 211-214.

Jo, Q.T., Laufer, H., Biggers, W.J. y H.S. Kang, 1999. Methyl farnesoate induced ovarian maturation in the spider crab, *Libinia emarginata*. *Invert. Reprod. Develop.*, 36: 1-3.

Jonnalagadda, S.B. y P.V.V. Prasada Rao, 1993. Toxicity, bioavailability and metal speciation. Mini review. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106(C): 585-595.

Joylet, F. y H. Viallanes, 1893. Recherches physiologiques sur le système nerveux accélérateur et modérateur du coeur chez le crabe. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie et Biologie Animale*, 14: 387-404.

Jugan, P. 1985. Régulation de la croissance ovocytaire chez le crustacé *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Démonstration d'une endocytose par récepteurs et approche du mode d'action de la neurohormone inhibitrice de la vitellogenèse. Tesis Doctoral, Université P. et M. Curie, Paris, 1985.

Jugan, P. y D. Soyez, 1985. Démonstration in vitro de l'inhibition de l'endocytose ovocytaire par un extrait de glande de sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 300 : 705-709.

Jugan, P. y F. Van Herp, 1989. Introductory study of an oocyte membrane protein that specifically binds vitellogenin in the crayfish *Orconectes limosus*. *Invert. Reprod. Develop.*, 16 : 149-154.

Kanost, M.R., Kawooya, J.K., Law, J.H., Ryan, R.O., Van Heusden, M.C. y R. Ziegler, 1990. Insect hemolymph proteins. En: *Advances in Insect Physiology*. Evans, P.D. y Wigglesworth, V.B. (eds.), Academic Press, Orlando, Vol. 22, pp. 199-396.

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

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

Keller, R., y J. Beyer, 1968. Zur hyperglykämischen wirkung von serotonin und augenstielextrakt beim flusskrebs *Orconectes limosus*. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 59: 78-85.

Keller, R. 1969. Untersuchungen zur Artspezifität eines Crustaceenhormons. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 63: 137-145.

Keller, R. y E.M. Andrew, 1973. The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 20: 572-578.

Keller, R. y G. Wunderer, 1978. Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34: 328-335.

Keller, R. y G. Kegel, 1984. Studies on crustacean eyestalk neuropeptides by use of high performance liquid chromatography. En: *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*. Hoffmann, J. y Porchet, M. (eds.), Springer, Berlin, pp. 145-154.

Keller, R., Jaros, P.P. y G. Kegel, 1985. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *Amer. Zool.*, 25: 207-221.

Keller, R. y D. Sedlmeier, 1988. A metabolic hormone in crustaceans: The hyperglycemic neuropeptides. En: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. Laufer, H. y Downer, R.G.H. (eds.), Alan R. Liss, New York, Vol. 2, pp. 315-326.

Keller, R. y H.P. Orth, 1990. Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. En: *Progress in Comparative Endocrinology*. Epple, A., Scanes, C.G. y Stetson, M.H. (eds.), Wiley-Liss, New York, pp. 265-271.

Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48, 439-448.

Kennedy, F.S. y D.G. Barber, 1981. Spawning and recruitment of pink shrimp, *Penaeus duorarum*, off eastern Florida. *J. Crust. Biol.*, 1: 474-485.

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

Knowles, F.G.W. 1953. Endocrine activity in the crustacean nervous system. *Proc. R. Soc. Lond.*, 141B: 248-267.

Kogan, M., López Greco, L.S. y E.M. Rodríguez, 2000. Effects of cadmium on somatic and gonadal growth of juvenile females of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). *Zool. Stud.*, 39: 344-350.

Koller, G. 1925. Farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. *Verh. Dtsh. Zool. Ges.*, 30: 128-132.

Koller, G. 1928. Versuche über die inkretorischen Vorgänge beim Garneelenfarbwechsel. *Zeitschrift Vergleichende Physiologie*, 8: 601-612.

Koller, G. 1930. Weitere Untersuchungen über Farbwechsel und Farbwechselhormone bei *Crangon vulgaris*. *Zeitschrift Vergleichende Physiologie*, 12: 632-667.

Kraak, M.H.S., Toussaint, M., Bleekar, E.A.J. y D. Lavy, 1993. Metal regulation in two species of freshwater bivalves. En: *Ecotoxicology of metals in Invertebrates*. Dallinger, R. y P.S. Rainbow (eds.), SETAC, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 178-186.

Kravitz, E.A., Glusman, S., Harris-Warrick, R.M., Livingstone, M.S., Schwartz, T. y M.F. Goy, 1980. Amines and a peptide as neurohormones in lobsters: Actions on neuromuscular preparation and preliminary behavioral studies. *J. Exp. Biol.*, 89: 159-175.

Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R. y P.K. Joshi, 1979. Effect of progesterone on ovarian maturation in a marine penaeid prawn *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers, 1878). *Ind. J. Exp. Biol.*, 17: 986-987.

Kulkarni, G.K., Glade, L. y M. Fingerman, 1991a. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on *in vitro* synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *J. Crust. Biol.*, 11: 513-522.

Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., Amaldoss, G., Jaiswal, R.G. y M. Fingerman, 1991b. 5-hydroxytryptamine stimulation of the ovary in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Amer. Zool.*, 31: 115A.

Kulkarni, G.K. y M. Fingerman, 1992. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101(C): 419-423.

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

Lachaise, F., Goudeau, M., Carpenter, G., Saidi, B. y H. Goudeau, 1992. Eyestalk ablation in female crabs: effects of egg characteristics. *J. Exp. Zool.*, 261: 86-96.

Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M. y R. Lafont, 1993. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control. Review. *J. Crust. Biol.*, 13: 198-234.



Laufer, H., Landau, M. y E. Homola, 1986. The synthesis and regulation of methyl farnesoate, a new juvenile hormone for crustacean reproduction. *Adv. Invert. Reprod.* 4: 135-143.

Laufer, H., Borst, D., Baker, F.C., Carrasco, C., Sinkus, M., Reuter, C.C., Tsai, L.W. y D.A. Schooley, 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science*, 235: 202-205.

Laufer, H. y M. Landau, 1991. Endocrine control of reproduction in shrimp and other Crustacea. In: *Frontiers in Shrimp Research*. P. DeLoach, W.J. Dougherty, and M.A. Davidson, eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 65-81.

Laufer, H., Sagi, A., Ahl, J.S.B. y E. Homola, 1992. Methyl farnesoate appears to be a crustacean reproductive hormone. *J. Invert. Reprod. Develop.*, 22: 1-3.

Laufer, H., Ahl, J.S.B. y A. Sagi, 1993. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *Amer. Zool.* 33, 365-374.

Laufer, H., Lui, L. y F. Van Herp, 1994. A neuropeptide family that inhibits the mandibular organ of Crustacea and may regulate reproduction. En: *Insect Neurochemistry and Neuropharmacology*. Borkovec, A.B. y Loeb, M.J. (eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 203-206.

Laufer, H., Biggers, W.J. y J.S.B. Ahl, 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 111: 113-118.

Laverdure, A. y D. Soyeux, 1988. Vitellogenin receptors from lobster oocyte membrane: solubilization and characterization by a solid phase binding assay. *J. Invert. Reprod. Develop.*, 13: 251-266.

Le Roux, A. 1968. Description d'organes mandibulaires nouveaux chez les Crustacés Décapode. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 266: 1414-1417.

Lee, R.F. y T. Noone, 1995. *Mar. Environ. Res.*, 39: 152-154.

Lee, C-Y. y R.D. Watson, 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis. J. Exp. Zool., 271: 364-372.

Lee, C-Y., Elton, T.S., Bej, A.K., Watts, S.A. y R.D. Watson, 1995. Molecular cloning of cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 209: 1126-1131.

Lee, R.F., O'Malley, K. y Y. Oshima, 1996. Effects of toxicants on developing oocytes and embryos of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Mar. Environ. Res., 40: 125-128.

Lee, C-Y., Watson, R.D. y R.D. Roer, 1998. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 249: 624-627.

Lemos, J.R. y A. Berlind, 1980. Cyclic adenosine monophosphate mediation of peptide neurohormones effects on the lobster cardiac ganglion. J. Exp. Biol., 90: 307-326.

Levi, D. y M. Vacchi, 1988. Macroscopic scale for simple and rapid determination of sexual maturity in *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1826) (Decapoda, Penaeidae). J. Crust. Biol., 8(4): 532-538.

Leuven, R.S.E.W., Jaros, P.P., Van Herp, F. y R. Keller, 1982. Species or group specificity in biological and immunological studies of crustacean hyperglycemic hormone. Gen. Comp. Endocrinol., 46: 288-296.

Lisk, R.D. 1961. Estradiol-17beta in the eggs of the American lobster, *Homarus americanus*. Can. J. Biochem. Physiol., 39: 659-662.

Liu, L., Laufer, H., Wang, Y. y T. Hayes, 1997. A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a crustacean. Biochem. Biophys. Res. Commun., 237: 694-701.

Livingstone, M.S., Harris-Warrick, R.M. y E.A. Kravitz, 1980. Serotonin and octopamine produce opposite postures in lobsters. Science, 208: 76-79.

López Greco, L.S. 1997. Adquisición de la madurez sexual y caracterización del patrón de crecimiento y reproducción en *Chasmagnathus granulata*, Dana 1851 (Brachyura, Grapsidae, Sesarminae) de Bahía Samborombón, Buenos Aires, Argentina. Tesis Doctoral, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, 244 pp.

López, L.S., Stella, V.S. y E.M. Rodríguez, 1997. Size at the onset of the sexual maturity in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Nauplius*, 5: 65-75.

López Greco, L.S. y E.M. Rodríguez, 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Cah. Biol. Mar.*, 40: 155-164.

López Greco, L.S., Lavolpe, M. y E.M. Rodríguez, 2001a. Embryogenesis and hatching of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae) exposed to copper. Fifth International Crustacean Congress and Summer 2001 meeting of The Crustacean Society. Melbourne, Australia.

López Greco, L.S., Sánchez, M.V., Nicoloso, G.L., Medesani, D.A. y E.M. Rodríguez, 2001b. "Toxicity of cadmium and copper on larval and juvenile stages of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae)". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 333-338.

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

Lui, C.W. y J.D. O'Connor, 1977. Biosynthesis of lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *Pachygrapsus crassipes*. *J. Exp. Zool.*, 199: 105-108.

Lüschen, W., Willig, A. y P.P. Jaros, 1993. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas*. *J. Comp. Biochem. Physiol.*, 105(C): 291-296.

Maldonado, H. y A. Miralto, 1982. *J. Comp. Physiol.*, 147: 455-459.

Mancillas, J.R., McGinty, J.F., Selverston, A.I., Karten, H. y F.E. Bloom, 1981. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurones of lobster. *Nature*, 293: 576-578.

Martin, G., Keller, R., Kegel, G., Besse, G. y P.P. Jaros, 1984. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. I: Isolation and characterization. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55: 208-216.

Mattson, M.P. y E. Spaziani, 1985. 5-hydroxytryptamine mediates release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. *Biol. Bull.*, 169: 246-255.

Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume D.C. y B.A. Rattner, 1992. Physiological and Nonspecific biomarkers. En: *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M. y H.L. Bergman (eds.), SETAC, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 5-86.

Maynard, D.M. 1961. Thoracic neurosecretory structures in Brachyura. I. Gross anatomy. *Biol. Bull.*, 121: 316-327.

Medesani, D.A., López Greco, L.S. y E.M. Rodríguez, 2001. Effects of cadmium and copper on hormonal regulation of glycemia by the eyestalks, in the crab *Chasmagnathus granulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 71-76.

Menni, R. 1983. Los peces en el medio marino. Estudio Sigma, S.R.L. (eds.), Bs. As., 169 pp.

Meusy, J.J., Blanchet, M.F. y Junéra, H. 1977. Mue et vitellogenèse chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* Pallas. II. Etude de la synthèse de la vitellogénine ("fraction protéique femelle" de l'hémolymphe) après destruction des organes Y. *General and Comparative Endocrinology*, 33: 35-40.

Meusy, J.J., Zerbib, C., Dacheux, F. y M.P. Dubois, 1983. Subcellular localization vitellogenin in crustacean adipocytes by the unlabelled antibody enzyme method. *Tissue Cell.*, 15: 301-310.

Meusy, J.J. y G. Payen, 1988. Female reproduction in malacostracan crustaceans. *Zool. Sci.*, 5: 217-265.

Munck, A., Guyre, P.M. y N.J. Holbrook, 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.*, 5(1): 25-44.

Munshi, A.B., Quan, S.Y. y S.J. Li, 1996. Acute toxicity of copper, cadmium and copper-cadmium mixture to the larvae of the shrimp *Penaeus monodon*. *Pak. J. Sci. Res.*, 39: 68-71.

Nagabushanam, R., Fingerman, S.W. y M. Fingerman, 1979. Effect of the polychlorinated biphenyl preparation Aroclor 1242 on the quantity of neurosecretory material in the medulla terminalis X-organ of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Experientia*, 35: 1083-1084.

Nagabushanam, R., Reddy, P.S. y M. Fingerman, 1998. Heavy metal pollution: Use of marine crustaceans as biological indicators. En: *Advances in Marine Biotechnology*, Vol 2: Environmental marine biotechnology. Fingerman, M., Nagabushanam, R. y M-F. Thompson (eds.), Oxford & IBH Publishing Co. PVT. Ltd., Nueva Delhi, Calcuta, pp. 225-254.

Naimo, T.J. 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicol.*, 4: 341-362.

Nery, L.E.M., Santos, E.A., Bianchini, A. y A.A. Gonçalves, 1993. Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. *Braz. Med. Biol. Res.*, 26: 1291-1296.

Nonnotte, L., Boitel, F. y J.P. Truchot, 1993. Waterborne copper causes gill damage and hemolymph hypoxia in the shore crab *Carcinus maenas*. *Canad. J. Zool.*, 71: 1569-1576.

OEA (Organización de los Estados Americanos). 1970. Cuenca del Río de la Plata. Informe del estudio de la oficina de Desarrollo regional (Unidad de recursos naturales) período 1968/1970. (Mapa de uso agrícola de la tierra).

Okumura, T., Han, C.H., Suzuki, Y., Aida, K. y I. Hanyu, 1992. Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Zool. Sci.*, 9: 37-45.

Olivier, S.R., Escofet, A.M., Penchaszadeh, P. y J.M. Orensanz, 1972a. Estudios de la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). I. Las comunidades bentónicas. *An. Soc. Cient. Arg.*, 193: 237-262.

Olivier, S.R., Escofet, A.M., Penchaszadeh, P. y J.M. Orensanz, 1972b. Estudios de la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). II. Relaciones tróficas interespecíficas. *An. Soc. Cient. Arg.*, 194: 89-104.

Orensanz, J.M., Parma, A.M. Armstrong, D.A. Armstrong, J. y P. Wardrup, 1995. The breeding ecology of *Cancer gracilis* (Crustacea, Decapoda, Cancridae) and the mating systems of cancrid crabs. *J. Zool.*, 235: 411-437.

Otsu, T. 1963. Biohormonal control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*. *Embryologica*, 8: 1-20.

Paasivirta, J. 1991. Cycles of chemicals in the environment. En: *Chemical Ecotoxicology*. Lewis Publisher, pp. 3-18.

Panouse, J. 1943. Influence de l'ablation du pédoncle oculaire sur la croissance de l'ovarie chez la crevette *Leander serratus*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris*, 217: 553-555.

Parvathy, K. 1972. Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustaceans. I. Effect of eyestalk removal in *Ocypode platytarsis*. *Mar. Biol.*, 14: 58-62.

Passano, L.M. 1951. The X organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. *Anat. Rec.*, 111: 502.

Passano L.M. 1960. Molting and its Control. En: *The physiology of Crustacea*. T. H. Waterman (ed.), Academic Press, N.Y., Vol. 1, pp. 473-536.

Paulus, J.E. y H. Laufer, 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda brachyura). *Int. J. Invert. Reprod. Develop.*, 11: 29-44.

Payen, G.G. 1986. Endocrine regulation of male and female genital activity: a retrospect and perspectives. En: *Advances in Invertebrate Reproduction*. M. Porchet, J.C. Andries y A. Dhainaut (eds.) Elsevier Science Publishers, Vol.4: pp. 125-134.

Perkins, E.B. 1928. Color changes in crustaceans, especially in *Palaemonetes*. *J. Exp. Zool.*, 50: 71-105.

Picaud, J.L. 1980. Vitellogenin synthesis by the fat body of *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacea, Isopoda). *Int. J. Invert. Reprod.* 2: 341-349.

Quackenbush, L.S. y M. Fingerman, 1984. Regulation of the release of chromatophorotropic neurohormones from the isolated eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Biol. Bull.*, 166: 237-250.

Quackenbush, L.S. y M. Fingerman, 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay of black pigment dispersing hormone from the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57: 438-444.

Quinitio, E.T., Hara, A., Yamauchi, K. y S. Nakao, 1994. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109(C): 21-26.

Rainbow, P.S. 1985. Accumulation of Zn, Cu and Cd by crabs and barnacles. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 21: 669-686.

Rainbow, P.S. 1988. The significance of trace metal concentrations in decapods. *Symp. Soc. Lond.*, 59: 291-313.

Rainbow, P.S. 1992. The significance of accumulated heavy metal concentrations in marine organisms. En: *Proceedings of Bioaccumulation Workshop*. Water Board and Australian Marine Sciences Association Inc., Sydney, 13 pp.

Rainbow, P.S. 1993. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. En: Ecotoxicology of metals in Invertebrates. Dallinger, R. y P.S. Rainbow (eds.), SETAC, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 3-23.

Rainbow, P.S. y R. Dallinger, 1993. Metal uptake. Regulation and excretion in freshwater invertebrates. En: Ecotoxicology of metals in Invertebrates. Dallinger, R. y P.S. Rainbow (eds.), SETAC, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 119-131.

Rainbow, P.S., Malik, L. y P. O'Brien, 1993. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarella*. Aquat. Toxicol., 25: 15-30.

Rainbow, P.S. 1995. Physiology, physicochemistry and metal uptake - A Crustacean perspective. Mar. Poll. Bull., 1-3: 55-59.

Rainbow, P.S. 1997. Ecophysiology of Trace Metal Uptake in Crustaceans. Estuar. Coast. Shelf Sci., 44: 169-175.

Ramamurthi, R., Mumbach, M.W. y B.T. Scheer, 1968. Endocrine control of glycogen synthesis in crabs. Comp. Biochem. Physiol., 26: 311-319.

Rao, K.R. 1965. Isolation and partial characterization of the moult-inhibiting hormone of the crustacean eyestalk. Experientia, 21: 593-594.

Rao, K.R. 1985. Pigmentary effectors. En: The Biology of Crustacea. Integument, pigments and hormonal processes. D.E. Bliss y Mantel, L.H. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 9: pp. 395-462.

Rao, K.R. y J.P. Riehm, 1989. The pigment-dispersing hormone family: chemistry, structure-activity relations, and distribution. Biol. Bull., 177: 225-229.

Rao, K.R. y J.P. Riehm, 1993. Pigment-dispersing hormones. En: The Melanotropic Peptides. Ann. N.Y. Acad. Sci., 680: 78-88.



Rao, K.R. 2001. Crustacean pigmentary-effector hormones: chemistry and functions of RPCH, PDH, and related peptides. *Amer. Zool.*, 41: 364-379.

Rasmussen, A.D. y O. Andersen, 1996. Apparent water permeability as a physiological parameter in Crustacean. *Review. J. Exp. Biol.*, 199: 2555-2564.

Ray, S. 1984. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia*, 40: 14-23.

Rebelo, M.F., Rodríguez, E.M., Ansaldo, M. y E.A. Santos, 2000. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 125(C): 157-164.

Reddy, P.S. y M. Fingerman, 1995. Effect of cadmium chloride on physiological color changes of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 31: 69-75.

Reddy, P.S., Katyayani, R.V. y M. Fingerman, 1996. Cadmium and naphthalene-induced hyperglycemia in the fiddler crab, *Uca pugilator*: differential modes of action on the neuroendocrine system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 425-431.

Reddy, P.S., Tuberty, S.R. y M. Fingerman, 1997. Effects of cadmium and mercury on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 62-65.

Reddy, P.S. y R. Ramamurthi, 1998. Methyl farnesoate stimulates ovarian maturation in freshwater crab *Oziotelphusa senex senex* Fabricius. *Current Science*, 24: 68-70.

Richardson, H.G., Deecaraman, M. y M. Fingerman, 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99C: 53-56.

Rodríguez Moreno, P.A., Schwarzbaum, P.J. y E.M. Rodríguez, 1998. Effects of cadmium on gill Na,K-ATPase activity of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) during postmolt: *in vivo* and *in vitro* studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61: 629-636.

Rodríguez, E.M. 1991. Efectos letales y subletales de dos plaguicidas sobre las especies *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Cangrejal Bonaerense). Tesis Doctoral, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, 219 pp.

Rodríguez, E.M., Monserrat, J.M. y O.A. Amín, 1992. Chronic toxicity of ethyl parathion and isobutoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to estuarine juvenile and adult crabs. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 22: 140-145.

Rodríguez, E.M. y A. Pisanó, 1993. Effects of parathion and 2,4-D to eggs incubation and larvae hatching in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachiura). Comp. Biochem. Physiol., 104(C): 71-78.

Rodríguez, E.M. y D.A. Medesani, 1994. Pathological lesions in larvae hatched from ovigerous females of *Chasmagnathus granulata* exposed to cadmium. Experientia, 50: 975-977.

Rodríguez, E.M., Monserrat, J.M., Medesani, D.A., Bigi, R., Rodríguez Moreno, P.A., Lopez, L.S., Stella, V.S., Cervino, C.O. y M. Ansaldo, 1998. Efectos letales y subletales de plaguicidas y metales pesados en cangrejos de estuario. Revisión de una década de investigaciones. En: Nueva Serie, N° 150- Ecotoxicología. MACN, Bs. As. T. Stadler (ed.), pp. 1-17.

Rodríguez, E.M., López Greco, L.S. y M. Fingerman, 2000. Inhibition of ovarian growth by cadmium, in the fiddler crab *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). Ecotoxicol. Environ. Saf., 46: 202-206.

Rodríguez, E.M., Bigi, R., Medesani, D.A., Stella, V.S., López, L.S., Rodríguez Moreno, P.A., Monserrat, J.M. y M. Ansaldo, 2001. Acute and chronic effects of cadmium on blood homeostasis of an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, and the modifying effect of salinity. Braz. J. Med. Biol. Res., 34: 509-518.

Rodríguez, E.M., López Greco, L.S., Medesani, D.A., Laufer, H. y M. Fingerman, 2002a. Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. Gen. Comp. Endocrinol., 125: 34-40.

Rodríguez, E.M., Medesani, D.A., López Greco, L.S. y M. Fingerman, 2002b. Effects of some steroids and other compounds on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during early vitellogenesis. *J. Exp. Zool.*, 292: 82-87.

Rossi, J.B. 1982. Aspectos hidrobiológicos del Arroyo de San Clemente (Bahía Samborombón). *Revista del Museo de la Plata (Nueva Serie), Sección Zoología*, XIII, 132: 29-38.

Sagi, A., Homola, E. y H. Laufer, 1991. Methyl farnesoate in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Synthesis by the mandibular organ *in vitro*, and titers in the hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99(B): 879-882.

Sandifer, A.P. 1973. Distribution and abundance of decapod crustacean larvae in the York river estuary and adjacent lower Chesapeake Bay, Virginia, 1968-1969. *Chesapeake Sci.*, 14: 235-257.

Santos, E.A., Nery, L.E.M. y G.C. Manzoni, 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decápoda: Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 89(A): 329-332.

Santos, E.A. y R. Keller, 1993a. Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone – evidence for a dual feedback control system. *J. Comp. Physiol.*, 163: 374-379.

Santos, E.A. y R. Keller, 1993b. 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(A) 2: 343-347.

Santos, E.A. y R. Keller, 1993c. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: current perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 106(A) 3: 405-411.

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

Sarojini, R., Jayalakshmi, K. y S. Sambashivavao, 1986. Effect of external steroids on ovarian development in freshwater prawn, *Macrobrachium lamerrii*. J. Adv. Zool., 7: 50-53.

Sarojini, R., Nagabhushanam, R. y M. Fingerman, 1994. A possible neurotransmitter-neuroendocrine mechanism in naphthalene-induced atresia of the ovary of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol., 108(C): 33-38.

Sarojini, R., Nagabhushanam, R. y M. Fingerman, 1995a. Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Gen. Comp. Endocrinol., 97: 160-170.

Sarojini, R., Nagabhushanam, R. y M. Fingerman, 1995b. Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: an *in vivo* and *in vitro* study. J. Exp. Zool., 271: 395-400.

Sastry, A.N. 1983. Ecological aspects of reproduction. En: The biology of Crustacea. D. Bliss (ed.), Academic Press, New York, Vol. 8, pp. 179-269.

Sasser, E.W. y C.A. Singhas, 1992. Presence of an estradiol-like steroid in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Aquaculture, 104: 367-373.

Scelzo, M.A. 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Inv. Mar., 25: 177-185.

Schmitt, A.S. y E.A. Santos, 1993a. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. Comp. Biochem. Physiol., 106(A) 2: 329-336.

Schmitt, A.S. y E.A. Santos, 1993b. Behaviour and haemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. Comp. Biochem. Physiol., 106(A) 2: 337-342.

Schubart, C.D., Cuesta, J.A. y D.L. Felder, 2002. Glyptograpsidae, a new brachyuran family from central america: larval and adult morphology, and a molecular phylogeny of the grapsoidae. J. Crust. Biol., 22(1): 28-44.

Schwabe, C.W., Scheer, B.T. y M.A.R. Scheer, 1952. The molt cycle in *Panulirus japonicus*. Part two of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. *Physiol. Comp. Oecol.*, 2: 310-320.

Sedlmeier, D. y R. Keller, 1981. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45: 82-90.

Sedlmeier, D. 1982. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH) II. Involvement of glycogen synthase. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47: 426-432.

Sedlmeier, D. 1985. Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *American Zoologist*, 25: 223-232.

Sedlmeier, D. 1987. The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.*, 87<sup>a</sup>: 423-425.

Sedlmeier, D. y A. Seinsche, 1998. Ecdysteroid synthesis in the crustacean Y-organ: role of cyclic nucleotides and Ca<sup>2+</sup>. En: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Primera edición, G.M. Coast y S.G. Webster (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 125-137.

Serfozo, J. 1993. Necrotic effects of the xenobiotics accumulations in the central nervous system of a crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschz). *Acta Biol. Szeged.*, 39: 23-38.

Shih, J.T. y Y.M. Wang, 1993. Progesterone-like substance in the ovaries, hepatopancreas and hemolymph of the female *Uca arcuata*. *Bull. Instit. Zool. Acad. Sinica*, 32: 120-126.

Skinner, D.M. 1985. Molting and regeneration. En: *The Biology of Crustacea*, Vol. 9. D.E. Bliss y L.H. Mantel (eds.), Academic Press, Orlando, pp. 43-146.

Soegianto, A., Charmantier-Daures, M. Trilles, J.P. y G. Charmantier, 1999. Impact of copper on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda). *J. Crust. Biol.*, 19: 209-223.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1981. Biometry, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Freeman.

Souty-Grosset, C. 1997. Vitellogenin Synthesis in Marine Invertebrates. En: Recent advances in marine biotechnology. Fingerman, M., Nagabhushanam, R., y M.F. Thompson (eds.), New Delhi, Oxford and IBH Publishing Co., Vol. I, pp. 203-248.

Soyez, D., Le Caer, J.P., Noel, P.Y. y J. Rossier, 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. Neuropeptides, 20: 25-32.

Spindler, K.D., Dinan, L. y M. Londershausen, 1984. On the mode of action of ecdysteroids in crustaceans. En: Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones. Hoffmann, J.A. y M. Porchet (eds.), Springer Verlag, Heidelberg, pp. 255-264.

Spindler-Barth, M. y K.D. Spindler, 1987. Antiecdysteroids and receptors. En: Receptor Mediated Antisteroid Action. Agarwal, M.K. (ed.), W. de Gruyter, Berlin, pp. 497-511.

Spindler, K.D., 1989. Hormonal role of ecdysteroids in Crustacea, Chelicerata and other Arthropods. En: Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action. J. Koolman (ed.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 290-295.

Spindler, K.D., Hennecke, R. y G. Gellissen, 1992. Protein production and the molting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordman 1842). Gen. Comp. Endocrinol., 85: 248-253.

Stangier, J., Dircken, H. y R. Keller, 1986. Identification and immunocytochemical localization of proctolin in pericardial organs of the shore crab, *Carcinus maenas*. Peptides, 7: 67-72.

Stangier, J., Hilbich, C., Beyreuther, K. y R. Keller, 1987. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 84: 575-579.

Staub, G.C. y M. Fingerman, 1984a. Effect of naphthalene on color changes of the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77(C): 7-12.

Staub, G.C. y M. Fingerman, 1984b. A mechanism of action for the inhibition of black pigment dispersion in the fiddler crab, *Uca pugilator*, by naphthalene. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79(C): 447-453.

Strolenberg, G.E.C. y F. Van Herp, 1977. Mise en évidence du phénomène d'exocytose dans la glande du sinus d'*Astacus leptodactylus* (Nordmann) sous l'influence d'injections de serotonine. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris*, 284D: 57-59.

Sullivan, R.E. 1980. Pharmacological investigation of crayfish hindgut: The actions of biogenic amines, acetylcholine and peptide hormone. *Physiologist*, 23: 16 pp.

Suzuki, S. 1986. Effect of Y-organ ablation on oocyte growth in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Biol. Bull.*, 170: 350-355.

Takayanagi, H., Yamamoto, Y. y N. Takeda, 1986. An ovary-stimulating factor in the shrimp *Paratya compressa*. *J. Exp. Zool.*, 240: 203-209.

Taketomi, Y. 1986. Ultrastructure of the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Cell Biol. Inter. Rep.*, 10: 131-136.

Tamone, S.L. y E.S. Chang, 1993. Methyl farnesoate stimulates ecdysteroid secretion from Y-organs *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 425-432.

Tensen, C.P., Janssen, K.P.C. y F. Van Herp, 1989. Isolation, characterization and physiological specificity of the crustacean hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* (Milne-Edwards). *Invert. Reprod. Develop.*, 16: 153-164.

Thabrew, M.I., Poat, P.C. y K.A. Munday, 1971. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B: 531-541.

Tom, M., Goren, M. y M. Ovadia, 1987. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Int. J. Invert. Reprod. Develop.*, 12: 1-12.

Tricart, J. 1973. Geomorfología de la pampa deprimida, como base para los estudios edafológicos y agronómicos. INTA, Colección Científica Nro. 12.

Truchot, J.P. y A. Rtal, 1998. Effects of long-term sublethal exposure to copper on subsequent uptake and distribution of metal in the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Crust. Biol.*, 18(2): 244-231.

Tsuchida, S. y S. Watanabe, 1997. Growth and reproduction of the spider crab *Tiarinia cornigera* (Latreille) (Brachyura, Majidae). *Res. Crust.*, 20: 53-55.

Tsukimura, B. y F.I. Kamemoto, 1991. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 92: 59-66.

Urien, C.M. 1972. Río de la Plata estuary environments. En: Environmental framework of coastal plain estuaries. B.W. Nelson (ed.), The Geological Society of America, Memoir, 133: 213-234.

Van Herp, F. y G.G. Payen, 1991. Crustacean neuroendocrinology: perspectives for the control of reproduction in aquacultural system. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph 16*: 513-539.

Van Herp, F. 1992. Inhibiting and stimulatory neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. *Invert. Reprod. Develop.*, 22: 21-30.

Van Herp, F. 1998. Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. En: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology* (G.M. Coast y Webster, S.G. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 53-70.

Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., Van der Mast, C.A. y D.I. Zandee, 1990. Effects of cadmium exposure and heat shock on protein synthesis in gill tissue of the sea mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 96(C): 419-428.



Verrengia Guerrero, N.R. y E.M. Kesten, 1993. Level of heavy metals in biota from the La Plata river. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 8: 335-344.

Viarengo, A. y J.A. Nott, 1993. Mini-review. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104(C): 355-372.

Villar, C., Tudino, M., Bonetto, C., de Cabo, L., Stripeikis, J., d'Huicque L. y O. Troccoli, 1998. Heavy metal concentrations in the lower Parana river and right margin of the Rio de la Plata estuary. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 963-966.

Villar, C., Stripeikis, J., Tudino, M., d'Huicque L., Troccoli, O. y C. Bonetto, 1999. Trace metal concentrations in coastal marshes of the lower Parana River and Rio de la Plata estuary. *Hydrobiol.*, 397: 187-195.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P. y E.M. Rodríguez, 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 122: 121-129.

Voogt, P.A., Den Besten, P.J., Kusters, G.C. y M.W.J. Messing, 1987. Effects of cadmium and zinc on steroid metabolism and steroid level in the sea star *Asterias rubens* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86(C): 83-89.

Wainwright, G., Webster, S.G., Wilkinson, M.C., Chung, J.S. y H.H. Rees, 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. Involvement on multihormonal regulation of growth and reproduction. *J. Biol. Chem.*, 271: 12749-12754.

Weber, R.E., De Zwaan, A. y A. Bang, 1992. Interactive effects of ambient copper and anoxic, temperature and salinity stress on survival and hemolymph and muscle tissue osmotic in *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 159: 135-156.

Webster, S.G. 1986. Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by *Carcinus maenas* Y-organ *in vitro*, and preliminary characterization of the putative molt-inhibiting hormone (MIH). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61: 237-247.

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

Webster, S.G. 1991. Amino acid sequence of putative molt-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc. Roy. Soc. London, Biol. Sci.*, 244: 247-252.

Webster, S.G. y H. Dirksen, 1991. Putative molt-inhibiting hormone in larvae of the shore crab *Carcinus maenas*. An immunocytochemical approach. *Biol. Bull.*, 180: 65-71.

Webster, S.G. 1993. High-affinity binding of putative molt-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. Roy. Soc. London, Biol. Sci.*, 251: 53-59.

Webster, S.G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.*, 199: 1579-1585.

Weidenmann, W., Gromoll, J. y R. Keller, 1989. Cloning and sequencing for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Letters*, 257: 31-34.

Whiteley, N.M. y A.J. El haj, 1997. Regulation of muscle gene expression over the moult in Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B: 323-331.

Wilder, M.N., Okumura, T., Suzuki, Y., Fusetani, N. y K. Aida, 1995. Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration. *Zool. Sci.*, 11: 45-53.

Wolcott, T.G. y D.L. Wolcott, 1982. Larval loss and spawning behaviour in the land crab *Gecarcinus lateralis* (Fréminville). *J. Crust. Biol.*, 2: 477-485.

Wright, D.A. 1977a. The effect of salinity on cadmium uptake by the tissues of the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Exp. Biol.*, 67: 137-146.

Wright, D.A. 1977b. The uptake of cadmium into the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas*: The relationship with copper and other divalent cations. *J. Exp. Biol.*, 67: 147-161.

Wright, D.A. 1977c. The effect of calcium on cadmium uptake by the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Exp. Biol.*, 67: 163-173.

Yang, W.J., Aida, K., y H. Nagasawa, 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kumura prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 135: 205-212.

Yang, W.J., Aida, K., Terauchi, A., Sonobe, H. y H. Nagasawa, 1996. Amino acid sequences of a peptide with molt-inhibiting activity from the kumura prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides*, 17: 197-202.

Yano, I. y Y. Chinzei, 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kumura prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B 9(2): 213-218.

Yano, I. 1992. Effect of thoracic ganglion on vitellogenin secretion in kumura prawn *Penaeus japonicus*. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquac.*, 21: 9-14.

Yano, I. y J.A. Wyban, 1992. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by injection of lobster brain extract. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquac.*, 21: 1-7.

Yudin, A.I., Diener, R.A., Clark, W.H. y E. Chang, 1980. Mandibular gland of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.*, 159: 760-772.

Zapata, V., López Greco, L.S. y E.M. Rodríguez, 2001. Effect of copper on hatching of larvae of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1579-1583.

Zukowska-Arendarczyk, M. 1981. Effect of hypophyseal gonadotropins (FSH and LH) on the ovaries of the sand shrimp *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.*, 63: 241-247.

