

Tesis Doctoral

Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decápoda: Parastacidae): ensayos in vitro e in vivo

Ferré, Lilian Elizabeth

2012

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

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

Cita tipo APA:

Ferré, Lilian Elizabeth. (2012). Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decápoda: Parastacidae): ensayos in vitro e in vivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ferré, Lilian Elizabeth. "Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decápoda: Parastacidae): ensayos in vitro e in vivo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad De Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce
***Cherax quadricarinatus* (Decápoda: Parastacidae):**
ensayos *in vitro* e *in vivo*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Lilian Elizabeth Ferré

Director: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez
Consejero de Estudios: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Buenos Aires, 2012

Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*
(Decápoda: Parastacidae): ensayos *in vitro* e *in vivo*

Resumen

Se determinaron los niveles de vitelina (Vn) y vitelogenina (Vg) en hembras de la langosta dulceacuícola *Cherax quadricarinatus* durante todo su ciclo reproductivo y además en respuesta a tratamientos tanto *in vitro* como *in vivo* con las siguientes hormonas o neuroreguladores: metil farnesoato (MF), 17 α -hidroxiprogesterona (17PG) y naloxona (Nx), ensayando adicionalmente 17 β -estradiol (E₂) *in vitro*. Los niveles de Vn y Vg se midieron en ovario (OV), hemolinfa (HL) y hepatopáncreas (HP) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA puesta a punto especialmente para el desarrollo de esta Tesis. En el estudio del ciclo reproductivo, se determinó la variación anual de los niveles de Vn y Vg en hemolinfa, ovario y hepatopáncreas de hembras adultas de *C. quadricarinatus* y se correlacionaron tales niveles con los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS). Se encontró una concentración máxima de vitelogenina circulante en el período reproductivo medio, en correlación con valores elevados de IHS y de contenido de Vg en hepatopáncreas.

En el caso de los ensayos *in vitro*, los compuestos ensayados se agregaron al medio de incubación, mientras que en el ensayo *in vivo* se incorporaron al alimento. Los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que el MF estimula la síntesis endógena de vitelina en el ovario, durante la maduración temprana e intermedia del mismo, siendo incluso capaz de inducir la síntesis de Vn en un ovario en quiescencia reproductiva (período post-reproductivo). El MF no mostró efectos sobre la producción de vitelogenina en sitios extraováricos. Las hormonas esteroideas estimularon la vitelogénesis endógena (en el ovario)

durante el periodo pre-reproductivo ó reproductivo temprano. El antagonista encefalinérgico naloxona no tuvo efecto sobre la s vitelogénesis indicando que la hormona estimulante gonadal, cuya secreción es estimulada por naloxona, no estaría involucrada directamente en la síntesis de Vn, aunque sí tendría efecto sobre la síntesis de otras proteínas ováricas. El presente trabajo provee herramientas de potencial aplicación en acuicultura a fin de optimizar la producción de la especie en estudio.

Palabras claves: crustáceos, vitelina, vitelogenina, ELISA, ciclo reproductivo, *in vitro*, *in vivo*, metil farnesoato, naloxona, 17 α - hidroxiprogesterona; 17 β -estradiol, acuicultura.

**Vitellogenin levels the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda:
Parastacidae): *in vitro* and *in vivo* assays**

Abstract

Vitellin (Vn) and vitellogenin (Vg) levels were determined in females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* during the entire reproductive cycle, and also in response to the following hormones and neuroregulators: methyl farnesoate (MF), 17 α -hydroxyprogesterone (17PG) and naloxone (Nx); additionally, 17 β -estradiol (E₂) was assayed *in vitro*. Vn and Vg levels were measured in hemolymph (HL), ovary (OV) and hepatopancreas, by means of the immunoenzymatic technique ELISA, specially developed for this Thesis. In the study of the reproductive cycle, the annual variation of Vn and Vg levels in ovary, hemolymph and hepatopancreas was determined and correlated to both the gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (HSI) indexes. A maximum concentration of circulating Vg was found in the mid reproductive period, in correlation to high values of both HSI and Vg content in hepatopancreas..

For the *in vitro* assays, the assayed compounds were added to the incubation medium, while for the *in vivo* assay, the same compounds were incorporated to the provided food. The results obtained both *in vitro* and *in vivo* indicate that MF stimulates the endogenous Vn synthesis in the ovary, during both its early and intermediate maturation, even being able to induce the Vn synthesis in a quiescent ovary (i.e., during the post-reproductive period). On the other hand, MF did not show any stimulating effect on Vg synthesis in extra-ovarian sites. Steroid hormones stimulated endogenous vitellogenesis (in the ovary) during either the pre-reproductive or early reproductive period. The enkephalinergic antagonist naloxona showed

no effect on vitellogenesis process, indicating that the gonad stimulating hormones, whose secretion is stimulated by naloxona, would not be directly involved in the Vn synthesis; instead, it would be stimulating the synthesis of other ovarian proteins. The current study provides tools of potential application in aquaculture, to improve the production of the studied species.

Key words: crustaceans, vitellin, vitellogenin, ELISA, reproductive cycle, *in vitro*, *in vivo*, methyl farnesoate, naloxona, 17 α -hidroxyprogesterone; 17 β -estradiol, aquaculture.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme llevar a cabo y financiar el presente estudio a través de distintos subsidios al grupo de investigación.

A la Universidad Nacional de Tucumán por mi formación de grado sin la cual no hubiese podido crecer profesionalmente y a toda la comunidad Lilloana que me acompañó a transitarla.

Al Dr. Enrique M. Rodríguez, por ser mi director y consejero de estudios, por colaborar en mi formación de postgrado y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Daniel A. Medesani (¡Mede, mi Co!) por todos los Elisás, *in vitro* e *in vivo* compartidos, por la paciencia (mutua), por la buena onda, por la ayuda brindada a lo largo de estos 5 años de doctorado. Gracias por amenizar los días, de principio a fin.

Al Dr. Fernando García por su paciencia y dedicación en mi formación en la Técnica ELISA y al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP- CONICET) donde fue llevada a cabo.

A la Dra. Carolina Pustovrh por su asistencia en las técnicas inmunoquímicas. A la Lic. Jimena Frontera y Dra. Andrea Pozzi, por su ayuda en las técnicas histológicas. Al Dr. Dante Paz por su buena predisposición para permitirme realizar dichas técnicas en el Laboratorio de Biología del Desarrollo (DBBE – FCEN- UBA).

A toda mi gran familia, por apoyarme desde el principio a emprender este desafío, por ser mi fuerza en la distancia, por alentarme, por contenerme en los largos días de extrañitis. Los Amo.

A mis admirables padrinos Negro y Margarita. A cada uno de mis queridos tíos, en especial a Quique, Isabel, Margoth, Carlos y Tere. A todos mis primas/os, especialmente a las del alma: Fer, María, Ceci, Emi, Lucre y Sofía por todo el cariño que me hacen sentir siempre.

A Freddy y Marcelo por la linda y grata hermandad que nos une, por creer en mí y por darle vida a los tres soles que iluminan mi alma: Valentina, Mariano y Santiago, mis bellos y amados sobrinos.

A mi madre, por sus consejos y su infinito amor, por ser un gran ejemplo de perseverancia y tenacidad, por ser mi mayor sostén en estos últimos y difíciles 5 años.

A los que ya no están pero que sé, hubieran compartido orgullosamente esta etapa. En particular a mi padre y a mis queridos abuelos, fieles guardianes de mi destino junto a Dios, siempre presentes en mi corazón.

A las Tías Johny y Lita por su preocupación en el día a día porteño, por tanto cariño, por las ricas comidas y las tardes de mates.

A Josefina, Néstor y Ramiro por aceptarme como parte de su familia y acompañarme cada uno a su modo en este largo camino.

A mis grandes amigos porque juntos vencimos las barreras del tiempo y la distancia. A Silvana y Gustavo, ejemplo de que todo llega y todo se puede. A Alejandra y Claudia por su constante apoyo, entre lágrimas o risas. A Emilio, mi además secretario académico, cuya visión de las ciencias despejó y atenúo muchas veces el panorama crítico. A Doly y Anita, por ponerle alegría y buenos momentos a mi vida. A Fernanda por tanto cariño y comprensión. A Rosandra por su chispa siempre encendida. A Karina y Gabriel por ser una buena hinchada. A las chicas del “cole” (las auxiliadoras) por los lindos reencuentros. A Paula por alentar esta amistad de norte a sur. Y a Juan Pablo, por demostrarme diariamente que la amistad es posible cuando la dedicación, el esfuerzo y la confianza guían nuestros lejanos e internacionales caminos.

A Ignacio, el mejor compañero de vida que gracias a esta Tesis pude encontrar. Las palabras no alcanzan para expresar cuánto amor encierra mi corazón y cuán feliz soy a tu lado. Gracias por los días y las noches, por la complicidad, por el optimismo, por el sostén, por las sonrisas, por la ayuda y por el amor incondicional. Ahora sé que: “no solo cuento contigo, sino que no cuento sintigo” (P. Neruda).

A los que pusieron piedras en el camino, porque me enseñaron a superarlas y no detener la marcha. A los que me alentaron en cada paso y me incentivaron a no bajar los brazos.

!!!GRACIAS!!!

He alcanzando la meta propuesta, ahora otros sueños me esperan por ser cumplidos y nuevos horizontes por ser conquistados.

A mis padres
Cacho y Blanquita
Por tanto amor...

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| Biología reproductiva de crustáceos | 2 |
| Vitelogénesis y vitelogenina | 7 |
| Endocrinología de crustáceos | 13 |
| Estructuras endocrinas, neuroendocrinas y sus productos de secreción | 14 |
| Regulación hormonal de la reproducción en hembras de crustáceos | 18 |
| Neuroreguladores | 24 |
| La Especie en estudio: <i>Cherax quadricarinatus</i> como modelo experimental | 28 |
| Ubicación taxonómica | 30 |
| Biología General | 30 |
| Anatomía | 30 |
| Alimentación | 33 |
| Ecdisis | 34 |
| Biología Reproductiva | 35 |
| Ciclo reproductivo | 38 |
| Producción de vitelogenina en <i>C. quadricarinatus</i> | 40 |
| Control endocrino de la reproducción | 42 |
| Relevancia de <i>C. quadricarinatus</i> en la acuicultura | 44 |
| | |
| <u>OBJETIVOS</u> | 51 |
| Objetivos generales | 52 |
| Objetivos específicos | 53 |
| | |
| <u>CAPÍTULO I</u> | |
| Análisis cuali-cuantitativo de la vitelina, identificación de los sitios productores y puesta a punto de la técnica ELISA | 54 |
| Objetivo específico | 55 |
| Metodología | 55 |
| Análisis proteómico de la vitelina | 55 |
| Aislamiento y purificación de la vitelina | 56 |
| Producción anticuerpo primario anti vitelina | 59 |
| Desarrollo de la Técnica de Western Blot | 60 |

| | |
|--|------------|
| Identificación de sitios productores de vitelina y vitelogenina | 62 |
| Puesta a punto de la técnica Inmunohistoquímica | 62 |
| Desarrollo de la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) | 64 |
| Puesta a punto de la técnica ELISA para <i>C. quadricarinatus</i> | 65 |
| Resultados | 67 |
| Discusión | 75 |
| | |
| <u>CAPÍTULO II</u> | |
| Determinación de los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa, durante el ciclo reproductivo | 82 |
| Objetivo específico e hipótesis | 83 |
| Metodología | 83 |
| Condiciones generales de experimentación | 83 |
| Variables medidas | 84 |
| Obtención y procesamiento de muestras biológicas para determinación de vitelogenina por la técnica ELISA | 85 |
| Procesamiento de muestras de ovario y hepatopáncreas | 86 |
| Diseño experimental | 87 |
| Análisis estadístico | 88 |
| Resultados | 89 |
| Discusión | 96 |
| | |
| <u>CAPÍTULO III</u> | |
| Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de hormonas y neuroreguladores sobre los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas | 101 |
| Objetivo específico e hipótesis | 102 |
| Metodología | 102 |
| Condiciones generales de experimentación | 102 |
| Ensayos <i>in vitro</i> | 103 |
| Incubación de tejidos | 103 |
| Variables Medidas | 104 |
| Determinación de los niveles de vitelina y vitelogenina | 104 |

| | |
|--|------------|
| Estimación de la tasa de síntesis de proteínas | 105 |
| Análisis Estadístico | 106 |
| A. Efecto <i>in vitro</i> de la hormona metil farnesoato sobre los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas | 107 |
| Diseño experimental | 107 |
| Primer experimento: efecto del metil farnesoato sobre el contenido de vitelina y vitelogenina | 108 |
| Segundo experimento: efecto del metil farnesoato sobre la síntesis de proteínas | 109 |
| Resultados | 110 |
| Primer experimento | 110 |
| Segundo experimento | 113 |
| Discusión | 113 |
| B. Efecto <i>in vitro</i> de las hormonas esteroideas sobre los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas | 119 |
| Diseño experimental | 119 |
| Primer experimento: efecto de la hormona 17 α -hidroxiprogesterona sobre el contenido de vitelina y vitelogenina | 119 |
| Segundo experimento: efecto de la hormona 17 β -estradiol sobre el contenido de vitelina | 120 |
| Resultados | 121 |
| Primer experimento | 121 |
| Segundo experimento | 125 |
| Discusión | 127 |
| C. Efecto <i>in vitro</i> del antagonista encefalinérgico naloxona sobre los niveles de vitelina en ovario | 130 |
| Diseño experimental | 130 |
| Resultados | 131 |
| Discusión | 133 |

CAPÍTULO IV

Evaluación del efecto *in vivo* de hormonas y neuroreguladores sobre los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa de *C. quadricarinatus* 136

Objetivo específico e hipótesis 137

Metodología 137

 Condiciones generales de experimentación 137

 Ensayos *in vivo* 138

 Dieta base 138

 Dieta experimental 139

 Diseño experimental 141

 Protocolos de administración 141

 Obtención de muestras biológicas 142

 Variables medidas 143

 Análisis estadístico 143

Resultados 144

Discusión 148

 Efecto del metil farnesoato 148

 Efecto de la hormona esteroidea 17 α -hidroxiprogesterona 150

 Efecto del antagonista encefalinérgico naloxona 153

DISCUSIÓN GENERAL 156

CONCLUSIONES 165

BIBLIOGRAFÍA 169

Los resultados de la presente Tesis Doctoral fueron parcialmente publicados:

- ❖ **Vitellogenin levels in hemolymph, ovary and hepatopancreas of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*, during the reproductive cycle.** 2012. Ferré, L.E.; Medesani, D.A; García C.F.; Grodzielski M.; Rodriguez, E.M. *Biología Tropical* 60 (1): 253-261.

- ❖ **In vitro effect of methyl farnesoate on the synthesis of ovarian proteins and the vitellogenin content of hepatopancreas, in the crayfish *Cherax quadricarinatus*.** 2011. Medesani, D.A.; Ferré, L.E.; Grodzielski, M.; Rodríguez, E.M. *Invertebrate Reproduction and Development* 56 (2): 138-143.

INTRODUCCIÓN

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE CRUSTÁCEOS

Los crustáceos, entre los que se cuentan más de 60.000 especies, representan un extenso subfiló dentro de los Artrópodos. Es un grupo altamente diverso en cuanto a tamaño corporal, hábitat y forma de vida, que incluye pulgas de agua, copépodos, percebes, camarones, krill, langostas, langostinos, cangrejos y muchos otros. Se caracterizan por ser principalmente acuáticos, ya sea de aguas marinas, salobres o dulceacuícolas, a excepción de los isópodos que son terrestres (Brusca & Brusca, 2005; Hickman *et al.*, 2009).

La mayoría de los crustáceos presenta un patrón sexual de tipo gonocórico (sexos separados) aunque también se observan casos de hermafroditismo, intersexualidad y partenogénesis (Calado & Dinis, 2007; Laubenheimer & Rhyne, 2008; Braga *et al.*, 2009). Entre las generalidades de la reproducción de crustáceos se puede destacar la existencia de cópula, el desarrollo de mecanismos de cortejo y la incubación de huevos (Barkii & Karplus, 1999).

El mecanismo de cortejo es un comportamiento iniciado por señales químicas (feromonas) que son detectables por quimiorrecepción a distancia o bien por contacto táctil (Kamio *et al.*, 2000). En las distintas especies de crustáceos el cortejo puede diferir en cuanto a la complejidad, la duración y el sexo que lo inicia (Barkii & Karplus, 1999; Correa & Thiel, 2003). El evento de cópula implica, por parte del macho la transferencia a la hembra de los espermatozoides contenidos en un espermatóforo. Ésta estructura es adherida al abdomen de la hembra, en una zona próxima a los gonoporos femeninos, a fin de facilitar la fecundación.

Las características sexuales externas de muchos crustáceos están asociadas particularmente con el proceso de apareamiento que realizan. Los machos de algunas especies de decápodos presentan apéndices modificados que actúan como estructuras copulatorias y/o para la transferencia de los espermatozoides. Estas modificaciones ocurren a nivel del 1° y 2° par de pleópodos. En las langostas de la familia Astacidae tanto el 1° como el 2° par de pleópodos constituyen en conjunto una estructura en forma de espátula para la transferencia del espermátforo (Hobbs *et al.*, 2007).

Los espermátforos están constituidos por una mezcla de espermatozoides y secreciones de adherencia cuyo origen es el vaso deferente del aparato reproductor masculino (Vogt, 2002). En las especies con fecundación externa, existe una tendencia a una mayor complejidad, asociada a la prolongada permanencia del espermátforo en el abdomen de la hembra (Bauer, 1996). Contrariamente, en las especies de fecundación interna, la estructura del espermátforo tiende a ser más simple (López Greco *et al.*, 2007; López Greco & Lo Nostro, 2008; Bugnot & López Greco, 2009).

En las hembras de algunas especies, el dimorfismo sexual se observa en el tamaño corporal y/o a nivel del pleon, el cuál se modifica para la incubación de los huevos (Jones, 1997). A excepción del grupo de los Dendobranchyata, la mayor parte de los crustáceos incuban sus huevos en alguna estructura especializada, como ser cámaras incubadoras especiales (branquiópodos y percebes) o sacos ovígeros a ambos lados del abdomen (copépodos). Los crustáceos malacostracos por lo general llevan sus huevos (y eventualmente también los juveniles tempranos) sujetos a apéndices abdominales modificados (Hickman *et al.* 2009). El periodo de incubación de los huevos varía en los distintos grupos de crustáceos, desde algunas semanas hasta diez meses, incluso con periodos de diapausa. La duración del

período de incubación es dependiente de la temperatura, entre otros factores (Reynolds, 2002).

Se sabe que la fecundidad es un concepto muy importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la biología reproductiva de cualquier especie. El potencial reproductivo de un organismo o población, se mide habitualmente por el número de huevos que porta una hembra en sus pleópodos y es un buen indicador de su *fitness* (Bilgin & Samsun, 2006). La fecundidad puede incrementarse o decrecer por influencia de varios factores exógenos, tales como variación latitudinal, alimentación, temperatura y fotoperíodo, además de la condición y edad de la hembra (Rubolini *et al.*, 2006; Bueno & Shimizu, 2008). En crustáceos, la fecundidad depende de la especie y del tamaño de la hembra (Huner & Lindqvist, 1991; Byant & Hartnoll, 1995). Por ejemplo, en *Procambarus clarkii* el intervalo reportado es de 300 a 600 huevos, mientras que para *Astacus astacus* varía de 100 a 233 aproximadamente (Reynolds, 2002). En *Stenopus hispidus*, las hembras incuban alrededor de 800 huevos (Gregati *et al.*, 2010) y en *Procambarus llamasii* se ha reportado un intervalo de entre 200 y 700 huevos por hembra (Rodríguez- Serna *et al.*, 2000). Los huevos de mayor tamaño, por lo general se producen y desovan en un menor número que los huevos mas pequeños (Reynolds, 2002). Esto implica una mayor probabilidad de sobrevivencia de la progenie, aunque a costa de una menor fecundidad (Byant & Hartnoll, 1995).

Se pueden reconocer dos tipos de desarrollo embrionario en crustáceos, a saber, desarrollo directo e indirecto. Las especies que se caracterizan por tener desarrollo directo son aquellas en las que, tras la eclosión del huevo, emerge un juvenil de aspecto idéntico a un adulto, pero de menor talla. Este patrón de desarrollo embrionario ocurre prácticamente en todos los crustáceos de agua dulce. Sin embargo, en la mayoría de los crustáceos el desarrollo

es indirecto, emergiendo del huevo una forma larvaria, completamente distinta al adulto en apariencia y estructura. Dicha larva, deberá experimentar distintas etapas de metamorfosis hasta alcanzar el estadio juvenil, según el grupo de crustáceos que se trate (Anger, 2006). En las especies con desarrollo indirecto, se observa una mayor inversión gamética, contrariamente a lo que ocurre en aquellos crustáceos con desarrollo directo, donde en cambio, el cuidado parental resulta más importante. En este último caso, la cantidad de huevos es considerablemente menor y de mayor tamaño con respecto a las especies que poseen desarrollo indirecto (Reynolds, 2002).

Los patrones de maduración sexual varían en cada uno de los grupos de crustáceos. En *P. clarkii* por ejemplo, son necesarias 11 mudas (Reynolds, 2002) para alcanzar la adultez. La maduración sexual depende de la densidad poblacional, la estructura social y las condiciones ambientales (Hartnoll & Bryant, 2001). Así, ante condiciones desfavorables, poblaciones enteras pueden mudar a formas adultas a partir de juveniles aún muy pequeños. No hay reglas generales que definan el tamaño y la edad a la cual los crustáceos adquieran la madurez sexual funcional que le permita reproducirse efectivamente; la talla y edad de madurez varía en los distintos grupos (Reynolds, 2002; Racotta *et al.*, 2003).

La diferenciación gonadal ocurre en crustáceos durante los primeros estadios larvales o juveniles, dependiendo del tipo de desarrollo. Los ovarios son estructuras mesodérmicas pares, localizados dorsal o dorsolateralmente al sistema digestivo de las hembras. Corren longitudinalmente a lo largo del cefalotórax y el abdomen, con distintos grados de fusión y conexión. Cabe destacar que los ovarios no presentan la división topológica de germario y vitelario conocida para los artrópodos en general. Sí presentan un epitelio germinal, dónde se desarrollan las oogonias de manera continua, una vez alcanzada la madurez sexual. Todos los

ovarios de crustáceos son del tipo sacular y están rodeados por una teca constituida por las células foliculares (Kroll *et al.*, 1992; Ando & MakioKa, 1998; Elorza & Dupré, 1999; Vázquez *et al.*, 2008). Los oviductos son los conductos genitales de evacuación de las gametas femeninas hacia los gonoporos externos, que se ubican en la base de algún par de apéndices del abdomen, variando de un grupo a otro el segmento en el cuál se abren (Subramonian, 1999).

El ovario experimenta en los distintos tipos de crustáceos importantes cambios de color y tamaño, conforme progresa el desarrollo oocitario. Distintos autores han propuesto diversos estadios de desarrollo oocitario, basándose en criterios tales como el diámetro, color y tamaño de los oocitos. Mas aún, a nivel histológico puede identificarse con precisión el grado de madurez ovárica, en base a la observación de distintos cambios microscópicos que suceden en el tejido ovárico, tales como la relación de tamaño entre el oocito y núcleo, la abundancia y distribución de glóbulos de lípidos y de vitelo (Ando & Makioka, 1998, Abdu *et al.*, 2000; López Greco, 1997; Noro *et al.*, 2008).

Otro de los aspectos que se ve modificado durante el desarrollo gonadal, es la composición bioquímica y el contenido energético del ovario. La nutrición es sin duda, un factor sumamente importante que influye sobre la maduración y los procesos reproductivos de los crustáceos (Harrison, 1990) siendo determinante para aumentar la producción de aquellas especies de importancia comercial. Una alimentación balanceada capaz de cubrir todos los requerimientos necesarios de proteínas, lípidos y carbohidratos es imprescindible para el éxito reproductivo. Varios trabajos realizados en distintas especies de crustáceos han reportado cambios estacionales en las gónadas, en cuanto al contenido de diferentes biomoléculas. Ejemplo de esto es el aumento de las reservas lipídicas, tanto en gónadas como

en hepatopáncreas, correlacionado con el aumento del tamaño gonadal y vinculado con la mayor demanda asociada a la reproducción (Harrison, 1990; Fernández *et al.*, 1996; Rodríguez-Gonzalez *et al.*, 2006; Cahansky *et al.*, 2008b; Da Silva Castiglioni *et al.*, 2008). Asimismo, los carotenoides y retinoides son metabolitos bioactivos de importancia para la maduración gonadal en crustáceos (Liñán - Cabello *et al.*, 2002, 2003). La astaxantina, en particular, cumple una función dominante en el ovario y en el desarrollo de huevos y larvas.

El crecimiento gonadal en crustáceos se encuentra además regulado por factores ambientales tales como la temperatura y el fotoperíodo (Fingerman, 1995). En ambientes fríos puede haber un desbalance entre crecimiento y reproducción, tal que la maduración puede estar retrasada y las hembras no pueden reproducirse todos los años (Reynolds, 2002). Daniels *et al.* (1994), evaluaron el efecto del fotoperíodo y de la temperatura en el desarrollo ovárico de hembras de *P. clarkii*. Estos autores determinaron que la temperatura controla el inicio del desarrollo ovárico y que luego éste es acelerado por el aumento del fotoperíodo. En los Astácidos, por ejemplo, la maduración ocurre a finales del verano y el apareamiento en otoño, cuando disminuye el nivel de agua del ambiente en el que habitan y el fotoperíodo se acorta (Reynolds, 2002). Existen además otros factores que afectan la reproducción a distintas escalas, como ser el tipo de sustrato y refugios, la densidad de animales, la proporción de sexos y el estrés ambiental (García- Guerrero *et al.*, 2003; Carmona -Osalde *et al.*, 2004).

VITELOGÉNESIS Y VITELOGENINA

En las hembras de crustáceos decápodos, la vitelogénesis es un proceso clave de la reproducción, que involucra la síntesis y acumulación por parte del oocito de proteínas del huevo o vitelo, esenciales para el desarrollo del embrión (Charmantier *et al.*, 1997; Harrison, 1990; Quackenbush, 1991; Tsukimura, 2001). El mayor componente de ese material nutritivo está dado por las proteínas denominadas vitelinas (Vn), derivadas de su precursor vitelogenina (Huberman, 2000).

Tanto las vitelinas como la vitelogenina (Vg) son proteínas complejas, de alto peso molecular, asociadas a lípidos, glúcidos y carotenoides, por lo que son llamadas lipoglicocarotenoproteínas. Algunos autores confirman que Vn y Vg son similares inmunológicamente y que la diferencia entre ambas estaría dada a nivel de las subunidades que la componen (Meusy, 1980; Tsukimura, 2001; Avarre *et al.*, 2003; Santhoshi *et al.*, 2009; Wilder *et al.*, 2010). En crustáceos, la estructura primaria completa de la vitelogenina (Vg) fue dilucidada por primera vez en el camarón *Marsupenaeus japonicus* por Tsutsui *et al.* (2000). Los estudios que determinan las características estructurales y bioquímicas de la Vg en especies de decápodos se basan en técnicas eletroforéticas y/o inmunológicas tales como ELISA y Western Blot (Chen, *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2005; Wilder *et al.*, 2010). El peso molecular de Vn y Vg en condiciones nativas varía en los distintas especies, dentro de un intervalo que va desde los 263KDa, encontrado en *Penaeus monodon* (Chang *et al.*, 1993) a 700- 800 KDa en *Macrobrachium rosenbergii* (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Okumura, 2004). En los crustáceos decápodos, la Vg está compuesta por al menos tres

subunidades, cuyos pesos moleculares son aproximadamente 200, 100 y 90 KDa (Wilder *et al.*, 2010).

El sitio de síntesis de la vitelogenina varía en los distintos grupos de crustáceos. En la última década, el avance en el empleo de técnicas que permiten estudiar la expresión del gen de vitelogenina ha permitido confirmar con precisión los sitios de síntesis de esta proteína (Tsutsui *et al.*, 2000; Avarre *et al.*, 2003; Serrano Pinto *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). En isópodos y anfípodos hay reportes que indican que esta síntesis ocurre en los cuerpos grasos o en el tejido adiposo (Suzuki, 1987; Okuno *et al.*, 2000; Wilder *et al.*, 2010). En los decápodos, distintos autores proponen que los sitios de síntesis de la Vg serían el hepatopáncreas, los ovarios o ambos (Meusy, 1980; Eastman-Reeks & Fingerman, 1985; Vázquez- Boucard *et al.*, 1986; Van Herp, 1993; Spaargaren & Haefner, 1994; Lee & Chang, 1997; Tseng *et al.*, 2001; Tsukimura, 2001; Yang *et al.*, 2005; Tiu *et al.*, 2006a; Santhoshi *et al.*, 2009; Wilder *et al.*, 2010).

En algunas especies, tales como la langosta de agua dulce *P. clarkii* y el cangrejo azul *Callinectes sapidus*, se ha documentado que la síntesis de vitelogenina ocurre dentro del mismo ovario, probablemente en las células foliculares (Kulkarni *et al.*, 1991; Lee & Watson, 1995). En los crustáceos, el hepatopáncreas es un importante sitio del metabolismo intermedio, constituyendo en numerosas especies la mayor fuente productora de vitelogenina (Tsukimura, 2001; Wilder *et al.*, 2010).

En la Figura 1, se esquematiza la dinámica de síntesis y procesamiento de la Vg en crustáceos (modificada de Okuno *et al.*, 2002). En el hepatopáncreas, el principal sitio de síntesis extraovárica de la Vg, ésta se sintetiza como una molécula precursora que luego

experimenta clivaje en dos subunidades, la A y la proB. Ambas subunidades, son secretadas a la hemolinfa, dónde la subunidad proB se cliva en dos subunidades adicionales: B y C/D. De esta forma, la vitelogenina es transportada por la hemolinfa para su posterior incorporación por los oocitos, pasando a formar parte finalmente, de las vitelinas del huevo (Yehezkel *et al.* 2000, Tahara *et al.* 2005).

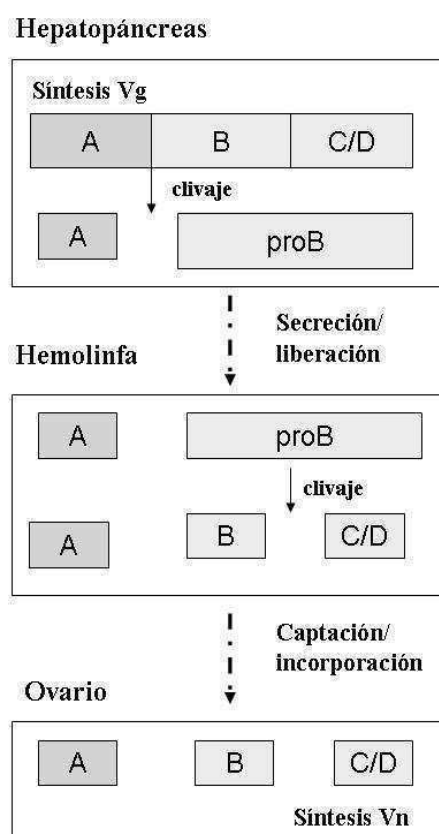


Figura 1. Representación esquemática de la síntesis, secreción, procesamiento y captación de la vitelogenina (Vg) en crustáceos. Vn: vitelina. Modificado de Okuno *et al.*, 2002.

El ciclo de crecimiento oocitario puede subdividirse en dos etapas principales: a) previtelogénica, caracterizada por la proliferación gonadal, en un ovario aún inmaduro, b) vitelogénica, que ocurre a su vez en dos fases: vitelogénesis primaria y secundaria (Charniaux- Cotton, 1985; Kulkarni *et al.*, 1991; Abdu *et al.*, 2000; Tsukimura, 2001).

Varios autores (Dhainaut & De Leersynder, 1976; Charniaux-Cotton, 1985; Meusy & Payen, 1988) han utilizado el término “previtelogénesis” para referirse al período en el cual los oocitos primarios, arrestados en profase meiótica, comienzan a incrementar su diámetro, los ribosomas son sintetizados a una elevada tasa en el citoplasma y el retículo endoplasmático rugoso comienza a desarrollarse.

En la *vitelogénesis primaria o endógena*, la Vg se sintetiza en los propios oocitos (Charniaux- Coton, 1985). Los oocitos en este estado no forman folículos sino que se encuentran libres en el ovario y se caracterizan por una activa síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático liso y en el aparato de Golgi.

La *vitelogénesis secundaria o exógena* se caracteriza por un aumento muy importante del diámetro de los oocitos, debido a la captación de la vitelogenina producida exógenamente. La Vg es captada por endocitosis, desde el espacio extracelular, por medio del receptor de Vg (VgR) presente en la membrana celular de los oocitos (Wilder *et al.*, 2010). En este estadio, los oocitos se encuentran rodeados por células foliculares, que también participan en la captación de Vg y que eventualmente pueden incluso producirla. El citoplasma se carga entonces de plaquetas vitelinas, principalmente por la incorporación de la Vg extraoocitaria proveniente del hepatopáncreas, de las células foliculares o de otro tejido.

A medida que progresa la vitelogénesis, el tejido ovárico comienza a pigmentarse (verde o naranja, según la especie) y el oocito aumenta significativamente de tamaño (Meusy & Charniaux-Cotton, 1985; Abdu *et al.*, 2000; Wainwright & Rees, 2001; Tsukimura, 2001; Vázquez *et al.*, 2008).

En hembras en estadio de post-puesta, se pueden reconocer en el ovario distintos componentes tales como oocitos previtelogénicos, células foliculares y oocitos secundarios (tipo II) con formación de vitelo. La proporción de cada uno varía según el tiempo transcurrido desde el último desove. Las puestas viables de huevos que se producen durante el periodo reproductivo de los crustáceos son posibles siempre que la acumulación previa de vitelogenina en los oocitos en crecimiento haya sido normal (Van Herp, 1993). En varias especies de crustáceos se indicó que existe una correlación positiva entre el desarrollo gonadal y los niveles hemolinfáticos de Vg con el índice gonadosomático. También los niveles circulantes de Vg guardan una relación con el ciclo de muda, que depende de la especie en estudio (Okumura, 2004; Santhoshi *et al.*, 2009).

Investigaciones realizadas en el camarón *Fenneropenaeus indicus*, reportan que las concentraciones de vitelogenina en hemolinfa y hepatopáncreas aumentan en los primeros estadios del desarrollo ovárico y decrecen a medida que aumenta la maduración (Vázquez-Boucard *et al.*, 2002). La misma relación fue observada por Chen *et al.* (2004) en ovarios del cangrejo *Eriocheir sinensis*, con respecto al contenido de vitelina. Por el contrario, Lee & Chang (1997) en *M. rosenbergii* no observaron asociación alguna entre las concentraciones de vitelina ovárica y de vitelogenina en hemolinfa. Los resultados de las investigaciones realizadas por Tahara *et al.* (2005) indican que, en *Marsupenaeus japonicus*, la vitelina es acumulada continuamente en el citoplasma de los oocitos hacia el final de la maduración.

Por último, el índice gonadosomático (IGS) es uno de los métodos cuantitativos más comúnmente empleados para la estimación de la actividad reproductiva de distintos grupos de invertebrados, incluyendo los crustáceos (Chu, 1995; Courtney *et al.*, 1995). El IGS es la relación porcentual entre el peso gonadal fresco y el peso fresco del animal entero (Grant & Tyler 1983). La determinación del IGS, permite comparar la condición reproductiva de animales de diferentes tallas. Dado que el incremento en peso del ovario ocurre por un aumento del crecimiento oocitario durante la fase de vitelogénesis secundaria, el IGS se utiliza como indicador de madurez ovárica (Grant & Tyler, 1983; López Greco *et al.*, 1997; Rodríguez González *et al.*, 2006). Por otra parte, el índice hepatosomático (IHS), que representa la relación porcentual entre el peso fresco del hepatopáncreas y el peso fresco del animal entero es otro de los parámetros que se utilizan para evaluar las modificaciones de las reservas energéticas y nutricionales durante el ciclo de crecimiento gonadal (Introzzi & Duhalde de Introzzi, 1986). Una relación inversa entre IGS y IHS sugeriría que existe una transferencia de reservas desde el hepatopáncreas hacia la gónada, imprescindible para el progreso de la vitelogénesis (Rodríguez González *et al.*, 2006).

ENDOCRINOLOGÍA DE CRUSTÁCEOS

El sistema endocrino de los crustáceos decápodos está constituido por glándulas endocrinas típicas de origen ectodérmico y por órganos neuroendocrinos cuyos productos de síntesis (neurohormonas) se originan en neuronas especializadas y son secretados a la hemolinfa (Vogt, 2002). Los órganos neuroendocrinos incluyen el complejo órgano X-glándula del seno en el pedúnculo ocular, el órgano postcomisural y el órgano pericárdico. Los órganos endocrinos de origen ectodérmico están formados por grupos de células epiteliales modificadas que sintetizan hormonas que son secretadas hacia los senos hemolinfáticos. Éste último grupo se encuentra representado por el órgano mandibular, el órgano Y, la glándula androgénica en machos y el ovario en hembras.

Entre los tipos de hormonas identificadas en crustáceos podemos mencionar péptidos, esteroides, aminas, terpenoides y prostaglandinas. Por otro lado, el sistema nervioso central de los crustáceos presenta numerosos neuroreguladores, que actúan como mensajeros químicos locales, modulando, por ejemplo, la secreción de neurohormonas (Fingerman & Kulkarni, 1991).

Estructuras endocrinas, neuroendocrinas y sus productos de secreción

En la Figura 2 se ilustra la ubicación de los principales órganos endocrinos y neuroendocrinos presentes en crustáceos, cuyas características generales se detallan posteriormente.

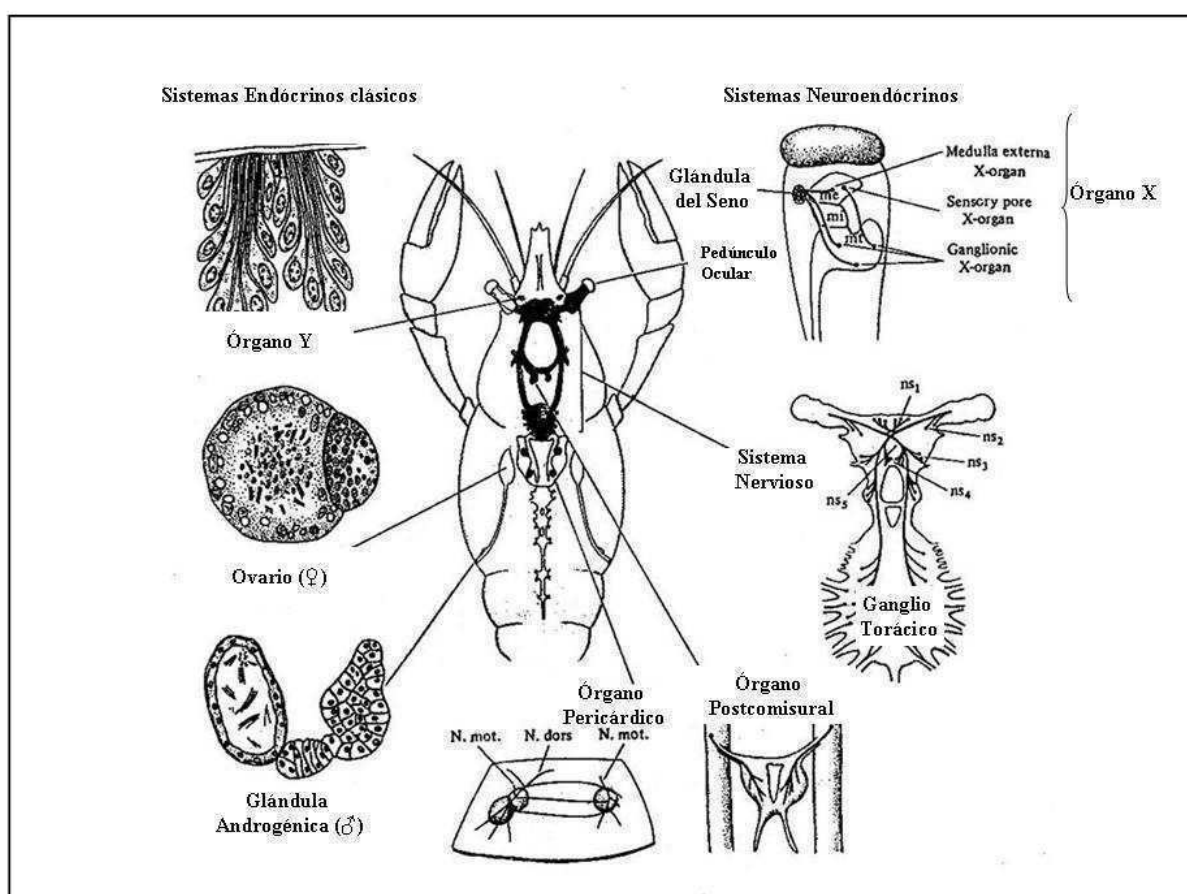


Figura 2. Ubicación de los principales órganos endocrinos y neuroendocrinos de crustáceos. Modificado de Whitters, 1994.

El **complejo órgano X- glándula del seno (OX-GS)** es el principal centro de control endocrino de los crustáceos. Se encuentra ubicado en los pedúnculos oculares y cumple un rol integrador de gran importancia en la regulación de la reproducción, la muda, la pigmentación y los ritmos circadianos entre otros procesos. Este complejo es el principal sitio de síntesis, almacenamiento y secreción de neurohormonas peptídicas tales como la hormona hiperglucemiante (**CHH**), la hormona inhibidora de la muda (**MIH**), la hormona inhibidora gonadal o inhibidora de la vitelogénesis (**GIH** ó **VIH**) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (**MOIH**) (Vogt, 2002). A su vez, estas neurohormonas regulan la actividad de órganos endocrinos tales como el órgano Y, el órgano mandibular y el ovario (Cooke & Sullivan, 1982; Van Herp, 1993; Fingerman 1995).

Otra estructura neuroendócrina es el **órgano pericárdico**. Se encuentra ubicado en la cavidad pericárdica y corresponde a un seno venoso que rodea al corazón y está formado por plexos nerviosos. La función principal es regular la actividad cardíaca. Este órgano, sintetiza distintas hormonas, principalmente aminas biogénicas tales como serotonina, octopamina y dopamina, así como ciertos péptidos cardioexcitatorios (Fingerman *et al.*, 1994).

El **órgano postcomisural** se halla compuesto por terminales axónicos provenientes de los nervios postcomisurales que surgen de la comisura post-esofágica, inmediatamente por detrás del esófago (Vogt, 2002).

El **cerebro (o ganglio cerebroide)** y el **ganglio torácico (GT)** son otras estructuras neurosecretoras que producen neurohormonas. Ambos ganglios corresponden a dos centros nerviosos principales derivados de la fusión de varios pares de ganglios en un cordón nervioso ventral. De acuerdo a lo propuesto por Fingerman (1997), el ganglio torácico

secretaría un neuropéptido denominado hormona estimulante gonadal (**GSH**) que estimularía el crecimiento ovárico. Otros autores han propuesto que la GSH podría ser una isoforma de CHH expresada en la cadena ventral de ganglios (De Kleijn & Van Herp, 1998; Fanjul-Moles, 2006).

Entre las glándulas endocrinas se encuentra el **órgano Y**. Este es un órgano par de origen ectodérmico ubicado en el segmento maxilar de la cabeza, en posición latero-ventral, por debajo de la inserción del músculo aductor externo de la mandíbula. Éste órgano, sintetiza la hormona **ecdisona**, un esteroide que desencadena y dirige el proceso de muda, regulando de este modo el crecimiento somático (Mykles, 2010). Se ha reportado que esta hormona puede también tener un efecto estimulante del crecimiento gonadal, sobre todo al comienzo de la maduración (Charmantier, 1997). La síntesis de ecdiesteroides por el órgano Y está regulada negativamente por la hormona MIH secretada por el complejo órgano X - glándula del seno (Chang, 1993; Fingerman & Nagabhusanam, 1997; Huberman, 2000).

Otra glándula endocrina par de origen ectodérmico es el **órgano mandibular**. Es una estructura pequeña que se encuentra a ambos lados del cefalotórax, cercana a la articulación entre la mandíbula y el apodema en el cual toma inserción el músculo aductor mandibular posterior (Sagi *et al.*, 1991). Esta glándula se relaciona funcionalmente con los procesos de reproducción y de muda. La principal hormona secretada por este órgano es el terpenoide metilfarnesoato (**MF**), químicamente similar la hormona juvenil III de insectos (Chang, 1987; Fingerman, 1995; Webster, 1998; Laufer & Biggers, 2001). Su síntesis y secreción se encuentra controlada negativamente por la hormona peduncular **MOIH** (Huberman, 2000; Nagaraju, 2007).

La **glándula androgénica** es una glándula endocrina exclusiva de los machos, ya que está asociada al vaso deferente. La hormona que sintetiza esta glándula es responsable de la diferenciación sexual, del mantenimiento de la actividad espermatogénica de los testículos y del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en machos (Fingerman 1995, Vogt, 2002; Ventura *et al.*, 2011). Abdu *et al.* (2002) también han reportado, en individuos intersexos de *C. quadricarinatus*, el rol de esta glándula en el arresto de la vitelogénesis.

El **ovario** de las hembras de crustáceos, es también un órgano con función endocrina. Existe evidencia de la síntesis de esteroides por parte del ovario y/o acumulación de estas hormonas en ellos (Fingerman, 1997; Charmantier *et al.*, 1997). Distintas moléculas similares a los esteroides de vertebrados fueron identificadas en el ovario (Fingerman, *et al.*, 1993; Lafont & Mathieu, 2007). Tales moléculas actuarían como hormonas con efecto sobre el ciclo reproductivo de los decápodos, a nivel de la maduración ovárica y la producción de vitelogenina (Yano, 1985; Fairs *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1992; Shih, 1993; Huberman, 2000). Dentro del grupo de **esteroides típicos de vertebrados** identificados en crustáceos, se encuentran el estradiol (17 β -estradiol) y la progesterona (PG) siendo sus derivados: 17 α -hidroxiprogesterona (17PG), 20 α -hidroxiprogesterona y 6 β -hidroxiprogesterona. Por otro lado, en el caso de los anfípodos e isópodos, el ovario, secretaría específicamente una hormona de naturaleza peptídica, aún no identificada. Dicha sustancia fue denominada provisoriamente como hormona estimuladora de la vitelogénesis (VSOH) y tendría efectos sobre la maduración del ovario y la inducción de la síntesis de vitelogenina en hepatopáncreas u otros tejidos extraováricos (Charmantier *et al.*, 1997).

REGULACIÓN HORMONAL DE LA REPRODUCCIÓN EN HEMBRAS DE CRUSTÁCEOS

El proceso de reproducción en los crustáceos decápodos ocurre durante la intermuda, correspondiente al estadio C del ciclo de ecdisis (Reynolds, 2002). Muda y reproducción son los dos mayores eventos de inversión energética que involucran la movilización de reservas orgánicas, desde los depósitos de almacenamiento hacia la epidermis y gónadas respectivamente. Ambos procesos poseen un importante control neuroendocrino (Reynolds, 2002).

La reproducción de los crustáceos se encuentra regulada por distintas hormonas y factores neuronales (Subramonian, 2000). Los neuropéptidos (principalmente GIH y MIH) secretados por el complejo órgano X – glándula del seno localizado en los pedúnculos oculares, constituyen las principales hormonas involucradas, además de los esteroides de origen gonadal, el metil farnesoato producido por el órgano mandibular y, en menor medida, la hormona ecdisona secretada por el órgano Y. También intervienen en la regulación de la reproducción, varias neurohormonas producidas en el cerebro y ganglio torácico, principalmente GSH (Nagaraju, 2010; Fingerman, 1997).

La **GIH**, producida en los pedúnculos oculares, impide el inicio de la vitelogénesis secundaria. Paulus & Laufer (1987) sugieren que los tejidos blanco de esta hormona serían los ovarios y el hepatopáncreas, lo cual estaría indicando que la GIH inhibiría específicamente la captación de vitelogenina por parte de los oocitos y/o la síntesis de las proteínas del vitelo, tanto en el ovario como en el hepatopáncreas (Charniaux-Cotton, 1985).

Nagaraju (2011) propone dos vías fisiológicas por las cuales se explicaría la inhibición de la captación de vitelogenina causada por la GIH. Una de ellas es que la GIH se uniría a la vitelogenina previniendo la unión al receptor. La otra vía indica que la GIH se uniría al receptor de manera tal de bloquear el sitio de unión de la vitelogenina. Finalmente, la acción de la GIH podría afectar la liberación de hormonas producidas por el ganglio torácico y el órgano mandibular, aunque aún no hay evidencias concluyentes al respecto (Nagaraju, 2011).

Uno de los primeros descubrimientos sobre la regulación endocrina de la reproducción de crustáceos, se obtuvo por medio de la ablación peduncular, que produjo una rápida maduración ovárica en hembras de la langosta *Palaemon serratus*, evidenciándose así la existencia de un factor inhibitorio producido en los pedúnculos oculares (Subramoniam, 1999; Fingerman, 1995). Posteriormente, esta técnica fue utilizada en distintas especies para estimular la maduración ovárica y la puesta de huevos (Makinouchi & Primavera, 1987; Stella *et al.*, 2000). Actualmente, esta técnica se ha reemplazado por otras, más específicas y menos lesivas.

En contraparte, la **GSH** producida por el cerebro y/o ganglio torácico, induciría en las hembras de crustáceos, el crecimiento gonadal y el desarrollo de la vitelogénesis secundaria mediante la incorporación de vitelogenina al oocito (Nagaraju, 2011). La función de esta hormona fue confirmada tanto por experimentos *in vitro* como *in vivo*, mediante ablación, implante e inyección de extractos de ganglio torácico en distintas especies (Charmantier *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 1991). Tanto GIH como GSH actuarían directamente sobre el ovario, mientras que en los machos su acción sobre las gónadas es indirecta, ya que primariamente actuarían sobre la glándula androgénica, regulando su producción hormonal (Fingerman, 1995).

Por otro lado, la hormona hiperglucemiante de crustáceos (**CHH**) también podría influir sobre la fisiología ovárica (Fanjul-Moles, 2006; Chung *et al.* 2010). De hecho, se han identificado receptores de CHH en oocitos de los cangrejos *Carcinus maenas* y *Cancer pagarus* (Webster, 1993). Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que una isoforma de CHH expresada en la cadena ventral de ganglios podría ser de hecho la GSH, siendo que esta última aún no ha sido químicamente identificada (De Kleijn & Van Herp, 1998; Fanjul-Moles, 2006). Además, la CHH podría estimular el crecimiento oocitario en el inicio de la vitelogénesis (Fanjul-Moles, 2006).

Por otra parte, estudios realizados por Gu *et al.* (2002) en el camarón *Metapenaeus ensis* indican que la hormona inhibidora de la muda (**MIH**) jugaría un rol clave en la coordinación de la muda y la reproducción, al inhibir el primer proceso y estimular indirectamente el segundo.

La reproducción de los crustáceos también se encuentra controlada por otras dos familias de hormonas no peptídicas: los esteroides y los sesquiterpenoides representados por el metilfarnesoato. El MF es secretado por el órgano mandibular y además de regular la reproducción en machos y hembras, participa en los procesos de muda, desarrollo larval y morfogénesis (Homola & Chang, 1997). La función del MF en hembras de crustáceos sería comparable a la que posee la JHIII de insectos, encontrándose por lo tanto asociada a la vitelogénesis secundaria y a la captación de vitelogenina (Laufer *et al.*, 1992, Yano, 1997; Huberman, 2000; Nagaraju, 2011).

Estudios realizados *in vitro* sobre el ovario de distintas especies de crustáceos reportan un crecimiento oocitario significativo frente a la utilización de alguno de los juvenoides o esteroides arriba mencionados, tal como se ha visto en el camarón *Penaeus vannamei* (Tsukimura & Kamemoto, 1991), en los cangrejos *Chasmagnathus granulata* (Zapata *et al.*, 2003) y *Oziotelphusa senex senex* (Nagaraju *et al.*, 2006), así como en la langosta *Procambarus clarkii* (Rodríguez *et al.*, 2002a). Los resultados obtenidos en estos estudios indican que, en hembras de crustáceos, el MF actuaría directamente tanto sobre ovario como sobre hepatopáncreas (Nagaraju, 2011). Ensayos *in vivo* consistentes en la incorporación de MF por la dieta, demuestran que esta hormona estimula la maduración ovárica y la vitelogénesis en *P. clarkii* (Laufer *et al.*, 1998, Rodríguez *et al.*, 2002b; Zapata *et al.*, 2003; Marsden *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de los esteroides que intervienen en la reproducción de crustáceos se encuentra los ecdiesteroides y los esteroides típicos de vertebrados. Si bien los **ecdiesteroides** fueron considerados primeramente como hormonas específicas de la muda, se sabe actualmente que en varias especies de decápodos cumplen importantes funciones en la regulación de la vitelogénesis, la maduración ovárica y la síntesis de proteínas, especialmente en aquellas especies en las cuáles la muda y la puesta de huevos son eventos próximos en el tiempo (Subramonian, 2000; Nagaraju, 2011). La 20-hidroxiecdisona (20HE), sintetizada periféricamente, es el metabolito activo de la ecdisona secretada por el órgano Y (Chang, 1993). Estudios realizados en camarones y peracáridos, en los cuales la muda ocurre muy cercanamente a la puesta de huevos, indican que la 20HE es el equivalente fisiológico de los estrógenos de mamíferos (Young *et al.*, 1993; Subramonian, 2000). Se sabe, por ejemplo, que en *Macrobrachium niponense*, existe correlación entre los niveles hemolinfáticos de ecdiesteroides y los distintos estadios de maduración ovárica (Okumura *et al.*, 1992).

Se han identificado en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa de crustáceos, distintos esteroides típicos de vertebrados capaces de actuar sobre los procesos reproductivos, tales como estradiol en su forma 17 β -estradiol (**E₂**) y la progesterona (**PG**) con sus derivados 17 α -hidroxiprogestero (17**PG**), 20 α -hidroxiprogestero y 6 β -hidroxiprogestero (Fingerman, *et al.*, 1993; Lafont & Mathieu, 2007). Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de vitelogenina en hemolinfa y los niveles circulantes de progesterona y estradiol, tanto en camarones como en cangrejos (Quinitio *et al.*, 1994; Shih, 1997; Shih & Tseng, 1999; Warriar *et al.*, 2001). En el cangrejo *Mictyris brevidactylus*, se detectó progesterona en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa en todas las etapas del ciclo reproductivo, con mayor prevalencia en el pre-reproductivo, mientras que el estradiol fue reportado exclusivamente para éste último período (Shih, 1997). En hembras del langostino *Penaeus japonicus*, Yano *et al.* (1987) demostraron que las inyecciones de 17PG producen aumento de los niveles séricos de vitelogenina. Estudios *in vivo* realizados en *Cherax albidus* por Coccia *et al.* (2010) revelan que tanto E₂ como PG inyectados en los animales, causan un incremento de la expresión hepatopancreática de Vg y de su concentración en hemolinfa, dependiendo, de la fase del ciclo reproductivo en que se encuentren las hembras. Mediante ensayos *in vitro*, se pudo observar el efecto directo de 17PG sobre el crecimiento ovárico de los cangrejos *C. granulata* (Zapata *et al.*, 2003) y *O. senex senex* (Reddy *et al.*, 2006).

En la Figura 3 se esquematiza de manera integral y a modo de resumen de esta sección, los principales controles endocrinos involucrados en la regulación del proceso de vitelogénesis en crustáceos decápodos.

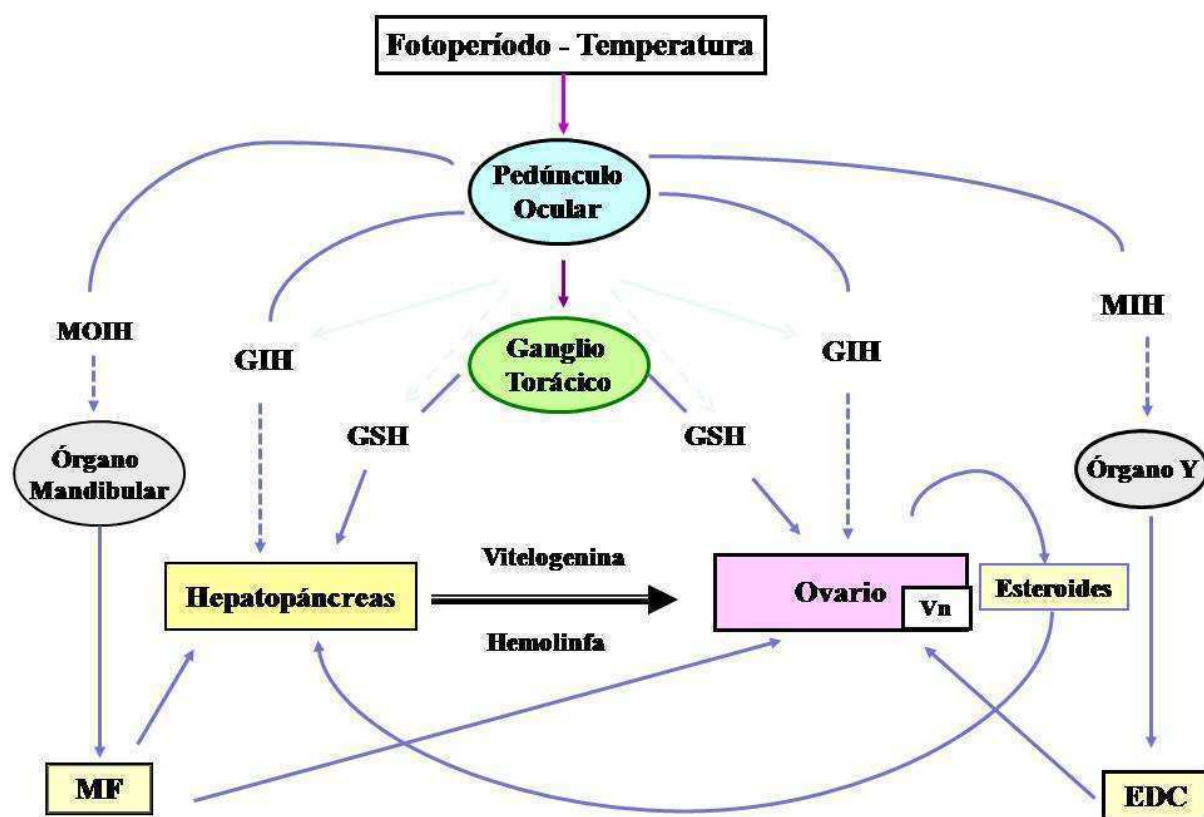


Figura 3. Representación esquemática de los principales controles endocrinos y neuroendocrinos sobre la vitelogenesis y reproducción en crustáceos decápodos. MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular; GIH: hormona inhibidora de las gónadas; GSH: hormona estimuladora de las gónadas; CHH: isoforma de la hormona hiperglucemiante de crustáceos; ECD: ecdiesteroides MF: metil farnesoato. Vn: vitelina. Las líneas sólidas indican efectos estimulantes; las líneas punteadas indican efectos inhibitorios. Modificado de Souty-Gosset (1997) y Nagaraju (2007).

Neuroreguladores

Un neurotransmisor es un compuesto que puede funcionar como neuroregulador o neuromodulador. En los crustáceos, los neuroreguladores son por lo general moléculas pequeñas, mayormente derivadas de aminas biogénicas e involucradas en la secreción de neurohormonas (Fingerman & Nagabhushanam, 1992; Fingerman *et al.*, 1994).

En lo concerniente a los neurotransmisores involucrados en el control endocrino de la reproducción de crustáceos, se encontró que la **serotonina (5-hidroxitriptamina ó 5-HT)** estimula la secreción de alguna neurohormona o factor de estimulación gonadal por parte del cerebro y/o ganglio torácico (GSH), que estimula a su vez el crecimiento ovárico (Richardson *et al.*, 1991; Fingerman, 1997; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2006). La 5-HT. como hormona circulante podría además actuar directamente sobre el ovario e influir sobre el desarrollo gonadal (Nagaraju, 2011). En *F. indicus*, varios bioensayos con administración de serotonina mostraron un aumento del GSI y del diámetro oocitario, así como de los niveles de Vg en hemolinfa (Santhoshi *et al.*, 2009; Sainath & Reddy, 2011).

La **dopamina (DA)** es otro neurotransmisor clásicamente descrito en crustáceos, aunque es escaso aún el conocimiento acerca de los receptores dopaminérgicos involucrados (Chen *et al.*, 2003). Se ha reportado que la utilización de **espiperona**, un antagonista dopaminérgico, es capaz de inducir la maduración ovárica en las langostas de agua dulce *P. clarkii* (Rodríguez *et al.*, 2002a) y *C. quadricarinatus* (Cahansky *et al.*, 2011) así como en el cangrejo *Chasmagnathus granulata* (Zapata *et al.*, 2003). En hembras de *Aegla platensis*, la spiperona produce un aumento en el diámetro oocitario y en el índice gonadosomático

(Cahansky *et al.*, 2008a). Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la dopamina podría reducir el crecimiento gonadal, ya sea inhibiendo la secreción de GSH, así como también estimulando la secreción de GIH (Charmantier *et al.*, 1997; Fingerman, 1997; Wainwright & Rees, 2001).

Tinikul *et al.* (2008) investigaron la dinámica de la 5-HT y de la DA en el sistema nervioso central y en el ovario, durante las diferentes fases del ciclo de maduración ovárica de hembras del camarón *M. rosenbergii*. La 5-HT mostró un aumento gradual de su concentración en cerebro, ganglio torácico y ovario, desde el inicio del desarrollo ovárico hasta la fase final de su desarrollo; mientras que la DA evidenció una concentración máxima durante las primeras fases de maduración. Del mismo modo, las inyecciones de 5-HT aumentaron significativamente los niveles de vitelogenina en hemolinfa, mientras que las de DA mostraron un efecto opuesto. Estos resultados estarían evidenciando el efecto opuesto que presentan estos neurotransmisores en la maduración y el desarrollo de los oocitos.

Dentro de los neuropéptidos que participan en la regulación de diferentes hormonas de crustáceos, se encuentran los opioides, tales como la **met-enkefalina** y **leu-enkefalina** (Fingerman *et al.*, 1985; Fingerman & Kulkarni, 1991; Nagabhushanam, 1995; Reddy, 2000). Estos péptidos opioides son cadenas cortas de aminoácidos que se unen a receptores específicos en el cerebro y están involucrados en el control de la reproducción de crustáceos (Nagaraju, 2011). Varios estudios reportaron sus efectos inhibitorios sobre la maduración ovárica, tanto en el cangrejo *Uca pugilator* (Sarojini *et al.*, 1995) como en la langosta *P. clarkii* (Sarojini *et al.*, 1996; Sarojini *et al.*, 1997). En contraposición, un antagonista del receptor de opioides endógenos como la **naloxona (Nx)** es capaz de inducir la maduración

ovárica en crustáceos al anular los efectos de los opioides endógenos mencionados (Sarojini *et al*, 1995; Sarojini *et al*, 1996; Sarojini *et al.*, 1997; Cahansky *et al.*, 2010, Kishori & Reddy, 2003). En el cangrejo *A. platensis*, se comprobó que el naloxona incorporado en alimento induce la maduración ovárica (Cahansky, 2008a).

A modo de resumen, se presenta en la Figura 4 el modelo propuesto por Fingerman (1997) que integra los posibles efectos de los distintos neurotransmisores arriba mencionados, sobre la reproducción de los crustáceos decápodos.

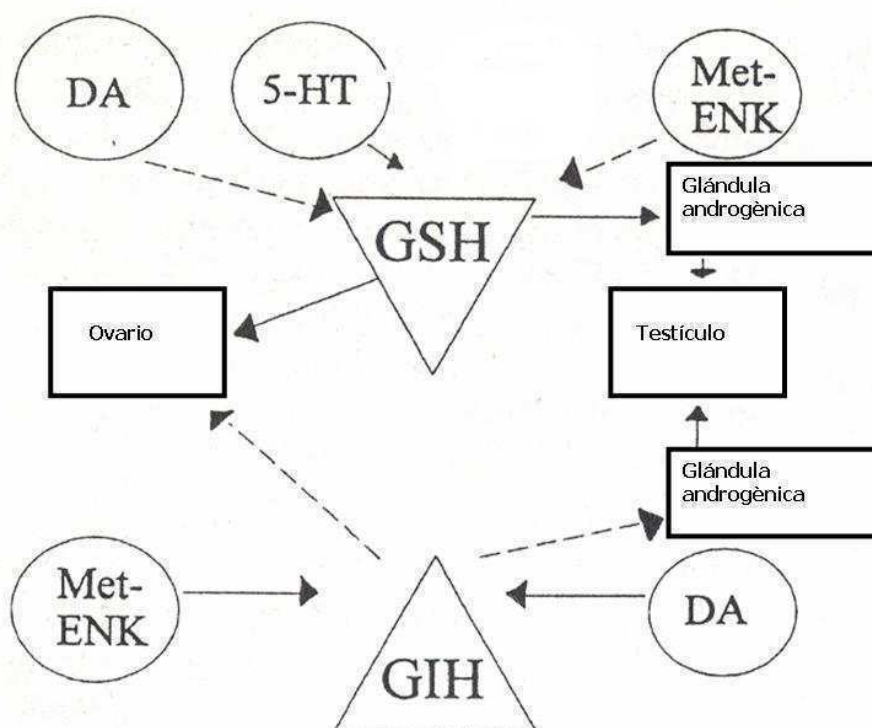


Figura 4. Esquema que representa los posibles roles e interacciones de los distintos neuroreguladores de la maduración gonadal en crustáceos decápodos. DA: dopamina; 5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina; Met-ENK: met-enkefalina; GSH: hormona estimulante gonadal; GIH: hormona inhibidora gonadal. Las líneas sólidas indican efectos estimulantes; las líneas punteadas indican efectos inhibitorios. Adaptado de Fingerman, 1997.

LA ESPECIE EN ESTUDIO: *CHERAX QUADRICARINATUS* COMO MODELO EXPERIMENTAL

La especie *Cherax quadricarinatus*, Von Martens, 1868 (Figura 5) se destaca entre los crustáceos decápodos por su importancia económica. Es una especie tropical originaria del noreste de Australia (Figura 6) que se distribuye en los ríos de la región de Queensland, extendiéndose hacia el oeste hasta el Golfo de Carpentaria (Jones 1990). Esta “langosta de agua dulce” tiene preferencia por los ríos de curso lento, lagos y lagunas. La disminución natural del caudal de los distintos cuerpos de agua induce a los animales a moverse contra la corriente, a fin de asentarse en lugares más estables (Wingfield, 2001). En general, se los encuentra en áreas con altos niveles de oxígeno y abundante vegetación. *C. quadricarinatus* es una especie eurihalina capaz de tolerar un amplio intervalo de salinidades, tolerando una salinidad de hasta 6 ‰ en las regiones donde habita y de hasta 20 ‰ en condiciones de laboratorio (Jones, 1997, Prymaczok *et al.*, 2008). Las salinidades inferiores a 10 ‰ son favorables para aumentar la ganancia de peso y la supervivencia de los juveniles (Meade *et al.* 2002). Estas langostas sobreviven además en un amplio intervalo de temperaturas, desde 10 a 36 °C, aunque muestran preferencias por el intervalo comprendido entre los 22 y 32°C (King, 1994) siendo la temperatura de 27°C la óptima para el crecimiento y la reproducción (Jones, 1997).



Figura 5. Langosta australiana de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Hembra (izquierda) incubando los huevos bajo su abdomen. Macho (derecha) mostrando su particular parche rojo en el borde externo de sus quelas.

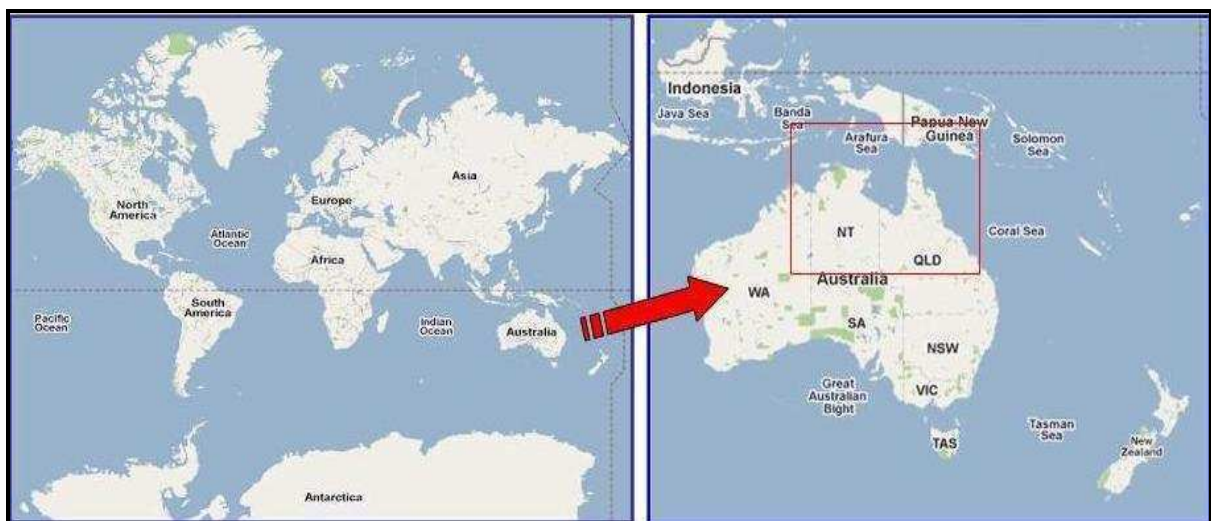


Figura 6. Mapa de distribución original de *Cherax quadricarinatus*. Adaptado de Google Earth 2010.

Ubicación Taxonómica

Subphylum Crustacea
Clase Malacostraca,
Subclase Eumalacostraca
Superorden Eucarida
Orden Decapoda
Suborden Pleocyemata
Infraorden Astacidae
Familia Parastacidae

Cherax quadricarinatus

Biología General**Anatomía**

El cuerpo de *C. quadricarinatus* se encuentra dividido en cefalotórax o *pereion* y abdomen o *pleon* y está íntegramente cubierto por un exoesqueleto de quitina, proteínas y carbonato de calcio (Jones, 1990). El caparazón tiene como principal función proteger a los órganos internos y en la región anterior se prolonga formando el rostro. Otras características que definen la anatomía externa de la especie en estudio son la presencia de un par de ojos pedunculados en la región anterior del cefalotórax, de órganos sensoriales constituidos por un par de anténulas birramosas y de un par de largas antenas simples. La función de estas dos últimas estructuras es netamente sensitiva, táctil y gustativa, ya que les permiten localizar el alimento, un predador o una posible pareja para cortejo, así como percibir distintas variables

de calidad de agua, tales como temperatura y salinidad. Sus apéndices torácicos comprenden un par de quelas y cuatro pares de patas caminadoras, denominados pereiópodos y numerados de manera antero-posterior del 2 al 5 (Figura 7).

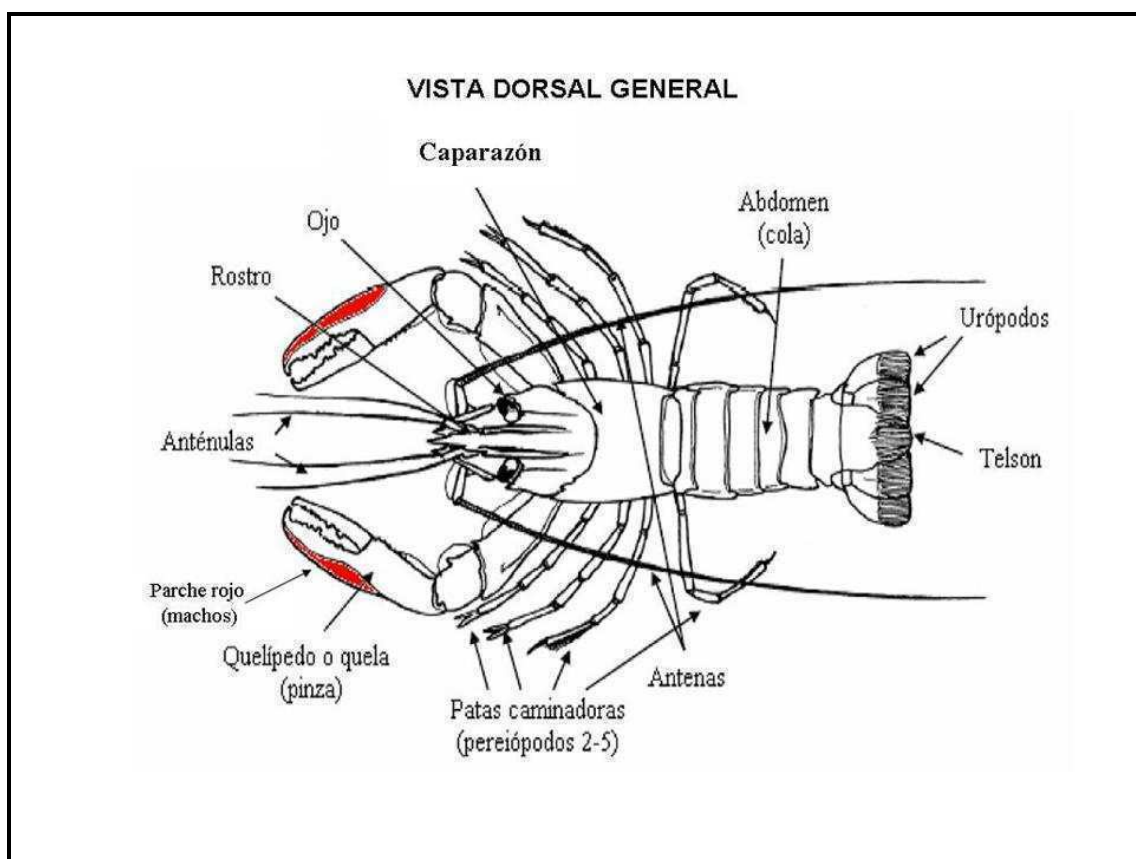


Figura 7. Características anatómicas de *Cherax quadricarinatus* en vista dorsal. Modificado de Jones (1997).

El abdomen consta de seis segmentos, cada uno de los cuales está cubierto dorsalmente por una cutícula dura pero articulada con los adyacentes mediante una membrana flexible. Cada segmento abdominal, del segundo al quinto, posee un par de apéndices denominados en conjunto pleópodos, con función natatoria. En el sexto segmento abdominal los pleópodos se alargan formando los urópodos, que junto con el telson forman el abanico caudal utilizado para generar la propulsión del agua cuando la langosta necesita moverse rápidamente. Las hembras, además, emplean los apéndices abdominales para retener los huevos durante el proceso de incubación y para oxigenarlos por medio de su batido (Levi *et al.*, 1999), a la vez que el abanico caudal participa en la formación de una cámara temporaria de protección de los huevos en incubación.

Existen diferencias anatómicas importantes entre machos y hembras. Las aberturas genitales o gonoporos difieren en su ubicación en cada uno de los sexos; en los machos se encuentran en la base del quinto par de pereiópodos, mientras que en las hembras se observan en la base del tercer par (Figura 8). Otra de las características dimórficas de la especie es el mayor tamaño de los quelípedos y la presencia de una membrana lateral roja en la superficie externa de la quela de los machos, denominada parche rojo o “red patch”. La función de este parche estaría relacionada con la conducta de apareamiento, pudiendo transmitir información sobre el sexo, el tamaño y la estado fisiológico del portador (Karplus *et al.*, 2003).

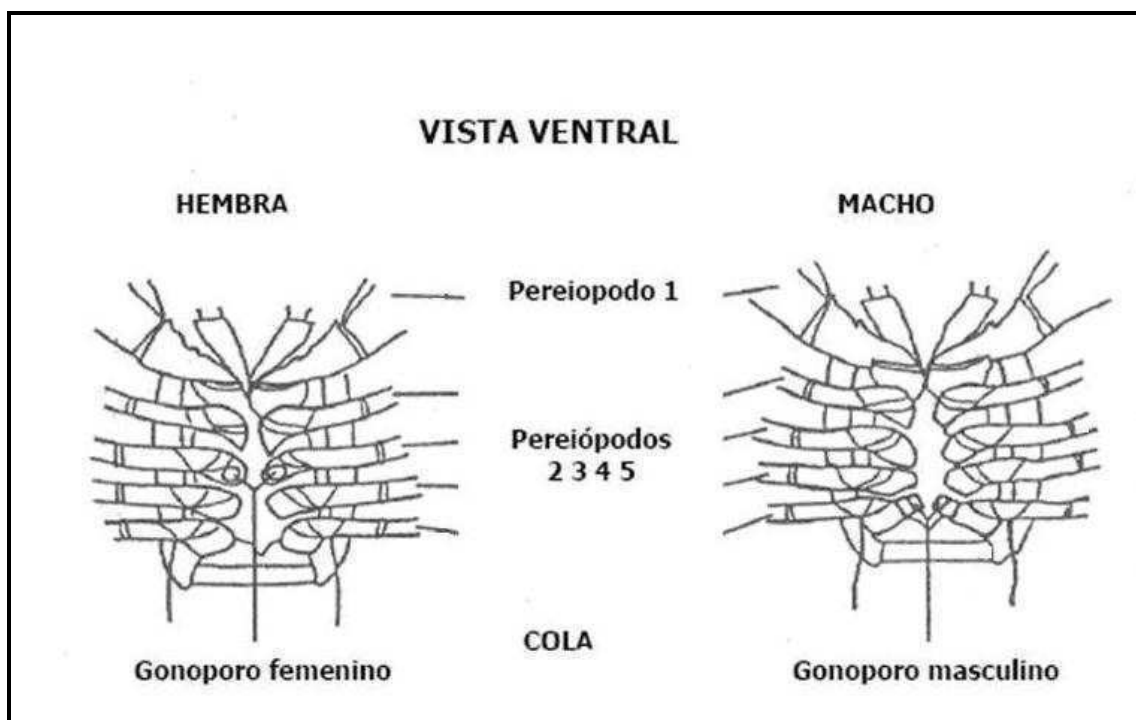


Figura 8. Características anatómicas de *Cherax quadricarinatus*. Vista ventral de hembra y macho.

Modificado de Jones (1997).

Alimentación

Los adultos de la langosta de agua dulce son animales detritívoros, se alimentan principalmente de materia orgánica en descomposición. Los juveniles pueden ingerir además microorganismos acuáticos (zooplancton). En caso de superpoblación o escasez de alimento se han observado casos de canibalismo en *C. quadricarinatus*. Es una especie nocturna con grandes períodos de actividad al atardecer y poco antes del amanecer. Se considera por lo tanto que los niveles de intensidad lumínica, constituyen un factor importante en la regulación de sus hábitos de alimentación (Jones, 1990; Villareal & Naranjo, 2008).

Ecdisis

Se conoce como muda o ecdisis al proceso fisiológico correspondiente al recambio del exoesqueleto que experimentan los artrópodos. Este proceso es fundamental para el desarrollo y el crecimiento de los crustáceos y artrópodos en general, ya que permite el aumento en tamaño corporal. Como resultado, tras cada muda el animal adquiere un nuevo caparazón, de mayor tamaño que el anterior. El evento de muda implica el desprendimiento del exoesqueleto, la reabsorción de la endocutícula, la formación de líneas de suturas y la neogénesis del nuevo exoesqueleto, con la consecuente mineralización (Phlippen *et al.*, 2000). Se pueden diferenciar una serie de etapas discretas o estadios de muda, a saber: pre-muda, ecdisis propiamente dicha, post-muda e intermuda. Cada uno de estos estadios se divide en subestadios con características particulares.

La muda es un proceso fisiológicamente crítico y costoso para el animal, ya que implica cambios en la tasa de absorción, transporte y deposición de varios iones, especialmente Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{2-} y CO_3^{2-} , aumento en la presión hidrostática y hemolinfática, y movilización de reservas energéticas, entre otros procesos. Por otro lado, al momento de la muda la langosta se torna más vulnerable a posibles ataques por parte de otros, inclusive de su misma especie (Vernet & Charmantier-Daures, 1994; Vigh & Dendinger, 1982).

El ciclo de la muda está controlado por dos hormonas principales: *la hormona inhibidora de la muda* (MIH), producida en el complejo órgano X- glándula del seno de los pedúnculos oculares, y la *ecdisona* producida en el órgano Y, cuya biosíntesis es inhibida por

la MIH durante la intermuda (Chang *et al.*, 1993). Como en la mayoría de los crustáceos, una vez alcanzada la madurez sexual los adultos de *C. quadricarinatus* continúan mudando y creciendo mediante sucesivas ecdisis. Tanto el crecimiento somático como el gonadal son procesos altamente costosos desde el punto de vista energético y son considerados antagónicos. En varios grupos de crustáceos decápodos, tales como cangrejos y langostas, ambos ciclos ocurren temporalmente separados, lo cual permitiría al animal no extenuar sus reservas metabólicas. En tales grupos, el periodo reproductivo de las hembras ocurre en coincidencia con el periodo de intermuda (Reynolds, 2002). Sin embargo, el patrón anual de muda y de puesta en hembras de las langostas de agua dulce puede estar influenciado por su distribución geográfica (Fingerman, 1997; Lawrence & Jones, 2002).

Biología Reproductiva

En las hembras de *C. quadricarinatus*, las gónadas se encuentran ubicadas dorsalmente en el cefalotórax. El ovario es trilobulado y presenta un oviducto a cada lado, que se abre al exterior por un gonoporo. El tamaño y la apariencia de las gónadas dependen de la edad y de las condiciones reproductivas del animal. La diferenciación sexual primaria en juveniles de *C. quadricarinatus* ocurre a partir de los 0.10 g de peso corporal, evidenciándose por la presencia de las gónadas y sus conductos (Vázquez *et al.*, 2007). En la época reproductiva y pre-reproductiva los órganos reproductivos aumentan de tamaño (Vogt, 2002).

Varios trabajos mostraron la existencia de cambios en la morfología de las gónadas, durante el proceso de maduración. Vázquez *et al.* (2008) mencionan que, en la fase temprana

de maduración los ovarios de las hembras de *C. quadricarinatus* presentan forma de H, mientras que adoptan forma de Y en fases más avanzadas del desarrollo, al igual que en otras langostas (Ando & Makioka 1998). La organización estructural del ovario presenta un diseño simple y similar al descrito para otros crustáceos decápodos. Consiste en una estructura en forma de saco, compuesto por tres capas y con una vaina que lo recubre. La capa más interna es una monocapa de epitelio ovárico compuesta por células cúbicas que delimitan el lumen del ovario y que desarrolla pliegues que rodean a los folículos, éstos contienen a su vez a los oocitos secundarios. La capa media está compuesta por tres o cuatro capas de células musculares, mientras que la capa mas externa está compuesta por tejido conectivo. La zona proliferativa que contiene las oogonias, se encuentra contigua al epitelio ovárico, mientras que los oocitos en crecimiento están localizados entre el epitelio ovárico y la capa externa de tejido conectivo (Vázquez *et al.*, 2008). El crecimiento de los oocitos está determinado por la acumulación de lípidos y proteínas de reserva.

El ciclo de vida de *C. quadricarinatus* es relativamente simple en comparación con el de otros crustáceos. Presenta un desarrollo directo sin estadios larvales externos. La hembra transporta los huevos adheridos a sus pleópodos, replegando el pleon y formando una especie de “cámara de incubación” hasta el momento de la eclosión (Figura 9). El periodo de incubación varía entre 66 y 77 días (Jones, 1995a). La cantidad de huevos por puesta depende del tamaño de la hembra, pudiendo variar el número entre 200 y 600 juveniles por hembra (Barki *et al.*, 1997). El desarrollo embrionario se completa a las 10 semanas, tiempo durante el cual se suceden los diferentes estadios larvales dentro del huevo. Al momento de la eclosión se obtienen individuos juveniles de morfología externa similar a la de los adultos; estos juveniles continúan asociados a la hembra hasta su total independencia, que recién se verifica en el estadio de juvenil III (Jones, 1997). Bajo condiciones apropiadas de hábitat y

disponibilidad de alimento, cada ejemplar eclosionado crece rápidamente alcanzando la madurez sexual entre los 6 y 12 meses, edad a la que está en condiciones de aparearse y recomenzar el ciclo. (Wingfield, 2001; Levi *et al.*, 1999),



Figura 9. Hembra ovígera de *C. quadricarinatus* en vista ventral, mostrando huevos en incubación retenidos por los pleópodos ubicados en la zona abdominal.

En la fase de pre-cópula, la hembra inicia el apareamiento al acercarse al macho, con el cuál establece contacto a través de sus quelas. A continuación, el macho manipula a la hembra volcándola sobre el dorso con el lado ventral hacia su propio vientre, depositando un espermátforo en la cercanía del gonoporo femenino. El proceso de apareamiento

propiamente dicho implica la transferencia, por parte del macho, de un espermátóforo que es depositado en la cercanía del gonoporo femenino. Entre las 12 y 24 horas siguientes a la cópula, la hembra produce el desove de sus huevos. Estos quedan retenidos en una cámara temporaria de incubación, ubicada en la cara ventral del pleon. Los espermatozoides se liberan por rotura del espermátóforo e ingresan a la cámara de incubación. La fecundación se realiza dentro de la cámara y los huevos quedan firmemente adheridos a las setas de los apéndices abdominales. Los huevos recién fecundados son ovalados y de color verde oliva. Durante su desarrollo, la hembra se encarga de limpiarlos con el quinto par de pereiópodos, y de oxigenarlos mediante el batido de los pleópodos. A lo largo del desarrollo, se observa un cambio secuencial en la coloración del huevo, así como variaciones morfológicas (Jones, 1997).

Ciclo Reproductivo

El ciclo reproductivo en las hembras de esta especie consta de tres periodos: reproductivo, post-reproductivo y pre-reproductivo (Arredondo Figueroa *et al.*, 1994; Jones, 1995a; Jones & Ruscoe 1996; Barki *et al.*, 1997; Karplus *et al.*, 2003). El período reproductivo comprende en su ambiente natural los meses de primavera-verano, dónde se verifica el mayor número de puestas, pudiendo las hembras ser impregnadas en más de una ocasión. Durante el período post-reproductivo (otoño), las hembras de *C. quadricarinatus* se encuentran en una etapa de quiescencia reproductiva, comenzando recién el crecimiento ovárico y la consecuente síntesis de vitelogenina durante el período pre-reproductivo. La reproducción en *C. quadricarinatus* depende de diversos factores, no sólo del momento del ciclo reproductivo en que se encuentren sino también de la temperatura del agua y del fotoperíodo.

Estudios realizados por Karplus *et al.* (2003) en hembras de la especie *C. quadricarinatus* mostraron que la exposición de las mismas a un fotoperíodo de invierno durante el verano, induce la puesta de huevos en el periodo invernal posterior. Estas investigaciones permitirían modificar el periodo de desove en aquellas áreas geográficas templadas, manejando así de manera eficiente las prácticas acuícolas. Las relaciones entre desove y muda en esta langosta también fueron estudiadas durante el año por Barki *et al.* (1997) bajo condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura. Estos autores observaron que no existe un rígido patrón antagónico como el descrito para otros crustáceos decápodos, en el sentido que tanto la muda como el desove ocurren durante el periodo reproductivo de *C. quadricarinatus*.

Se han realizado además investigaciones que relacionan los aspectos nutricionales con el proceso de reproducción (Hernández, 2004; Díaz, *et al.*, 2006). En efecto, el estado nutricional y el tipo de dieta son factores que influyen sobre el desarrollo gonadal, el desove y la calidad de los huevos. Así, por ejemplo, el contenido de lípidos presente en la dieta de las hembras influye en el tamaño y el peso de los huevos (Liñán- Cabello *et al.*, 2004; Rodríguez-González *et al.*, 2006). En especies de importancia comercial como *C. quadricarinatus*, la formulación de las dietas es un aspecto muy importante a considerar en los cultivos para poder maximizar su producción y asegurar la composición bioquímica requerida para los huevos (García Guerrero *et al.*, 2002, 2003). Los requerimientos lipídicos y proteicos para alcanzar un óptimo desarrollo gonadal en hembras de *C. quadricarinatus* fueron establecidos tras varios ensayos con dietas controladas. Rodríguez-González *et al.* (2009a) indicaron que una proporción de lípidos en la dieta de un 8% constituye el óptimo para lograr huevos de alta calidad en hembras de la especie en estudio; los mismos autores

recomiendan además una concentración de 33% de proteína cruda en la dieta para inducir un desarrollo gonadal adecuado.

Producción de vitelogenina en *C. quadricarinatus*

Abdu *et al.* (2000) distinguen para *C. quadricarinatus*, cinco estadios de vitelogénesis primaria (o endógena) y tres de vitelogénesis secundaria (o exógena). En la última parte de la vitelogénesis primaria se observa un importante depósito de gotas lipídicas, siendo muy activa la síntesis de glucoproteínas (vitelinas producidas endógenamente). La vitelogénesis secundaria se caracteriza por el crecimiento sincronizado de grupos de oocitos y la acumulación de una mayor cantidad de vitelo debido al ingreso de la vitelogenina producida exógenamente. En hembras en vitelogénesis avanzada pueden encontrarse oocitos tanto en vitelogénesis primaria como secundaria, siendo estos últimos mas numerosos (Abdu *et al.*, 2000; Vogt, 2002; Reynolds, 2002; Vázquez *et al.*, 2008). En *C. quadricarinatus*, el aporte de vitelogenina exógena está dado principalmente por el hepatopáncreas (Vogt, 2002, Serrano Pinto *et al.*, 2005).

Rodríguez- González *et al.* (2006) evaluaron los cambios que ocurren durante la oogénesis, en cuanto a la composición bioquímica del ovario y del hepatopáncreas. Estos autores describen una relación inversa entre los índices gonado y hepatosomático, lo cuál sugiere una transferencia de las reservas energéticas desde el hepatopáncreas hacia el ovario, a fin de activar y sostener el proceso de gametogénesis. Se encontraron además correlaciones significativas y positivas entre el contenido de proteínas ó de lípidos con el IGS (Rodríguez- González *et al.*, 2006).

Se ha establecido que en *C. quadricarinatus*, tanto el ovario como el hepatopáncreas constituyen los principales sitios de síntesis de vitelogenina en hembras maduras (Serrano Pinto *et al.*, 2003, 2004, 2005) y que la presencia de ésta lipoproteína en hemolinfa está relacionada con la vitelogénesis secundaria (Yehezkel *et al.*, 2000; Abdu *et al.*, 2002). Las subunidades que conforman la molécula de vitelogenina en *C. quadricarinatus* fueron identificadas por distintos autores. Abdu *et al.* (2000) destacan sólo dos polipéptidos de bajo peso molecular en el ovario de hembras en vitelogénesis primaria, mientras que en vitelogénesis secundaria reportan 3 subunidades. En la hemolinfa de hembras de *C. quadricarinatus* se encontraron cuatro polipéptidos, en una fracción de alta densidad lipoproteica, que podrían ser los precursores de varias proteínas del vitelo (Abdu *et al.*, 2000; Yehezkel *et al.*, 2000)

Serrano-Pinto *et al.* (2003) caracterizaron mediante electroforesis dos formas de vitelinas en ovarios en vitelogénesis secundaria de la especie en estudio. Estos compuestos, de naturaleza lipoglucocarotenoproteica, presentaron pesos moleculares nativos de 470 y 440 kDa. Se registraron además, para ambas vitelinas, las subunidades polipeptídicas constituyentes. En el mismo trabajo, utilizando anticuerpos preparados contra vitelina purificada, los autores demostraron una completa identidad inmunológica entre la vitelogenina existente en hepatopáncreas y hemolinfa, y la vitelina presente en ovarios de hembras maduras.

En el trabajo de Sagi *et al.* (1999), las concentraciones de esta lipoproteína se cuantifican por el método inmunoenzimático ELISA, utilizando un anticuerpo anti polipéptido (106 kDa) específico de la vitelogénesis secundaria (Abdu *et al.*, 2001b). Se sugiere además que una lipoproteína específica de hembras (LP II), identificada en hemolinfa,

serviría como marcador del inicio de la vitelogénesis secundaria e incluso es posible que corresponda a la propia vitelogenina que se transporta desde el hepatopáncreas al ovario (Yehezkel *et al.*, 2000).

Abdu *et al.*, (2002) confirman que en *C. quadricarinatus* existe una síntesis extraóvarica de proteínas del vitelo, que ocurre en el hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria y que la captación de esa vitelogenina desde fuentes extraováricas por los oocitos se realiza por endocitosis mediada por receptores (Abdu *et al.*, 2000). Además, Khalaila *et al.* (2004) dilucidaron varias características estructurales de la vitelogenina en hemolinfa de *C. quadricarinatus*, mediante estudios bioquímicos a nivel de los sitios de glucosidación proteica. Estos primeros aportes sobre los oligosacáridos asociados servirían de base para entender el proceso de ensamblado, reconocimiento y transporte de la vitelogenina, así como su empaquetamiento en los huevos para su posterior utilización durante la embriogénesis.

Control endocrino de la reproducción en *C. quadricarinatus*

El control endocrino de la reproducción puede ser estudiado a través de distintas técnicas. En *C. quadricarinatus*, han sido utilizados varios procedimientos de manipulación, implantación o remoción de la glándula androgénica y de los pedúnculos oculares. Todos ellos tendientes a evaluar los cambios producidos durante los procesos de plasticidad sexual en individuos intersexos, y para controlar el inicio de la vitelogénesis secundaria con fines de aplicación en acuicultura (Yehezkel, *et al.*, 2000; Khalaila *et al.*, 2002; Shechter *et al.*, 2005). Por otro lado, el empleo de diferentes neuroreguladores y hormonas, tanto en estudios *in vivo*

como *in vitro*, constituye una herramienta de suma importancia para estudiar la regulación endocrina de la reproducción.

En hembras adultas de *C. quadricarinatus* se realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro* para evaluar el efecto del antagonista encefalinérgico naloxona sobre la inducción del crecimiento ovárico (Cahansky *et al.*, 2008b). Los estudios *in vitro* mostraron un aumento de la biosíntesis de proteínas en el grupo experimental que incluyó ovario, ganglio torácico y naloxona, en comparación con un control sin adición de este último. Los tratamientos *in vivo* consistieron en la adición del neuroregulador en el alimento, observándose oocitos de mayor diámetro y en vitelogénesis secundaria, en relación a los controles. Tanto para los experimentos *in vitro* como *in vivo*, se concluye que el periodo post-reproductivo es el indicado para aplicar estas técnicas de manipulación endocrina. Dichos resultados fueron reforzados en estudios posteriores en los cuáles se evaluaron los efectos *in vitro* de antagonistas dopaminérgicos y encefalinérgicos sobre el crecimiento del ovarios en distintos periodos del ciclo reproductivo de *C. quadricarinatus*. Cahansky *et al.* (2011) confirman entonces, para el periodo post-reproductivo, el efecto estimulante tanto de naloxona como de spiperona sobre el ovario, ambos en presencia del ganglio torácico.

La administración de metil farnesoato incorporado al alimento de hembras de la especie en estudio, no produjo durante la época invernal un efecto directo sobre la reproducción, pero si se observó una tendencia a acelerar el proceso de ecdisis y una importante tasa de mortalidad (Abdu, *et al.*, 2001a). Sin embargo, en ensayos *in vitro* realizados por Soroka *et al.* (2000) en ovarios de la misma especie se encontró que el metil farnesoato está involucrado en el inicio de la vitelogénesis mediada por la activación de la proteína Kinasa C (PKC).

Por otra parte, se ha establecido la importancia de los carotenos en los procesos fisiológicos de maduración ovárica (Sagi *et al.*, 1995; Liñán-Cabello *et al.*, 2004). La astaxantina es el principal carotenoide presente en el ovario maduro de *C. quadricarinatus*. Se sabe que existe una correlación positiva entre la concentración de astaxantina, tanto en el ovario como en hemolinfa, y el desarrollo de los oocitos. Esto demuestra que dicho carotenoide, y no otros, se encuentra asociado específicamente con la acumulación de vitelina (Sagi *et al.*, 1996; Abdu *et al.*, 2002).

RELEVANCIA DE *CHERAX QUADRICARINATUS* EN LA ACUICULTURA

La práctica de la acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica la intervención humana en el proceso de crianza para mejorar la producción. A nivel mundial, la producción acuícola aumentó de 32,4 millones de toneladas en el año 2000 a 52,5 millones de toneladas en el 2008. Se estima que en 2012 la acuicultura producirá más del 50 % del pescado comestible consumido en todo el mundo (FAO, 2010). En Argentina, también se produjo un fuerte crecimiento en la producción acuícola, durante el período 1992 a 2007, de 450 a 3014 toneladas, lo que representa un incremento anual promedio del 16.6% (Luchini & Panné Huidobro, 2008). Entre los principales ítems que se cultivan en nuestro país, podemos mencionar distintas especies de peces (trucha, pacú, tilapias, carpas), moluscos (ostras y mejillones), crustáceos (langosta de pinzas rojas), anfibios (ranas) y reptiles (yacaré).

Particularmente, la producción de crustáceos a nivel global se incrementó en promedio un 15% por año en el periodo 1990-2000 correspondiendo en el 2008 a 5 millones

de toneladas de la producción total en acuicultura (9% de la producción acuícola general). Estos últimos datos indican la relevancia de los crustáceos, especialmente decápodos, en el sector productivo de alimentos ricos en proteínas de origen acuático.

C. quadricarinatus, es una especie de alto valor comercial que se cultiva intensiva o semi-intensivamente en Australia, su país de origen desde 1985 y en otros países tales como Israel, Ecuador, México y Cuba (Lawrence & Jones, 2002; García-Guerrero *et al.*, 2003; McPhee *et al.*, 2004; Luchini & Panné Huidobro, 2008). En Argentina, la langosta fue introducida a principios de la década de 1990, alcanzando en el año 2001 un máximo de producción de 30 toneladas/año (Luchini, 2004; Luchini & Panné Huidobro, 2008).

El marcado interés en esta especie, por parte de los productores locales, reside en las ventajas operacionales que presenta su cría y engorde, así como en el elevado valor agregado que posee por su demanda en el mercado internacional “gourmet”.

Algunos de los rasgos de *C. quadricarinatus*, que la hacen atractiva para el desarrollo de su cultivo son: elevada tasa de crecimiento, desoves múltiples durante el periodo reproductivo, desarrollo directo con buen índice de fecundidad, baja agresividad, soporta altas densidades, rápida adaptación a alimentos balanceados, ausencia de enfermedades de difícil erradicación, alta capacidad de sobrevivida fuera del agua (importancia para la comercialización de animales vivos) y capacidad de tolerar condiciones ambientales subóptimas (Austin 1992; Lawrence & Jones, 2002; Villareal & Naranjo, 2008). Estas langostas alcanzan además un buen tamaño de comercialización entre los 50-120 g, con elevada proporción de carne, lo que las hace especialmente aptas para el consumo (Wingfield, 1998).

El cultivo de esta langosta consta de varias fases identificables (Fig. 10). Una vez producido el apareamiento, desove y eclosión en los estanques de reproductores, los juveniles son mantenidos en una fase de pre-engorde bajo techo, durante unos tres meses, a temperaturas de 26 a 28 °C (Jones, 1995). Desde la eclosión hasta un peso aproximado de 1 gramo (fase de “hatchery”), los juveniles son considerados como *tempranos*, mientras que aquellos que se encuentran entre 1 y 5 gramos (fase de “nursery”), son denominados *avanzados*. La fase de pre-engorde de juveniles, abarca desde la independencia hasta aproximadamente los 5 gramos.

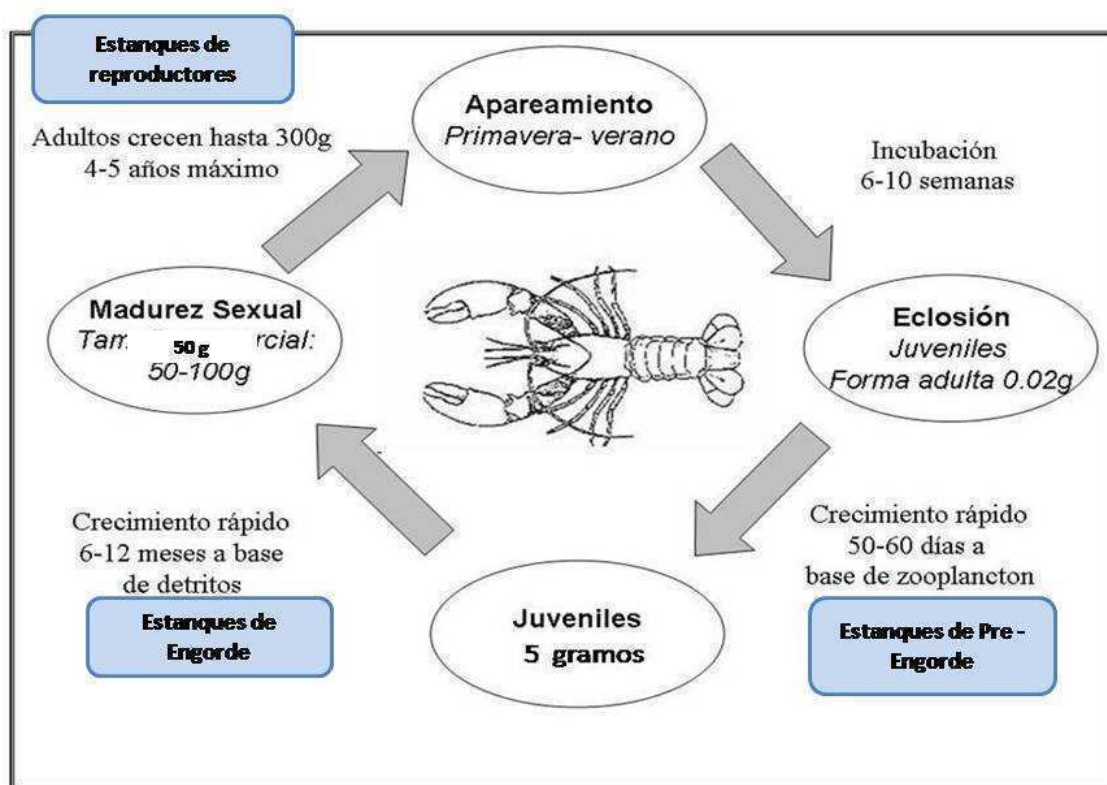


Figura 10. Esquema del ciclo de vida de *Cherax quadricarinatus* en criadero, modificado de Jones (1997).

Finalmente, el periodo de engorde se lleva a cabo en estanques de tierra (Figura 11). Los juveniles son transferidos a estanques externos, excavados en tierra y fertilizados a fin de asegurarles la provisión natural de zooplancton. En climas tropicales, esta fase de engorde comprende de 6 a 8 meses, abarcando principalmente las estaciones de otoño e invierno; al término de este período los animales alcanzan la talla comercial mínima de 50 grs. (Jones, 1996, 1997).



Figura 11. Cultivo de la langosta *C. quadricarinatus* en Argentina. A: estanques excavados en tierra, dónde se lleva a cabo la fase de engorde. B: ejemplares de talla comercial. C: estanques de tierra de menor profundidad dónde se realiza el preengorde de juveniles. D: instalaciones correspondientes a la fase de “hatchery y nursery”.

Los primeros estudios tendientes a optimizar el cultivo de *C. quadricarinatus*, que sistematizan el conocimiento biológico de esta especie, fueron publicados por Jones (1990,1995a). En las últimas dos décadas, se han realizado avances significativos en el cultivo de *C. quadricarinatus*, generando en consecuencia el desarrollo de nuevas y diferentes tecnologías para maximizar su producción.

En lo que respecta al cultivo de juveniles, Jones (1995b,c) menciona que los parámetros más importantes a considerar son la nutrición y el hábitat, ya que estos influirán sobre las tasas de supervivencia y crecimiento, en función de la densidad y tamaño de stock (Jones & Ruscoe 2000). Levi *et al.* (1999), observaron que bajo condiciones de espacio limitado, se prolonga la duración de la fase de liberación de los juveniles retenidos por la madre, como así también el tiempo entre el comienzo de la liberación y la siguiente puesta de huevos de la hembra. En lo referente al hábitat, se remarca la importancia de los refugios (Jones & Ruscoe, 2001) y la presencia de vegetación en el medio como enriquecedor nutricional y ambiental. El desarrollo de procedimientos que permitan mejorar las etapas de desove, incubación de huevos y finalmente el crecimiento de los juveniles eclosionados, es un punto de interés indicado por Jones (1995a) y Parnes & Sagi (2002).

Se realizaron distintos estudios con el objetivo de optimizar las dietas para el crecimiento de los juveniles de esta especie, en condiciones de cultivo. Así, Cortés Jacinto *et al.* (2003, 2004,2005, 2009) evaluaron el efecto de distintos niveles proteicos y energéticos sobre el crecimiento y la supervivencia de pre-adultos de *C. quadricarinatus*. Cortes Jacinto *et al.* (2003), demostraron que el porcentaje de proteína cruda en la dieta debe ser del 35% para conseguir un crecimiento óptimo de los juveniles. Sin embargo, si la fuente de proteína es harina de pescado, basta con un 30% de proteína en el alimento (Thompson *et al.*, 2004,

2005) e incluso puede reemplazarse por harina de soja (Muzinic *et al.*, 2004). La harina de pescado es uno de los alimentos más completos nutricionalmente para la formulación de dietas artificiales, sin embargo, su alto costo hace necesario la búsqueda de fuentes alternativas de alimento orientadas hacia el sector vegetal (Campaña Torres *et al.* 2005, 2006). Complementariamente, Gutiérrez & Rodríguez (2010) ensayaron distintas proporciones de harina de pescado y soja para evaluar el crecimiento y la supervivencia de juveniles. Estos autores concluyeron que el mayor incremento de peso de los juveniles, se obtuvo con la dieta que se reemplazó en un 50% la harina de pescado por la de soja. Por otro lado, aquellas dietas enriquecidas con la hormona α -ecdisona produjeron un mayor incremento del peso y de la tasa de crecimiento específica en juveniles recién independizados, en comparación con dietas estándar (Chaulet *et al.*, 2006).

En Argentina, la acuicultura necesita de la investigación experimental en campo, del avance en el desarrollo de especies potencialmente aptas para producción acuícola y del mejoramiento de las tecnologías actualmente utilizadas, para poder sostener el crecimiento productivo (Luchini & Panné Huidobro, 2008), por lo que se requieren técnicas que permitan aumentar la producción en criadero por medio de un manejo controlado.

Dado que el desarrollo óptimo de *C. quadricarinatus* se verifica en climas tropicales (norte de Australia), en los climas templados o subtropicales imperantes en nuestro País las temperaturas invernales representan un problema para el crecimiento y engorde de los juveniles. Por este motivo para que el engorde de los juveniles de 5g ocurra durante los meses mas cálidos del año (primavera-verano) es necesario inducir la puesta de huevos en las estaciones de otoño e invierno, correspondientes a los períodos post y pre-reproductivo normales de *C. quadricarinatus*. Esto sería teóricamente posible debido a la plasticidad

reproductiva de esta especie (Jones *et al.*, 1995; Barki *et al.*, 1997; Karplus *et al.*, 2003; Cahansky *et al.*, 2008).

A fin de optimizar el cultivo de *C. quadricarinatus* en climas templados o subtropicales, se requerirá entonces del desarrollo de nuevas tecnologías y procedimientos de manejo tendientes a maximizar la reproducción y crecimiento de esta especie en condiciones de criadero. Entre los procedimientos posibles de aplicar para mejorar la reproducción de las hembras, se incluyen el manejo de factores ambientales, la formulación de dietas específicas y la administración de hormonas y/o neuroreguladores.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

- Evaluar, mediante técnicas específicas y sensibles, el efecto de diversas hormonas y neuroreguladores sobre los niveles de vitelogenina y vitelina de hembras adultas de *Cherax quadricarinatus* en diferentes períodos de su ciclo reproductivo con el fin de acrecentar los conocimientos teóricos sobre la fisiología reproductiva de esta especie.
- Proporcionar herramientas de potencial aplicación en acuicultura a fin de optimizar la producción de esta especie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Cada uno de los siguientes objetivos específicos se desarrollan particularmente en los próximos Capítulos de la presente Tesis, en los cuales se postulan además, si correspondiese, la o las hipótesis pertinentes.

OBJETIVO I: Desarrollar una técnica analítica sensible y específica, capaz de determinar los niveles de vitelogenina y vitelina en *C. quadricarinatus*.

OBJETIVO II: Determinar los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa, durante todo el ciclo reproductivo de hembras adultas de *Cherax quadricarinatus*.

OBJETIVO III: Evaluar el efecto *in vitro* de hormonas (progesterona, estradiol, metil farnesoato) y del antagonista encefalinérgico naloxona sobre el contenido de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus*.

OBJETIVO IV: Evaluar los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hemolinfa y hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con dietas adicionadas con progesterona, metil farnesoato o naloxona

CAPÍTULO I

**ANÁLISIS CUALI-CUANTITATIVO DE LA VITELINA/
VITELOGENINA, IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS
PRODUCTORES Y PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA
ELISA**

OBJETIVO ESPECÍFICO

OBJETIVO I: Desarrollar una técnica analítica sensible y específica, capaz de determinar los niveles de vitelina y vitelogenina en *C. quadricarinatus*.

METODOLOGÍA

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA VITELINA

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con genómica, el estudio de los genes. La proteómica es una ciencia relativamente reciente y se apoya en el uso de distintas técnicas asociadas. Entre ellas podemos mencionar la espectrometría de masas, los métodos de fraccionamiento y la separación de péptidos y proteínas como la electroforesis en geles de poliacrilamida, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el western blot, entre otras. A continuación se detallan las técnicas desarrolladas en la presente Tesis para la identificación, aislamiento, purificación y caracterización de la proteína en estudio, la vitelina así como para la producción de un anticuerpo primario.

Aislamiento y purificación de la vitelina

Se siguió, para la especie en estudio, el protocolo descrito por García *et al.* (2006, 2008), llevado a cabo en el camarón *Macrobrachium borellii*. Para el aislamiento y la purificación de vitelina (Vn) se emplearon tres hembras adultas de *C. quadricarinatus* con IGS mayor a 2 correspondiente a ovarios maduros de acuerdo a Abdu *et al.* (2002). A partir de estos ejemplares se realizó un pool de ovarios y se efectuó una homogeneización en buffer fosfato de sodio 50 mM y pH 7,4 conteniendo 2 µl/mL de inhibidor de proteasas (PMSF), en una relación 1:3 (peso/volumen). El homogenato resultante fue centrifugado a 10.000xg durante 20 minutos, y el sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado a 100.000xg durante 60 minutos. Se extrajo el sobrenadante (fracción citosólica) y se lo congeló a -70 °C hasta el posterior aislamiento.

Las muestras de citosol se colocaron en tubos de centrifuga sobre una solución de NaBr de densidad 1.26 g/ml y fueron ultracentrifugadas para lograr separaciones en gradiente de densidad. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman L8M, con un rotor de ángulo móvil SW60 Ti, a 178.000 xg y a 10 °C durante 24 horas. En forma paralela se centrifugó, sobre el mismo colchón de NaBr, una solución salina de igual densidad que las muestras. El contenido de cada tubo muestra y blanco fue fraccionado desde el tope hasta el fondo, en alícuotas de 200 µl.

Para cuantificar las proteínas totales presentes en las distintas fracciones se midió la absorción de luz ultravioleta a 280 nm de cada alícuota, en un espectrofotómetro Zeiss MQII. Con los valores obtenidos se construyeron perfiles (concentración relativa de proteínas vs

fracción separada del gradiente), los que permitieron ubicar máximos proteicos correspondientes a las lipoproteínas.

Las densidades de las diferentes fracciones se calcularon a partir de los índices de refracción de las alícuotas obtenidas del tubo testigo, que se midieron con un refractómetro Abbey (Bausch & Lomb) a 26°C. Los datos obtenidos se interpolaron con los datos tabulados por Lindgren, 1973.

Con los valores obtenidos se construyó un perfil de concentración relativa de proteínas vs. la fracción separada del gradiente, en este último se puede observar un máximo en las fracciones 12, 13, 14 y 15. Este pico se correspondió con una densidad de entre 1,17 y 1,21 g/mL, esperada para la vitelina. (Fig. 12).

Una vez separadas las fracciones de interés, se efectuó una diálisis para eliminar sales, principalmente NaBr y purificar así la muestra. Este paso se realizó en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 durante 24h a 7 °C.

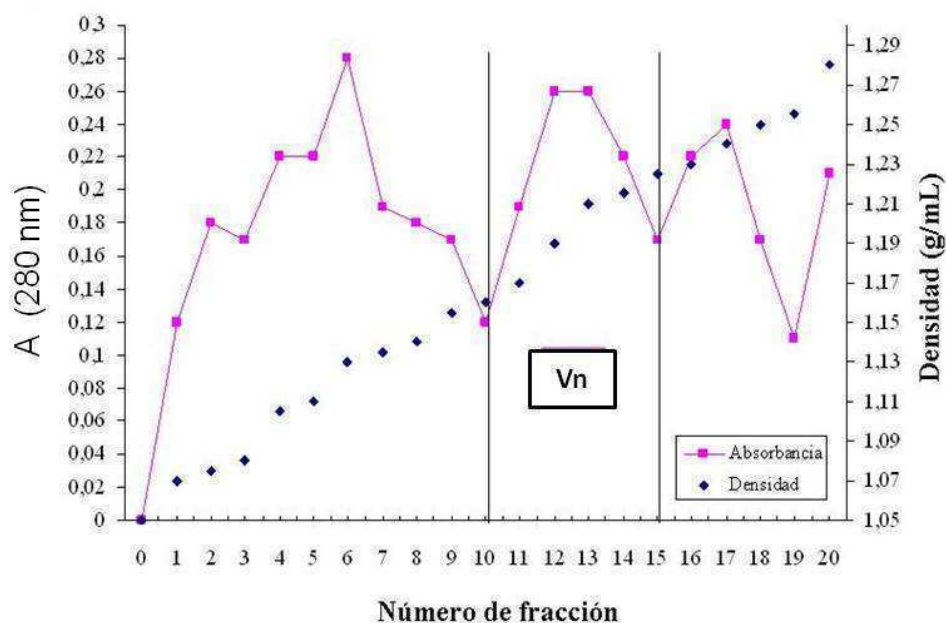


Figura 12. Perfil de densidad y absorbancia a 280 nm obtenido a lo largo del gradiente luego de ultracentrifugar citosol de ovario de *Cherax quadricarinatus* en NaBr de densidad 1,26 g/ml.

Se verificó la pureza de la vitelina (Vn) aislada, mediante un electroforesis en gel de poliacrilamida, en gradiente nativo 4-23% teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical Co., St Luis, MO) según el protocolo de García *et al.* (2004). Para esto, se sembró la vitelogenina previamente purificada en una concentración de 6 mg/mL correspondientes a 48 μ g de proteína. La corrida electroforética se contrastó con marcadores de pesos moleculares, en un intervalo de 100 a 800 kDa.

Producción del anticuerpo primario anti-vitelina

Se prepararon anticuerpos policlonales contra vitelina en conejo. La lipoproteína fue aislada por ultracentrifugación en gradiente de densidad como se mencionó anteriormente. Los conejos fueron mantenidos bajo condiciones controladas en el bioterio del INIBIOLP, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, siguiendo los protocolos estandarizados por García *et al.* (2008) y por Dreon *et al.* (2003).

Para lograr una respuesta inmunogénica fuerte y prolongada deseada cuando se trata de antígenos solubles, se utilizaron estimulantes no específicos de la respuesta inmune conocidos como adyuvantes. En este caso se utilizó el adyuvante de Freund, una emulsión de agua en aceite, preparada con aceites no metabolizables que en el caso del adyuvante completo contiene además *Mycobacterium tuberculosis* muertas por calor (Harlow & Lane, 1988). Se suministró a los animales una inyección subcutánea de 1,2 mg de lipoproteína (previamente dializada) emulsionada en adyuvante de Freund completo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Tres semanas después se administró una segunda inyección de 1,5 mg de antígeno con adyuvante de Freund incompleto. Una última inyección con 1,5 mg de antígeno puro fue realizada luego de dos semanas. Seis días después de la última inyección los animales fueron sangrados.

La sangre colectada fue mantenida a 37° C por 30 minutos para su coagulación y luego a 4° C durante toda la noche para lograr la retracción del coágulo. Después de una centrifugación suave (10.000 xg durante 10 minutos) la fracción IgG fue purificada por precipitación con sulfato de amonio. El precipitado resuspendido en PBS se almacenó a -70° C hasta su utilización.

Desarrollo de la Técnica Western blot

Esta técnica fue llevada a cabo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, bajo la asistencia, colaboración y supervisión de la Dra. Carolina Pustovrh.

El western blot es una técnica analítica utilizada para detectar proteínas específicas e identificar las subunidades que constituyen el polipéptido (Federici *et al.*, 2001), en este caso la vitelina. El protocolo empleado fue modificado a partir de investigaciones previas en el tema realizadas por Pustovrh *et al.* (2009), García *et al.* (2008) y Abdu *et al.* (2001b).

Brevemente, la electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida SDS- PAGE al 7.5 % en condiciones reductoras. Se sembraron cuatro concentraciones de la proteína en estudio, por duplicado: 1:500; 1:250; 1:100 y 1:50 además de marcadores comerciales de peso molecular (250 a 36 kDa) y una calle para control negativo del anticuerpo anti vitelina a la mayor concentración. De cada muestra se tomaron 20 μ l y se diluyeron en 5 μ l de buffer muestra 5X (Trizma base 10 mM, SDS 2%, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0.06%, b-mercaptoetanol 5%). Antes de la siembra, las muestras fueron sometidas a 100°C durante 3 min, con el objeto de desnaturalizar las proteínas.

La electroforesis se realizó primero a 40 V por 2 horas aproximadamente, y luego se elevó el voltaje a 100-120 V en equipo Power Pac300 (Bio-Rad Laboratories). Finalizada la electroforesis, el gel fue lavado durante 15 minutos en buffer de transferencia (Trizma base 20mM, glicina 150 mM, metanol 20% pH 8,8) con el objeto de eliminar el SDS remanente. Las proteínas fueron luego transferidas desde el gel a una membrana de PVDF de 0,45 μ m de tamaño de poro. Para ello se utilizó un sistema de transferencia húmedo, en el cual todo el sistema (filtros, membranas y geles) se encuentra sumergido en el buffer de transferencia.

Este proceso se realizó a 30 V, *over night* a 4°C con agitación constante en el equipo Mini Trans Blot® Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories).

Una vez finalizada la electrotransferencia, se tiñó la membrana transferida con Rojo Ponceau S 0,5% en 1% ácido acético por un minuto, para corroborar el éxito del procedimiento. Luego se lavó con PBS Tritón X - 100. A continuación se efectuó el bloqueo de la membrana con leche descremada 5% (leche descremada en polvo, PBS), durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante. La incubación con el anticuerpo primario anti vitelina (**1:500** diluido en PBS) también se realizó durante una hora a temperatura ambiente y con agitación. El control negativo fue realizado por omisión del anticuerpo primario. Finalizada esta etapa, la membrana fue lavada 3 veces (5 minutos cada vez) con PBS Tritón X – 100 y posterior adición de PBS en agitación para eliminar restos del anticuerpo primario unido de manera inespecífica. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, obtenido de Cabra (H+L) y conjugado con peroxidasa (Bio-Rad laboratories) diluido **1:3000** en PBS por una hora.

Tras este tiempo se repitieron los lavados y se procedió al revelado, a fin de detectar las subunidades que conforman la proteína vitelogenina. La membrana fue incubada en solución reveladora durante 1-2 minutos, preparada con DAB (3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato) diluida en un buffer sustrato comercial. La reacción de revelado fue detenida con agua destilada. Posteriormente, se realizó la adquisición de la imagen en escáner Epson® Stylus TX135 para determinar los pesos moleculares de las bandas de interés. El cálculo de los pesos moleculares de las bandas obtenidas se realizó por medio de la comparación y relativización con los estándares de peso molecular, mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

El frente del gel fue medido en la membrana transferida, determinándose por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, en este caso el colorante azul de bromofenol. El valor obtenido de la relación RF para las proteínas estándares del marcador de peso se correlacionó con los valores logarítmicos de los pesos moleculares correspondientes, a fin de obtener una curva lineal, cuyo logaritmo se utilizó para determinar el valor final de cada marca de proteína obtenida en la membrana transferida.

IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS PRODUCTORES DE VITELINA Y VITELOGENINA

Puesta a punto de la Técnica inmunohistoquímica

Con el objetivo de determinar la presencia de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas mediante una técnica inmunohistoquímica (IHQ), se tomaron muestras de ambos órganos, en hembras adultas de *C. quadricarinatus* durante el periodo reproductivo. En general, las técnicas inmunohistoquímicas se basan en la aplicación de reacciones antígeno-anticuerpo únicas o secuenciales, altamente sensibles y específicas. En la especie en estudio, se utilizaron los mismo anticuerpo primario (anti Vn obtenido previamente) y secundario (biotinilado + estreptavidina conjugada con peroxidada) que se emplearon en la técnica ELISA.

En el presente trabajo se desarrolló un protocolo específico de la técnica IHQ para ovarios y hepatopáncreas de hembras adultas de la langosta *C. quadricarinatus*, a partir de estudios previos realizados por Abdu *et al*, (2001b), Heer *et al*, (2008) y Rey Vázquez *et al*. (2009). La técnica aplicada consta de los siguientes pasos:

- a) Fijación de las piezas de ovario y hepatopáncreas. Se probaron inicialmente distintas combinaciones de soluciones fijadoras y temperaturas óptimas para el proceso, a saber:
 - i. Bouin a temperatura ambiente
 - ii. Bouin a 4°C
 - iii. Formalina (Formol 10%) a temperatura ambiente
 - iv. Formalina (Formol 10%) a 4°C

La solución de Bouin consistió en: 75 partes de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 20 partes de formol y 5 partes de ácido acético glacial.

- b) Inclusión en parafina.
- c) Cortes de 7 μm en micrótomo.
- d) Desparafinado, hidratación y lavado con PBS (0,1mM, pH 7,6).
- e) Bloqueo de peroxidases endógenas con peróxido de hidrógeno 3% en PBS, durante 10 min.
- f) Lavados con PBS y bloqueo de sitios inespecíficos con leche en polvo 5% en PBS, durante 45 min.
- g) Incubación anticuerpo primario antiVn 1:500, *over night*, a 4°C
- h) Lavados con PBS

- i) Incubación del anticuerpo secundario anti IgG de conejo obtenido de cabra (H+L) conjugado con peroxidasa (Bio-Rad laboratories) 1:500, durante 1h.
- j) Lavado y revelado con 0,1% DAB en buffer tris 0,1 M (pH 7,6) y peróxido de hidrogeno 0,02%.
- k) Tinción con hematoxilina, deshidratación y montaje con DPX para observación final bajo microscopio.

DESARROLLO DE LA TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

La técnica ELISA es un tipo de inmunoensayo en la cual un antígeno se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color. En el presente trabajo, se utilizó un ELISA de tipo indirecto. Este sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario, contra el antígeno, y otro secundario, contra el primario. El desarrollo específico de la técnica de medición de vitelina/vitelogenina, y su puesta a punto, se llevaron a cabo íntegramente en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección y colaboración del Dr. C. Fernando García.

Puesta a punto de la técnica ELISA en *C. quadricarinatus*

La puesta a punto de la técnica inmunoenzimática ELISA se realizó según el procedimiento descrito por García *et al.* (2008). Se probaron distintas combinaciones de las concentraciones de Vn aislada, de los anticuerpos primario y secundario y de las muestras de hemolinfa, hepatopáncreas y ovario. Finalmente, se estandarizó el protocolo de trabajo que se describe a continuación, como el óptimo y más específico para las muestras de la especie en estudio.

Se utilizaron placas Nunc-Immuplate Polisorp de 96 pocillos, descartándose el empleo de los pocillos ubicados en los cuatro bordes de la placa. En todos los casos, el volumen final de siembra de las muestras fue de 50 μ l; las muestras fueron diluidas (**1/3**) en buffer coating (15 mM de carbonato de sodio, 35 mM de bicarbonato de sodio, pH 9,6). El stock de vitelina aislada y purificada previamente se utilizó en una dilución **1/500** a partir de la cual se realizó la curva de titulación (por triplicado) entre los 0 y los 300 ng a intervalos de 30 ng. Las muestras de hemolinfa, ovario y hepatopáncreas se sembraron por duplicado. Las muestras de hemolinfa fueron previamente diluidas **1/10** en PBS.

La primera incubación de las muestras, se realizó a 37 °C durante 90 min en cámara húmeda. Una vez finalizada, se descartó el sembrado realizado y se lavó cada placa, agregando 300 μ l de PBS por pocillo. A continuación, se procedió al bloqueo de sitios inespecíficos con 300 μ l de solución de PBS, pH 7,4, con 6% de leche descremada en polvo. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2 h, y luego se repitieron tres lavados con PBS-Tween 0,05% (500 μ l Tween en 1 L de PBS, pH 7,4). El anticuerpo

primario anti-Vn obtenido, se utilizó también en una dilución **1/500** realizada en PBS-Tween 0,05%, con 6% de leche descremada en polvo, y se sembró en cada pocillo un volumen de 50 μ l. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Transcurrido este período, se realizaron tres lavados sucesivos de cada placa con PBS-Tween 0,05%, sembrándose a continuación 50 μ l del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, obtenido de Cabra (H+L) y conjugado con peroxidasa (Bio-Rad laboratories), en una dilución 1/500 en PBS-Tween 0,05% con 6% de leche descremada en polvo. La incubación de las placas con el anticuerpo secundario se realizó en cámara húmeda a 37 °C, durante 2 h. Finalizada esta incubación, se efectuaron cuatro lavados con PBS-Tween, colocando a continuación en cada pocillo 100 μ l de solución de Revelado (sustratos: ABTS y H₂O₂ + ácido cítrico 0,2 M y Na₂HPO₄ 0,2 M), incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, la reacción colorimétrica se detuvo mediante el agregado de ácido oxálico al 2% (100 μ l/pocillo). La absorbancia de las muestras fue medida a 415 nm en un lector de placas ELISA (Bio-Rad ® Laboratories Modelo 680).

Para el cálculo de los niveles finales de vitelina y vitelogenina en las muestras analizadas, se utilizó una formula que integra los valores obtenidos de la curva de titulación de la vitelina (ng/ μ l) con la lectura de densidad óptica para cada una de las muestras, la lectura del blanco, la dilución de las muestras y la concentración sembrada por placa. En el caso de las muestras de tejidos (ovario y hepatopáncreas), el contenido de las proteínas vitelogénicas se expresó en μ g/g ó μ g/ovario o hepatopáncreas, mientras que para las muestras de hemolinfa la concentración de vitelogenina se expresó en ng/ μ l.

RESULTADOS

Se aisló y purificó exitosamente la lipoproteína vitelina a partir de un pool de tejidos ováricos de hembras de *Cherax quadricarinatus* según el protocolo descrito anteriormente.

La pureza de la vitelina (Vn) se verificó mediante una electroforesis, identificándose una banda muy nítida entre los 400 y 650 kDa correspondiente a la Vg en estudio. Finalmente se realizó la determinación del peso molecular de la Vn alrededor de los 500 kDa, de acuerdo a los marcadores de peso molecular empleados en la técnica. (Figura 13)

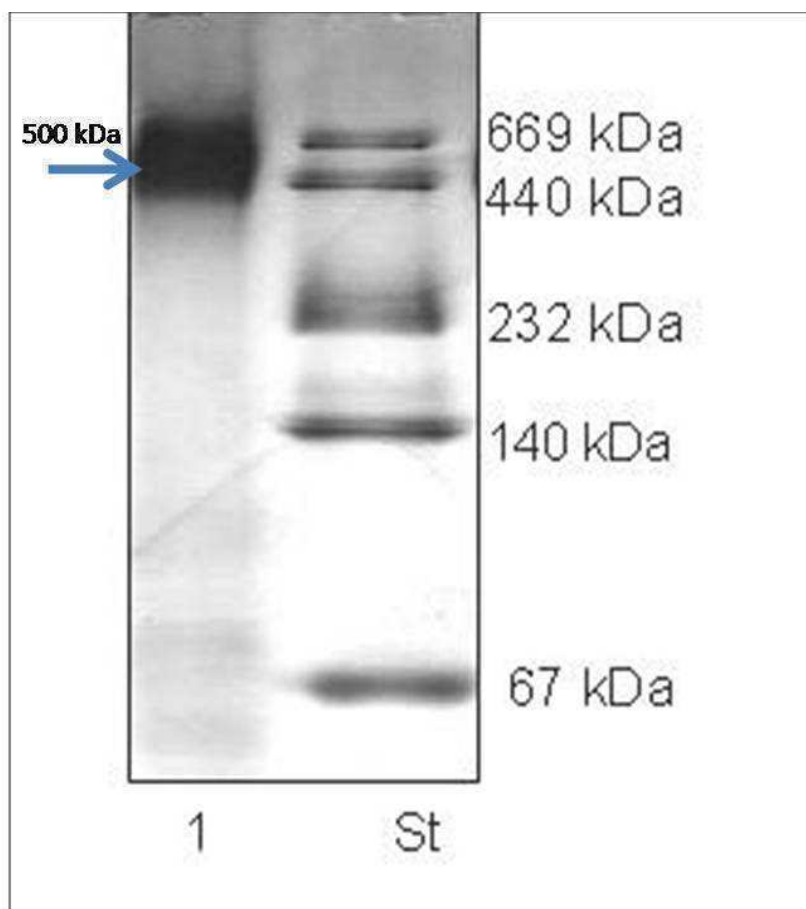


Figura 13. Gel de Poliacrilamida. Verificación de la pureza de la lipoproteína vitelina (Vn) aislada de *C. quadricarinatus*. Calle 1: 6 mg/mL de Vn correspondientes a 48 μ g de proteína; calle St: marcador de pesos moleculares.

La producción del anticuerpo primario anti-vitelina específico para la especie en estudio fue realizada satisfactoriamente. La validación del anticuerpo policlonal anti vitelina generado se realizó por distintas técnicas que permitieron evidenciar su especificidad. En la Figura 14 A se muestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes teñido con Coomassie Brilliant Blue. En el mismo se sembró la vitelina previamente aislada. La electroforesis se contrastó con marcadores de pesos moleculares (ST) en un intervalo de 100 a 300 kDa. Por otro lado, en la figura 14 B pueden observarse nítidamente las bandas correspondientes a las subunidades peptídicas que conforman la vitelina. Se identificaron 5 bandas de polipéptidos principales cuyos pesos moleculares establecidos corresponden a: **138, 107, 98, 85 y 61** KDa respectivamente.

En el gel de poliacrilamida (Fig. 14 A), si bien no es de alta definición, se pueden observar dos de las subunidades indicadas anteriormente, las de 61 y 85 kDa. Estos resultados constituyen una primera evidencia de la especificidad del anticuerpo primario generado para la vitelina de la especie en estudio.

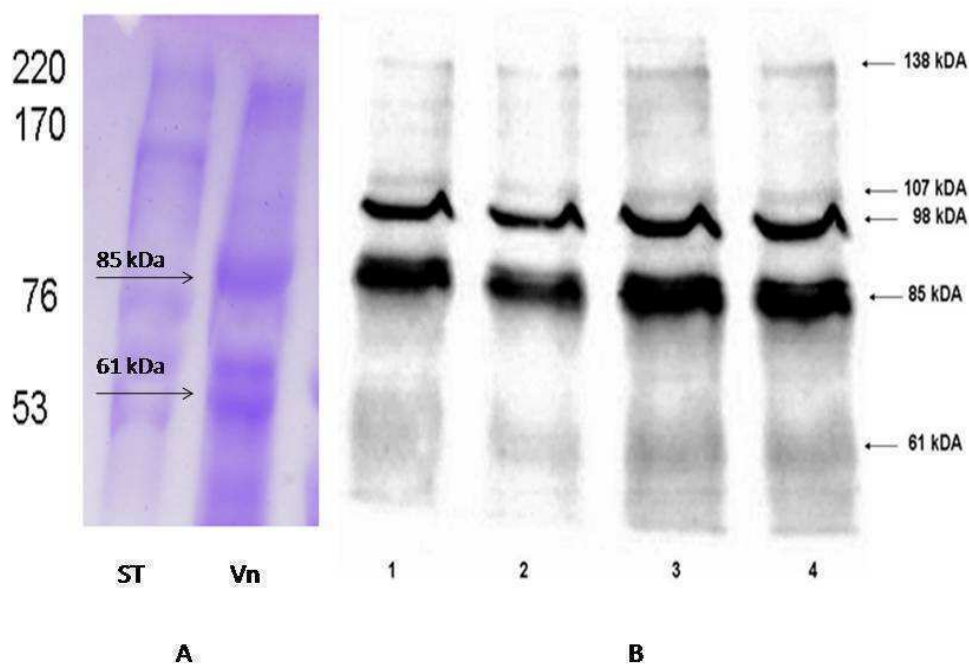


Figura 14. A: Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Calle ST: marcadores de pesos moleculares. Calle Vn: vitelina aislada y purificada. Las flechas indican las subunidades de 61 y 85 kDa. **B:** Western blot en condiciones reductoras de la vitelina de *C. quadricarinatus*. Calles 1 y 2: Vn 1:250 por duplicado; calles 3 y 4: Vn 1:100 por duplicado. A la derecha se indican los pesos moleculares de las bandas identificadas.

Complementariamente, la especificidad del anticuerpo anti Vn se determinó mediante inmunotransferencia empleando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, a partir de homogenatos de ovario y de hepatopáncreas y con muestras de hemolinfa. En la Figura 15 pueden observarse los resultados obtenidos, a partir del western blot realizado. El objetivo de este ensayo fue corroborar que el anticuerpo obtenido fuera específico para las subunidades de Vn y de Vg, y además, determinar las subunidades constituyentes de estas lipoproteínas. En la última calle, donde fue sembrada la muestra de hemolinfa, se observa sin

embargo una elevada cantidad de proteínas, atribuible a una dilución demasiado baja de la muestra de hemolinfa. A pesar de esto pudieron determinarse algunas de las subunidades de las lipoproteínas vitelogénicas reconocidas en los homogenatos de tejido. En ovario se identificaron claramente 3 de las subunidades correspondientes a Vn: 107, 85 y 61 kDa. Por su parte, en hepatopáncreas la banda de 107 kDa resulta notoria y se evidencia tenuamente la de 61kDa.

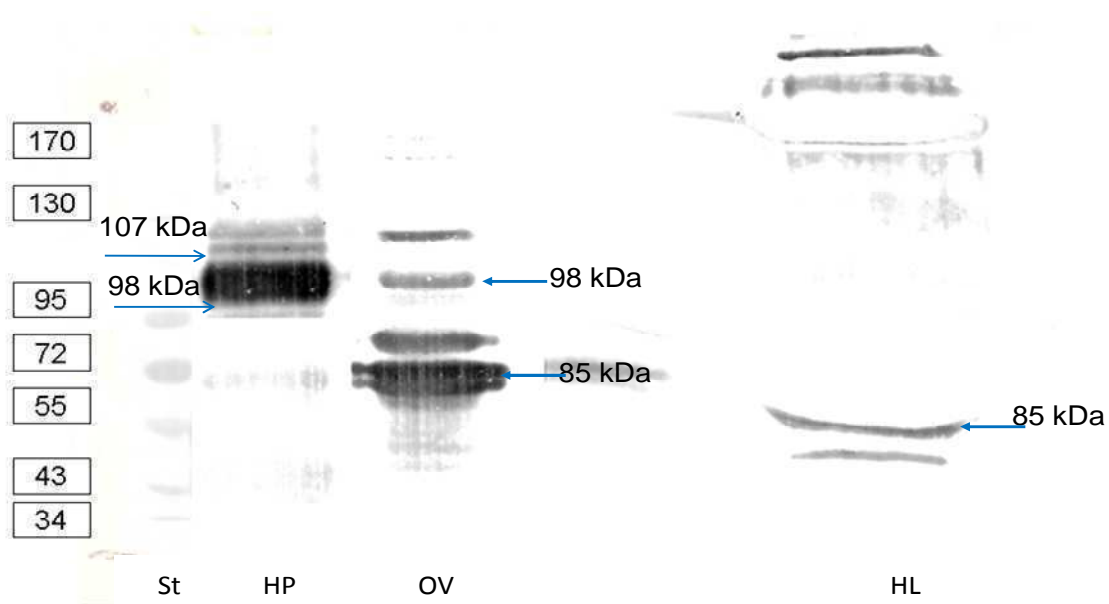


Figura 15. Western blot en condiciones reductoras a partir de homogenatos de hepatopáncreas (HP) y ovario (OV) y de una muestra de hemolinfa (HL) de hembras maduras en período reproductivo de *C. quadricarinatus*. ST: marcadores de pesos moleculares.

Además, se puso a punto un protocolo específico para la técnica inmunohistoquímica (IHQ) en *C. quadricarinatus*. Previamente, se determinaron las sustancias fijadoras y condiciones óptimas de temperatura para cada tipo de tejido procesado. Se determinó el empleo de formalina (Formol 10%) a temperatura ambiente como solución fijadora óptima para ovario y hepatopáncreas. La formalina permite mantener las estructuras anatomohistológicas en las condiciones requeridas para la IHQ a diferencia de la solución de Bouin, que no resultó adecuada en este caso. Para la detección de vitelina y vitelogenina en cortes histológicos de ovario y hepatopáncreas, respectivamente se empleó el anticuerpo primario anti Vn en una dilución 1/500, mientras que el secundario fue utilizado 1/3000 para OV y 1/500 para HP.

Se identificó inmunoreactividad para Vn/Vg en muestras de ovario y hepatopáncreas tomadas de hembras adultas de *C. quadricarinatus* en periodo reproductivo (diciembre 2010). En la figura 16 puede observarse la inmunomarca citoplasmática de vitelina en distintas regiones del oocito. Es característica en estas muestras la presencia de abundantes gotas lipídicas constituyentes del vitelo. También puede observarse inmunomarca en la zona cercana a las células foliculares correspondiente posiblemente a vitelogenina sintetizada por dichas células.

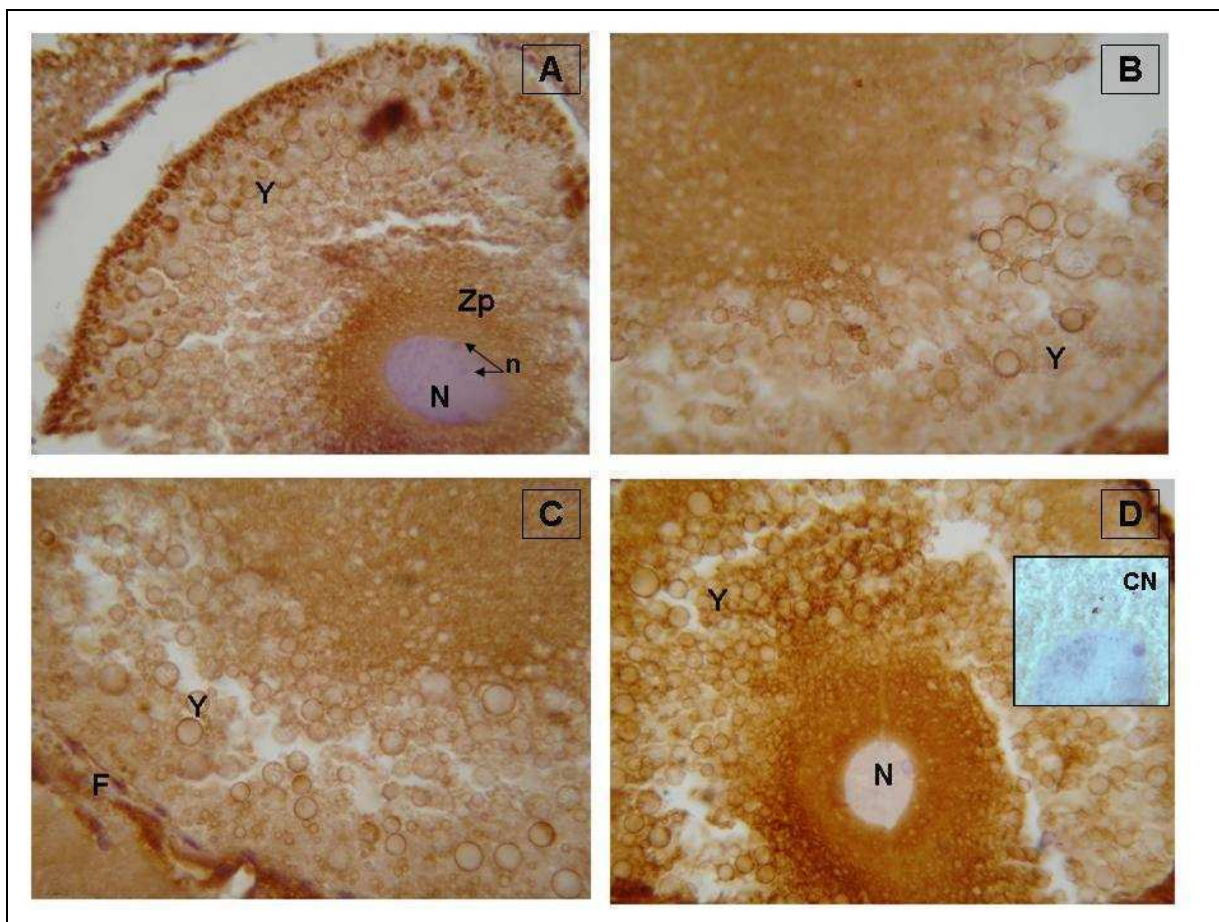


Figura 16. Inmunoreactividad para vitelina en ovario de hembras de *C. quadricarinatus* en periodo reproductivo. (Aumento: 250X) Secciones representativas de ovario. Inserto en D: control negativo de especificidad (CN) correspondiente a corte de ovario donde se ha omitido el anticuerpo primario. **F:** células foliculares. **N:** núcleo oocito, **n:** nucleolos, **Y:** glóbulos de vitelo, **Zp:** zona perinuclear.

La estructura del hepatopáncreas mostró ser de tipo tubular, representado por un epitelio simple compuesto por cuatro tipos celulares principales: E (embrionarias, cilíndricas), F (fibrilares), B (de mayor tamaño, núcleo basal, vacuolas grandes) y R (absortivas, más numerosas, núcleo medio a basal, con vacuolas llenas de lípidos y glucógeno). En la figura 17 puede observarse la inmunomarca obtenida para vitelogenina en hepatopancreas. La misma se encuentra asociada principalmente a las células R y B, éstas

últimas en proximidad con el lumen, donde puede observarse secreción. También se encontró inmunomarca de disposición intertubular.

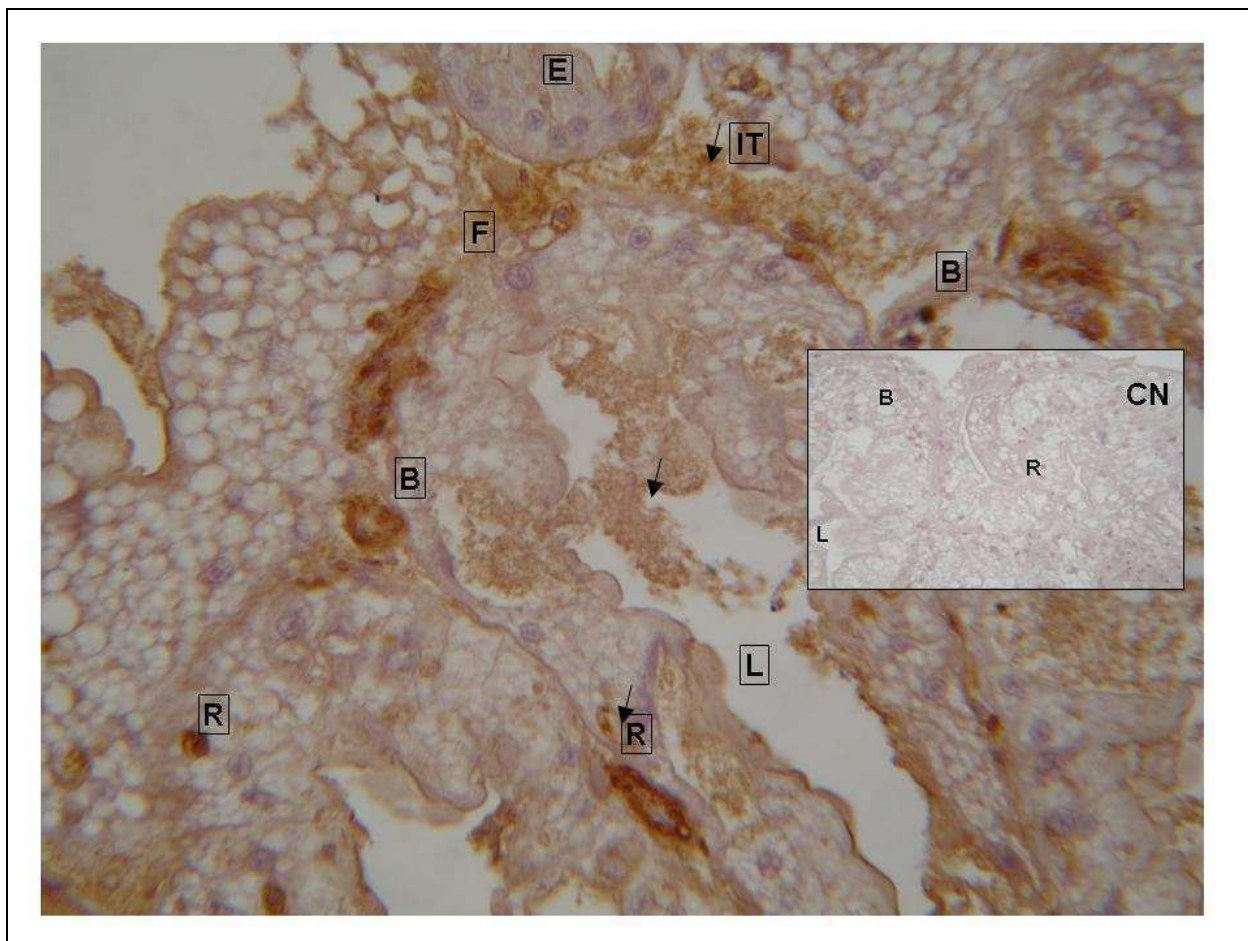


Figura 17. Inmunoreactividad para vitelina en hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus* en período reproductivo (Aumento: 250X). Inserto control negativo de especificidad (CN) correspondiente a corte de hepatopáncreas donde se ha omitido el anticuerpo primario. **B:** células B; **E:** células E, **F:** células F; **R:** células R, **L:** lumen, **IT:** intratubular. La flechas indican las zonas en las cuales se puede observar claramente la inmunomarca para Vn

La puesta a punto la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) permitió medir con elevada sensibilidad y especificidad los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa de la langosta *C. quadricarinatus*. Tanto el anticuerpo primario como el secundario fueron empleados en una dilución 1/500. En la Figura 18 se muestra una típica curva de calibración usando la Vn aislada previamente en una dilución 1/500. Esta curva muestra la linealidad entre las 0 y 300 ng de Vn.

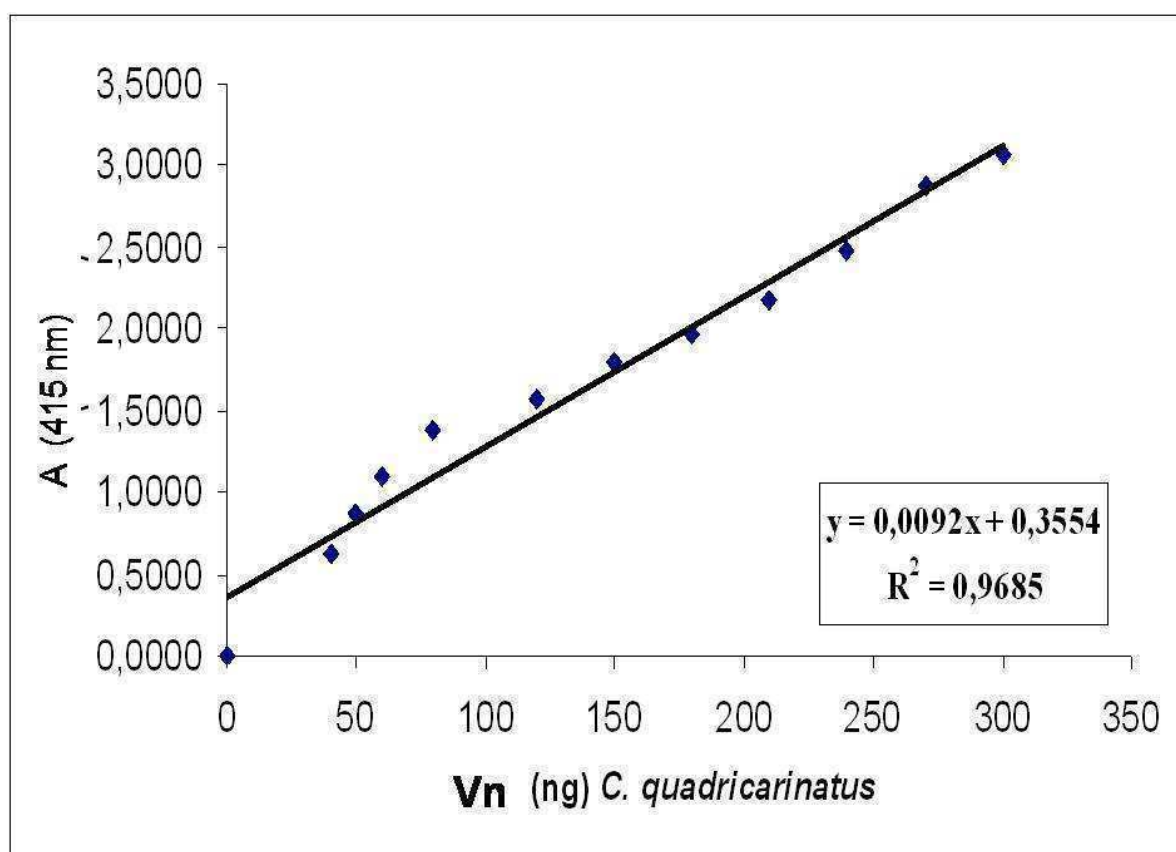


Figura 18. Típica curva de calibración por ELISA de la vitelina (Vn) de *C. quadricarinatus*. DO: densidad óptica, lectura a 415 nm.

DISCUSIÓN

Las lipoproteínas involucradas en el proceso de vitelogenénesis, vitelogenina y vitelina, han sido identificadas y caracterizadas en distintas especies de crustáceos, constituyendo una herramienta de alto valor en los estudios sobre biología reproductiva en este taxón (Quackenbush, 1994, Oberdörster *et al.* 2000, Pateraki & Stratakis 2000, Okumura, 2004, Chen *et al.* 2004, García *et al.* 2006, 2008). La detección de vitelogenina circulante constituye una técnica de gran utilidad, que permite monitorear el estado reproductivo de las hembras mediante la sola extracción de una pequeña muestra de hemolinfa. Además, la determinación de los contenidos de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas, hace posible evaluar las respuestas fisiológicas de esos órganos a manipulaciones endocrinas o de otro tipo.

En la presente investigación se realizó de manera exitosa el aislamiento y purificación de la lipoproteína vitelina, a partir de ovarios maduros de *C. quadricarinatus*. La Vn fue analizada por corrida electrorforética en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, evidenciándose una banda proteica alrededor de los 500 kDa. Este resultado confirma y amplía la información existente al respecto. El peso molecular de la banda identificada fue similar a los valores reportados por Serrano Pinto *et al.* (2003) para las principales formas de vitelina identificadas en ovarios y en huevos maduros en *C. quadricarinatus* y dentro del rango esperado para los crustáceos como se mencionara en la sección Introductoria.

Varios autores han reportado que Vn y Vg son similares inmunológicamente, y que la diferencia entre ambas estaría dada a nivel de las subunidades que la componen (Meusy, 1980; Tsukimura, 2001; Avarre *et al.*, 2003; Santhoshi *et al.*, 2009; Wilder *et al.*, 2010). Sin

embargo, la composición de estas lipoproteínas presenta cierto grado de variabilidad entre distintas especies de crustáceos. Tsukimura (2001) indica que el número de subunidades de las vitelinas de crustáceos varía entre 2 y 8. Por ejemplo, en *P. monodon* la Vn purificada a partir de ovarios consta de 8 subunidades, cada una de ellas con un peso molecular ubicado entre los 35 y 92 kDa, mientras que la Vg de la misma especie sólo está constituida por 2 polipéptidos, de 170 y 82 kDa (Chang, et al., 1994). Lui & O'Connor (1976) indican que la lipovitelina obtenida de ovarios de crayfish *P. clarkii* consta de 5 subunidades.

La producción del anticuerpo policlonal primario anti-vitelina para la especie en estudio, fue realizada satisfactoriamente por inmunización en conejos. La especificidad de dicho anticuerpo fue evidenciada en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y por la técnica de western blot. Se analizaron las subunidades polipeptídicas constituyentes de la Vn en *C. quadricarinatus*. Se identificaron 5 polipéptidos principales cuyos pesos moleculares establecidos corresponden a 138, 107, 98, 85 y 61 kDa. Estos resultados, muestran similitudes con reportes previos de trabajos realizados en la misma especie (Abdu *et al.*, 2000; Yehezkel *et al.*, 2000; Abdu *et al.*, 2001; Serrano-Pinto *et al.*, 2003; Khalaila *et al.* 2004) con algunas diferencias que no resultan ser significativas ya que se encuentran dentro del error esperado en el método empleado para su determinación.

Si bien la resolución de la membrana transferida no fue la ideal técnicamente, se puede observar que el anticuerpo policlonal obtenido reconoce bandas concretas que se corresponden con las subunidades de vitelogenina y vitelina. Aún con los inconvenientes técnicos mencionados puede considerarse que los controles realizados son válidos para la utilización del anticuerpo anti-vitelina en las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo de investigación. Tales controles representan una evidencia experimental

acerca de la ausencia de reacción cruzada con otros componentes tisulares presentes principalmente en ovario y hepatopáncreas.

El uso de vitelina purificada a partir de ovarios para la producción de anticuerpos anti Vn ha sido ampliamente empleado en distintas investigaciones referidas a crustáceos (Tom, *et al.*, 1987; Vázquez Boucard *et al.*, 2002, Tahara *et al.*, 2005). En particular, Serrano Pinto *et al.* (2003), utilizando anticuerpos preparados a partir de ovario y de huevos, demostraron una completa identidad inmunológica entre la vitelogenina presente en hepatopáncreas y en hemolinfa y la vitelina encontrada en ovarios de hembras maduras de *C. quadricarinatus*. Esta semejanza o correspondencia también pudo observarse en los resultados obtenidos en la presente Tesis, ya que el anticuerpo primario, producido a partir de las proteínas de ovarios maduros inoculadas en conejos, resultó igualmente sensible para cuantificar las proteínas tipo vitelogénicas tanto sea en ovario, hepatopáncreas como en hemolinfa, a través del método ELISA que fue puesto a punto para este fin.

Refuerza lo expuesto, el hecho que la técnica IHQ desarrollada en la presente Tesis permitió identificar al ovario y al hepatopáncreas como sitios de síntesis de estas lipoproteínas. Mediante esta técnica se determinaron tanto las células como los sitios específicos implicados en el proceso de vitelogénesis, lo cual se vió reflejado en la inmunomarca específica para las lipoproteínas en estudio, a partir del empleo del anticuerpo primario anti Vn obtenido.

Como se indicó en la Introducción, los principales sitios de síntesis de vitelogenina en los distintos grupos de crustáceos serían el ovario y el hepatopáncreas (Eastman- Reeks & Fingerman, 1985; Sagi *et al.*, 1995; Thuberty & Fingerman, 1998; Chen *et al.*, 2004; Li *et al.*,

Tseng *et al.*, 2001; 2006; Tiu *et al.*, 2006). En *C. quadricarinatus*, Serrano Pinto *et al.* (2004, 2005) caracterizaron justamente al hepatopáncreas y al ovario como los principales sitios de síntesis de vitelogenina en hembras, durante la vitelogénesis secundaria. Estos autores determinaron los sitios de expresión de mRNA de vitelogenina mediante el análisis por RT-PCR.

Respecto a la puesta a punto de la *técnica inmunohistoquímica* (IHQ), se determinó en primer lugar que el empleo de formalina (Formol 10%) a temperatura ambiente resultó ser una solución fijadora óptima tanto para el ovario como para el hepatopáncreas. La formalina permite mantener las estructuras anatomohistológicas en las condiciones requeridas para la IHQ, a diferencia de la solución de Bouin probada. Estos resultados difieren con protocolos utilizados en investigaciones previas realizadas en la misma especie (Abdu *et al.*, 2001b) y en *C. albidus* (Coccia *et al.*, 2010), quienes emplearon Bouin para muestras de hepatopáncreas a utilizarse para IHQ

En muestras de ovario y hepatopáncreas tomadas en periodo reproductivo de hembras adultas de *C. quadricarinatus*, se identificó inmunoreactividad para Vn/Vg tanto en ovario como en hepatopáncreas, coincidentemente con lo informado por Serrano Pinto *et al.* (2004, 2005) mediante RT-PCR.

En los cortes histológicos de ovario se observaron dos tipos de células, por un lado las foliculares y por otro los oocitos en distintos grados de desarrollo, según lo esperado en base a trabajos previos en la especie en estudio (Vázquez *et al.*, 2008) y en otros crustáceos (Johnson, 1980; Kroll *et al.*, 1992; Ikuta & Makioka, 1997). Se detectó inmunomarca citoplasmática de vitelina en oocitos secundarios y en la región próxima a las células

foliculares (posiblemente vitelogenina). La disposición de vitelina en el citoplasma resultó acorde con las investigaciones histológicas realizadas en diversas especies de crustáceos (Johnson, 1980; Tom *et al.*, 1987; Charniaux–Coton & Payen, 1988; Meusy & Payen, 1988) que refieren un aspecto granular del citoplasma debido a la acumulación e incorporación de vitelogenina en los oocitos, durante la vitelogénesis secundaria ó exógena. Durante este periodo, Okumura *et al.* (2004) encontraron que en *P. hypsinotus* existe una activa endocitosis en la superficie del oocito, sugiriendo que los glóbulos de vitelo se forman exógenamente por captación de la vitelogenina hemolinfática. En las muestras analizadas en el presente trabajo pudo evidenciarse una abundante acumulación de gotas lipídicas y de vitelo en el citoplasma de los oocitos.. Estos resultados están de acuerdo con lo esperado para la época reproductiva, en varias especies de crustáceos (Lee & Walker, 1995; Tahara *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2007; Kruevaisayawan *et al.*, 2010) y particularmente en *C. quadricarinatus* (Khalaila *et al.*, 1999; Abdu, *et al.*, 2000).

La estructura histológica del hepatopáncreas mostró una marcada similitud con descripciones realizadas en otros crustáceos decápodos (Johnson, 1980; Icely & Nott, 1992; Sousa *et al.*, 2005; Coccia *et al.*, 2010) y en juveniles de la especie en estudio (Calvo *et al.*, 2011). La inmunomarca para Vg estuvo asociada principalmente a las células R y B, éstas últimas en proximidad al lumen hacia donde se vuelcan las secreciones. También se encontró inmunomarca de disposición intertubular. Se sabe que en *P. argentinus*, las células R se caracterizan por la presencia de gotas lipídicas y por la acumulación de nutrientes en su citoplasma (Sousa *et al.*, 2005). En *M. rosebergii*, mediante técnicas de hibridación *in situ*, Jasmani *et al.* (2004) sugieren justamente que las células R serían las responsables de la síntesis de vitelogenina. La observación de inmunomarca en células B podría deberse a una cierta capacidad de las mismas, de absorber materiales desde el lumen tubular para su

almacenamiento en vacuolas o para su posterior degradación, como fuera descrito en otros decápodos (Icely & Nott, 1992; Sousa *et al.*, 2005).

Por otro lado, la técnica **ELISA** constituye una herramienta de gran importancia para determinar concentraciones de vitelina y/o vitelogenina en distintas especies de crustáceos (Thuberty & Fingerman, 1998; Chen *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2005; Tsikumura *et al.*, 2006; García *et al.*, 2008). En la presente Tesis, se desarrolló y puso a punto una técnica ELISA para determinar cuantitativamente los niveles de Vn en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa de *C. quadricarinatus*. Dicha técnica resultó altamente sensible, específica y útil para detectar los niveles de las proteínas vitelogénicas correspondientes a cada período del ciclo reproductivo de la especie en estudio.

Dependiendo de las características de las especies en estudio, así como de los protocolos metodológicos que siguen los distintos investigadores, puede encontrarse una cierta variabilidad, aún para una misma técnica. El origen y la obtención de las muestras, junto con el proceso de producción del anticuerpo primario, resultan ser algunos de los factores más críticos. En *C. quadricarinatus*, Sagi *et al.* (1999) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático cuantitativo para monitorear el proceso de vitelogénesis en hembras adultas. Para esto, los autores mencionados emplearon un anticuerpo anti polipéptido 106 kDa específico de la vitelogénesis secundaria, obtenido en conejo a partir de huevos recién desovados.

Por su parte, Serrano Pinto *et al.* (2003) utilizando anticuerpos preparados a partir de ovarios y huevos, demostraron una completa identidad inmunológica entre la vitelogenina

existente en hepatopáncreas y hemolinfa y la vitelina de ovarios de hembras maduras. Esta coincidencia también pudo observarse en los resultados obtenidos en la presente Tesis, ya que al anticuerpo primario obtenido a partir de las proteínas de ovarios maduros inoculadas en conejos, resultó igualmente sensible para cuantificar proteínas tipo Vg, tanto sea en ovario, hepatopáncreas o hemolinfa.

CAPÍTULO II

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE VITELINA EN
OVARIO Y VITELOGENINA EN HEPATOPÁNCREAS Y
HEMOLINFA DE *CHERAX QUADRICARINATUS* DURANTE
EL CICLO REPRODUCTIVO.**

OBJETIVO ESPECÍFICO E HIPÓTESIS

OBJETIVO II: Determinar los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa durante todo el ciclo reproductivo de hembras adultas de *Cherax quadricarinatus*.

Hipótesis II: Existen diferencias entre los diferentes periodos del ciclo reproductivo, con respecto a los niveles de las proteínas vitelogénicas en hemolinfa, ovario y hepatopáncreas.

METODOLOGÍA

CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACIÓN

Durante la presente investigación se utilizaron hembras adultas de la especie *Cherax quadricarinatus* provenientes del criadero Pinzas Rojas S.R.L., sito en la localidad de Gobernador Garmendia, Departamento Burryacú, Provincia de Tucumán. Una vez trasladadas al laboratorio, las hembras fueron mantenidas hasta el momento del ensayo en acuarios “stock” de 40x60x30 cm, conteniendo 15 L de agua dulce declorada, con aireación constante y condiciones de temperatura y fotoperíodo correspondientes al período del año en que se realizó cada ensayo. La densidad en cada acuario stock fue de cuatro hembras, incorporando en ellos refugios artificiales consistentes en tubos de PVC de 7,5 cm de diámetro y 22 cm de largo, de acuerdo a recomendaciones de trabajos previos realizados en la misma especie (Barki & Karplus, 1999). La alimentación suministrada hasta el inicio de la fase experimental consistió en alimento balanceado para peces tropicales (TetraDiskus[®]),

complementado con plantas de *Elodea* sp., *ad libitum*. El período de aclimatación previa a los ensayos fue de alrededor de una semana, siendo el objetivo de esta etapa disminuir los posibles efectos estresantes de la manipulación sufrida en el criadero y durante el viaje de traslado (1200 Km aproximadamente) de los animales al laboratorio.

En cada ensayo sólo se utilizaron hembras en fase de intermuda, las cuales fueron identificadas (bajo microscopio estereoscópico, A:100X) mediante el criterio de setogénesis, tomando muestras del borde de los urópodos, de acuerdo con estudios previos realizados en otras especies del género *Cherax* (Burton & Mitchell, 1987; Sagi *et al.*, 1996)

VARIABLES MEDIDAS

Durante el transcurso de los ensayos realizados se determinaron las siguientes variables:

- Índice gonadosomático (IGS), calculado como:

$$\text{IGS} = (\text{Peso gonadal fresco} / \text{peso corporal fresco}) \times 100$$

- Índice hepatosomático (IHS), calculado como:

$$\text{IHS} = (\text{Peso hepatopancreático fresco} / \text{peso corporal fresco}) \times 100$$

El peso de los animales se determinó en balanza de precisión 0,01 g, mientras que el peso del ovario y del hepatopáncreas se determinó mediante balanza de precisión 0,0001 g.

- Nivel de vitelina (Vn) y vitelogenina (Vg): se determinó el nivel de estas lipoproteínas mediante la técnica ELISA, tanto en ovario como en hepatopáncreas, expresándolo por gramo de tejido fresco ($\mu\text{g/g}$) o por órgano completo ($\mu\text{g/ovario}$ ó $\mu\text{g/hepatopáncreas}$). Los niveles hemolinfáticos se expresaron como $\text{ng}/\mu\text{l}$. El protocolo completo se detalla mas adelante.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA DETERMINACION DE VITELINA Y VITELOGENINA POR LA TÉCNICA ELISA

En todos los ensayos realizados se siguió el procedimiento de extracción y posterior procesamiento de las muestras que se describe a continuación, ya sea para hemolinfa, ovario o hepatopáncreas, con el fin de determinar el contenido de las proteínas vitelogénicas estudiadas.

En primer lugar, cada hembra fue pesada *in vivo* en balanza de precisión (0,01 g) (Fig. 19 A). Luego, se extrajeron 100 μl de hemolinfa con jeringa de tuberculina desde la base del 4° ó 5° par de pereiópodos (Fig. 19 B). Cada muestra fue recogida en un tubo Eppendorf conteniendo 15 μl de oxalato de potasio al 10% e inhibidor de-proteasas PMSF 0,01 M en una relación 3:1. A continuación, las muestras fueron mantenidas en freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento por la técnica ELISA.

El siguiente paso fue anestésiar a cada animal sumergiéndolo completamente en un baño de agua fría a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Se procedió luego a la ablación completa del hepatopáncreas y del ovario de cada animal. Efectuada esta, se registraron los pesos frescos

de ambos órganos y se calcularon los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS).

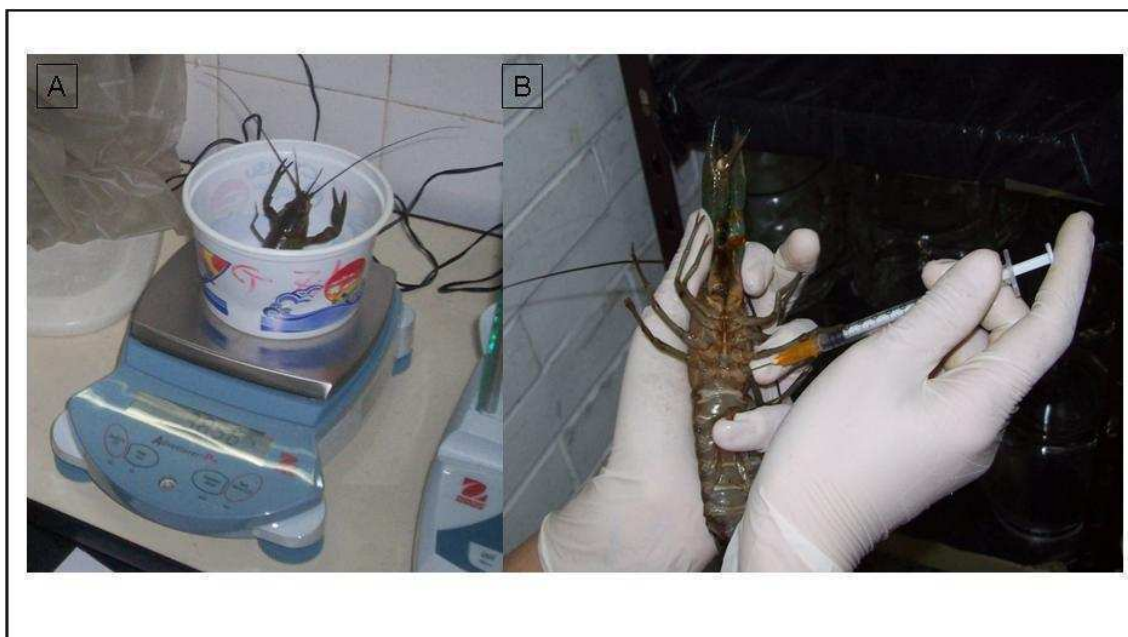


Figura 19 A: pesaje en balanza de precisión (0,01 g). B: extracción de hemolinfa.

Procesamiento de muestras de Ovario y Hepatopáncreas

Las muestras de ovario y hepatopáncreas obtenidas fueron procesadas en buffer fosfato de sodio (PBS: 50mM, pH 7,4, con 2 μ L/mL de PMSF) en una relación 1:3 (peso/volumen) en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón. Cada homogenato fue centrifugado a 10.000xg por 20 min en centrífuga Eppendorf® 5415D a 4°C. Finalizada la centrifugación, se descartó el pellet y el sobrenadante obtenido fue llevado a un volumen final de 5 mL con PBS, para ser ultracentrifugado a 100.000xg por 50 min, en ultracentrífuga Beckman® modelo XL-90 con rotor 90Ti a 4°C. Nuevamente, se separó el sobrenadante de cada muestra en tubos Eppendorf, que se mantuvieron en freezer a -70 °C hasta su procesamiento por la técnica ELISA (Fig. 20).



Figura 20. A: disección de ovario y hepatopáncreas. B: homogeneización de tejidos. C: ultracentrifugación D: placas de ELISA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para los ensayos de esta sección se emplearon hembras adultas de *Cherax quadricarinatus* con un peso promedio de $43,11 \pm 0,79$ g (N= 38). Tales ensayos fueron llevados a cabo en los siguientes periodos del ciclo reproductivo.

- ***pre-reproductivo***: 16 de julio de 2009. Peso promedio de las hembras: $42,21 \pm 2,65$ g (N=10)
- ***reproductivo medio***: 9 de diciembre 2009. Peso promedio de las hembras: $28,18 \pm 1,47$ g (N=8)
- ***reproductivo tardío***: 10 de febrero de 2009. Peso promedio de las hembras: $47,18 \pm 3,31$ g (N=10)
- ***post-reproductivo***: 2 de junio 2009. Peso promedio de las hembras: $52,2 \pm 2,70$ g (N=10)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron a través del software Statistica versión 7.0. Los índices somáticos y los niveles de vitelogenina en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa fueron analizados por medio de ANOVA de un factor seguido por el test de Tukey (Sokal & Rohlf 1981). También se estimó en cada caso el coeficiente correlación (Sokal y Rohlf 1981). El nivel de confianza considerado fue del 5%.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores promedios de los índices gonadosomático y hepatosomático así como de la concentración de vitelogenina [Vg], expresada como ng/μl en hemolinfa (HL) y como μg/g en ovario (OV) y hepatopáncreas (HP), para los cuatro períodos considerados.

| Variables Períodos | IGS | IHS | VgHL (ng/ul) | VnOV (ug/g) | VgHP (ug/g) |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Pre-reproductivo | 1,66 ± 0,14 a | 6,39 ± 0,19 a | 313,49± 10,31 a | 1015,28± 195,93 a | 839,44± 90,49 a |
| Reproductivo medio | 1,57 ± 0,40 a | 8,20 ± 0,56 b | 457,33 ± 41,27 b | 983,04 ± 309,56 a | 962,24 ± 209,46 a |
| Reproductivo tardío | 2,00± 0,52 a | 4,93 ± 0,31 c | 221,32 ± 4, 24 c | 1005,59 ± 161,82 a | 315,013± 38,92 b |
| Post-reproductivo | 1,33 ± 0,16 a | 7,26 ± 0,26 ab | 302,69 ± 5,13 a | 875,85 ± 133,86 a | 804,76 ± 91,41 a |

Tabla 1. Niveles promedio de vitelogenina detectados en hemolinfa (VgHL), ovario (VgOV) y hepatopáncreas (VgHP) de hembras adultas de *C. quadricarinatus*, en los cuatro períodos considerados del ciclo reproductivo, Se indican además los valores de los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) obtenidos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre períodos.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre períodos, al analizar el IGS. Por el contrario, el IHS mostró diferencias significativas entre el período pre-reproductivo y ambos períodos reproductivos, medio y tardío ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). En esta última variable se observaron, además, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre ambos períodos reproductivos considerados y entre el período reproductivo tardío y el post-reproductivo.

En cuanto a los niveles circulantes de vitelogenina en hemolinfa ([VgHL]) se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) durante el período reproductivo medio, en comparación con los otros tres períodos, mientras que en el período reproductivo tardío se detectó el menor nivel de vitelogenina circulante en hemolinfa, siendo significativamente diferente ($p < 0,01$) al medido en los otros períodos.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre períodos en lo que respecta al contenido de vitelina en ovario ([VnOV]). Con respecto al contenido de vitelogenina en hepatopáncreas ([Vg HP]), se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) durante el período reproductivo tardío, en comparación con los otros tres períodos analizados.

Al analizar los resultados teniendo en cuenta el ciclo reproductivo completo y comparando entre pares de variables, se obtuvieron ciertas correlaciones significativas. En la Figura 21 se puede observar que un mayor [VnOV] se corresponde con un mayor [VgHP], mostrando entre sí una correlación positiva significativa ($p < 0,05$). También encontramos una correlación positiva significativa ($p < 0,01$) entre el [VgHP] y el IHS (Figura 22).

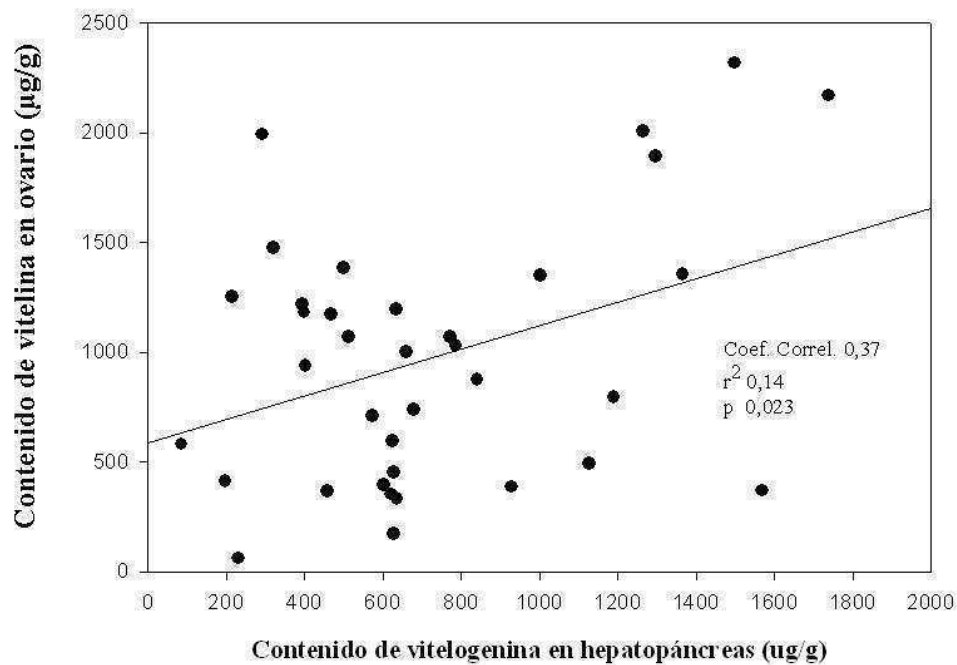


Figura 21 Correlación significativa ($p < 0,05$) entre contenido de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas obtenida durante el ciclo reproductivo completo de *C. quadricarinatus*. Se indican los valores del r^2 , el coeficiente de correlación y el p valor.

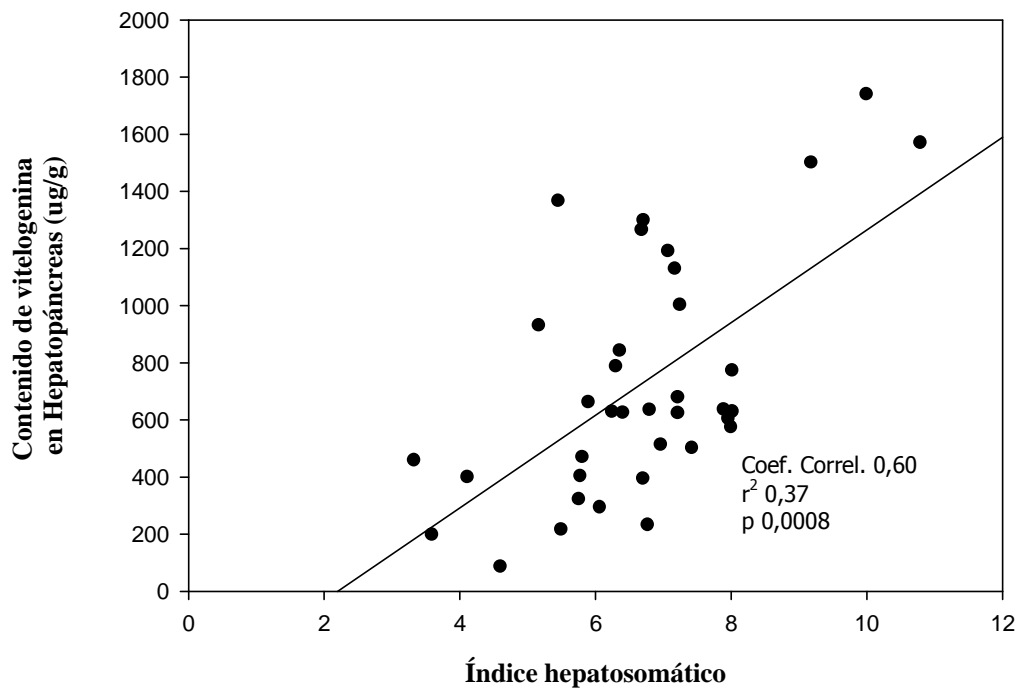


Figura 22. Correlación significativa ($p < 0,05$) entre el contenido de vitelogenina en hepatopáncreas y el índice hepatosomático obtenida durante el ciclo reproductivo completo de *C. quadricarinatus*. Se indican los valores del r^2 , el coeficiente de correlación y el p valor.

En las Figuras 23y 24 puede observarse cómo VgHL correlacionó positivamente y de manera significativa ($p < 0,01$) tanto con el IHS como con el [VgHP], respectivamente.

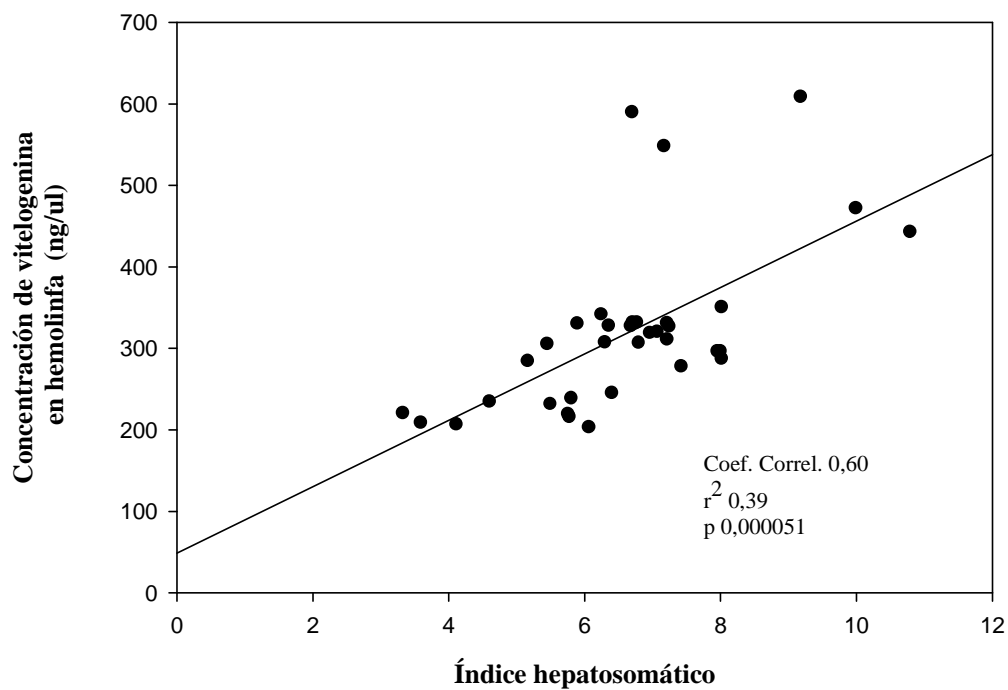


Figura 23. Correlación significativa ($p < 0,05$) entre la concentración (ng/ul) de vitelogenina en hemolinfa y el índice hepatosomático obtenida durante el ciclo reproductivo completo de *C. quadricarinatus*. Se indican los valores del r^2 , el coeficiente de correlación y el p valor.

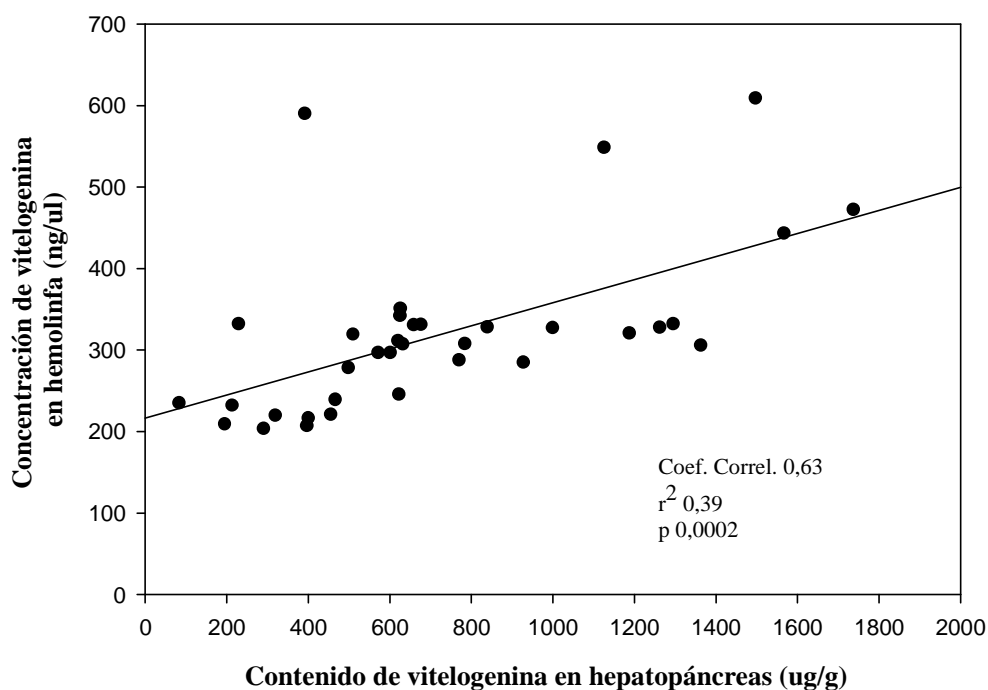


Figura 24. Correlación significativa ($p < 0,05$) entre la concentración (ng/ul) de vitelogenina en hemolinfa y el contenido en hepatopáncreas [VgHP] obtenida durante el ciclo reproductivo completo de *C. quadricarinatus*. Se indican los valores del r^2 , el coeficiente de correlación y el p valor.

En la Figura 25 se presenta la correlación negativa encontrada entre los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS). Si bien la correlación obtenida no es estadísticamente significativa, se destaca la tendencia existente.

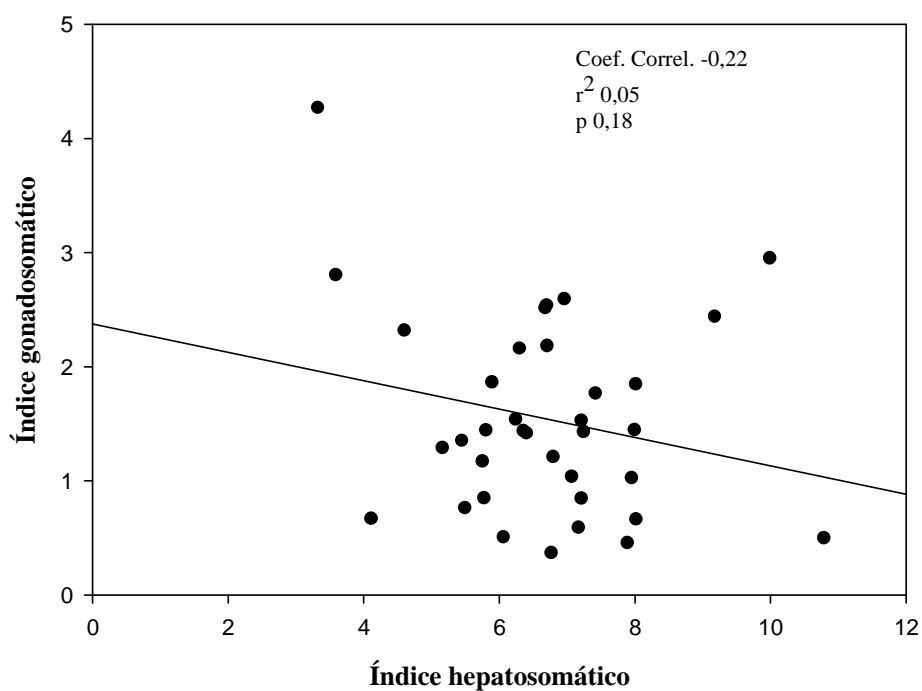


Figura 25 Correlación entre los índices gonadosomático y hepatosomático obtenida en el ciclo reproductivo completo de *C. quadricarinatus*. Se indican los valores del r^2 , el coeficiente de correlación y el p valor.

DISCUSIÓN

Los niveles séricos de Vg son utilizados ampliamente como biomarcadores para estimar la actividad reproductiva (Tahara *et al.*, 2005; Vázquez Boucard *et al.*, 2002). Los niveles circulantes de Vg pueden además ser empleados para evaluar el efecto de diferentes tratamientos, tal como se discute mas adelante para los ensayos *in vivo* realizados como parte de la presente Tesis.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis muestran la variación en función del estado reproductivo en cuanto a los niveles de vitelina y vitelogenina detectados mediante la técnica ELISA en ovario y en hepatopáncreas y hemolinfa, respectivamente, de hembras adultas de *Cherax quadricarinatus*, en correlación con los valores de los índices gonadosomático y hepatosomático, durante el ciclo reproductivo completo.

La concentración de Vg en hemolinfa en *C. quadricarinatus* varió entre 220 y 500 µg/mL según el periodo del ciclo reproductivo. Estos valores se encuentran dentro del intervalo reportado para distintas especies de crustáceos decápodos (Tabla 2).

| <i>Especie</i> | <i>Nivel de vitelogenina en hemolinfa (ng/μL)</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------------------|---|--------------------------------------|
| Pleocyemata | | |
| Astacidea | | |
| <i>Cherax quadricarinatus</i> | 220-500 | Presente trabajo |
| <i>Procambarus clarkii</i> | 10-2880 | Thuberty & Fingerman, 1998 |
| <i>Homarus americanus</i> | 700 | Tsukimura, 2001 |
| Caridea | | |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | 50-2500 | Lee & Chang, 1997 |
| | 0-7000 | Meusy & Payen, 1988 |
| Brachyura | | |
| <i>Callinectes sapidus</i> | 410 | Lee & Puppione, 1988 |
| Dendrobranchiata | | |
| Penaeoidea | | |
| <i>Sicyonia ingentis</i> | 200 | Tsukimura <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Fenneropenaeus indicus</i> | 0-2600 | Vázquez Boucard <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Penaeus monodon</i> | 441 | Quinitio <i>et al.</i> , 1994 |

Tabla 2. Niveles de vitelogenina (ng/μL) en hemolinfa de hembras de distintas especies de crustáceos decápodos.

En los decápodos de importancia en acuicultura, resulta interesante establecer la relación entre los niveles circulantes de Vg en hemolinfa y el grado de desarrollo ovárico de hembras reproductoras. Se observó en ciertos casos una buena correlación entre los niveles circulantes de Vg y el crecimiento del ovario (Tsukimura 2001, Tahara *et al.*, 2005, Ibarra *et al.* 2009, Santhoshi *et al.* 2009). Sin embargo, en la presente investigación dicha correlación no fue evidenciada, en concordancia con los estudios realizados por Lee & Chang (1997). Cabe mencionar además que, en algunas especies se ha encontrado que los niveles de Vg circulantes disminuyen en cierta medida hacia el final de la maduración del ovario, es decir,

justo antes de la oviposición (Tsukimura 2001, Tahara *et al.* 2005). Esto se relaciona con la dinámica de absorción por parte del ovario de la Vg transportada por la hemolinfa durante la vitelogénesis secundaria.

Con respecto al contenido relativo las lipoproteínas vitelogénicas, los valores promedios cuantificados a lo largo del ciclo reproductivo de *C. quadricarinatus* oscilaron entre 875–1015 ug/g para la Vn ovario y 315–962 ug/g para la Vg en hepatopáncreas. El contenido promedio expresado por órgano entero, fue de 0,68 mg/ovario y 1,59 mg/hepatopáncreas. Estos niveles se encuentran dentro de los esperados para otros crustáceos decápodos. Por ejemplo, Chen *et al.* (2004) cuantificaron en *E. sinensis*, valores de 0,22–360 mg/ovario, mientras que Lee & Chang (1997) indican para *M. rosenbergii* un contenido de 0,2-276 mg/ovario y de 0,2–80 mg/hepatopáncreas. Sin embargo, Vázquez Boucard *et al.* (2002) reportan para *F. indicus* valores mas altos, de 5-72 mg/ovario y 6-18 mg/hepatopáncreas.

Como se mencionara antes, el hepatopáncreas cumple un papel relevante en la vitelogénesis de *C. quadricarinatus*, como fuente extraovárica de Vg. Este rol fue verificado específicamente para *C. quadricarinatus* por Serrano Pinto *et al.* (2005) así como en otros crustáceos (Quackenbush, 1994; Lee & Chang, 1997). Sin embargo, en el caso del camarón *F. indicus*, Vázquez Boucard *et al.* (2002) sugieren que el aporte del hepatopáncreas en la vitelogénesis no sería suficiente para el crecimiento ovárico.

De acuerdo a Serrano Pinto *et al.* (2003, 2005) el ovario de *C. quadricarinatus* cumple un rol relevante en la producción de Vg, pero sólo en hembras de primera madurez. Sin embargo, en hembras con desoves previos, el hepatopáncreas sería el principal sitio de producción de Vg. Las hembras utilizadas en esta Tesis fueron en todos los casos multíparas,

es decir, con desoves anteriores. Las correlaciones detectadas en los niveles de Vg entre hepatopáncreas y hemolinfa, estuvieron por lo tanto de acuerdo con el papel central del hepatopáncreas como sitio de la síntesis de vitelogenina, tal como han sugerido Serrano Pinto *et al.* (2003, 2005) para hembras multíparas.

Si bien la concentración de vitelina en ovario y el IGS se mantuvieron relativamente constantes durante el período de observación, se detectaron variaciones significativas entre períodos respecto a los niveles hemolinfáticos y hepatopancreáticos de vitelogenina. Además, la concentración de Vg en hemolinfa y hepatopáncreas correlacionaron positivamente con el índice hepatosomático. Se evidenció también una correlación positiva entre el contenido de Vn en ovario y el de Vg en hepatopáncreas (ug/g de tejido). Estos resultados ponen en evidencia la relación entre ambos órganos, sugiriendo que, cuando se incrementa la síntesis de vitelogenina en el hepatopáncreas se estaría favoreciendo el aumento del [Vn] en ovario, por incorporación de la Vg por los oocitos.

El incremento del [Vg] en el hepatopáncreas se vio reflejado también en el aumento de su correspondiente índice (IHS). Con esto, se evidenciaría, por lo tanto, que un IHS elevado es consecuencia de una mayor síntesis de vitelogenina en el hepatopáncreas. Si bien la correlación entre ambos índices somáticos considerados, no resultó estadísticamente significativa, se observó una tendencia a la correlación negativa entre IHS e IGS. Dicha tendencia fue confirmada en otros crustáceos (Palacios *et al.*, 2000) y en hembras de *C. quadricarinatus* (Abdu *et al.*, 2000; Rodríguez-González *et al.*, 2006). En este contexto se necesitaría para su confirmación un mayor número de individuos experimentales.

Por otro lado, se observó que el aumento en la producción de vitelogenina en hepatopáncreas provoca la elevación de los niveles circulantes de esta lipoproteína. Esto demostraría, la función relevante de la hemolinfa como medio de transporte de elevada capacidad entre el sitio de síntesis extraovárica y el ovario.

CAPÍTULO III

**EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VITRO* DE HORMONAS Y
NEUROREGULADORES SOBRE LOS NIVELES DE
VITELINA EN OVARIO Y VITELOGENINA EN
HEPATOPÁNCREAS DE *CHERAX QUADRICARINATUS*.**

OBJETIVO ESPECÍFICO E HIPÓTESIS

OBJETIVO III: Evaluar el efecto *in vitro* de hormonas (progesterona, estradiol, metil farnesoato) y del antagonista encefalinérgico naloxona sobre el contenido de vitelina en ovario y vitelogenina en hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus*.

HIPÓTESIS III: La hormonas esteroideas progesterona y estradiol, así como el juvenoide metil farnesoato y la naloxona, incrementan el contenido de las proteínas vitelogénicas en ovario y/o hepatopáncreas de la langosta en estudio.

METODOLOGÍA

CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon hembras adultas de *C. quadricarinatus* provenientes del criadero Pinzas Rojas S.R.L. ubicado en la provincia de Tucumán, Argentina. Previamente al ensayo, los ejemplares fueron mantenidos durante una semana en acuarios de 40x60x30 cm, conteniendo 15 L de agua dulce de clorada, con aireación constante y bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo, correspondientes a cada estación del año estudiada. En los ensayos realizados durante el período reproductivo las hembras fueron mantenidas en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura, en el bioterio Central de la FCEN- UBA. En los restantes periodos del ciclo reproductivo, los animales fueron mantenidos en el laboratorio debido a las bajas temperaturas ambientales. Durante el período post-reproductivo los animales se mantuvieron a una temperatura de 26 ± 1 °C y un fotoperíodo de 10:14

(luz:oscuridad), mientras que durante los experimentos realizados en período pre-reproductivo se mantuvieron a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 12:12.

ENSAYOS *IN VITRO*

La metodología de los ensayos *in vitro*, destinados a evaluar el efecto de diferentes factores hormonales y neuroendocrinos sobre ovario y hepatopáncreas de *C. quadricarinatus*, se basó en trabajos previos desarrollados en crustáceos decápodos por Rodríguez *et al.* (2002); Zapata *et al.* (2003), Medesani *et al.* (2004) y Cahansky *et al.* (2008b, 2011).

Incubación de tejidos

Una vez pesados el ovario y hepatopáncreas disecados de cada animal, se procedió a la fragmentación de dichos órganos en al menos cuatro piezas de 0,1 a 0,3 g (5 a 10 mm. de largo, aproximadamente) utilizando bisturí y pinza de disección. Cada pieza de tejido, correspondiente a un determinado tratamiento, fue colocada en un pocillo de una placa de cultivo estéril de 12 pocillos (Costar® 3516 de Corning Inc, USA). Cada pocillo fue llenado previamente con 2 mL de medio de cultivo M199 (Sigma®) suplementado con: penicilina G (100 unidades/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL), PMSF (0,1 mM), suero fetal bovino (10% v/v) y EDTA (5% v/v). La osmolaridad del medio de cultivo (14,55 g/L) terminó de ajustarse finamente mediante el agregado de sal marina artificial (HW Marinemix®), de acuerdo a parámetros establecidos en trabajos previos (Soroka *et al.*, 2000; Khalaila *et al.*, 2002; Meng & Zou, 2009).

Para conseguir la concentración deseada de hormona o neuroregulador, se adicionó a cada pocillo una alícuota (15 μ l) de una solución concentrada de la sustancia a ensayarse, o bien del vehículo utilizado, según el diseño experimental establecido. Este último fue disecado de cada hembra, dividido en dos mitades. Una mitad fue asignada al tratamiento con sólo ovario y GT y la restante al tratamiento con ovario, GT y naloxona. En estos casos, el grupo control recibió un fragmento de músculo del quelípedo o del abdomen, de tamaño similar al ganglio torácico, como control de tejido. La co-incubación con GT se realizó a fin de trabajar directamente con la fuente productora de GSH y de encefalinas para evaluar el efecto de la naloxona sobre el sistema encefalinérgico.

VARIABLES MEDIDAS

Los ensayos *in vitro* realizados durante la Tesis comprendieron la determinación de los niveles de vitelogenina, o bien de la tasa de síntesis proteica, de acuerdo con la metodología detallada a continuación.

a. Determinación de los niveles de vitelina y vitelogenina

Estos ensayos *in vitro* fueron realizados durante los tres períodos del ciclo reproductivo de *C. quadricarinatus*, a fin de evaluar el efecto de distintas hormonas y neuroreguladores sobre los niveles de vitelogenina en ovario y hepatopáncreas. Las placas de cultivo fueron incubadas durante 20 h en oscuridad constante, en estufa de cultivo con atmósfera controlada (5% de CO₂) a 28°C. Luego de la incubación, las piezas de ovario y hepatopáncreas de cada pocillo fueron retiradas, colocadas en tubos Eppendorf y tratadas según el protocolo descrito anteriormente en el Capítulo II (ver Metodología: Obtención y

procesamiento de muestras de ovario y hepatopáncreas para determinación de vitelogenina por la técnica ELISA).

b. Estimación de la tasa de síntesis de Proteínas

Estos ensayos *in vitro* fueron realizados en los tres períodos del ciclo reproductivo de hembras de *C. quadricarinatus* a fin de evaluar el efecto del metil farnesoato sobre la tasa de síntesis de proteínas en ovario y hepatopáncreas. Los diferentes pocillos de las placas donde se incubó el tejido con la hormona ensayada recibió además, una alícuota 3 μ Ci de leucina 3 H, midiéndose la incorporación de este aminoácido radioactivo a las proteínas ováricas y hepatopancreáticas sintetizadas *de novo*, como método directo de cuantificación del crecimiento ovárico. Esta metodología, basada en ensayos previos del grupo de trabajo se resume a continuación.

Las placas fueron incubadas en cámara con atmósfera controlada (5% de CO₂) a 28°C, en condiciones de oscuridad constante durante 20 horas, luego de lo cual cada pieza ovárica fue secada en papel de filtro y pesada. Cada pieza de tejido se colocó en un volumen de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% frío y se homogeneizó manualmente en homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón; los homogenatos obtenidos fueron colocados en tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugados a 10.000 xg durante 10 min, en centrífuga Eppendorf® 5415D a 4°C. Se descartó el sobrenadante y cada pellet fue resuspendido en 2mL de TCA 10% y filtrado. Los filtros conteniendo las muestras fueron transferidos a viales conteniendo 2 mL de solución centelladora (OPTIPHASE Hi Safe 2), donde permanecieron 24 h a 4°C, hasta la posterior determinación de las CPM (cuentas por

minuto) en contador de centelleo (Beckman®). Los valores de CPM registrados fueron relativizados al peso de la pieza ovárica, quedando expresados como CPM/g de ovario.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados obtenidos *in vitro* se empleó el software Statistica versión 7.0. Se aplicó un ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de comparaciones planeadas (LSD) (Sokal y Rohlf, 1981). Además, se aplicó un ANOVA de un factor para la comparación de los GSI y HSI entre períodos. El nivel de confianza fue del 5%.

A. EFECTO IN VITRO DE LA HORMONA METIL FARNESOATO SOBRE OVARIO Y HEPATOPÁNCREAS

DISEÑO EXPERIMENTAL

En estos ensayo se incubaron piezas de ovario (OV) y hepatopáncreas (HP) con tres concentraciones de **metil farnesoato (MF)**: 0,15 (MF I); 1,5 (MF II) y 15 (MF III) μM , equivalentes a la concentración máxima esperada en hemolinfa luego de la inyección de 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} moles / langosta, respectivamente. Cada vial recibió 15 μl de la droga ensayada mientras que los grupos controles (CT) recibieron una alícuota similar de etanol absoluto (EtOH), vehículo de disolución del MF.

El metil farnesoato (trans-trans), se sintetizó a partir de geranilacetona comercial en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, de acuerdo con la metodología de Rodríguez & Gros (1990), siendo gentilmente donada por el primero de estos dos autores. Como vehículo de disolución de esta hormona se utilizó etanol absoluto (p.a. 99% pureza).

PRIMER EXPERIMENTO: EFECTO DEL METIL FARNESOATO SOBRE EL CONTENIDO DE VITELINA Y VITELOGENINA

Este experimento se llevó a cabo en cada uno de los siguientes períodos del ciclo reproductivo, según se detalla a continuación:

- ***pre-reproductivo temprano***: 2 y 30 de junio de 2009. Peso promedio de las hembras: $48,86 \pm 2,85$ g (N=20)
- ***reproductivo***: 10 de febrero de 2009 (N=10). Peso promedio de las hembras: $49,65 \pm 2,43$ g (N=10)

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV+ CT**: pieza ovárica + EtOH
- 2) **OV+ MF I**: pieza ovárica + MF 0,15 μ M
- 3) **OV+ MF II**: pieza ovárica + MF 1,5 μ M
- 4) **OV+ MF III**: pieza ovárica + MF 15 μ M
- 5) **HP+ CT**: pieza hepatopáncreas + EtOH
- 6) **HP+ MF I**: pieza hepatopáncreas + MF 0,15 μ M
- 7) **HP + MF II**: pieza hepatopáncreas + MF 1,5 μ M
- 8) **HP + MF II**: pieza hepatopáncreas + MF 15 μ M

SEGUNDO EXPERIMENTO: EFECTO DEL METIL FARNESOATO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Este experimento se llevó a cabo en cada uno de los siguientes períodos del ciclo reproductivo, según se detalla a continuación:

- **pre-reproductivo:** 30 de junio 2009. Peso promedio de las hembras: 56.20 ± 2.69 g (N=10)
- **reproductivo:** 10 de febrero de 2009. Peso promedio de las hembras: $49,65 \pm 2,43$ g (N=10)
- **post-reproductivo:** 5 de mayo de 2008. Peso promedio de las hembras: $37,04 \pm 3.78$ g (N=10)

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV+ CT:** pieza ovárica + EtOH
- 2) **OV+ MF I:** pieza ovárica + MF 0,15 μ M
- 3) **OV+ MF II:** pieza ovárica + MF 1,5 μ M
- 4) **OV+ MF III:** pieza ovárica + MF 15 μ M

RESULTADOS*Primer experimento*

No se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el IGS, entre ambos periodos considerados. Con respecto al índice hepatosomático, durante el periodo reproductivo las hembras presentaron un índice significativamente menor ($p<0,01$) en comparación con el pre-reproductivo temprano (Tabla 3).

| Periodo | IGS | IHS | N |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Pre-reproductivo temprano | 1,43±0,14 a | 7,19±0,28 a | 20 |
| Reproductivo | 2,01±0,52 a | 4,93±0,32 b | 10 |

Tabla 3. Índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) de hembras de *C. quadricarinatus* empleadas en el primer experimento *in vitro* con MF. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre períodos, para cada índice.

Durante el período pre-reproductivo temprano se obtuvo un incremento significativo ($p<0,05$) en el contenido de vitelina luego de incubar las piezas de ovarios con la mayor concentración de metil farnesoato (Fig. 26). Por el contrario, en las piezas de hepatopáncreas incubadas con la mayor concentración de MF se observó, en el período reproductivo, una disminución significativa ($p<0,05$) del contenido de vitelogenina, con respecto al control. Cabe destacar, además, que los niveles de vitelogenina en el hepatopáncreas fueron significativamente ($p<0,05$) menores durante

la etapa reproductiva que los detectados en el período pre-reproductivo temprano (Fig. 27).

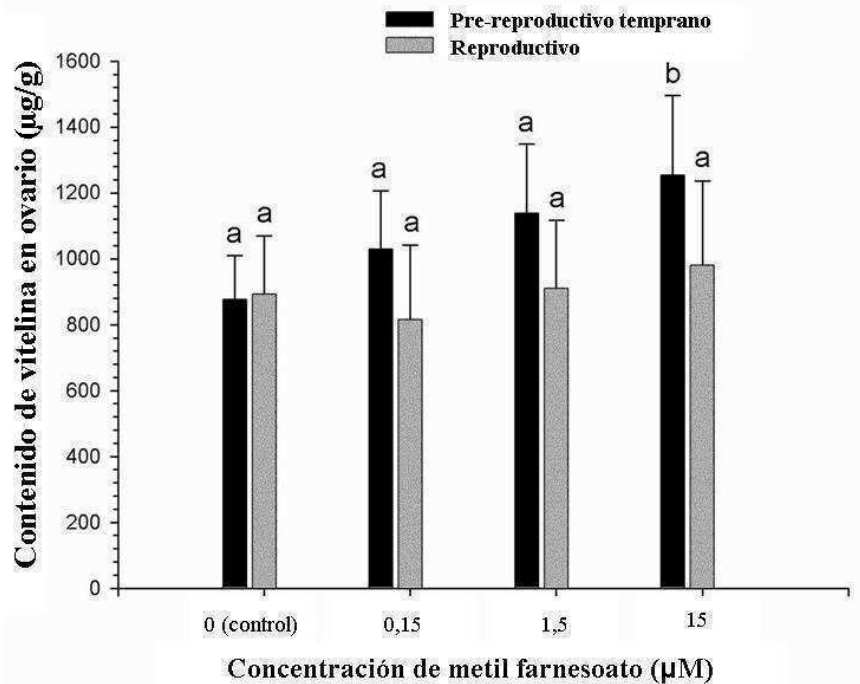


Figura 26. Efecto *in vitro* del metil farnesoato sobre el contenido de vitelina (ug/g) en ovario de hembras de *C. quadricarinatus* empleadas en el primer experimento *in vitro* con MF. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

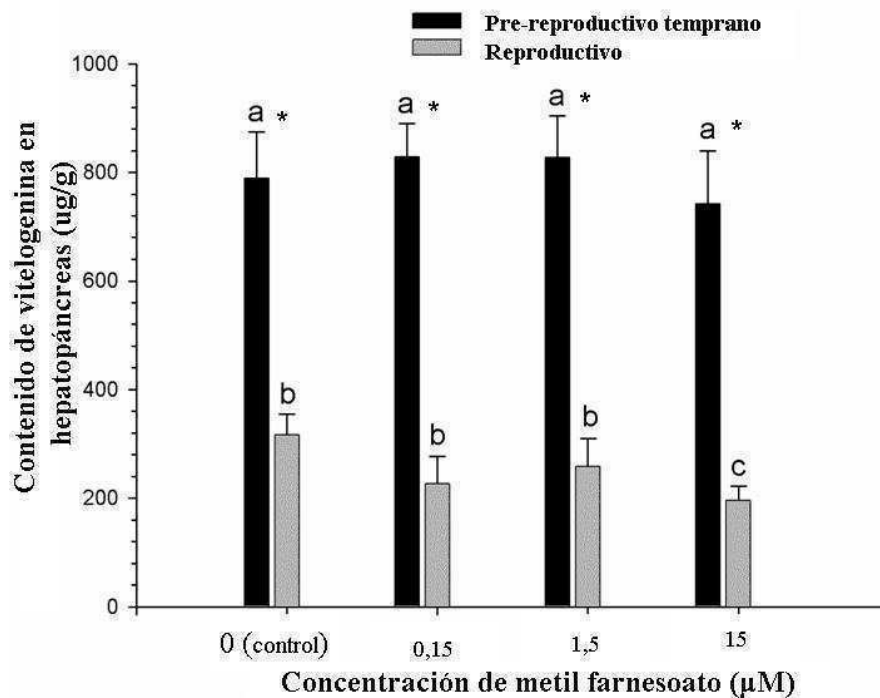


Figura 27. Efecto *in vitro* del metil farnesoato sobre el contenido de vitelogenina (ug/g) en hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus* en el primer experimento *in vitro* con MF. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre períodos, para cada tratamiento.

Segundo experimento

En la Tabla 4 pueden observarse los valores promedios de los IGS e IHS calculados en las hembras utilizadas en el experimento. Al comparar entre sí los distintos períodos del ciclo reproductivo, se observó que los valores de IGS de las hembras del período post-reproductivo fueron significativamente ($p < 0,05$) menores a los determinados en hembras de la época reproductiva.

| Periodo | IGS | N |
|--------------------------|-----------------------|----------|
| Pre-reproductivo | 1,31 ± 0,33 ab | 10 |
| Reproductivo | 2,05 ± 0,53 a | 10 |
| Post-reproductivo | 0,68 ± 0,04 b | 10 |

Tabla 4. Índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) de hembras de *C. quadricarinatus* empleadas en el segundo experimento *in vitro* con MF. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre períodos.

En este experimento, los resultados obtenidos indican que la mayor concentración de MF ensayada (15 μ M) provocó un aumento significativo ($p < 0,05$) de la síntesis proteica en ovario, durante los períodos post-reproductivo y pre-reproductivo, en comparación con el grupo control. Por el contrario, no se observaron efectos significativos del MF durante el período reproductivo (Fig. 28). Además, durante la época reproductiva se observaron en todos los grupos experimentales niveles de leucina

tritiada (incorporada a proteínas), significativamente mayores ($p < 0,05$), en comparación con los otros dos períodos analizados.

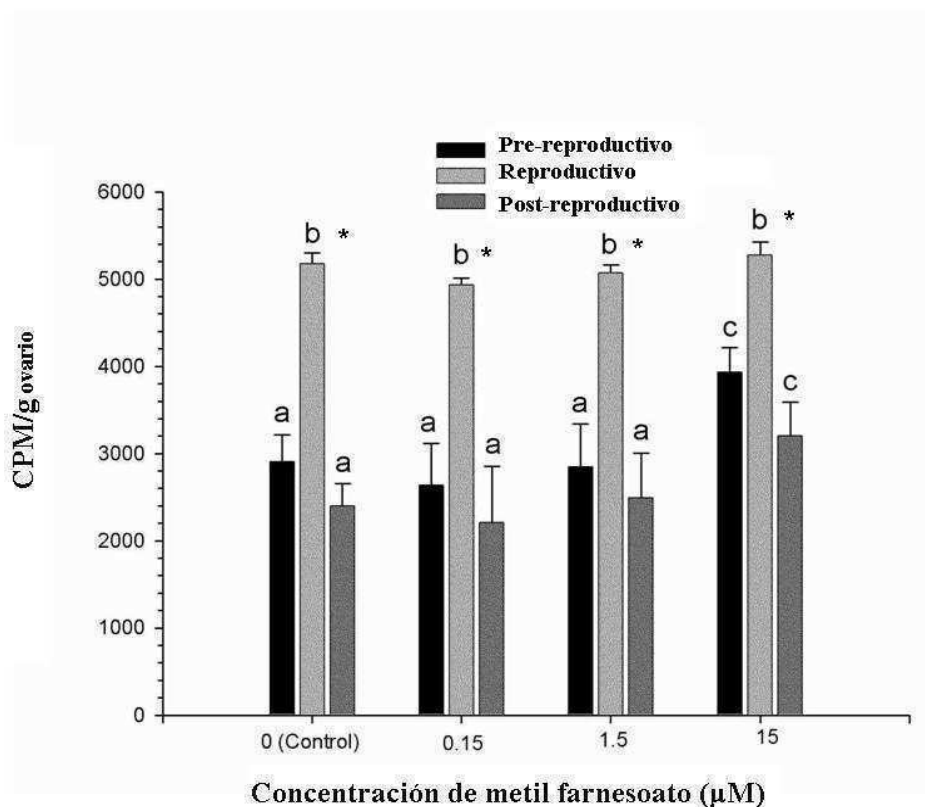


Figura 28. Efecto *in vitro* del metil farnesoato sobre la incorporación de leucina tritiada a las proteínas ováricas de hembras de *C. quadricarinatus*, durante el ciclo reproductivo. CPM/g ovario: cuentas por minuto en función del peso del ovario. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el período reproductivo y los otros dos períodos analizados.

DISCUSIÓN

El metil farnesoato (MF) es una hormona secretada por el órgano mandibular, a la cual se le han atribuido múltiples funciones, ya que participa en la regulación tanto de la muda como de la reproducción de crustáceos (Laufer *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2007; Laufer & Biggers, 2001). Más precisamente, se sabe que en las hembras esta hormona está asociada a las etapas de vitelogénesis secundaria y captación de vitelogenina (Laufer *et al.*, 1987, 1993; Homola & Chang, 1997; Nagaraju, 2007). Algunos estudios llevados a cabo en *P. clarkii* mostraron que la administración de metil farnesoato, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*, posee un efecto estimulante sobre el crecimiento ovárico (Laufer *et al.*, 1992; Tsukimura & Kamemoto, 1991; Rodríguez *et al.*, 2002a). Por otro lado, Soroka *et al.* (2000) mencionan específicamente la posible activación del sistema de señalización intracelular de la PKC por el metil farnesoato, durante la maduración del ovario de *C. quadricarinatus*. Tsukimura & Kamemoto (1991) observaron a partir de ovarios inmaduros de hembras *P. vannamei* que la incubación con MF produce un crecimiento oocitario significativo, corroborando de este modo la posibilidad de estimulación ovárica fuera de la época reproductiva.

En el primer experimento realizado *in vitro*, se observó que la mayor concentración ensayada de metil farnesoato (15 μ M) produjo un aumento del contenido vitelina en el ovario durante el periodo pre-reproductivo temprano. Mas aún, en el segundo experimento *in vitro* con MF, se observó un aumento de la síntesis de proteínas de *novo* en el ovario, tanto en el período pre-reproductivo temprano como post-reproductivo. Estos resultados se corresponden con otros previamente reportados para la langosta de agua dulce *P. clarkii* por Rodríguez *et al.* (2002b) y Kulkarni *et al.* (1991).

Tales investigaciones se basaron en ensayos *in vitro* de estimulación ovárica en presencia de juvenoides y esteroides. Kulkarni *et al.* (1991) observaron que la incorporación de leucina varía de acuerdo al estado de maduración oocitaria, siendo justamente máxima en estadios tempranos de la vitelogénesis.

Durante el periodo reproductivo, sin embargo, el metil farnesoato no estimuló la síntesis de vitelina, ni la síntesis de proteínas totales en el ovario de *C. quadricarinatus*, a cualquier concentración ensayada. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los reportados por Marsden *et al.* (2008), en los cuales, el MF no tiene efecto, o es incluso inhibitorio, sobre los ovarios maduros del langostino *Penaeus monodon*. En consecuencia, la presente Tesis aporta nueva evidencia que apoya la posible pérdida de sensibilidad del ovario maduro de los crustáceos a la hormona MF.

Durante el período pre-reproductivo, en la mayoría de los crustáceos, el crecimiento ovárico ocurre progresivamente debido a la producción endógena de vitelogenina en el propio ovario, así como por la captación de vitelogenina producida en sitios extraováricos, típicamente el hepatopáncreas (Charmantier *et al.*, 1997; Zmora *et al.*, 2007). Esta captación se incrementa en gran medida durante la vitelogénesis secundaria o exógena, que tiene lugar durante la maduración avanzada del ovario.

De acuerdo con los valores de IHS obtenidos en las hembras empleadas en el primer experimento, la producción de vitelogenina en el hepatopáncreas se llevaría a cabo principalmente durante el período pre-reproductivo. En efecto, durante este periodo se detectaron niveles más elevados de vitelogenina, en comparación con el período reproductivo. En este último, los ovarios también presentaron altos valores de

IGS, probablemente debido tanto a la captación previa de vitelogenina (secretada desde el hepatopáncreas hacia la hemolinfa) como a la síntesis endógena de vitelogenina y vitelina que llevan a cabo los oocitos en el proceso de maduración. Esta última estuvo de acuerdo con el aumento de la síntesis proteica observado durante el período reproductivo, en términos de una mayor tasa de incorporación de leucina. Un patrón similar de acumulación y síntesis de vitelogenina fue sugerido en camarones por Vázquez Boucard *et al.* (2002).

Si bien durante el periodo reproductivo los ovarios de las hembras de *C. quadricarinatus* no mostraron ningún cambio por efecto del metil farnesoato, los mayores niveles de incorporación de leucina en todos los grupos experimentales, en comparación con los demás períodos, estaría indicando que la síntesis endógena de proteínas (vitelinas y otras) en los ovarios maduros podría ser estimulada por otras hormonas, diferentes al metil farnesoato. En un contexto fisiológico más amplio, las hormonas esteroideas producidas probablemente por el ovario, alguna isoforma de CHH peduncular, o bien la GSH secretada por el ganglio torácico serían buenas candidatas a producir efectos estimulantes del crecimiento ovárico durante la última fase de maduración (De Kleijn & Van Herp, 1998; Charmantier, 1997). Los experimentos de la presente Tesis realizados con hormonas esteroideas arrojan luz sobre este interrogante, tal como se discute mas adelante.

Con respecto a la posible estimulación que el MF pudiese ejercer sobre la síntesis extraovárica de Vg, los resultados obtenidos fueron negativos, ya que no se incrementó el contenido de vitelogenina en hepatopáncreas con ninguna de las concentraciones de MF ensayada *in vitro*, en ningunos de los periodos considerados. La

vitelogenesis exógena no parecería ser estimulada, entonces, por el metil farnesoato. Si bien se ha reportado en cangrejos un efecto estimulante del ácido farnesoico (un terpenoide implicados en la ruta biosintética del metil farnesoato) sobre la síntesis de vitelogenina en el hepatopáncreas, al comienzo de la re-maduración ovárica, este efecto se redujo a medida que progresaba el proceso de vitelogenesis (Mak *et al.*, 2005). Tiu *et al.*, (2010) ensayaron en la langosta *Homarus americanus* un amplio rango de concentraciones de MF sobre la expresión de gen de vitelogenina en hepatopáncreas, no encontrando efecto de esta hormonas aunque sí del ácido farnesoico, su precursor.

En conjunto, los resultados obtenidos *in vitro*, sugieren fuertemente que el efecto del metil farnesoato sobre el ovario ocurre durante la maduración temprana del mismo, estimulando en el mismo ovario la síntesis endógena de vitelogenina y vitelinas, y que esta hormona no tendría efecto sobre la producción de vitelogenina en sitios extraováricos.

**B. EFECTO IN VITRO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE
LOS NIVELES DE VITELINA EN OVARIO Y
VITELOGENINA EN HEPATOPÁNCREAS**

DISEÑO EXPERIMENTAL

**PRIMER EXPERIMENTO: EFECTO DE LA HORMONA 17 α -
HIDROXIPROGESTERONA SOBRE EL CONTENIDO DE VITELINA Y
VITELOGENINA**

Para estos ensayos *in vitro* se incubaron tanto piezas de ovario (OV) como de hepatopáncreas (HP) y se ensayaron dos concentraciones de **17 α -hidroxiprogesterona (17PG)**: 1,5 y 15 μ M, equivalentes a la concentración máxima esperada en hemolinfa luego de la inyección de 10^{-8} y 10^{-7} moles de PG / langosta, respectivamente. Las piezas fueron colocadas en tubos viales que recibieron 15 μ l de la droga ensayada; en el caso de los grupos controles (CT), se agregó 15 μ l de etanol absoluto (EtOH), vehículo de disolución de la **17PG**. La hormona 17PG fue adquirida en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo): catálogo H5752.

Los ensayos se realizaron en los siguientes períodos del ciclo reproductivo, según se detalla a continuación:

- **pre-reproductivo**: 16 de julio de 2009. Peso promedio de las hembras: $40,56 \pm 3$ g (N=10)
- **reproductivo**: 9 de diciembre de 2009. Peso promedio de las hembras: $27,30 \pm 1,36$ g (N=10)
- **post-reproductivo**: 27 de mayo de 2010. Peso promedio de las hembras: $33,73 \pm 3,23$ g (N=10)

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV+ CT**: pieza ovárica + EtOH
- 2) **OV+ 17PG I**: pieza ovárica + 17PG 1,5 μ M
- 3) **OV+ 17PG II**: pieza ovárica + 17PG 15 μ M
- 4) **HP+ CT**: pieza hepatopáncreas + EtOH
- 5) **HP+ 17PG I**: pieza hepatopáncreas + 17PG 1,5 μ M
- 6) **HP + 17PG II**: pieza hepatopáncreas + 17PG 15 μ M

SEGUNDO EXPERIMENTO: EFECTO DE LAS HORMONAS 17 α -HIDROXIPROGESTERONA Y 17 β -ESTRADIOL SOBRE EL CONTENIDO DE VITELINA

Para estos ensayos *in vitro* se incubaron piezas de ovario con 15 μ M de **17 β -estradiol (E₂)** ó de **17PG**. Esta concentración fue equivalente a la máxima esperada en hemolinfa luego de la inyección de 10^{-7} moles de **E₂** ó **17PG** / langosta. Las piezas fueron colocadas en tubos viales que recibieron 15 μ l de la droga ensayada; en el caso

de los grupos controles (CT), se agregó 15 µl de etanol absoluto (EtOH) (p.a. 99% pureza), vehículo de disolución de E₂ y 17PG.

Ambas hormonas fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, catálogo E8875. Como vehículo de disolución se utilizó etanol absoluto

El ensayo se llevó a cabo en el siguiente periodo del ciclo reproductivo:

- **Reproductivo temprano:** 3 de octubre de 2011. Peso promedio de las hembras: 56,06 ± 2,39 (N=10)

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV+ CT:** pieza ovárica + EtOH
- 2) **OV+ 17PG II:** pieza ovárica + 17PG 15 µM
- 3) **OV+ E₂:** pieza ovárica + E₂ 15 µM

RESULTADOS

Primer experimento

En la Tabla 5 se muestran los valores promedios de los IGS e IHS calculados en las hembras utilizadas en el experimento. Los valores de IGS obtenidos fueron significativamente ($p < 0,05$) menores en el período post-reproductivo, en comparación

los otros períodos. Con respecto al índice hepatosomático, las hembras alcanzaron un índice significativamente ($p < 0,01$) mayor en el período reproductivo, en comparación con los otros dos periodos evaluados.

| Periodo | IGS | IHS |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| Pre-reproductivo | 1,74±0,15 b | 6,28± 0,20 b |
| Reproductivo | 1,29± 0,36 b | 8,09± 0,46 a |
| Post- reproductivo | 0,89± 0,27 a | 6,12± 0,29 b |

Tabla 5. Índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) de hembras de *C. quadricarinatus* empleadas en los ensayos *in vitro* realizados con 17 α -hidroxiprogesterona (17PG), en los tres períodos considerados. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre períodos, para cada índice.

Los resultados obtenidos muestran que el contenido de vitelina en piezas de ovario de *C. quadricarinatus* se incrementó significativamente ($p < 0,05$) en el período pre-reproductivo luego de la incubación con la mayor concentración de progesterona ensayada (Figura 29).

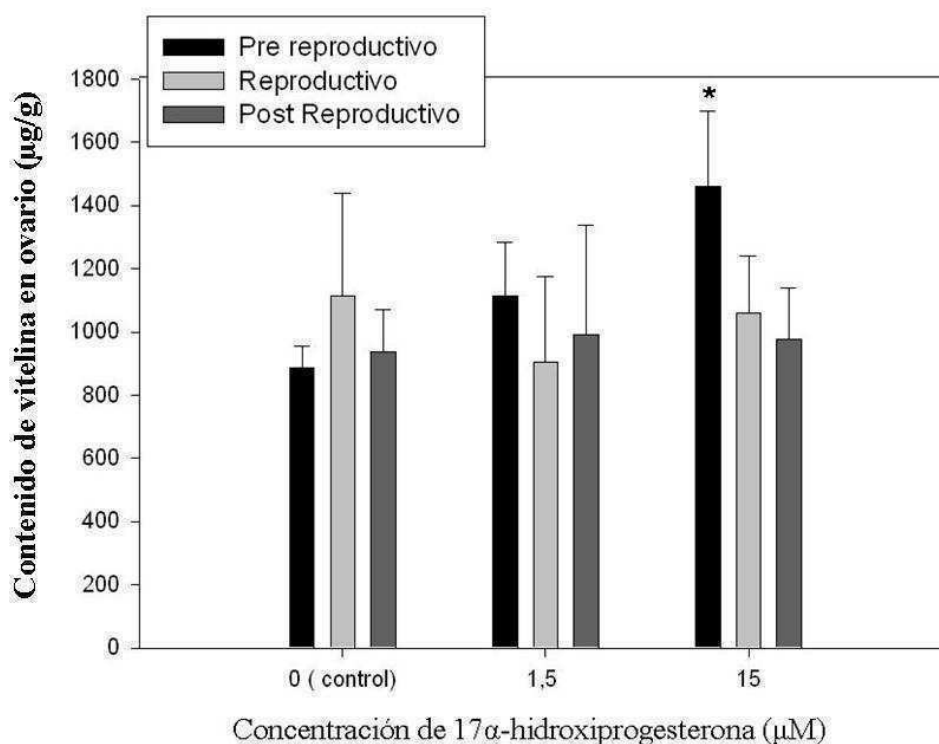


Figura 29 Contenido de vitelina (ug/g) en muestras de ovario de hembras de *C. quadricarinatus*, incubadas *in vitro* con dos concentraciones (1,5 y 15 μM) de 17α-hidroxi-progesterona, en los tres períodos del ciclo reproductivo. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

Por otro lado, se evidenció en el hepatopáncreas un descenso significativo del contenido de vitelogenina durante el período post-reproductivo ($p < 0,05$) al ser incubado este tejido con la mayor concentración de progesterona. En el período pre-reproductivo se puede observar la misma tendencia, si bien no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al control (Figura 30). En el período reproductivo, tanto en ovario como en hepatopáncreas, no se modificaron significativamente ($p > 0,05$) los

niveles de vitelogenina, entre las diferentes dosis ensayadas de progesterona y el control.

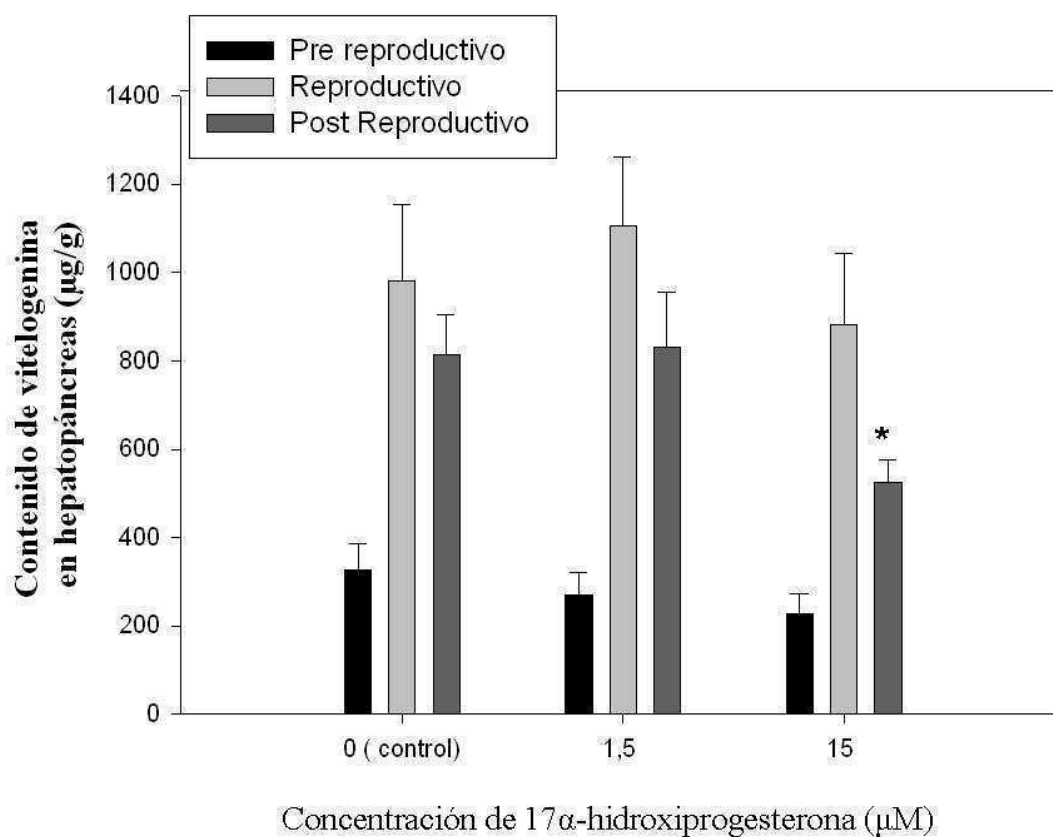


Figura 30. Contenido de vitelogenina (ug/g) en muestras de hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus*, incubadas *in vitro* con dos concentraciones (1,5 y 15 uM) de 17α-hidroxiprogesterona, en los tres períodos del ciclo reproductivo. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

Segundo experimento

Los valores de los IGS e IHS para el periodo reproductivo en estudio se muestran en la Tabla 6.

| Periodo | IGS | IHS |
|------------------------------|------------|------------|
| Reproductivo temprano | 0,99± 0,17 | 5,41± 0,26 |

Tabla 6. Índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) de hembras de *C. quadricarinatus* empleadas en los ensayos *in vitro* realizados con 17β-estradiol en el período considerado.

Los resultados obtenidos muestran que el contenido de vitelina en piezas de ovario de *C. quadricarinatus* incubadas con 17β-estradiol se incrementó significativamente ($p < 0,05$) respecto al control en el período reproductivo temprano. En los fragmentos de ovario incubados con 17 PG no se produjo un incremento significativo ($p > 0,05$) del contenido de vitelina. (Figura 31).

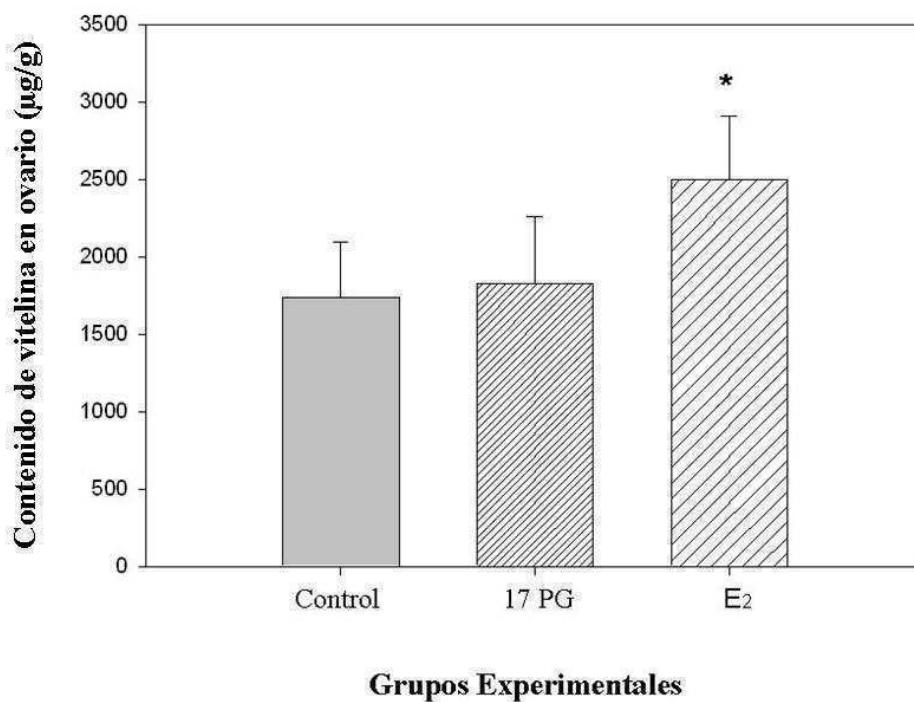


Figura 31: Contenido de vitelina (ug/g) en muestras de ovario de hembras de *C. quadricarinatus*, incubadas *in vitro* con 15 uM de 17 α -hidroxiprogesterona (17 PG) y 15 uM de 17 β -estradiol (E₂) en el período reproductivo temprano. El asterisco indican diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

DISCUSIÓN

Se sabe que las hormonas esteroideas tienen efectos sobre el ciclo reproductivo de las hembras de crustáceos a nivel de la maduración ovárica y la producción de vitelogenina (Yano, 1985; Fairs *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1992; Shih, 1993; Huberman, 2000). Particularmente, la 17 α -hidroxiprogesterona y el 17 β -estradiol son hormonas involucradas en el aumento del índice gonadosomático y del diámetro oocitario (Yano & Hoshino, 2006).

Diversos ensayos *in vitro* llevados a cabo en distintas especies de crustáceos, demuestran que la 17 α -hidroxiprogesterona es una molécula inductora del crecimiento ovárico. Young *et al.* (1992) realizaron incubaciones de distintos tejidos para evaluar el metabolismo de la progesterona en dos especies de crustáceos decápodos. Los resultados indicaron que los ovarios vitelogénicos en estadio II expresaron una alta tasa metabólica, incorporando aproximadamente el 86% de la progesterona adicionada. Por otro lado, Tsukimura & Karemoto (1991) evaluaron el efecto de cuatro tipos de esteroides sobre el desarrollo oocitario, en hembras inmaduras del camarón *P. vannamei*. De las hormonas ensayadas, sólo la 17PG produjo un aumento significativo del diámetro oocitario, en todo el intervalo de concentraciones ensayadas.

En la presente Tesis, los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* corroboran el efecto inductor de las hormonas 17 α -hidroxiprogesterona y 17 β -estradiol sobre el proceso de vitelogénesis en hembras de *C. quadricarinatus*, acotado al período pre-reproductivo y reproductivo temprano.

Zapata *et al.* (2003) encontraron en estudios *in vitro* realizados durante el periodo reproductivo con hembras del cangrejo *C. granulata*, que la 17PG tiene un efecto directo sobre el crecimiento ovárico. Dicho resultado se obtuvo en ensayos de evaluación de los niveles de leucina tritiada incorporada a proteínas. En dicha publicación se sugiere un posible efecto estimulante sobre la síntesis endógena de vitelinas en los oocitos o bien sobre la síntesis de Vg en las células foliculares. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente Tesis indican que el contenido específico de vitelina sólo se incrementó significativamente en el periodo pre-reproductivo, al incubar ovarios con la mayor dosis probada de 17PG (15µM). En el periodo reproductivo no se observó dicho efecto, pudiendo deberse a características propias de la especie en estudio o a una cierta variabilidad en el estado de maduración ovárica de las hembras durante el estadio reproductivo.

En lo que respecta a la hormona 17β-estradiol, Yano & Hoshino (2006) confirman el efecto inductor del 17β-estradiol sobre la síntesis y secreción de Vg, en ovarios de hembras pre vitelogénicas de *Marsupenaeus japonicus*, por medio de una técnica inmunoelctroforética. En concordancia con lo indicado por ese trabajo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que el contenido de vitelina en piezas de ovario de *C. quadricarinatus* incubadas con 17β-estradiol se incrementó significativamente con respecto al control, en el período reproductivo temprano.

Tanto la 17PG como el E₂ estimulan en el camarón *M. ensis* la expresión del gen para vitelogenina en piezas de hepatopáncreas incubadas, siendo la hormona E₂ la más efectiva (Tiu *et al.*, 2006b). En los ensayos *in vitro* llevados a cabo en la presente Tesis, se observó un descenso significativo del contenido de vitelogenina en hepatopáncreas

incubados con 17PG, en el periodo post-reproductivo. Esto podría deberse a un efecto de tipo inhibitorio sobre la síntesis o secreción de vitelogenina en ese periodo en particular. A pesar que se sabe que los esteroides sexuales pueden ser detectados en hemolinfa, ovario y hepatopáncreas (Shih, 1993; Warriar *et al.*, 2001; Okumura & Sakiyama, 2004), las investigaciones específicas sobre estudios *in vitro* en hepatopáncreas de crustáceos son aún escasas. Por lo general los estudios con esteroides sexuales son aplicados en mayor medida al tejido ovárico. Esto imposibilita una comparación más exhaustiva de los resultados obtenidos en la especie en estudio.

C. EFECTO IN VITRO DEL ANTAGONISTA ENCEFALINERGICO NALOXONA SOBRE LOS NIVELES DE VITELINA EN OVARIO

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los ensayos se realizaron en diferentes períodos del ciclo reproductivo, según se detalla a continuación:

- **reproductivo**: 30 de noviembre de 2010. Peso promedio de las hembras: $53,46 \pm 6,25$ g (N=10)
- **post-reproductivo**: 19 de mayo de 2011. Peso promedio de las hembras: $45,43 \pm 1,85$ g (N=11)
- **reproductivo temprano**: 3 de octubre de 2011. Peso promedio de las hembras: $65,26 \pm 2,86$ g (N=10)

Para estos ensayos *in vitro* se incubaron piezas de ovario, con el agregado de **Naloxona** (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo: catálogo N7758), a una concentración de $125\mu\text{M}$, utilizada en trabajos previos con la misma especie (Cahansky *et al.*, 2008, 2011). Las piezas fueron colocadas en tubos viales que recibieron $15\ \mu\text{l}$ de la droga ensayada; en el caso de los grupos controles (CT) se agregó $15\ \mu\text{l}$ de dimetil sulfóxido (DMSO), vehículo de disolución del Nx. Las piezas ováricas (OV) fueron coincubadas con ganglio torácico o bien, con músculo de la quela (M) en el caso de los grupos controles. El agregado de ganglio torácico (GT) se realizó a fin de trabajar con la la fuente productora de GSH y evaluar así el efecto positivo del antagonista encefalinergico naloxona sobre la maduración ovárica y/o vitelogénesis. De esta forma

se pretende estimular la secreción de GSH al deshinbir el efecto negativo de las encefalinas producidas por el ganglio torácico, logrando finalmente un efecto indirecto sobre la vitelogénesis endógena.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV+ M+ CT:** pieza ovárica + músculo+ vehiculo (control)
- 2) **OV+ M+ NX:** pieza ovárica + músculo + naloxona
- 3) **OV+GT+CT:** pieza ovárica + ½ ganglio torácico+ vehiculo (control)
- 4) **OV+GT+NX:** pieza ovárica + ½ ganglio torácico + naloxona

RESULTADOS

En la Tabla 7 se muestran los valores promedios de los IGS e IHS calculados en las hembras utilizadas en los ensayos con Nx. Al comparar los valores del IGS, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres periodos considerados, observándose los menores valores en el post reproductivo, y los mayores en el reproductivo. En este último periodo, las hembras en periodo reproductivo presentaron un índice hepatosomático significativamente mayor ($p < 0,05$) respecto a los otros dos.

| Periodo | IGS | IHS |
|------------------------------|----------------------|----------------------|
| Reproductivo | 3,44± 0,52 a | 5,58± 0,23 a |
| Post- reproductivo | 0,35± 0,07 b | 5,27 ± 0,18 b |
| Reproductivo temprano | 1,28 ± 0,22 c | 5,36 ± 0,21 b |

Tabla 7. Índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) de hembras de *C. quadricarinatus* en los diferentes experimentos *in vitro* realizados con naloxona (Nx) Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre períodos, para cada índice.

Con respecto al contenido de vitelina en ovario, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales ensayados, según se muestra en la Figura 32.

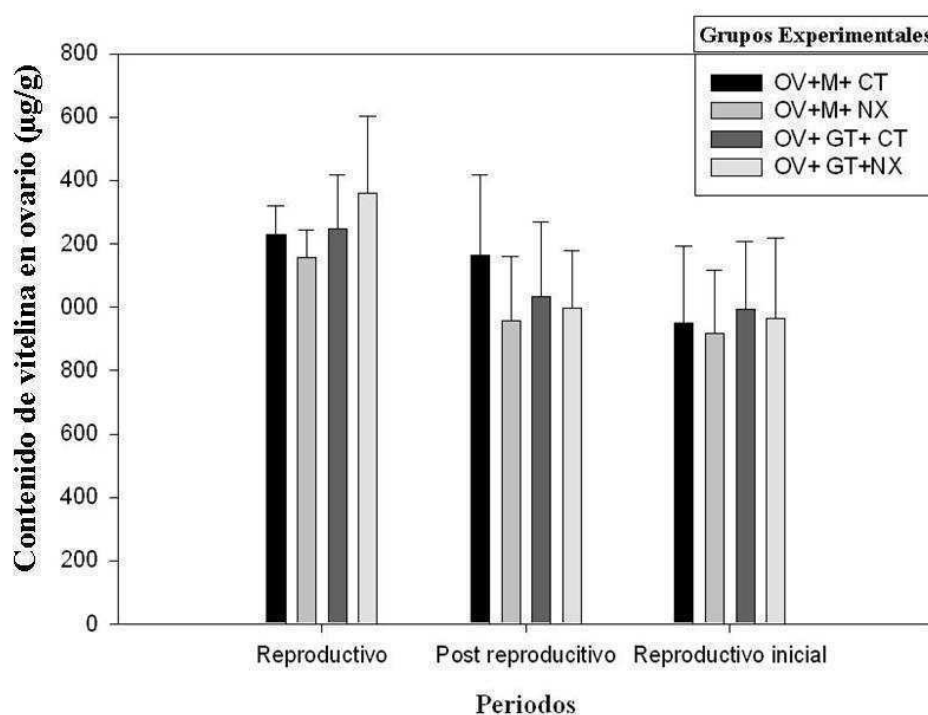


Figura 32. Niveles promedio de vitelina (Vg) detectados en ovario (OV) de hembras adultas de *C. quadricarinatus* en los cuatro grupos experimentales ensayados *in vitro* por periodo. M: músculo; CT: control; NX: naloxona; GT: ganglio torácico.

DISCUSIÓN

Se sabe que en crustáceos el sistema opioide está involucrado en la regulación del desarrollo ovárico. Tanto estudios *in vivo* como *in vitro* han aportado fuerte evidencia al respecto (Fingerman *et al.*, 1985; Sarojini *et al.*, 1995, 1996, 1997; Cahasny *et al.*, 2008, 2011). Fingerman (1997) ha propuesto que el mecanismo de acción de los neuropéptidos opiodes, met- y leu-enkefalinas, sería la inhibición de la secreción de la GSH y/o la estimulación de la secreción de GIH. En contraposición, un inhibidor de opiodes endógenos como el naloxona, es capaz de inducir la maduración ovárica en crustáceos al anular los efectos de los opiodes endógenos mencionados. (Sarojini *et al.*, 1995, 1996, 1997; Kishori & Reddy, 2003).

Varios ensayos *in vitro* realizados en *P. clarkii* prueban la acción inhibitoria de la met-enkefalina sobre la maduración ovárica, mediante la administración de su antagonista, la naloxona. Sarojini *et al.* (1997) mediante experimentos de incubación de ovario con ganglio torácico, a distintas concentraciones de met-enkefalina y de Nx, observaron por un lado que el efecto estimulador del ganglio torácico fue bloqueado por la acción inhibitoria de las met-enkefalina de manera dependiente de la concentración. Por otro lado, la Nx, incrementó de manera significativa el crecimiento del ovario en presencia del ganglio torácico, en comparación con el tratamiento con ganglio torácico sólo. De manera similar, los ensayos *in vitro* llevados a cabo en *C. quadricarinatus* por Cahansky *et al.* (2008), demuestran que al incubar fragmentos de ovario con ganglio torácico y Nx (a 125 μ M), aumenta significativamente el crecimiento ovárico (en términos de incorporación de leucina tritiada) respecto del control. Los resultados de estos trabajos, estarían indicando que la Nx potencia la acción estimuladora del ganglio

torácico sobre la secreción de GSH y en consecuencia sobre la síntesis de proteínas del ovario.

El efecto *in vitro* de antagonistas dopaminérgicos y encefalinérgicos sobre el crecimiento ovárico fue además realizado en distintos periodos del ciclo reproductivo de *C. quadricarinatus* (Cahansky *et al.*, 2011). Durante el periodo post-reproductivo, al agregar Nx al ovario co-incubado con ganglio torácico, se obtuvo un crecimiento significativo del ovario, mientras que en el periodo pre-reproductivo no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Sin embargo, en la presente Tesis no se obtuvieron resultados significativos respecto al contenido de Vn al incubar ovario con ganglio torácico y Nx en ninguno de los tres periodos del ciclo reproductivo. Esto podría indicar que la GSH, cuya secreción es inducida por el naloxona en el ganglio torácico, no estaría involucrada directamente en el proceso específico de vitelogénesis, aunque tendría efecto sobre la síntesis de otras proteínas ováricas.

Al respecto, Ward *et al.* (2009) identificaron en el cangrejo *C. pagarus*, mediante espectrometría de masas, las proteínas constituyentes del ovario, entre las que se encuentran además de la vitelogenina y vitelina, proteínas estructurales (actina y tubulina), de transporte, de choque térmico (HSP), cierta variedad de enzimas, subunidades de hemocianina y ferritina entre otras proteínas con funciones heterogéneas. Navakanitworakul *et al.* (2012) mencionan que en el camarón *F. merguensis*, las proteínas ribosomales, están implicadas en la síntesis general de proteínas y contribuyen al proceso de maduración ovárica. Por otro lado, Sathapondecha

et al. (2011) reportan además, dos proteínas multifuncionales, tran glutaminasa y tioredoxina, que estarían involucradas también en la maduración ovárica de *P. monodon* con posibles implicancias sobre la vitelogénesis y fertilización. Ante estos recientes hallazgos, y en base a lo obtenido en la presente investigación, es posible que el efecto principal de la GSH sea estimular, en una primera etapa, la síntesis de proteínas ováricas estructurales que preparen al ovario para iniciar el proceso específico de vitelogénesis.

CAPÍTULO IV

**EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VIVO* DE
HORMONAS Y NEUROREGULADORES SOBRE
LOS NIVELES DE VITELINA EN OVARIO NY
VITELOGENINA EN HEPATOPÁNCREAS Y
HEMOLINFA DE *CHERAX QUADRICARINATUS*.**

OBJETIVO ESPECÍFICO E HIPÓTESIS

OBJETIVO IV: Evaluar los niveles de vitelina en ovario y vitelogenina en hemolinfa y hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con dietas adicionadas con progesterona, metil farnesoato o naloxona.

HIPÓTESIS IV: Dietas con un contenido óptimo de proteínas y lípidos, adicionadas con progesterona, metil farnesoato o naloxona, aumentarían los niveles de las proteínas vitelogénicas en hemolinfa, ovario y hepatopáncreas en *C. quadricarinatus*.

METODOLOGÍA

CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los ejemplares de hembras adultas de *C. quadricarinatus* permanecieron bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperíodo, en las instalaciones del Bioterio Central de la FCEN- UBA por un mínimo de 7 días, tiempo esperado para que los animales se recuperen del traslado desde el criadero de origen (Pinzas Rojas, Tucumán). Al término de esta etapa, los animales fueron asignados aleatoriamente a cada grupo experimental, colocándolos en acuarios de vidrio de 40x60x30cm, conteniendo 15 L de agua dulce declorada, con aireación constante y bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperíodo (ya que permanecieron en las mismas instalaciones del Bioterio Central arriba mencionadas). La densidad de animales fue de cinco hembras

por acuario, en los cuales además se colocaron refugios artificiales. El agua de los acuarios fue recambiada completamente una vez por semana.

ENSAYOS *IN VIVO*

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* durante el período pos-treproductivo. El objetivo del mismo fue inducir la maduración ovárica (y la consecuente síntesis de vitelogenina) fuera de la época reproductiva o pre-reproductiva. La aplicación de esta metodología en criadero permitiría desarrollar una técnica para la producción de juveniles durante todo el año.

En el ensayo *in vivo* se evaluó el efecto de las sustancias adicionadas en comparación con una dieta control (sin agregado de hormonas o neuroreguladores). Para esto se siguió un protocolo adaptado de trabajos previos (Rodríguez *et al.*, 2002 a,b; Zapata *et al.*, 2003; Cahansky *et al.*, 2002, 2003), utilizándose dosis similares de hormonas y neuroreguladores.

Dieta base

En el ensayo *in vivo* se utilizó una **dieta base** compuesta de 33,21% de proteínas, 8,96% de lípidos y 26,60% de carbohidratos, siguiendo las recomendaciones de trabajos previos realizados con hembras de *C. quadricarinatus* (Rodríguez-González *et al.*, 2009a,b). Dicha dieta fue formulada en el laboratorio de Fisiología Animal Comparada (FCEN-UBA) a partir de una fuente proteica dada por 50% de harina de

pescado y 50% de harina de soja, de acuerdo a Gutiérrez & Rodríguez (2010). La composición pormenorizada de la dieta utilizada se indica en la Tabla 8.

| Componente | cantidad | Aporte de Proteínas (%) | Aporte de Lípidos (%) | Aporte de Carbohidratos (%) |
|--|-----------------|--|--------------------------------------|--|
| Harina de Pescado | 260 g | 17,01 | 2,43 | 0,54 |
| Harina de Soja | 370g | 16, 2 | 2,88 | 1,44 |
| Almidón Pregelificado | 250g | 0 | 0 | 24,62 |
| Aceite de Soja | 37,75g | 0 | 3,65 | 0 |
| Bentonita | 61g | 0 | 0 | 0 |
| Premix vitamínico- mineral ^a | 20g | 0 | 0 | 0 |
| Astaxantina ^b | 1,25g | 0 | 0 | 0 |
| Total | 1000 | 33,21 | 8,96 | 26,60 |

Tabla 8. Composición (g/kg) de la dieta usada en los ensayos *in vivo*. ^aPremix vitamínico-mineral Rovimix SuperAcqua® de DSM. ^bAstaxantina: Carophill Pink® 10% de DSM.

Dieta experimental

La dieta base antes descrita fue adicionada con las hormonas y los neuroreguladores estudiados previamente en los ensayos *in vitro*.

Las drogas y las dosis probadas en los ensayos *in vivo* fueron las siguientes:

- *Naloxona* (Nx) = 5×10^{-8} moles/animal
- *17 α -hidroxiprogesterona* (17PG) = 10^{-7} moles/ animal
- *Metil Farnesoato* (MF) = 10^{-7} moles/ animal.

Las drogas utilizadas fueron obtenidas según se especificó en la sección de ensayos *in vitro* (Capítulo III). Una vez disueltas en el vehículo correspondiente, fueron mezcladas con la dieta base en el momento de la preparación de los pellets. Dichos pellets fueron manufacturados en laboratorio mediante un dispositivo extrusor (Fig. 33) y secados en estufa a 40°C durante 24h, a fin de obtener una consistencia firme y estable en agua por al menos 3h. Cada pellet fue fraccionado idénticamente a fin de obtener un peso seco de entre 0,12 y 0,14g, y una longitud de 1cm por unidad. El alimento para los grupos controles se realizó de la misma manera recibiendo, en lugar de la dosis de droga, la dosis equivalente de vehículo (etanol +dimetil sulfóxido).



Figura 33. Proceso de manufactura de los pellets utilizados en los ensayos *in vivo*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El ensayo se llevó a cabo en el siguiente período del ciclo reproductivo, y comprendió 4 semanas de duración:

Post-reproductivo: 23 de mayo al 21 de junio de 2011. Peso promedio de las hembras: $49,15 \pm 1,20\text{g}$ (N= 50).

Los grupos experimentales fueron los siguientes

- 1) **Dieta Control (CT)** = con adición de los vehículos etanol y dimetilsulfónico (DMS).
- 2) **Dieta Naloxona (Nx)** = 5×10^{-8} moles/animal por pellet suministrado.
- 3) **Dieta 17 α -hidroxiprogesterona (17PG)** = 10^{-7} mol/ animal de 17PG por pellet suministrado.
- 4) **Dieta Metil Farnesoato (MF)** = 10^{-7} mol/ animal de MF por pellet suministrado.

Protocolo de Administración

Durante el transcurso del ensayo todos los animales fueron alimentados cinco veces por semana. La cantidad de alimento suministrado se ajustó al 2% de la biomasa/día (Lawrence & Jones, 2002). Los grupos designados como controles recibieron todos los días los pellets control (adicionados con vehículo). Cada animal perteneciente a un grupo experimental recibió dos días a la semana un pellet

conteniendo la dosis completa de la hormona o neuroregulador. Una vez consumido este pellet, así como en los restantes días de la semana, cada animal recibió el mismo alimento que el grupo control. Complementariamente, tres veces por semana se suministraron pequeñas ramas de *Elodea sp* a todos los grupos.

Diariamente, los animales fueron inspeccionados registrándose la fecha de muda o eventual muerte. Las hembras mudadas fueron retiradas del acuario y mantenidas en otro acuario similar, hasta que el caparazón adquiriese una consistencia firme (aproximadamente 72 horas), reintegrándolas luego al acuario de origen y manteniéndose el tratamiento según el grupo experimental al que correspondiese.

Obtención de Muestras Biológicas

Se tomaron muestras de hemolinfa de todas las hembras de *C. quadricarinatus* utilizadas en los ensayos *in vivo*, al inicio, a los 15 días y al finalizar el ensayo (día 30). Tanto al inicio (control inicial), como al final (control concurrente) del experimento, se obtuvieron muestras de ovario y hepatopáncreas, previo sacrificio de los animales. Las técnicas empleadas para la extracción de hemolinfa y obtención de muestras de ovario y hepatopáncreas fueron las mismas descritas en el Capítulo II (ver Metodología: Obtención y procesamiento de muestras de ovario y hepatopáncreas para determinación de vitelogenina por la técnica ELISA).

VARIABLES MEDIDAS

Se determinaron los índices gonadosomático y hepatosomático, el peso de los animales y los niveles de proteínas vitelogénicas en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa. Complementariamente, se determinó la tasa de mortalidad y el número de mudas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados obtenidos *in vivo* se empleó el software Statistica versión 7.0. A fin de comparar entre grupos experimentales las variables registradas, se aplicó un ANOVA de un factor, seguido de comparaciones planeadas por el método de la menor diferencia significativa (Sokal & Rohlf, 1981), utilizando eventualmente la transformación angular para normalizar los datos. Los porcentajes de mortalidad y mudas fueron comparados entre tratamientos (como proporciones) mediante el test exacto de Fisher (Sokal & Rohlf, 1981). El nivel de confianza, en todos en los casos fue del 5%.

RESULTADOS

En la Tabla 9 se muestra los pesos promedios de las hembras de las hembras al inicio y al final del ensayo, así como el número inicial y final de ejemplares, porcentaje de mudas y de mortalidad detectados durante el tratamiento. En ningún caso se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($p > 0,05$). Además, no se observaron patologías en ovario ó hepatopáncreas, que pudieran ser producto de las drogas ensayadas.

| Grupo experimental | Peso promedio inicial (g) | Peso promedio final (g) | 5 | N final | % mudas | % Mortalidad |
|--|----------------------------------|--------------------------------|----------|----------------|----------------|---------------------|
| <i>Control</i> | 50,49±1,56 | 49,92±1,04 | 13 | 12 | 23,07 | 7,7 |
| <i>Naloxona</i> | 49,73±2,12 | 48,37±0,96 | 13 | 12 | 7,7 | 7,7 |
| <i>Metil Farnesoato</i> | 51,51±1,96 | 48,37±1,04 | 13 | 12 | 7,7 | 7,7 |
| <i>17α hidroxiprogesterona</i> | 50,77±1,88 | 49,95±1,41 | 12 | 12 | 0 | 0 |

Tabla 9. Peso promedio de las hembras empleadas, número inicial y final de ejemplares, porcentaje de mudas y de mortalidad correspondientes al ensayo *in vivo* realizado durante el periodo post reproductivo

Al analizar los valores de índice gonadosomático (IGS), los grupos experimentales tratados con metilfarnesoato y naloxona mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) del IGS, en comparación con los valores del control (Fig. 34).

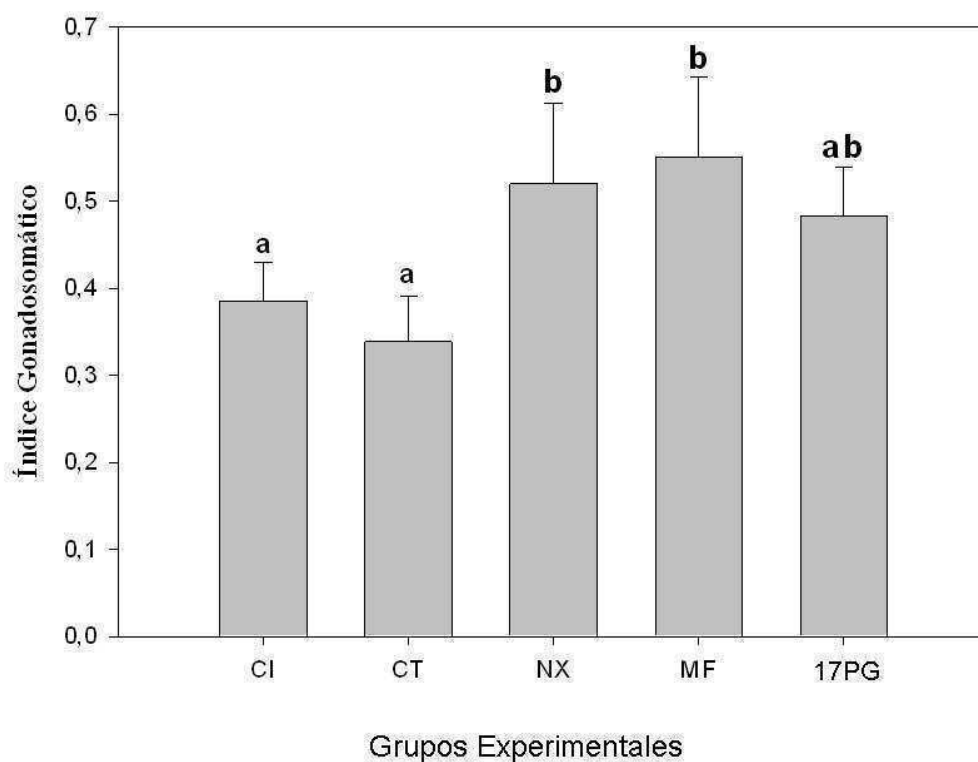


Figura 34. Valores promedios del índice gonadosomático de hembras de *C. quadricarinatus* en los distintos grupos experimentales, al finalizar el ensayo *in vivo* (periodo post reproductivo). CI: control inicial. CT: Control; NX: naloxona; MF: metil farnesoato; 17PG: 17α -hidroxiprogesterona. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

El contenido promedio de vitelina en ovario de hembras tratadas con MF (150,61 μg) resultó ser significativamente ($p < 0,05$) mayor que el control (88,31 μg) tal como puede observarse en la Fig. 35

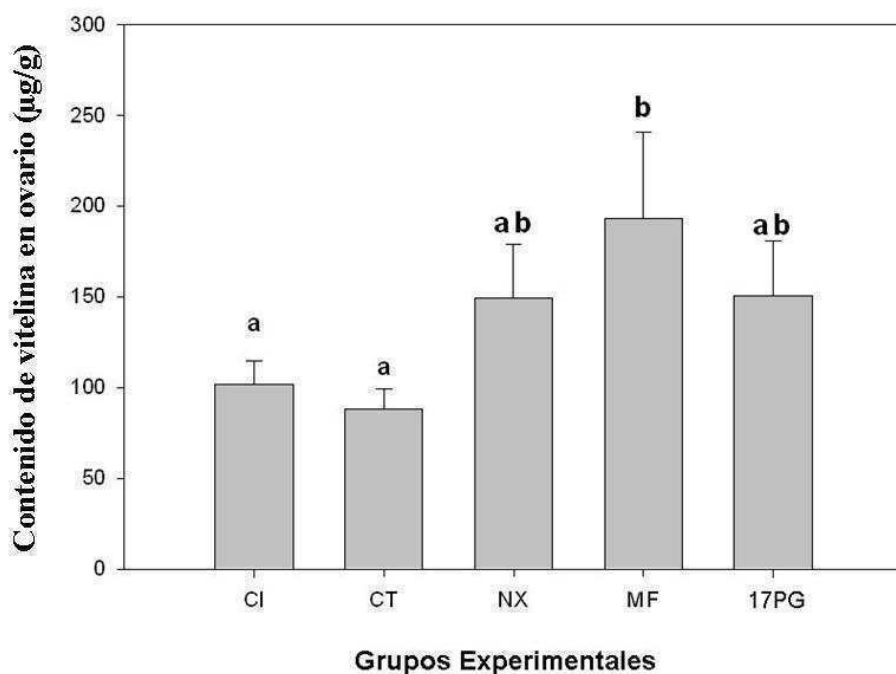


Figura 35. Efecto *in vivo* de los distintos tratamientos sobre el contenido de vitelina en ovario (μg) de hembras de *C. quadricarinatus*, durante el periodo post reproductivo. CI: control inicial. CT: Control; NX: naloxona; MF: metil farnesoato; 17PG: 17α hidroxiprogesterona. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control (CT).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) al analizar los valores del índice hepatosomático y el contenido de vitelogenina en hepatopáncreas (Vg HP) (Tabla 10).

| | CI | CT | NX | MF | 17PG |
|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| IHS | 5,27 ± 0,19 | 5,92 ± 0,50 | 6,52 ± 0,40 | 6,46 ± 0,26 | 6,23 ± 0,22 |
| Vg Hp (µg) | 509,18 ± 103,52 | 1194,04 ± 133,14 | 1182,13 ± 119,70 | 1249,65 ± 116,55 | 1140,86 ± 110,46 |

Tabla 10. Valores promedios del índice hepatosomático (IHS) y contenido de vitelogenina en hepatopáncreas (VgHP) al final del experimento. CI: control inicial. CT: Control; NX: naloxona; MF: metil farnesoato; 17PG: 17 α -hidroxiprogesterona

En la Tabla 11 se muestra los valores promedios de vitelogenina en hemolinfa detectados al día 0 (inicio), día 15 (medio) y día 30 (fin) del tratamiento, para cada uno de los grupos experimentales. La concentración de vitelogenina en hemolinfa no difirió significativamente ($p > 0,05$) entre los tres tiempos de medición, si bien se observa una tendencia hacia el aumento de los niveles circulantes de vitelogenina en todos los tratamientos.

| | CT | NX | MF | 17PG |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Día 0 | 147,15 ± 8,81 | 133,42 ± 11,41 | 171,85 ± 13,91 | 155,23 ± 13,69 |
| Día 15 | 151,54 ± 7,99 | 138,08 ± 8,90 | 134,77 ± 16,58 | 151,80 ± 6,90 |
| Día 30 | 175,30 ± 10,29 | 180,42 ± 19,11 | 197,94 ± 6,60 | 185,25 ± 6,79 |

Tabla 11. Valores promedios de la concentración (ng/µl) de vitelogenina en hemolinfa (VgHL) al día 0, 15 y 30 de iniciado los ensayos *in vivo*, durante el periodo post-reproductivo, en los

distintos grupos experimentales. CT: Control; NX: naloxona; MF: metil farnesoato; 17PG: 17 α -hidroxiprogesterona

DISCUSIÓN

Efecto del metil farnesoato

La administración de MF en el alimento de hembras de *C. quadricarinatus* demostró ser efectiva para la estimulación del crecimiento ovárico. Al finalizar el ensayo llevado a cabo en el período post-reproductivo, se observó un incremento significativo del índice gonadosomático y del contenido de Vn en ovario en las hembras tratadas con esta hormona respecto al grupo control.

El efecto *in vivo* del MF sobre la reproducción de crustáceos fue estudiado en distintas especies de decápodos. En algunos casos particulares, se menciona el rol inhibitorio del MF sobre algunos aspectos de la reproducción. Por ejemplo, en *P. monodon* la administración oral de dos dosis distintas de MF provocó un descenso del número de desoves y de la fecundidad relativa como resultado de una inhibición del desarrollo ovárico durante la etapa final de la vitelogénesis (Marsden *et al.*, 2008). En *T. longicaudatus*, Tsukimura *et al.* (2006) observaron una disminución en el número de oocitos y en el peso del ovario e índice gonadosomático al administrar oralmente distintas dosis de MF a través de un vector biológico (*nauplii* de *Artemia sp.*).

Sin embargo, existen fuertes evidencias del efecto estimulante que ejerce el MF en ensayos *in vivo*, sobre ciertos aspectos de la reproducción en crustáceos (Hinsch,

1980; Huberman, 2000; Okumura, 2004; Nagaraju, 2007, 2011). Se reportó una inducción de la maduración ovárica en el cangrejo *O. senex senex* y en el camarón *P. monodon*, en grupos de hembras inyectadas con MF, con respecto a las hembras controles (Reddy & Ramammurthi, 1998; Reddy *et al.*, 2004; Suneetha *et al.*, 2010). Por su parte, Balusubramanian *et al.*, (2010) ensayaron también distintas dosis de MF administradas a *Sicyonia ingentis* mediante inyecciones, observando al final del experimento un incremento significativo del IGS en el grupo tratado. Lo mismo fue observado por Nagaraju *et al.* (2003) en *Macrobrachium malcolmsonii*. En experimentos realizados en el cangrejo araña *Libinia emarginata*, se observó cierta estimulación del sistema reproductivo, en términos de un aumento en los niveles circulantes de vitelogenina, tras inyectar MF en hembras con pedúnculo ocular ablacionado (Vogel & Borst, 1989). Además, en el camarón *P. vanamei* se reportó una mayor tasa de fecundidad y desove, luego de la alimentación con pellets enriquecidos MF (Laufer *et al.*, 1992).

En el “crayfish” *P. clarkii* también fueron ensayadas dietas experimentales con la adición de MF durante los periodos pre reproductivo y reproductivo (Laufer *et al.*, 1998). En este caso, se observó una estimulación positiva sobre la maduración del ovario, puesto de manifiesto por aumentos de los valores de IGS y del diámetro oocitario. Éste último reflejaría de manera directa la incorporación de Vg a los oocitos, remarcando el activo rol del MF sobre el proceso de vitelogénesis.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis, demuestran que la administración *in vivo* de MF por vía oral es un procedimiento efectivo a los fines reproductivos. El empleo de pellets enriquecidos es una opción aplicable en acuicultura y no invasiva, en

comparación con el método de inyección practicado en crustáceos por otros autores (Reddy & Ramammurthi, 1998; Reddy *et al.*, 2004; Suneetha *et al.*, 2010). Por otro lado, la muda no se vio afectada por la administración de la hormona, ni tampoco se registró un aumento en la mortalidad.

En coincidencia con lo observado por Balusubramanian *et al.* (2010) en *S. ingentis*, la administración de MF no produjo un incremento en las concentraciones de Vg en hemolinfa. Esto podría deberse al importante aumento de la tasa de captura de la Vg circulante por parte de los oocitos, disminuyendo así la concentración de Vg en hemolinfa.

Por otro lado, los ensayos *in vivo* realizados confirman y amplían la información reportada en distintas investigaciones en crustáceos (Tsukimura & Kamemoto, 1991; Laufer *et al.*, 1992; Laufer *et al.* 1998; Rodríguez *et al.*, 2002a) al obtenerse un aumento del índice gonadosomático junto con un incremento del contenido de vitelina en ovarios de hembras tratadas. Esto reafirma la clara función que cumple el MF en la inducción del crecimiento ovárico.

Efecto de la hormona esteroidea 17 α -hidroxiprogesterona

Diversos ensayos *in vivo* han puesto de manifiesto la función de la 17 α -progesterona en el desarrollo ovárico y su efecto inductor de la reproducción. Las inyecciones con 17PG produjeron una estimulación del crecimiento ovárico en distintas especies de camarones peneidos (Kulkarni *et al.*, 1979; Nagabhushanam *et al.*, 1980;

Yano, 1985). En *P. clarkii*, Rodríguez *et al.* (2002a) probaron el efecto de los esteroides 17α -progesterona y 17β -estradiol mediante dos inyecciones semanales, durante 3 semanas, a fines del periodo pre-reproductivo. Los resultados obtenidos confirman un aumento significativo del diámetro oocitario y del valor del IGS, por efecto de ambas hormonas. Los mismos efectos fueron reportados en el cangrejo *O. senex senex*, por Reddy *et al.* (2006) al ensayar dos dosis inyectables de PG (10^{-8} y 10^{-7} mol/ animal) complementándose además con un aumento en los niveles de Vg circulantes en hemolinfa.

En hembras adultas del cangrejo *C. granulata*, el crecimiento ovárico fue inducido por 17PG en los tres periodos de su ciclo reproductivo, a una dosis 10^{-8} mol/animal (Zapata *et al.*, 2003). Este efecto se manifestó tanto por medio de inyecciones como mediante la incorporación del esteroide al alimento suministrado.

Yano (1987) propuso una acción estimuladora de la PG sobre la secreción de Vg hacia la hemolinfa en *P. japonicus*. Los niveles séricos de esta lipoproteína aumentaron al inicio del periodo reproductivo, tras la inyección de una única dosis de la hormona en estudio. En la investigación realizada por Coccia *et al.* (2010) en hembras de *C. albidus*, se corrobora nuevamente el efecto de la inyección de estradiol y progesterona sobre la reproducción de esta langosta dulceacuícola. En este caso, la progesterona y sus metabolitos fueron capaces de incrementar la expresión de Vg en hepatopáncreas, así como su concentración en hemolinfa, al comienzo del periodo reproductivo.

Sin embargo, en el ensayo *in vivo* realizado en la presente Tesis durante el periodo post-reproductivo, no se obtuvieron diferencias significativas en los índices IGS

e IHS ni en el contenido de vitelina en ovario ni de vitelogenina en hepatopáncreas, tras el tratamiento con 17PG administrada en pellets. Durante el ensayo *in vivo* realizado, la concentración de vitelogenina en hemolinfa tampoco varió en los grupos tratados respecto a los controles.

Koskela *et al.* (1992) tampoco encontraron un incremento del IGS durante el periodo post-reproductivo, en este caso, en hembras inmaduras del langostino *Penaeus esculentus* inyectadas con 17PG. El período post-reproductivo representa en muchas especies de crustáceos decápodos una etapa de quiescencia reproductiva durante la cuál resulta muy difícil inducir la remaduración gonadal mediante la manipulación de estímulos ambientales (Waddy & Aiken, 2000). Durante esta etapa, tales especies destinan principalmente la energía disponible a procesos de crecimiento somático, dentro de un contexto fisiológico en el cuál el ovario sería refractario a ser estimulado por ciertas hormonas (Zapata *et al.*, 2003). Tal parece ser el caso de la progesterona, en la especie en estudio.

Además, en la presente investigación, la mortalidad de los animales en tratamiento con 17PG fue nula. Zapata *et al.* (2003) destacan también la mortalidad prácticamente nula de los individuos alimentados con pellets enriquecidos hormonalmente, en comparación con los que fueron inyectados. Éste último tratamiento produjo varias muertes ocasionadas probablemente por estrés de la manipulación y debido al efecto traumático de la propia inyección. Algo similar se observó en otros trabajos en los cuáles los animales fueron inyectados (Rodríguez *et al.*, 2002b). Este conocimiento resultó de gran importancia para elegir el tratamiento de administración de la hormona directamente en la alimentación, al ser éste es menos nocivo e

igualmente eficiente que la inyección. Por otra parte, el hecho de utilizar al alimento como vector para la administración hormonal resulta ser el único método utilizable para el tratamiento de un número importante de animales, que precisamente es el caso en los criaderos de langosta.

Efecto del antagonista encefalinérgico Naloxona

El efecto de los opiodes sobre la regulación de la maduración ovárica también fue estudiado *in vivo* en distintas especies de crustáceos decápodos. En el cangrejo *Uca pugilator* se realizaron ensayos de administración por vía inyectable con distintas concentraciones de met-enkefalina y naloxona. Sarojini *et al.* (1995) concluyeron que existe una acción inhibitoria de la met-enkefalina sobre el ovario, al disminuir el índice gonadomático y el diámetro oocitario en las hembras evaluadas. Correspondientemente, el inhibidor encefalinérgico naloxona fue capaz de estimular el crecimiento del ovario con todas las concentraciones ensayadas. Ensayos similares se realizaron en *P. clarkii* (Sarojini *et al.*, 1996) reafirmando las conclusiones anteriores sobre el rol fisiológico de los opiodes en crustáceos.

En *C. quadricarintus*, Cahansky *et al.* (2008) llevaron a cabo varios ensayos *in vivo*, consistentes en la administración de naloxona en la alimentación, durante el periodo post-reproductivo. Los pellets enriquecidos con este neuroregulador a una concentración de 10^{-9} mol/g de animal fueron suministrados dos veces por semana a las hembras en tratamiento durante trece semanas. Los resultados obtenidos en dicha investigación corroboran el efecto inductor del naloxona sobre el crecimiento del

ovario, al aumentar significativamente el diámetro oocitario en las hembras tratadas, respecto del control.

De manera concordante, en la presente investigación se observó un aumento del índice gondasomático tras 4 semanas de tratamiento *in vivo*, con una dosis de naloxona similar a la utilizada por Cahansky *et al.* (2008). Sin embargo, no se encontró un aumento del contenido de vitelina en ovario. Esto podría deberse a que la hormona estimulante gonadal (GSH) podría estar estimulando durante el periodo post-reproductivo la síntesis de proteínas ováricas diferentes a la vitelogenina, tal como se discutió en el Capítulo III. Otra posible causa que explicaría el aumento del índice gonadosomático sería un incremento de la permeabilidad al agua en la membrana oocitaria. Como consecuencia de esto, ocurriría un aumento de volumen celular y del peso total de ovario, tal como fue observado en otras especies animales durante el proceso de maduración ovárica (Ozu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012) ó bien, por efecto de distintas drogas, como es el caso, de ciertos esteroides (He *et al.*, 2006). En crustáceos decápodos, la naloxona podría causar el mismo efecto, aunque su acción no fue confirmada aún. Además, la regulación de la síntesis de vitelogenina dependería de la acción de más de una hormona, no sólo de la GSH, no existiendo, probablemente, durante el periodo post-reproductivo un contexto favorable en ese sentido. El hecho de que tampoco se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al contenido de Vg en hepatopáncreas estaría de acuerdo con las posibles hipótesis antes mencionadas.

Con respecto a los niveles de vitelogenina circulante, no se encontraron diferencias durante ni al final del ensayo, entre las hembras tratadas y controles. Este mismo patrón también fue observado en ensayos *in vivo* llevados cabo en hembras de *C.*

quadricarinatus, durante el período post-reproductivo, con administración de naloxona en el alimento (Cahansky, 2010).

Finalmente, se puede señalar, en base a los resultados obtenidos, que el antagonista encefalinérgico naloxona no estaría involucrado en la estimulación de la síntesis y/o secreción de vitelogenina en ovario ni hepatopáncreas de *C. quadricarinatus*, vía el sistema encefalinérgico, al menos durante el periodo post-reproductivo. De esta manera se rechaza la hipótesis de que este neuroregulador incrementaría, *in vivo*, el contenido de vitelina y vitelogenina durante ese período.

DISCUSIÓN GENERAL

En nuestro país los criaderos de la langosta *C. quadricarinatus* se encuentran ubicados en regiones templadas y subtropicales, por lo que el planteo de obtener crías para engorde fuera del período reproductivo normal, representaría para el productor una ganancia importante al poder mantener una oferta continua de animales durante todo año.

En la presente Tesis se desarrolló una técnica analítica para detectar el efecto estimulante de diversas hormonas y neuroreguladores sobre el potencial reproductivo de hembras de *Cherax quadricarinatus*, especialmente sobre los niveles de vitelina y vitelogenina. Las proteínas constituyentes del vitelo son la principal fuente de los nutrientes necesarios para el desarrollo de los oocitos y del embrión en animales ovíparos, entre los que se incluyen los crustáceos. Precisamente, la vitelogenina es una lipoproteína compleja, importante por ser la precursora de la vitelina, principal proteína formadora del vitelo (Meusy, 1980; Caharniaux-Cotton, 1985; Meusy & Payen, 1988; Serrano Pinto *et al.*, 2005). Los niveles de vitelogenina pueden emplearse como buenos indicadores del estado reproductivo de las hembras en muchas especies de crustáceos (Huberman 2000; Tsukimura, 2001; Tahara *et al.*, 2005) siendo una herramienta de alto valor agregado en las prácticas de acuicultura.

En la presente Tesis se logró de manera exitosa el aislamiento, purificación y caracterización de la vitelina, obteniéndose un anticuerpo útil para poner a punto la técnica de detección y cuantificación de la vitelogenina en hepatopáncreas y hemolinfa. Además se corroboró mediante una técnica inmunohistoquímica que el

ovario y el hepatopáncreas son sitios de síntesis de proteínas vitelogénicas en la langosta de pinzas rojas *C. quadricarinatus*.

Para cuantificar los niveles de vitelina y vitelogenina se puso a punto la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), empleada anteriormente en diversas especies de crustáceos de importancia comercial (Sagi *et al.*, 1999; Okumura *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Wider *et al.*, 2010). Previamente, se realizó el aislamiento y purificación de la lipoproteína vitelina a partir de ovarios de hembras adultas de *C. quadricarinatus*. La producción del anticuerpo primario anti-vitelina específico para la especie en estudio fue realizada satisfactoriamente. La técnica ELISA resultó ser altamente sensible y específica y permitió medir los niveles de la lipoproteína vitelogénica en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa.

Como se mencionó en la Introducción, las hembras de la langosta en estudio, presentan un ciclo reproductivo anual que consta de tres periodos: pre-reproductivo, reproductivo y post-reproductivo (Arredondo Figueroa *et al.*, 1994; Jones, 1995a; Jones & Ruscoe 1996; Barki *et al.*, 1997; Karplus *et al.*, 2003). En la presente Tesis, se estudió la variación anual, es decir, durante el ciclo reproductivo completo, de los niveles de vitelogenina en hemolinfa, ovario y hepatopáncreas en la especie *C. quadricarinatus* y su correlación con los índices gonadosomático y hepatosomático.

Algunos autores han determinado que el hepatopáncreas cumple un papel relevante en la vitelogénesis de *C. quadricarinatus*, como fuente extraovárica de Vg (Serrano Pinto *et al.* 2005), de manera similar a lo reportado para otros crustáceos (Quackenbush, 1994; Lee & Chang, 1997). Además, la correlación de los niveles

circulantes de Vg en hemolinfa con el IHS y con el contenido de Vg en HP evidencia la función relevante de la hemolinfa como medio de transporte de elevada capacidad entre el sitio de síntesis extraovárica y el ovario. El hepatopáncreas y el ovario están relacionados de manera directa entre sí, ya que al incrementarse la síntesis de vitelogenina en el primero, se estaría favoreciendo el aumento del contenido de vitelina en ovario, por incorporación de esta lipoproteína a los oocitos. Por lo tanto, la transferencia de las reservas energéticas desde el hepatopáncreas al ovario permiten activar y sostener el proceso de gametogénesis en las hembras de la especie en estudio, tal como se reportó en otros crustáceos (Abdu *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2000; Rodríguez-González *et al.*, 2006).

La concentración de vitelogenina circulante se ubicó dentro del intervalo reportado para otras especies de crustáceos (Quinitio *et al.*, 1994; Lee & Chang, 1997; Thuberty & Fingerman, 1998, Tsukimura *et al.*, 2000, 2001) mostrando un aumento significativo durante el período reproductivo medio. Este periodo corresponde precisamente a la época de mayor actividad reproductiva, en la cual el aporte de vitelogenina extraovárica es fundamental.

En muchas especies de crustáceos que presentan un patrón estacional de reproducción, las hembras son sensibles a la inducción o estimulación ovárica mediante técnicas de manipulación ambiental y/o endocrinológica (Waddy & Aiken, 2000; Stella *et al.*, 2000). De hecho, un objetivo central de la presente Tesis fue identificar tanto el período del ciclo como los inductores químicos que pueden estimular la síntesis de vitelogenina y vitelina en la especie en estudio, a dos niveles de estudio: *in vivo* e *in vitro*. Esta aproximación experimental provee de respuestas que luego pueden integrarse

de manera complementaria, contribuyendo así a una mejor comprensión del fenómeno en estudio.

Los reguladores ensayados, tanto *in vitro* como *in vivo*, como posibles inductores de la síntesis y secreción de la vitelogenina fueron metil farnesoato, 17 α -hidroxiprogesterona y naloxona. Adicionalmente, se ensayo el efecto *in vitro* de 17 β -estradiol.

El metil farnesoato, un terpenoide secretado por el órgano mandibular, ha sido asociado con la vitelogénesis secundaria y a la acumulación de vitelogenina en el ovario (Laufer *et al.*, 1987, 1993; Homola & Chang, 1997; Nagaraju, 2007). Al integrar los resultados de los ensayos realizados con MF durante la presente Tesis, se concluye que esta hormona logra estimular la síntesis proteica en ovario y específicamente la vitelogénesis. Mas aún, los resultados de la presente Tesis indican que el efecto del MF se manifiesta no sólo durante la vitelogénesis secundaria (ya que fue efectivo durante la época pre-reproductiva) sino también durante la fases tempranas de vitelogénesis, ya que también logró inducir la síntesis de vitelogenina, tanto *in vitro* como *in vivo*, durante el período post-reproductivo. Como ya se mencionó, durante este período el ovario se encuentra en quiescencia reproductiva, con un alto grado de refractariedad a estímulos tanto ambientales como hormonales. En este sentido, el metil farnesoato podría convertirse en una herramienta de gran relevancia para la producción continua de juveniles en criadero.

Esta potencial aplicación del MF como inductor en acuicultura se ve reforzada por el hecho de que no sólo evidenció un aumento *in vitro* de la vitelina (y de las

proteínas en general) en el ovario, sino que también indujo *in vivo* un aumento del índice gonadosomático y del contenido de vitelina en el ovario, durante el período de mayor refractariedad a la inducción, es decir, durante el post-reproductivo.

Existen evidencias que indican que distintos tipos de esteroides, identificados en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa, tendrían efectos sobre el ciclo reproductivo de los decápodos, a nivel de la maduración ovárica y la producción de vitelogenina (Quinitio *et al.*, 1994; Shih, 1997; Warriar *et al.*, 2001, Rodríguez *et al.*, 2002a; Zapata *et al.*, 2003). En cuanto a las hormonas esteroideas ensayadas *in vitro* en la presente Tesis, la 17 α -hidroxiprogesterona produjo un aumento del contenido de vitelina en ovario durante el periodo pre-reproductivo, mientras que la 17 β -estradiol tuvo igual efecto en el periodo reproductivo temprano. En el ensayo *in vivo* realizado en el periodo post-reproductivo, no se consiguió estimular la maduración ovárica con la 17 PG. Si bien no era esperable un efecto directo de la 17 PG, dado que los resultados *in vitro* llevados a cabo durante el mismo periodo tampoco mostraron inducción de la síntesis de Vn en el ovario, no se podía descartar *a priori* un posible efecto indirecto de la 17 PG que consistiese, por ejemplo, en estimular la secreción de alguna otra hormona o agente regulador durante el período post-reproductivo. Los resultados obtenidos llevaron finalmente a descartar esta última posibilidad.

Como se mencionó en la introducción, la reproducción en crustáceos se encuentra regulada no sólo por hormonas, sino también por factores neuronales (Subramonian, 2000). En particular, el desarrollo ovárico, se encuentra bajo el control de las hormonas inhibidora gonadal (GIH), secretada en los pedúnculos oculares, y la estimuladora gonadal (GSH) secretada en el cerebro y ganglio torácico (Sarojini *et al.*,

1996). De acuerdo a lo propuesto por Fingerman (1997), el ganglio torácico, a través de la secreción de GSH estimularía el crecimiento ovárico.

El efecto de la naloxona sobre varios procesos regulados por encefalinas ha sido reportado en crustáceos (Sarojini *et al.*, 1995; Sarojini *et al.*, 1996; Sarojini *et al.*, 1997; Cahansky *et al.*, 2010, Kishori & Reddy, 2003). Si bien ciertos neuropéptidos opioides inhiben la reproducción en crustáceos, al disminuir la tasa de secreción de GSH y/o aumentar la de GIH (Fingerman *et al.*, 1985; Fingerman & Kulkarni, 1991; Nagabhushanam, 1995; Reddy, 2000; Nagaraju, 2011), no se ha observado en la presente Tesis un efecto de la naloxona, antagonista de las encefalinas endógenas, sobre la síntesis de vitelogenina, aunque sí se observó un efecto estimulante de la naloxona sobre el aumento del índice gonadosomático *in vivo*.

En efecto, en el caso de *C. quadricarinatus*, la inducción de la síntesis y secreción de vitelogenina o vitelina mediante la administración de naloxona no fue lograda *in vitro* en ninguno de los periodos del ciclo reproductivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo *in vivo* realizado en el periodo post-reproductivo, en el cual, la administración de naloxona en el alimento tampoco logró estimular la síntesis y/o secreción de las proteínas vitelogénicas en ovario ni hepatopáncreas, ni aumentar los niveles circulantes de esta lipoproteína. Sin embargo, en el mismo ensayo *in vivo* sí se consiguió la inducción del crecimiento ovárico, en términos de un aumento del IGS en las hembras tratadas con naloxona. Este resultado coincide con el reportado por Cahansky *et al.* (2008). Por otra parte, Cahansky *et al.* (2011) han reportado que el naloxona produce un incremento *in vitro* de la síntesis proteica en el ovario de *C. quadricarinatus*, en términos de un aumento en la captación

de leucina marcada, durante el período post-reproductivo. Teniendo en cuenta todos estos resultados, es decir, los obtenidos en la presente Tesis y los derivados de los trabajos previos mencionados en la especie en estudio, se puede concluir que la hormona GSH, cuya secreción se encuentra estimulada en este caso por la naloxona, no estaría involucrada específicamente en la regulación de la vitelogénesis, aunque si podría estar estimulando la síntesis de otras proteínas ováricas, tal como se discutió en el Capítulo III (sección C).

En base a los resultados obtenidos y a investigaciones previas realizadas en crustáceos, se recomienda la administración vía alimento de: a) metil farnesoato como principal herramienta de manejo de la reproducción en hembras de *C. quadricarinatus*, durante los periodos pre y post-reproductivos; b) 17 α -hidroxiprogesterona a fin de aumentar la vitelogénesis en el periodo pre-reproductivo. Eventualmente, podría administrarse, de manera alternativa 17 β -estradiol durante las fases tempranas del ciclo reproductivo, para favorecer un mayor contenido de vitelina en ovarios.

Los resultados presentados en esta Tesis representan un avance en el conocimiento sobre la regulación endocrina de la reproducción de crustáceos, mas específicamente sobre el control de la síntesis y procesamiento de la vitelogenina. Desde el punto de vista aplicado, abren la posibilidad de instrumentar nuevos métodos para aumentar la producción de crustáceos de importancia comercial. La administración de hormonas en el alimento permitiría, de manera práctica, factible y no invasiva, obtener mayores porcentajes de hembras con buena calidad reproductiva, en términos de elevados contenidos de vitelogenina, capaz de aumentar la progenie fuera de la época estrictamente reproductiva. Esto constituiría una herramienta concreta de aplicación en

criaderos a fin de inducir el número de puestas, al adelantar el calendario reproductivo natural. Como consecuencia de esta modificación, podrían obtenerse juveniles de manera más o menos continua durante el año y que estuvieran en condiciones de ingresar a la fase de engorde en condiciones óptimas de temperatura y fotoperiodo.

CONCLUSIONES

- La técnica ELISA puesta a punto, previo aislamiento y purificación de la lipoproteína vitelina a partir de ovarios de hembras de *Cherax quadricarinatus*, resultó ser altamente sensible y específica y permitió medir exitosamente los niveles de proteínas vitelogénicas en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa.
- La concentración de vitelogenina circulante es máxima en el período reproductivo medio. Los niveles circulantes de Vg en hemolinfa correlacionan positivamente tanto con el IHS como con el contenido de Vg en hepatopáncreas.
- La correlación positiva entre el contenido de vitelogenina en ovario y en hepatopáncreas evidencian la relación directa entre ambos órganos, sugiriendo que, cuando se incrementa la síntesis de vitelogenina en el hepatopáncreas se favorece el aumento de vitelina en ovario, por incorporación de la Vg a los oocitos.
- La correlación entre el contenido de Vg en hepatopáncreas y el IHS indican que un IHS elevado es consecuencia de una mayor síntesis de vitelogenina en el hepatopáncreas.
- Los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que el metil farnesoato tiene un efecto estimulante sobre el ovario durante la maduración temprana del mismo e incluso podría inducir el desarrollo en un ovario en quiescencia reproductiva (período post-reproductivo), estimulando la síntesis endógena de vitelogenina. El efecto del MF también se manifiesta durante el período pre-reproductivo, cuando el proceso de vitelogénesis se intensifica.

- El MF no tendría efecto sobre la producción de vitelogenina en sitios extraováricos.

- Los resultados obtenidos *in vitro* indican que las hormonas esteroideas actúan directamente sobre el ovario, estimulando la vitelogénesis endógena durante el periodo pre-reproductivo ó reproductivo temprano.

- Mediante los tratamientos con Naloxona, se concluye que el sistema encefalinérgico no estaría involucrado directamente en el proceso de vitelogénesis aunque sí tendría efecto sobre la síntesis de otras proteínas ováricas.

- Ninguna patología reconocible se observó en ovarios ni hepatopáncreas de los animales tratados *in vivo* con las drogas empleados.

- La mortalidad y eventos de mudas no resultaron significativos en los grupos experimentales respecto al control.

En base a los resultados obtenidos se recomienda:

- el empleo de *alimento enriquecido* con **metil farnesoato** como principal herramienta de manejo de la reproducción en hembras de *C. quadricarinatus* en los Periodos **pre** y **post-reproductivo** y también en hembras de post-puestas para favorecer la re-maduración ovárica en época reproductiva.

- la aplicación de las hormonas esteroideas. **17 α -hidroxiprogesterona** y **17 β -estradiol** a fin de aumentar la vitelogénesis endógena en el periodo pre-reproductivo y/o durante las fases tempranas del ciclo reproductivo de modo tal de asegurar un alto contenido de vitelogenina en ovarios.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Abdu, U.; Yehezkel, G.; Sagi, A. 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and Development* 37: 75-83.
- Abdu, U.; A. Barki; I. Karplus; S. Barel; P. Takac; G. Yehezkel; H. Laufer; A. Sagi. 2001a. Physiological effects of methyl farnesoate and pyriproxyfen on wintering female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 202: 163-175.
- Abdu, U.; G. Yehezkel; S. Weil; T. Ziv; A. Sagi. 2001b. Is the unique negatively charged polypeptide of crayfish yolk HDL a component of crustacean vitelin?. *Journal of Experimental Zoology* 290: 218-226.
- Abdu, V.; C. Davis; I. Khalaila and A. Sagi. 2002. The vitellogenin cDNA of *Cherax quadricarinatus* encodes a lipoprotein with calcium binding ability and its expression is induced following the removal of the androgenic gland in a sexually plastic system. *General and comparative Endocrinology* 127: 263-272.
- Adiyodi, K.G.; R.G. Adiyodi. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biological Reviews* 45: 121-165.
- Ando, H.; Makioka, T. 1998. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Zoological Science* 15: 893-901.
- Anger, K. 2006. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction and Development* 49(3): 175–205.
- Arredondo Figueroa, J., Sanchez Inclán A., Palafox J. y Campos Verduzco R., 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la langosta de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*). Subsecretaria de Pesca, Dirección general de Acuicultura, 85 pp. México.
- Austin, C.M. 1992. Preliminary pond production of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* in the Central United States. *Journal of Applied Aquaculture* 1(4): 93-102.

-
- Avarre, J.C.; R. Michelis; A. Tietz; E. Lubzens. 2003. Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary dnas. *Biology of Reproduction* 69: 355-364.
- Balusbramanian C.P.; I.J.Fierro; B. Tsukimura. 2010. Stimulation of ovarian growth by methyl farnesoate and eyestalk ablation in pennaeoidean model shrimp *Sicyonia ingentis* Burkenroad, 1938. *Aquaculture Research* 41: 1887-1897.
- Bauer, R.T., 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 6: 313–325
- Barki, A.; T. Levi; G. Hulata; I. Karplus. 1997. Annual cycle of spawning and molting in the red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under laboratory conditions. *Aquaculture* 157: 239-249.
- Barki, A.; I. Karplus. 1999. Mating behavior and a behavioral assay for female receptivity in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology* 19 (3):493-497.
- Barki, A.; I. Karplus. 2000. Crowding female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under small-tanks hatchery conditions: what is the limit?. *Aquaculture* 181:235–240
- Bilgin, S.; O. Samsun. 2006. Fecundity and Egg Size of Three Shrimp Species, *Crangon crangon*, *Palaemon adspersus*, and *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda: Caridea), off Sinop Peninsula (Turkey) in the Black Sea. *Turkish Journal of Zoology* 30: 413-421.
- Braga, A.A.; L.S. López Greco; D.C. Santos; A.Fransozo. 2009. Morphological evidence for protandric simultaneous hermaphroditism in the caridean *Exhippolysmata oplophoroides*. *Journal of Crustacean Biology* 29(1): 34–41.
- Bryant, A.D.; R.G. Hartnoll. 1995. Reproductive investment in two spidercrabs with different breeding strategies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 188: 261-275.
- Brusca, R. C.; G.J. Brusca. 2005. *Invertebrados* 2da ed. McGraw-Hill Interamericana: 1005 pp.
- Bueno, S.L.S.; R.M. Shimizu. 2008. Reproductive biology and functional maturity in females of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura: Aegliidae). *Journal of Crustacean Biology*, 28(4): 652–662.

Bugnot, A. B.; L.S. López Greco. 2009. Sperm production in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture* 295 292–299.

Burton, E.M. & Mitchell, B.D. 1987. Moulst staging in the Australian freshwater crayfish, *Cherax albidus* Clark and *Cherax destructor* Clark (Decapoda: Parastacidae), via uropod setal development. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 38, 545-552.

Cahansky, A.V., López Greco, L.S., Rodríguez, E.M., 2002. Inducción de crecimiento ovárico en *Cherax quadricarinatus*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (www.civa2002.org), pp. 720-724.

Cahasny, A.; López Greco, L., Rodríguez, E.M., 2003. Incremento de la producción de hembras ovígeras de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* durante período reproductivo, mediante la administración de hormonas y neuroreguladores. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (www.civa2003.org), pp. 512-517.

Cahansky, A.; B. Dutra; D. Castiglioni; G. Oliveira; G. Bond-Buckup; E. Rodriguez. 2008a. Induction of ovarian growth in *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae) by means of neuroregulators incorporated to food. *Revista de Biología Tropical* 56: 1201-1207

Cahansky, A.; D.A. Medesani; E.M. Rodríguez. 2008b Induction of ovarian growth in the red clan crayfish, *Cherax quadricarinatus*, by the enkephalineric antagonist naloxona: *in vivo* and *in vitro* studies. *Invertebrate Reproduction and Development* 51(2): 61-67.

Cahansky, A.V. 2010. Inducción del crecimiento ovárico en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, mediante la administración de antagonistas dopaminérgicos y encefalinérgicos. Tesis Doctoral. FCEN, Universidad de Buenos Aires. 126pp.

Cahansky, A.; D.A. Medesani; A. Chaulet; E.M. Rodríguez. 2011. *In Vitro* effects of both dopaminergic and enkephalineric antagonist on the ovarian growth of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae) at different periods of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A* 158: 126-131.

- Calado, R.; M.T. Dinis. 2007. Minimization of precocious sexual phase change during culture of juvenile ornamental shrimps *Lysmata seticaudata* (Decapoda: Hippolytidae). *Aquaculture* 269: 299–305.
- Calvo, N.S.; L. Stumpf; S. Pietrokovsky; L.S. Lopéz Greco. 2011. Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopáncreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 319: 355-362.
- Campaña Torres, A.; Martínez Córdoba, L.R., Villarreal Colmenares, H.; Civera Cerecedo, R. 2005. *In vivo* dry matter and protein digestibility of three plant derived and four animal derived feedstuffs and diets for juvenile Australian redclaw, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 250:748-754.
- Campaña Torres, A.; Martínez Córdoba, L.R.; Villarreal Colmenares, H.; Civera Cerecedo, R. 2006. Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition* 12:103-109.
- Carmona–Osalde, C.; Rodríguez-Sernab, M.; Olvera-Novooa, M.A.; Gutierrez-Yurrita, P.J. 2004. Gonadal development, spawning, growth and survival of the crayfish *Procambarus llamasi* at three different water temperatures. *Aquaculture* 232: 305–316
- Chang, E.S. 1983. Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. *Annual Review of Entomology*. 38: 161-180.
- Chang, E.S 1987. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. *In* Recent advances in marine biotechnology. Fingerman, Nagabhushanam & Thompson (eds). New Delhi, India Oxford & IBH Publishing Co. Vol. I: 163-178.
- Chang, E. S. Comparative endocrinology of molting and reproduction: Insects and Crustaceans. *Annual Review of Entomology* 38: 161-180.
- Chang, C.F.; F.Y. Lee, Y.S. Huang 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 105: 409–414.

-
- Chalet, A.; López Greco, L.S.; Rodríguez, E.M. 2006. Induction of somatic growth in juveniles of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*, by ecdysone added to different diets. *Tópicos Especiais em Biología Acuática e Aqüicultura II*. Capítulo 27.
- Charmantier G., M. Charmantier- Daures, F. Van Herp. 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. *In* Recent advances in marine biotechnology. Fingerman, Nagabhushanam & Thompson (eds). New Delhi, India. Oxford & IBH Publishing Co. Vol. I: 109-161.
- Charniaux Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoology* 25: 197-206.
- Charniaux Cotton, H.; G. Payen. 1988. Crustacean reproduction. *In* : H. Laufer, R.G.H Downer (eds). *Endocrinology of selected invertebrate types*. Alan R. Liss, New York. Pp: 279-303.
- Chen, Y. N.; Fan, H. F.; Hsieh, S. L.; Kuo, C. M. 2003. Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 228:383-395.
- Chen, L.; H. Jiang; Z. Zhou; K. Li; K. Li; G.Y. Deng; Z. Liu. 2004. Purification of vitellin from the ovary of chinese mitten- handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an antivitelin ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 138: 305-311.
- Chu, K.H. 1995. Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from de Zhujiang Estuary, China. *Journal of Crustacean Biology* 15(2): 214-219.
- Chung, J.S; N. Zmora; H. Katayama; N. Tsutsui. 2010. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology* 166: 447-454
- Coccia, E.; E. De Lisa; C. Di cristo; A. Di Cosmo; M. Paolucci. 2010. Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus*. *The Biological Bulletin* 2187: 36-47.
- Cooke, I.M.; R.E. Sullivan. 1982. Hormones and Neurosecretion. *In* *The Biology of Crustacea*. Bliss, Atwood & Sandeman (eds). Academic Press, New York. Vol. 3: 205-290.

Correa C.; M.Thiel. 2003. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 187-203.

Cortés Jacinto, E.; Villarreal Comenares, H.; Civera Cerecedo, R.; Martínez Córdoba, R. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastadidae). *Aquaculture Nutrition* 9:207-213.

Cortés--Jacinto, E.; H. Villarreal-Colmenares; R. Civera-Cerecedo; J Naranjo-Paramo. 2004. Effect of dietary protein level on the growth and survival of pre-adult freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) in monosex culture. *Aquaculture Research* 35: 71-79.

Cortés-Jacinto, E.; Villarreal-Colmenares, H.; Cruz-Suárez, L.; Civera-Cerecedo, R.; Nolasco-Soria, H.; Hernández-Llamas, A. 2005. Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Nutrition*. 11: 283-291.

Cortés-Jacinto, E.; A.I. Campa- Córdoba; F. Ascencio; H. Villarreal-Colmenares; R.J. Holguín-Pena. 2009. The effect of protein and energy levels in diet on the antioxidant activity of juvenile redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868). *Hidrobiológica* 19 (2): 77-83.

Courtney, A.J.; S.S. Montgomery; D.J. Die; N.L. Andrew; M.G. Cosgrove; 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. *Marine Biology*. 122: 547-556.

Daniels, H.; D'abramo, L.; Graves, K. 1994. Ovarian developmental of females red swamp crayfish (*Procambarus clarki*) as influenced by temperature and photoperiod. *Journal of Crustacean Biology* 14: 530-537.

Da Silva Castiglioni, D.; Cahansky, A.V.; Rodríguez, E.M.; kaiser Dutra, B.; Torcato Oliveira, G.; Bond-Buckup, G. 2009. Indução do crescimento ovariano em *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Anomura, Aeglidae) mediante a incorporação de neuroreguladores ao alimento. *Iheringia Série Zoologia*: 286-290.

Dehn, P.F; D.E. Aiken; S.L. Waddy. 1983. Aspects of vitellogenesis in the lobster *Homarus americanus*. Canadian Techniques of Reproduction Fisheries and Aquatic Sciences 1161 pp 24.

De Kleijn, D.P.V.; Van Herp, F. 1998. Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 33: 263-272.

Dhainaut, A. & De Leersnyder, M., 1976. Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire du crabe *Eriocheir sinensis*. I. Ovogenèse naturelle. *Archives of Biology*. 87: 261-282.

Díaz F.; G. Escalante; A.D. Re; E. Sierra. 2006. Physiological energetics of *Cherax quadricarinatus* (von Martens) feed with two diets and exposed to constant and fluctuating temperatures. *Hidrobiológica* 16 (1): 35-44.

Ding X.; G.P.C. Nagaraju; D. Novotney; D.L. Lovett; D.W. Borst. 2010. Yolk protein expression in the green crab, *Carcinus maenas*. *Aquaculture* 298: 325–331

Dreon, M.S.; H. Heras; R.J.Pollero. 2003. Metabolism of ovorubin, the major egg lipoprotein from the apple snail. *Molecular and Cellular Biochemistry* 243: 9-14.

Eastman- Reeks; S. H. ; M. Fingerman. 1985. In vitro synthesis of vitellin by de ovary of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Journal of Experimental Zoology* 233:111-116.

Elorza A, Dupré E (1999) Arquitectura del ovario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis*. *Investigaciones Marinas* 28: 175-194.

Fairs, N.J.; R.P. Evershed; P.T. Quinlan; L.J. Goad. 1989. Detection og unconjugated and conjugated steroids in the ovary eggs and haemolymph of the decapod crustacean *Nephrops norvegicus*. *General and Comparative endocrinology* 4:199-208.

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

FAO. 2010. *Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2010*. Roma, FAO: 219pp.

Federici M.; M. Hribal; L. Perego; M. Ranalli; Z. Caradonna; C. Perego; L. Usellini; R. Nano; P. Bonini; F. Bertuzzi; L.N. Marlier; A.M. Davalli; O. Carandente; A.E. Pontiroli; G. Melino; P. Marchetti; R. Lauro; G. Sesti; F. Folli. 2001. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50(6):1290-301.

Fernández, M.A.S.; Mendonca, M.I.R.; Marques, J.C.; Madeira, V.M.C. 1996. Seasonal changes in the biochemical composition and energy content of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (girard) in the lower Mondego river valley, Portugal. *Journal of Crustacean Biology* 14: 736-743.

Ferré, L.E.; D.A. Medesani; M. Grodzielski; C.F. García; E.M. Rodríguez. 2012. Vitellogenin levels in hemolymph, ovary and hepatopancreas of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*, during the reproductive cycle. *Revista Biología Tropical/ International Journal of Tropical Biology* Vol. 60 (1): 253-261.

Fingerman, M.; Hunumante, M.; Kulkarni, G.; Ikeda, R.; Vacca, L. 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 and Tissue Research* 241: 473-477.

Fingerman, M.; K. Kulkarni. 1991. *Biologically Active Peptides of Crustacean Nervous System: Their Roles as Neurohormones, Neurotransmitters and neuromodulators*. Eds: Thompson M, Sarojini R,

Fingerman, M.; R. Nagabhushanam. 1992. Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 102 (3): 343-352.

Fingerman, M.; R. Nagabhushanam; R. Sarojini. 1993. Vertebrate-type hormones in crustaceans: localization, identification and functional significance. *Zoology Science*. 10: 13-29.

Fingerman, M.; R. Nagabhushanam; R. Sarojini; P.S. Reddy. 1994. Biogenic amines in crustaceans: identification, localization and roles. *Journal of Crustacean Biology* 14 (3):413-437.

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

Fingerman M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 31:47-54.

Fingerman, M.; R. Nagabhushanam. 1997. Roles of neuroregulators in controlling the release of the growth and reproductive hormones in crustacea. *In Recent advances in Marine Biotechnology*. Fingerman, Nagabhushanam, Thompson (eds) Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi. Volume 1:179-201.

García, F.; M.R. González- Baró; H. Garda; M. Cunningham. R. Pollero. 2004. Fenitrothion-induced structural and functional perturbations in the yolk lipoproteins of the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* Vol 39 (4): 389-396.

García, C.F.; M. Cunningham; J.L. Soluages; H.A. Garda; R. Pollero. 2006. Structural characterization of the lipovitellin from the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 145: 365-370.

García, F., M.L. Cunningham; H. Garda; H. Heras. 2008. Embryo lipoproteins and yolk lipovitellin consumption during embryogenesis in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 151: 317-322.

García, F.; M.R. González- Baró; H. Garda; M. Cunningham. R. Pollero. 2004. Fenitrothion-induced structural and functional perturbations in the yolk lipoproteins of the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* Vol 39 (4): 389-396.

García-Guerrero, M.; I.S. Racotta; H. Villareal. 2002. Variation in lipid, protein and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 23(1):1-6.

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

Grant, A.; P.A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6: 259-269.

Gregati, R.A.; V. Fransozo; L.S. López-Greco; M. L. Negreiros-Fransozo. 2010. Reproductive cycle and ovarian development of the marine ornamental shrimp *Stenopus hispidus* in captivity. *Aquaculture* 306: 185–190.

Gu H.; P.B. Mather; M.F. Capra. 1995. Juvenile growth performance among stocks and families of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture* 134: 29-36

Gu, P.; S. Tobe; B. Chow; K. Chu; J. Ke; S. Chan. 2002. Characterization of an additional molt inhibiting hormone- like neuropeptide from the shrimp *Metapenaeus ensis*. *Peptides* 23: 1875-1883.

Gutiérrez, M.L.; E. M. Rodríguez. 2010. Effect of protein source on growth of early juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Freshwater crayfish* 17: 23-29.

Harlow, E. Lane, D. 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1-726.

Hartnoll, R.G.; A.D. Bryant. 2001. Growth to maturity of juveniles of the spider crabs *Hyas coarctatus* Leach and *dorsettensis* (Pennant) (Brachyura: Majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263:143-158.

Harrison, K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shellfish Research* 9 (1):1-28.

Hernández P.V.; M.A. Olvera-Novoa; D.B. Rouse. 2004. Effect of dietary cholesterol on growth and survival of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 236: 405– 411

Heer, T.; C. Yovanovich; A. Pozzi; D.A. Paz. (2008). Galanin: presence and distribution in the brain and pituitary of *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) during development. *Tissue & Cell* 40: 333-342.

Hickman, C.P.; A. Larson; L.S. Roberts; H. I 'Anson; D.J Eisenhour. 2009. *Principios integrales de zoología*. 14a. ed. McGraw-Hill: 917pp

Hinsch, G.W. 1980. Effect of mandibular organ implants upon spider crab ovary. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 99: 317- 322.

Hobbs Jr. H.H; .M.C. Harvey; H.H. Hobbs III. 2007. *A Comparative Study of Functional Morphology of the Male Reproductive Systems in the Astacidea with Emphasis on the Freshwater Crayfishes* (Crustacea: Decapoda). Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington D.C.

Homola, E.: E.S. Chang. 1997. Methyl Farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 117 (3): 347-356.

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191: 191-208.

Huner, J.V. & O.V. Linqvist. 1991. Special problems in freshwater crayfish egg production. *In: Crustacean Egg Production*. Wenner & Kuris (Eds.). A-A. Balkema, Rotterdam: 236-246.

Icely, J.D.; J.A. Nott. 1992. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. *In: Microscopic Anatomy of invertebrates*. Wiley –Liss (Eds). 147-201

Introzzi, A.R.; G. Duhalde de Introzzi. 1986. Estudio de las concentraciones de los ácidos nucleicos (RNA/DNA) en el músculo blanco e hígado de la lisa (*Mugil brasiliensis*) a lo largo de sus períodos de reposo y maduración gonadal. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 6: 117-129.

Ikuta, K.; T. Makioka. 1997. Structure of the adult ovary and oogenesis in *Argulus japonicus thiele* (Crustacea: Branchiura). *Journa. Of Morphology* 231: 29-39.

Jasmani S.; T. Ohira; V. Jayasankar; N. Tsutsui; K. Aida; M.N. Wilder. 2004. Localization vitellogenin mRNA expression and vitellogenin uptake during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Experimental Zoology*. 301A: 334-343.

Johnson, P.T. 1980. *Histology of the blue crab Callinectes sapidus*. Prager publishers, New York, USA:440pp.

Jones, C.M. 1990. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Queensland: Department of primary Industries Information Series QI90028. 109 pp.

Jones, C.M., 1995a. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae). I. Development of hatchery and nursery procedures. *Aquaculture* 138: 221-238.

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

-
- Jones, C.M. 1995c. Production of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae). III. Managed pond production trials. *Aquaculture* 138:247–255.
- Jones, C.M.; I.M. Ruscoe. 1996. Production Technology for Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Final Report FRDC Projec 92/119. Fisheries Research and Development Corporation, Canberra.
- Jones, C.M.; I.M. Ruscoe. 2000. Assessment of stocking size and density in the production of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae), cultured under earthen pond Conditions. *Aquaculture* 189: 63-71.
- Jones, C.M.; I.M. Ruscoe. 2001. Assessment of Five Shelter Types in the Production of Redclaw Crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) Under Earthen Pond Conditions. *Journal of the World Aquaculture Society* 32 (1): 41-52.
- Kamio, M.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. 2000. Studies on Sex Pheromones of the Helmet Crab, *Telmessus cheiragonus* 1. An Assay Based on Precopulatory Mate-Guarding. *Zoological Science* 17: 731–733.
- Karplus I.; M. Zoran; A. Milstein; S. Harpaz; Y. Eran; D. Joseph; A. Sagi. 1998. Culture of the Australian red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* in Israel III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures. *Aquaculture* 166: 259–267
- Karplus, I.; Gideon, H. ,Barki, A. 2003. Shifting the natural spring-summer breeding season of the Australian freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* into the winter by environmental manipulations. *Aquaculture* 220: 277-286.
- Karplus I.; A. Barkii. 2004. Social control of growth in the redclaw crayfish. *Cherax quadricarinatus*: testing the sensory modalities involved. *Aquaculture* 242: 321–333
- Khalaila I.; S. Weil; A. Sagi. 1999. Endocrine balance between male and female components of the reproductive system in intersex *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Experimental Zoology* 283: 286-294.

Khalaila, I. R. Manor, S. Weil; Y. Granot; R. Keller; A. Sagi. 2002. The eyestalk–androgenic gland–testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology* 127: 147–156

Khalaila, I.; J. Peter- Katalinic; C. Tsang; C.M. Radcliffe; E.D. Aflalo; D.J. Harvey; R.A. Dwek; P.M.Rudd; A. Sagi.2004. Structural characterization of the N-glycan moiety and site of glycosylation in vitellogenin from the decapod crustacean *Cherax quadricarinatus*. *Glycobiology* 14(9): 767-774.

King, C.R. 1994. Growth and survival of redclaw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture* 122: 75-80.

Kishori, B.; P. Reddy. 2003. Influence of leucine – enkephalin on moulting and vitellogenesis in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex* (Fabricius, 1791) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana* 76: 1281-1290.

Koskela, R.W.; J.G. Greenwood; P.C. Rothlisberg. 1992. The influence of prostaglandin E2 and the steroid hormones, 17 α -hydroxyprogesterone and 17 β -estradiol on moulting and ovarian development in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell, 1879 (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 101 (2): 295-299.

Krol R, Hawkins W, Overstreet M (1992) Reproductive Components. *In: Harrison FW and Humes AG (eds) Microscopic Anatomy of the Invertebrates*, Willey-Liss, New York, pp 295-343.

Kruevaisayawan H.; R. Vanichviriyakit; W. Weerachayanukul; B. Withyachumnarnkul; J. Chavadej; P. Sobhon. 2010. Oogenesis and formation of cortical rods in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 301:91–98.

- Kulkarni, G.K.; R. Nagabhushanam; P.K. Joshi. 1979. Effects of progesterone on ovarian maturation in a marine penaeid prawn *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers, 1878). *Indian Journal of Experimental Biology*. 17: 986- 987.
- Kulkarni, G.K.; Glade, L.; Fingerman, M. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Journal of Crustacean Biology* 11: 513-521.
- Lafont, R. & M. Mathieu. 2007. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 109-130.
- Laubenheimer, H.; A.I. Rhyne. 2008. Experimental confirmation of protandric simultaneous hermaphroditism in a Caridean shrimp outside of the genus *Lysmata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88(2): 301–305.
- Laufer, H.; D. Borst; F.C. Baker; C. Carrasco; M. Sinkus; C.C. Reuter; L.W. Tsai; D.A. Schooley. 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235: 202–205.
- Laufer, H.; J.S.B. Ahl; E. Homola. 1992. Methyl Farnesoate appears to be a crustacean reproductive hormone. *Invertebrate Reproduction Development*. 22 (1-3): 17-20.
- Laufer, H.; J.S.B Ahl; A. Sagi. 1993. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *American Zoologist* 33: 365–374.
- Laufer, H.; A. Sagi; J.S.B. Ahl. 1994. Alternate mating strategies of polymorphic males of *Libinia emarginata* appear to depend on methyl farnesoate. *Invertebrate Reproduction Development* 23(1): 41-44.
- Laufer, H. W.J. Biggers; J.S.B. Ahl. 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *General and Comparative Endocrinology* 111: 13-118.
- Laufer, H.; W.J. Biggers. 2001. Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post- embryonic development. *American Zoology* 41: 442-457.
- Lawrence, C.; Jones, C. 2002. *Cherax*. In *Biology of freshwater crayfish*, Holdrich D, eds. Nottingham. Blackwell Science: 635-669.

-
- Lee, C.Y.; D. Watson. 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 271: 364-372.
- Lee, F.Y.; C.F. Chang. 1997. The concentration of vitellogenin (Vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 117: 433-439.
- Lee F.Y.; T.W Shih; C.F. Chang 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Comparison with ovarian vitellin. *General Comparative Endocrinology*. 108: 406–415.
- Lee, R.F.; D.L. Puppione. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: lipoprotein II associated with vitellogenesis. *Journal of Experimental Zoology* 248: 278. 289.
- Lee, R.F.; A. Walker. 1995. Lipovitelin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology*. 271: 401-412.
- Levi, T.; A. Barki.; G. Hulata.; I Karplus. 1999. Mother-offspring relationship in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology*, 193: 477-484.
- Li, K.; C. Liqiao; Z. Zhou, E. Li; X. Zhao; H. Guo. 2006. The site of itellogenin synthesis in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 143: 453–458.
- Lindgren, F. 1975. Preparative ultracentrifugal laboratory. *Ed by PERKNs E. G. pp. 204-224. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL.*
- Liñán- Cabello, M.A.; J. Paniagua- Michel; P.M. Hopkins. 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustacean. *Aquaculture Nutrition* 8: 299-309.

-
- Liñán- Cabello, M.A.; J. Paniagua- Michel; T. Zenteno- Savín. 2003. Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 9: 383-389.
- Liñán- Cabello, M.A.; R. Medina- Zendejas; M. Sanchez- Barajas; A. Mena Herrera. 2004. Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research* 35: 905-911.
- Lopez Greco, L.; V.S. Stella; E.M. Rodriguez. 1997. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine*. 40: 155-164.
- López Greco, L.S.; F.J. Vázquez, E.M. Rodríguez, E., 2007. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoolica* 88, 223–229.
- López Greco, L.S., F.L. Lo Nostro. 2008. Structural changes of the spermatophore in the freshwater “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoolica* 89, 149–155.
- Lowry, O.H.; N.J. Rosebrough; A.R. Farr; R.J. Randal, 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Luchini, L. 2004. Perspectivas en acuicultura, nivel mundial, regional y local. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura, Buenos Aires, Argentina. 96 p.
- Luchini L.; S. Panné Huidobro. 2008. Perspectivas en Acuicultura: nivel mundial, regional y local. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura, Buenos Aires, Argentina. 96 p.
- Lui, C.W.; J.D. O’ Connor. 1976. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. II Characterization of and in vitro incorporation of amino acids into the purified subunits. *Journal of Experimental Zoology*. 195: 41-52.

-
- Mak, A.S.C., Choi, C.L., Tiu, S.H.K., Hui, J.H.L., He, J.G., Tobe, S.S. & Chan, S.M. 2005. Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression. *Molecular Reproduction and Development* 70: 288–300
- Makinouchi, S.; Primavera, H. 1987. Maturation and spawning of *Penaeus indicus* using different ablation methods. *Aquaculture* 62:73–81.
- Marsden, G.; D. Hewit; E. Boglio; P. Mather; N. Richardson. 2008. Methyl Farnesoate inhibition of late stage ovarian development and fecundity reduction in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 280:242-246.
- Marzari, R.; E.A. Ferrero. 1989. Yolk proteins in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda). *In* *Biology of stomatopods*. Ferrero (eds). Muchi, Modena: 161-177.
- McPhee; C.P.; C.M. Jones; S.A. Shanks. 2004. Selection for increased weight at 9 months in redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 237: 131-140.
- Meng, Y.; E. Zou.2009. Impacts of molt-inhibiting organochlorine compounds on epidermal ecdysteroid signaling in the fiddler crab, *Uca pugilator*, in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*: 436–441
- Meusy, J.J. 1980. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in crustacea: a review. *Reproduction Nutritional Development* 20 (1A): 1-21.
- Meusy, J.J.; Charniaux-Cotton, H. 1984. endocrine control of vitellogenesis in malacostraca crustaceans. *Advances in Invertebrates Reproduction* 3: 231-241
- Meusy, J.J.; G.G. Payen. 1988. Female Reproduction in Malacostracan Crustacea. *Zoological Science* 5: 217.265.
- Muzinic, L.A.; K.R. Thompson; A. Morris; C.D. Webster; D.B. Rouse; L. Manomaitis. 2004. Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and brewer's grains with yeast in practical diets for Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 230: 359–376

Mykles, D.L. 2010. Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jsbmb.2010.09.001

Nagabhushanam R.; P. K. Joshi; G.K. Kulkarni. 1980. Induced Spawning in Prawn *Parapenacopsis stylifera* (H. Milne Edwards) using a steroid hormone 17 hidroxy progesterone. *Indian Journal of Marine Sciences* 9 (8): 227pp.

Nagabhushanam R. 1995. Bioactive compounds from marine organism. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, India:237-242.

Nagaraju, G.P.C.; N.J. Suraj; P.S. Reddy. 2003. Methyl Farnesoate Stimulates Gonad Development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae) *Crustaceana*, 76 (10):1171-1178.

Nagaraju, G.P.C.; P.R..Reddy; P.S. Reddy. 2006. In vitro methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of the crab *Oziotelphusa senex senex*. *Fisheries Science*. 72:410-414.

Nagaraju, G.P.C. 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone ?. *Aquaculture* 272: 39-54.

Nagaraju, G.P.C. 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *Journal of Experimental Biology* 214: 3-16.

Naranjo-Páramo, J.; A. Hernandez-Llamas; Humberto Villarreal. 2004. Effect of stocking density on growth, survival and yield of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in gravel-lined commercial nursery ponds. *Aquaculture* 242: 197–206

Navakanitworakul, R.; P. Deachamag; M. Wonglapsuwan; W. Chotigeat. 2012. The roles of ribosomal protein S3a in ovarian development of *Fenneropenaeus merguensis* (De Man). *Aquaculture*: doi:10.1016/j.aquaculture.2012.01.024

Noro, C.; López-Greco, L.S.; Backup, L. 2008. Gonad morphology and type of sexuality in *Parastacus defossus* Faxon 1898, a burrowing, intersexed crayfish from southern Brazil (Decapoda: Parastacidae). *Acta Zoologica* 89: 59–67.

Okumura, T.; C.Han; Y. Suzuki; K.Aida; I. Hanyu. 1992. Changes in hemolymph vitellogenin and ecdisteroid levels during the reproductive and non- reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Zoological Science*. 9:37-45.

Okumura, T. 2004. Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *Japan Agricultural Research Quarterly* 38 (1): 49-54.

Okumura, T.; K. Yoshida; H. Nikaido. 2004. Ovarian development and hemolymph vitellogenin levels in laboratory maintained protandric shrimp *Pandalus hypsinotus*: measurement by a newly developed time resolved fluorimnuoassasy (RF- FIA). *Zoological Science* 21: 1037- 1047.

Okumura, T.; K. Yamano; K. Skiyama. 2007. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation and oviposition in female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 147: 1028-1037.

Okuno, A.; H. Katayama; H. Nagasawa. 2000. Partial characterization of vitellin and localization of vitellogenin production in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126: 397–407.

Okuno, A.; W.J. Yang; V. Jayasankar; H. Saido.-Sakanaka; D. T. T. Huong; S. Jasmani; M. Atmomarsono; T. Subramoniam; N. Tsuitsui; T. Ohira; I. Kawazoe; K. Aida; M. N. Wilder. 2002. Deduced Primary Structure of Vitellogenin in the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Yolk Processing During Ovarian Maturation. *Journal of Experimental Zoology* 292:417–429.

Palacios, E.; A.M. Ibarra; I.S. Racotta. 2000. Tissue Biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond- reared *Penaeus vannamei* broodstok. *Aquaculture* 185: 353-371.

Parnes, S.; A. Sagi. 2002. Intensification of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* culture I. Hatchery and nursery system. *Aquacultural Engineering* 26: 251-262.

Paulus, J. & H. Laufer. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda Brachyura). *International Journal of Invertebrate Reproduction Development* 11: 29-44.

Phlippen, M.K.; S.G. Webster; J.Sooek Chung; H. Dircksen. 2000. Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph. *Journal of Experimental Biology* 203:521-534

Prymaczok, N.C; Medesani, D.A.; Rodríguez, E.M. 2008. Levels of ions and organic metabolites in the adult freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, to different experimental salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41: 121-130.

Quackembush, L.S. 1991. Regulation of vitellogenesis in Penaeid Shrimp. *Frontiers in shrimp Research*. DeLoach, P.; W.J. Eds: Dougherty and M.A. Davidson: 125-140.

Quinitio, E.; A. Hara; K. Yamauchi; S. Nakao. 1994. Changes in the steroid hormona and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp *Penaesu monodon*. *Comp. Bioch. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 109: 21-26.

Racotta, I.S.; E. Palacios; A.M. Ibarra.2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227: 107–130.

Reddy, P.S. 2000. Involment of opioid peptides in the regulation of reproduction in the prawn *Penaeus indicus*. *Naturwissenschaften* 87: 535-538.

Reddy.P.S.; R. Ramamurthi. 1998. Methyl farnesoate stimulates ovarian maturation in fresh water crab *Oziotelphusa senex senex* Fabricius. *Current Science* 74: 68-70.

Reddy, P.R.; P Kiranmayi; K. Kumari; P.S. Reddy 2006. 17α - hydroxyprogesterone induced ovarian grwth and vitellogenesis in the freshwater rice field crab *Oziotelphusa senex senex*. *Aquaculture* 254: 768-775.

Rey Vázquez, G., Meijide, F.J.; R.H. Da Cuña; F.L. Lo Nostro; Y.G. Piazza; P.A. Babay; V.L. Trudeau; M.C. Maggese and Guerrero, G.A. 2009. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 150: 298-306.

Reynolds, J.D. 2002. Growth and Reproduction. *In: Biology of freshwater crayfish*. Holdich D (Eds). *Biology of freshwater crayfish*. Nottingham: Blackwell Science: 152-191.

Richardson, H.G.; Deecaraman, M.; Fingerman, M. 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 99: 53-56.

Rodgers; L.J.; P.I. Saoud, D.B. Rouse. 2006. The effects of monosex culture and stocking density on survival, growth and yield of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in earthen ponds. *Aquaculture* 259: 164–168

Rodríguez, E.; López Greco, L.; Medesani, D.; Laufer, H.; Fingerman, M. 2002a. Effects of methyl farnesoato, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 125: 34-40.

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

Rodríguez- González, H.; A. Hernández-Llamas; H. Villareal; P- Saucedo; M. García- Ulloa; C. Rodríguez- Jaramillo. 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the gonadasomatic index at first maturation. *Aquaculture* 254: 637-645.

Rodríguez- González, H.; Villarreal, H.; García-Ulloa, H.; Hernández-Llamas, A. 2009a. Dietary Lipid Requirements for Optimal Egg Quality of Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 40 (4):531-439.

Rodríguez- González, H.; Villarreal, H.; García-Ulloa, H.; Hernández-Llamas, A. 2009b. Evaluation of practical diets containing different protein levels on gonadal development of female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture nutrition* 15: 347-355.

Rodriguez- Serna, M.; C. Carmona- Osalde; M.A. Olvera Novoa; J.L. Arredondo Figueroa. 2000. Fecundity, egg development and growth of juvenile crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* (Villalobos 1955) under laboratory conditions. *Aquaculture Research* 31: 173- 179.

Rodriguez-Sosa, L.; Calderon-Rosete, G.; Villalobos, M.G.P.; Mendoza Zamora E.; Gonzalez, V.A. 2006. Serotonin modulation of caudal photoreceptor in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 142: 220-230.

Rubolini, D.; P. Galeotti; G. Ferrari; M. Spairani; F. Bernini ; M. Fasola. 2006. Sperm allocation in relation to male traits, female size, and copulation behaviour in a freshwater crayfish species. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 212–219

Sagi, A.; Y. Soroka; E. Snir; O. Chomsky; J. Calderón; Y. Miller. 1995. Ovarian proteína síntesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Does ovarian vitellin synthesis exists? *Invertebrate Reproduction Development* 27: 41-47.

Sagi, A.; M. Rise; I. Khalaila; S. Arad. 1995. Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 1128 (2): 309.313.

Sagi, A.; R. Shoukrun; I. Khalaila; M. Rise. 1996. Gonad maturation, morphological and physiological changes during the first reproductive cycle of the crayfish *Cherax quadricarinatus* female. *Invertebrate Reproduction and Development* 29 (3): 235- 242.

Sagi, A.; A. Milstein; Y. Eran; D. Joseph; I. Khalaila; U. Abdu; S. Harpaz; I. Karplus. 1997a. Culture of the Australian Red –Claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture* 49 (4): 222- 229.

Sagi, A.; Shoukrun, R.; Levy, T.; Barki, A.; Hulata, G. and Karplus, I. 1997b. Reproduction and molt in previously spawned and first-time spawning red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*

females following eyestalk ablation during the winter reproductive-arrest period. *Aquaculture* 156: 101-111.

Sagi, A.; I. Khalaila; U. Abdu; R. Shoukrum; S. Weil. 1999. A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary- vitellogenin- specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology* 115: 37-45.

Sagi, A. R. Manor; C. Segall; C. Davis; I. Khalaila. 2002. On intersexuality in the crayfish *Cherax quadricarinatus*: an inducible sexual plasticity model. *Invertebrate Reproduction and Development* 41(1-3): 17-33.

Sainath, S.B.; P.S. Reddy. 2011. Effect of selected biogenic amines on reproduction in the fresh water edible crab, *Oziotelphusa senex senex*. *Aquaculture* 313: 144–148

Santhoshi, S.; V. Sugumar; N. Munuswamy. 2009. Serotonergic stimulation of ovarian maturation and hemolymph vitellogenin in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 291: 192-199.

Sarojini, R.; R. Nagabhushanam; M. Fingerman. 1995. Evidence for opioid involvement in the regulation of ovarian maturation of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 111 (2): 279-285.

Sarojini, R.; Nagabhushanam, R.; Fingerman, M. 1996. In vivo assessment of opioid agonist and antagonist on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 115: 149-153.

Sarojini, R.; Nagabhushanam, R.; Fingerman, M. 1997. An in vitro study of the inhibitory action of methionine enkephaline on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 117: 207-210.

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

Sathapondecha, P.; S. Treerattrakool; S. Panyim; A. Udomkit. 2011. Potential roles of transglutaminase and thioredoxin in the release of gonad-stimulating factor in *Penaeus monodon*: Implication from differential expression in the brain during ovarian maturation cycle. *Marine Genomics* 4: 279–285.

Souty-Grosset, C. 1997. Vitellogenin synthesis in marine invertebrates. *In* Recent advances in marine biotechnology. Fingerman, Nagabhushanam & Thompson (eds). New Delhi, India. Oxford & IBH Publishing Co. Vol. I: 203-248.

Serrano-Pinto, V.; C. Vazquez – Boucard; H. Villareal- Colmenares. 2003. Yolk protens during ovary and eg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134 (1): 33-43.

Serrano Pinto, V.; I. Landais; M.H. Ogliastro; M.Gutierrez Ayala; H. Mejía Ruíz; H. Villareal Colmenares; A. García Gasca; C.Vazquez Boucard. 2004. Vitellogenin mRNA during secondary vitellogenic at first maturation females. *Molecular Reproduction And development* 69: 17-21.

Serrano-Pinto, V.; M.G. Carrisoza-Valenzuela; M. Ramírez-Orozco. 2005. Determination site of vitellogenin synthesis in freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* at different maturation stages females. *Investigaciones Marinas de Valparaíso* 33 (2): 195-200.

Shechter, A.; E.D. Aflalo; C. Davis; A. Sagi. 2005. Expression of the Reproductive Female-Specific Vitellogenin Gene in Endocrinologically Induced Male and Intersex *Cherax quadricarinatus* Crayfish. *Biology of Reproduction* 73, 72–79

Shih, J.T. 1993. Annual patterns of gonadomatic and hepatosomatic indexes and progesterone – like substance levels of female *Mictyris brevidactylus*. *Bull. Inst. Zool. Academica Sinica* 32(4): 221-228.

Shih, J.T. 1997. Sex steroid- like substances in the ovaries, hepatopancreas and body fluid of female *Mictyris brevidactylus*. *Zoological Studies* 36: 136-145.

Shih, J.T.; S.S Tseng. 1999 Progesterone- like substance in ovary and hepatopáncreas of *Uca vocans borealis*. *Zoological Studies* 38(4): 458-465.

Sokal RR & F.J. Rohlf. 1981. *Biometry*. Freeman. New York, EEUU.

Soroka, Y.; A. Sagi; I. Khalaila; U. Abdu; Y Milner. 2000. Changes in protein kinase C during vitellogenesis in the crayfish *Cherax quadricarinatus* – possible activation by methyl farnesoate. *General and Comparative Endocrinology* 118: 200-208.

Spaargaren D.H.; P. A. Haefner jr. 1994. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.) II Biochemical relationships. *Journal of Crustacean Biology* 14(1): 6-19.

Stella, V.; López Greco, L.; Rodríguez, E. 2000. Effects of eyestalk ablation at different times of the year on molting and reproduction of the estuarine grapsid crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Journal of Crustacean Biology* 20: 239-244.

Subramonian, T. 1999. Endocrine regulation of egg production in economically important crustacean. *Current Science* 76: 350-360.

Subramonian, T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 125: 135-156.

Suneetha, Y.; P. N. Jyothi; M. S. Reddy. 2010. Impact of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the tropical penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 125 (2): 135–156

Suzuki, S. 1987. Vitellins and vitellogenins of the terrestrial isopod, *armadillidium vulgare*. *BioL Bull.* 173: 345- 354. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 5(4): 226= 230.

Tahara D., K. Suitoh & H Hattori. 2005. Hemolymph vitellogenin levels during final maturation and post-spawning in the female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* 245: 311-319.

Thompson, K.R.; Muzinic, L.A.; Engler, L.S., Morton, S.; Webster, C.D. 2004. Effects of feeding practical diets containing various protein levels on growth, survival, body composition, and processing traits of Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and on pond water quality. *Aquaculture Research* 35:659-668.

Thompson, K.R.; Muzinic, L.A., Engler, L.S.; Webster, C.D. 2005. Evaluation of practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, for juvenile Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 244:241-249.

Thuberty, S. R.; M. Fingerman. 1998. Vitellogenesis in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *American Zoologist* 38 (5): 186pp.

Tinikul, Y.; Mercier, J.A.J.; Sobhon, P. 2009. Distribution of dopamine and octopamine in the central nervous system and ovary during the ovarian maturation cycle of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Tissue and Cell* 41: 430–442.

Tiu, S.H.K.; J.H.L. Hui; A.S.C. Mak; J.G. He; S.M.Chan. 2006a. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 254: 666–674.

Tiu, S.H.K.; J.G. He; S. Tobe; S.M. Chan. 2006b. Characterization of vitellogenin in the shrimp *Metapenaeus ensis*: expression studies and hormonal regulation of MeVg1 transcription in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 73: 424-436.

Tiu, S.H.K.; S.M. Chan; S. S. Tobe. 2010. The effects of farnesoic acid and 20-hydroxyecdysone on vitellogenin gene expression in the lobster *Homarus americanus*, and possible roles in the reproductive process. *General Comparative Endocrinology*. 166: 337-345.

Tom, M.; M. Goren; M. Ovadia. 1987. Purification and partial characterization of vitellin from the ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 87 (1): 17-23.

Tseng, D.Y.; Y.N. Chen; G. Koua; C.F. Loa; C.M. Kuo. 2001. Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 129: 909-917.

Tsukimura, B. 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist* 41: 465-476.

Tsukimura, B.; J.S. Bender; C.J. Linder. 2000. Development aspects of gonadal regulation in the ridgeback shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 127: 215-224.

Tsukimura, B.; F.I. Kamemoto. 1991. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 92: 59-66.

Tsukimura, B.; W.K. Nelson; C.J. Linder. 2006. Inhibition of ovarian development by methyl farnesoate in the tadpole shrimp *Triops longicaudatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 144: 135-144.

Tsutsui N.; I. Kawazoe; T. Ohira; S. Jasmani; W.J. Yang; M.N. Wilder; K. Aida K. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Zoological Science* 17, 651–660.

Van Herrp, P. 1993. Importance of reproductive biological knowledge for application of biotechnology in aquaculture: crustaceans as an example. *Journal of Marine Biotechnology* 1: 17-20.

Vázquez, F.J.; Lopez Greco, L.S. 2007. Diferenciación sexual en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Revista de Biología Tropical* 55: 33-38.

Vázquez, F.J.; Tropea, C.; López Greco, L.S. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Invertebrate Biology* 127: 433–443.

Vazquez- Boucard, C.G.; H.J. Ceccaldi; Y. Benyamin; C. Roustan. 1986. Identification, purification et caractérisation de la lipovitelline chez un crustacé décapode natantia *Penaeus japonicus* (Bate). *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 97: 37-50.

Vazquez Boucard, C.G.; P. Levy; H.J. Ceccaldi; C.H. Brogren. 2002. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 281: 63– 75.

Ventura, T.; O.R.; A. Sagi. 2011. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *General and Comparative Endocrinology* 173(3):381-388.

Vernet, G.; M. Charmantier-Daures. 1994. Mue, Autotomie et regeneration. *In: Fascicule I Morphologie, Physiologie et reproduction, Tome III. Crustacés. Traite de Zoologie.* P. Grasse (eds). Masson. Paris: 107-195.

Vigh, D.A.; J.E. Dendinger. 1982. Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the atlantic blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 72: 365-369.

Villarreal Colmenares, H.; Naranjo Páramo, J. 2008. Cultivo de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Redclaw). Una oportunidad para la diversificación de la industria acuícola. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Programa de Acuicultura. 1-16.

Vogel, J.M. & D.W. Borst. 1989. Spider crab yolk protein: molecular characterization and the effects of methyl farnesoate (MF) on its hemolymph levels. *American Zoologist*. 29: 49A.

Vogt, G. 2002. Functional anatomy. *In Biology of freshwater crayfish.* Holdich D. (eds). Nottingham. Blackwell Science: 53-151.

Waddy, S.L. y D.E. Aiken, 2000. Endocrinology and the Culture of Homarid Lobsters. En: *In: Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 4: Aquaculture, Part A* (M. Fingerman y R. Nagabhushanam, eds.). Science Publishers Inc., Enfield, New Jersey, pp. 195-247

Wainwright, G.; Rees, H.H. 2001. Hormonal regulation of reproductive development in crustaceans. Eds: Atkinson, D., Thorndyke, M. *Environment and Animal Development*, Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, 71-84.

Ward, D.A.; E.M. Sefton; M.C. Prescott; S.G. Webster; G. Wainwright; H.H. Rees; M. J. Fisher. 2010. Efficient identification of proteins from ovaries and hepatopancreas of the unsequenced edible crab, *Cancer pagurus*, by mass spectrometry and homology-based, cross-species searching. *Journal of Proteomics* 7 3: 2354– 2364.

- Warrier, S. R.; R. Tirumalai; T. Subramonian. 2001. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*: 130:283-294.
- Webster, S. 1993. High- affinity binding of putative moult- inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) to membrane- bound receptors on the Y- organ of the shore crab *Carcinus maenus*. *Proceedings Biological Sciences* 251: 53-59.
- Webster, S.G. 1998. Neuropeptides inhibiting growth and reproduction in crustaceans. *In Recent advances in arthropod endocrinology*. Coast & Webster (eds). Cambridge, USA. Society for Experimental Biology, Semunar Series 65: 33-51.
- Wilder, M.N; T. Okumura; N. Tsutsui. 2010. Reproductive Mechanisms in Crustacea Focusing on Selected Prawn Species: Vitellogenin Structure, Processing and Synthetic Control. *Aqua-BioScience Monographs* 3 (3): 73-110.
- Wingfield, M. 2001. An overview of the australian freshwater crayfish farming industry. *Freshwater crayfish* 13: 177-183.
- Withers, P.C. 1992. Endocrinology. *In Comparative Animal Physiology*. P.C. Whithers (ed). Saunders Collegue Publishing, cap 11: 493-563.
- Yang, F.; H.T. Xu; Z.M. Dai; W.J. Yang. 2005. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 142 456 – 464.
- Yano, I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture* 47:223-229.
- Yano, I. 1987. Effect of 17 α - Hydroxy – Progesterone on vitellogenin secretion in *Kuruma Prawn, Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 61: 49-57.
- Yano, I.; R. Hoshimo. 2006. Effects of 17 β – estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 144: 18 -23.

Yehezkel, G.; R.chayoth, U.Abdu; I. Khalaila; A. Sagi. 2000. High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 127: 411-421.

Young, N.J.; P.T. Quinlan; L.J. Goad. 1992. Progesterone metabolism in vitro in the decapod crustacean *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology* 87: 300-311.

Young, N.J.; S. Webster; H.Ress. 1993. Ecdysteroids profiles and vitelogénesis in *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) *Invertebrate Reproduction Development*. 24:107-117.

Zapata, V., López Greco, L.S., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata*, induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. *Aquaculture* 224, 339-352.

Zmora, N.; J. Trant; S.M. Chan; J.S. Chung. 2007. Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: gene expression, synthesis, transport, and cleavage. *Biology of Reproduction*: 77: 138-146.