

## Tesis Doctoral

# Evaluación de dietas, horarios de alimentación, disponibilidad de alimento, atractantes y tiempo de ayuno en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Aplicaciones a su cultivo

Sacristán, Hernán Javier

2015-03-19

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

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

Cita tipo APA:

Sacristán, Hernán Javier. (2015-03-19). Evaluación de dietas, horarios de alimentación, disponibilidad de alimento, atractantes y tiempo de ayuno en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Aplicaciones a su cultivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sacristán, Hernán Javier. "Evaluación de dietas, horarios de alimentación, disponibilidad de alimento, atractantes y tiempo de ayuno en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Aplicaciones a su cultivo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-19.

**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

Evaluación de dietas, horarios de alimentación, disponibilidad de alimento, atractantes y tiempo de ayuno en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae).  
Aplicaciones a su cultivo

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **Ciencias Biológicas**

**Lic. Hernán Javier Sacristán**

Directora de tesis: Dra. Laura Susana López Greco

Directora asistente: Dra. Analía Verónica Fernández Gimenez

Consejera de estudios: Dra. Laura Susana López Greco

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 19/3/2015

## Resumen

La langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*, presenta numerosas características biológicas y comerciales que la convierten en una especie apropiada para la acuicultura. Sin embargo, el crecimiento productivo ha sido poco significativo en la Argentina debido a diferentes motivos tales como la ausencia de tecnologías de cultivo, elección inadecuada del sitio de cultivo y, principalmente, por la falta de “semilla” en distintas fases para su comercialización. Dada la escasa información existente sobre el cultivo de esta especie, se plantearon los siguientes objetivos generales: evaluar y comparar los efectos de alimentos comerciales y formulados especialmente para esta especie sobre la fisiología digestiva; estudiar el ritmo diario de secreción de las enzimas digestivas y su posible modificación en función del momento de alimentación y el período de ayuno; evaluar la inclusión de la harina de calamar como attractante y analizar el efecto de la disponibilidad de alimento luego de un ayuno corto o moderado sobre la actividad de enzimas digestivas y estudiar el efecto del ayuno prolongado y posterior alimentación sobre las respuestas bioquímicas y fisiológicas de *C. quadricarinatus*. Los animales alimentados con el alimento especialmente formulado presentaron una buena condición fisiológica en función de la actividad enzimática digestiva y una estructura celular y tisular conservada de la glándula digestiva. Sin embargo, la dieta diseñada para esta especie presentó baja digestibilidad *in vitro* de proteínas. La secreción de las enzimas digestivas no mostró un patrón diario y el momento de alimentación (matutina o vespertina) afectó la actividad de las enzimas digestivas. El ayuno moderado provocó modificaciones en el patrón de ritmo diario de secreción de las enzimas digestivas. La harina de calamar no actuó como attractante para *C. quadricarinatus*, mientras que la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno corto no causó modificaciones en la actividad de las enzimas digestivas; por el contrario, dicha actividad se vio alterada por la disponibilidad de alimento cuando los animales fueron expuestos previamente a un ayuno prolongado. En función de los resultados obtenidos sobre la disponibilidad de alimento y a estudios previos de otros autores, se propone una posible vía de regulación de la actividad de la lipasa digestiva. Finalmente, el ayuno prolongado provocó la disminución de reservas energéticas (glucógeno y lípidos), niveles de glutatión reducido, actividad de lipasa y proteasa; y alteraciones en la estructura celular y tisular de la glándula digestiva, aunque no causó un

incremento en el daño oxidativo. La posterior alimentación, luego del ayuno prolongado, provocó que se restablecieran todos los parámetros anteriormente descritos. La presente tesis aporta información novedosa e importante sobre la respuesta fisiológica de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* que podría ser de gran utilidad para el cultivo de la especie.

Palabras clave: acuicultura, *Cherax quadricarinatus*, alimentación, glándula digestiva, enzimas digestivas, digestibilidad, histología, disponibilidad de alimento, ayuno, reservas energéticas, estrés oxidativo.

## Abstract

The freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, have many biological and commercial characteristics which turn it into a suitable species for aquaculture. Nevertheless, productive breeding has been hardly significant in Argentina due to different reasons, such as the absence of breeding technologies, the bad choice of the breeding sites, and mainly to the lack of the “seed” in the different stages of the commercialization process. Due to the scarce available information on the breeding of this species, the following general objectives were considered: to evaluate and compare the effects of commercial feeds, as well as specifically formulated feeds for this species based on its digestive physiology; to study the daily secretion pattern of the digestive enzymes, and its possible modification based on the time of feeding and the fasting period; to evaluate the inclusion of squid meal as an attractant, and analyze the effect of food availability on the activity of digestive enzymes after a short or moderate starvation; and to study the effect of extended starvation and subsequent feeding on the biochemical and physiological parameters of *C. quadricarinatus*. The animals fed with the specifically formulated feed, showed a good physiological condition according to digestive enzymatic activity, and a conserved tissue structure of the digestive gland. Notwithstanding, the designed diet for this species presented low *in vitro* protein digestibility. The digestive enzymes secretion did not show a daily secretion pattern, and the moment of feeding (morning or evening) affected the activity of digestive enzymes. Moderate starvation caused modifications in the pattern of the daily secretion of digestive enzymes. The squid meal did not act as an attractant for *C. quadricarinatus*, whereas food availability after a short starvation period did not modify the activity of digestive enzymes. On the contrary, such activity was altered by food availability when animals were previously exposed to an extended starvation. In consideration of the observed results on food availability, and other author’s previous studies, it is proposed a possible way of regulation of the activity of digestive lipase. Finally, the extended fasting caused a reduction in the energetic reserves (glycogen and lipids), reduced levels of glutathione, activity of lipase and proteinase and alterations in the cellular and tissue structure of the digestive gland, even though it did not increase the oxidative damage. The subsequent feeding, after extended starvation, brought the restoration of all previously described parameters. The present thesis contributes with new

and meaningful information on the physiological responses of freshwater crayfish, *C. quadricarinatus*, which could be very useful for the breeding of this species.

Key words: aquaculture, *Cherax quadricarinatus*, feeding, digestive gland, digestive enzymes, digestibility, histology, food availability, starvation, energetic reserves, oxidative stress.

## Agradecimientos

- ❖ A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por financiar el presente proyecto a través de los subsidios PICT 2007 y 2012 (proyectos 01187 y 1333), PIP 2009-2011 (proyecto 129) y 2012-2014 (proyecto 219), UBACYT (proyectos X458 y 20020100100003) y MINCYT-CONACYT (México) MX/09/07.
- ❖ A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas otorgadas que me permitieron desarrollar la presente Tesis.
- ❖ A mi directora y consejera de estudios, la Dra. Laura S. López Greco, por darme la posibilidad de formarme como doctor, su dedicación, tiempo y todos los conocimientos transmitidos durante estos cinco años.
- ❖ A mi directora asistente, Dra. Analía V. Fernández Gimenez, por brindarme sus conocimientos sobre enzimas digestivas, su dedicación, tiempo y estar siempre presente a pesar de la distancia.
- ❖ Al MsC Gustavo Wicki y equipo del CENADAC y al Sr Carlos Anselmi de Las Golondrinas SRL por la provisión de animales.
- ❖ A la Dra. Juliana Giménez por permitirme sacar numerosas fotos histológicas.
- ❖ A la Dra. Cecilia Rodríguez por ayudarme siempre que necesité el liofilizador y algún otro reactivo “faro”.
- ❖ Al Dr. Héctor Nolasco-Soria, Dr. Edilmar Cortés Jacinto y a la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, por sus conocimientos transmitidos durante mi pasantía en el CIBNOR (México).
- ❖ Al Dr. Martín Ansaldo por haberme iniciado en el mundo de la fisiología animal cuando era estudiante de grado, transmitirme sus conocimientos, consejos y sobre todo, por ser un AMIGO.

- ❖ A mis padres, Palmira y Antonio, por darme la vida, su amor, consejos, apoyo y ser mi guía y ejemplo siempre.
- ❖ A mi hermana y sobrino, Natalia y Benjamín, por su amor inagotable.
- ❖ A Victoria por escucharme, acompañarme y bancarse mi ~~fanatismo científico~~.
- ❖ A mis grandes AMIGOS, Rodrigo, Cristian y Diego, por acompañarme, escucharme y estar siempre presentes de una u otra manera junto a mí a lo largo de la carrera.
- ❖ A mis compañeras/os del laboratorio Carolina, Natalia, Liane, Luis, Ana Laura, Verónica, Karine, Amir y a los vecinos del laboratorio 1, Enrique, Daniel, Anouk, Luciana, Gabriela, Ivana, Camila, por aprender juntos, compartir el día a día durante estos cinco años y aguantar mis ~~gruñidos~~.
- ❖ A Gabriel y Claudio, por su predisposición para ayudarme con algún equipo, soportarme diariamente y la buena onda de siempre.

A todos, ETERNAMENTE GRACIAS!



*La presente tesis se la dedico muy especialmente a mi padre Antonio quien fue un ejemplo como persona, por todo lo que me enseñó en la vida y hoy me acompaña desde el cielo...*

# Índice

## INTRODUCCION

GENERAL.....	1
--------------	---

<b>CAPÍTULO 1:</b> Efecto de diferentes dietas sobre la actividad de las enzimas digestivas, digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas y la estructura de la glándula digestiva en juveniles de langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> .....	12
--	----

1.1 Introducción.....	13
-----------------------	----

1.2 Objetivo.....	18
-------------------	----

1.3 Materiales y métodos.....	19
-------------------------------	----

1.3.1 Obtención de los animales.....	19
--------------------------------------	----

1.3.2 Ensayos de alimentación y diseño experimental.....	19
--	----

1.3.3 Extracción de la glándula digestiva y preparación de los extractos enzimáticos.....	22
---	----

1.3.4 Ensayos de actividad enzimática.....	23
--	----

1.3.5 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas.....	26
--	----

1.3.6 Análisis histológico.....	27
---------------------------------	----

1.3.7 Análisis estadístico.....	27
---------------------------------	----

1.4 Resultados.....	28
---------------------	----

1.4.1 Ensayos de alimentación.....	28
------------------------------------	----

1.4.2 Análisis enzimáticos.....	29
---------------------------------	----

1.4.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas.....	33
--	----

1.4.4 Análisis histológico.....	33
---------------------------------	----

1.5 Discusión.....	37
--------------------	----

<b>CAPÍTULO 2:</b> Influencia de la alimentación sobre el ritmo diario de las enzimas digestivas en juveniles de etapa de engorde de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> .....	43
--	----

2.1 Introducción.....	44
-----------------------	----

2.2 Objetivo.....	47
2.3 Materiales y métodos.....	48
2.3.1 Obtención de los animales.....	48
2.3.2 Diseño Experimental.....	48
2.3.3 Extracción de la glándula digestiva y preparación de los extractos enzimáticos.....	52
2.3.4 Ensayos de actividad enzimática.....	52
2.3.5 Análisis estadístico.....	52
2.4 Resultados.....	52
2.5 Discusión.....	63
<b>CAPÍTULO 3: Efecto de un atractante, período de ayuno y disponibilidad de alimento sobre las enzimas digestivas de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> .....</b>	<b>67</b>
3.1 Introducción.....	68
3.2 Objetivos.....	71
3.3 Materiales y métodos.....	72
3.3.1 Obtención de los animales.....	72
3.3.2 Comportamiento de respuesta de <i>C. quadricarinatus</i> a la presencia de alimento.....	72
3.3.3 Efecto de la harina de calamar sobre la respuesta de los juveniles de <i>C.</i> <i>quadricarinatus</i> .....	73
3.3.4 Determinaciones de la respuesta comportamental al estímulo alimenticio (ensayos individuales y grupales).....	76
3.3.5 Efecto de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas.....	77
3.3.6 Preparación de los extractos enzimáticos y ensayos de actividad enzimática.....	78
3.3.7 Análisis estadístico.....	79
3.4 Resultados.....	79
3.4.1 Descripción comportamental de respuesta de <i>C. quadricarinatus</i> a la presencia de alimento.....	79

3.4.2 Efecto de la harina de calamar sobre la respuesta de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> .....	80
3.4.3 Efecto de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas.....	81
3.5 Discusión.....	85
<b>CAPÍTULO 4: Efecto del ayuno prolongado y posterior alimentación sobre las respuestas bioquímicas y fisiológicas de juveniles de <i>Cherax quadricarinatus</i> .....</b>	<b>92</b>
4.1 Introducción.....	93
4.2 Objetivo.....	96
4.3 Materiales y métodos.....	97
4.3.1 Obtención de los animales.....	97
4.3.2 Diseño Experimental.....	97
4.3.3 Reservas energéticas, estrés oxidativo y actividad enzimas digestivas.....	99
4.3.4 Análisis estadístico.....	103
4.4 Resultados.....	104
4.4.1 Reservas energéticas, estrés oxidativo y actividad enzimas digestivas.....	105
4.5 Discusión.....	112
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>119</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>124</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>127</b>

# Introducción General

---

## *Acuicultura mundial y en Argentina*

La producción pesquera mundial ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de animales comestibles se ha incrementado a una tasa media anual del 3,2%, superando así la tasa de crecimiento de la población mundial del 1,6%. Este incremento notable se ha debido a una combinación de crecimiento demográfico, aumento de los ingresos y urbanización; también se ha visto propiciado por la fuerte expansión de la producción pesquera y la mayor eficacia de los canales de distribución (FAO 2014).

La producción acuícola mundial aumentó a una tasa media anual del 6,2% entre los años 2000 a 2012, lo que supuso un menor crecimiento que en los períodos 1980-1990 (10,8%) y 1990-2000 (9,5%). En 2012, el número de especies cultivadas registradas en las estadísticas de la FAO fue de 567, incluidos peces óseos (354 especies, con 5 híbridos), moluscos (102), crustáceos (59), anfibios y reptiles (6), otros invertebrados acuáticos (9) y algas marinas y de agua dulce (37). Según las últimas estadísticas a nivel mundial, la producción acuícola alcanzó un valor máximo histórico de 90,4 millones de toneladas en 2012, de las cuales 66,6 millones de toneladas correspondieron a peces óseos, crustáceos, moluscos, anfibios, tortugas de agua dulce y otros animales acuáticos (FAO 2014).

El desarrollo de la acuicultura en el mundo no es homogéneo y su producción tiene una distribución desigual, pues Asia representa el 88% del volumen de la producción acuícola mundial. Por otro lado, países como Chile y Egipto llegaron a convertirse en productores de millones de toneladas en 2012 y Brasil ha mejorado significativamente su posición mundial en los últimos años (FAO 2014).

En particular, Argentina se encuentra entre aquellos países de menor producción acuícola con un volumen que alcanza las 3.000 toneladas anuales, participando sólo en un 0,004% en la producción mundial acuícola (Luchini 2011). Desde 1992 hasta 2007 inclusive, la producción de la acuicultura en Argentina tuvo un crecimiento anual del 16,6% (Luchini y Panné Huidobro 2008). Actualmente se cultivan 21 especies, siendo las de mayor producción la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y pacú (*Piaractus mesopotamicus*) seguidas en menor proporción por ostra, mejillón, distintas especies de

carpas, ranas, yacarés, tilapia, randia, dorado, sábalo, surubí, boga, esturión y langosta de pinzas rojas entre otros (MINAGRI 2013).

### *Acuicultura de crustáceos*

El cultivo de crustáceos incluye la producción de especies marinas y de agua dulce como camarones, langostinos, langostas y cangrejos. Desde 1980, la producción mundial de crustáceos se ha incrementado anualmente tanto en cantidad como en el número de especies cultivadas. Además, la producción se distribuyó de manera uniforme entre especies de agua dulce (1,9 millones de toneladas), marina (0,7 millones de toneladas) y salobre (2,4 millones de toneladas) (FAO 2010, Saoud *et al.* 2013). En 2012, los crustáceos cultivados representaron el 9,7% (6,4 millones de toneladas) de la producción acuícola en volumen, pero el 22,4% en valor (FAO 2014).

### *Cherax quadricarinatus*

*Cherax quadricarinatus* es una especie de crustáceo decápodo de la familia Parastacidae, endémica de los ríos del noroeste de Queensland, norte de Australia y el sudeste de Nueva Guinea (Jones 1997). Comúnmente es llamada langosta de pinzas rojas, debido a que los machos presentan un "parche" rojo en el lado externo de las quelas. Dada su importancia comercial, ha sido introducida en varios países como México, Ecuador, Costa Rica, Guatemala, Japón, Taiwán, Jamaica, China, Italia, Grecia, Israel, Islas del Caribe, Nueva Caledonia, España, Malasia, Tailandia, Singapur, Zambia, Uruguay, Indonesia, Vietnam, Puerto Rico y Argentina (Ghanawi y Saoud 2012, Saoud *et al.* 2013). En el año 2006, la producción mundial de esta especie fue de 115 toneladas, siendo Australia el mayor productor con 103 toneladas, mientras que México, Ecuador, Argentina y Uruguay contribuyeron con 12 toneladas (FAO 2008).

*Cherax quadricarinatus* presenta importantes características biológicas que la convierten en una especie adecuada para el cultivo comercial:

**Desarrollo directo**, lo que facilita los protocolos de cultivo sin la necesidad de utilizar los costosos y sofisticados requerimientos para las etapas de cultivo larval (Curtis y Jones 1995, Jones 1995a, Jones y Rouscoe 2000, Jones *et al.* 2000, Masser y Rouse 1997, Rodgers *et al.* 2006, Saoud *et al.* 2013).

**Fecundidad moderada**, las hembras alcanzan la madurez sexual entre los 7 y 9 meses, pudiendo oviponer de 3 a 5 veces por año. Dependiendo el tamaño de la hembra, pueden desovar entre 100 y 1.000 huevos por puesta (Jones 1995a, Masser y Rouse 1997, Saoud *et al.* 2013).

Exhibe un **rápido crecimiento**, alcanzando la talla comercial (40-200 g) entre los 6 y 9 meses (Rouse *et al.* 1991, Wickins y Lee 2002, Saoud *et al.* 2013).

La especie presenta **hábitos gregarios, baja agresividad y no presenta un comportamiento excavador**, por lo tanto, puede tolerar altas densidades y requiere de tecnología simple para su producción y cosecha (Masser y Rouse 1997, Saoud *et al.* 2013).

**Tolera un amplio rango de condiciones de calidad de agua**, que incluye bajas concentraciones de oxígeno (> 1 ppm), dureza y alcalinidad en un rango entre 20 y 300 ppm y pH entre 6,5 y 9 (Masser y Rouse 1997, Saoud *et al.* 2013).

**Utiliza de manera eficiente un amplio rango de fuentes alimentarias desde las primeras etapas del desarrollo** (Jones 1995a, Jones y Ruscoe 1996b, 1996c, 1996d, Masser y Rouse 1997, Ghanawi y Saoud 2012, Saoud *et al.* 2013).

**Tolera un tiempo de transporte entre 24 y 48 horas con elevada sobrevida** (Romero y Murillo 1997, Saoud *et al.* 2013) facilitando su comercialización.

Esta especie ha sido introducida en Argentina en 1990 y ha sido cultivada de manera semi-intensiva. El comercio interno está basado principalmente para su consumo en restaurantes y como especie ornamental (mascotas) (Luchini 2004). Sin embargo, el crecimiento productivo en campo ha sido poco significativo, debido a diferentes motivos



como la ausencia de tecnologías de cultivo, sitios de cultivo inapropiados en algunos casos y principalmente por la falta de “semilla” en distintas fases para su comercialización, lo que obliga a los productores a realizar el ciclo de vida completo de la especie (Wicki *et al.* 2008). En los últimos años el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC, Corrientes, Argentina) viene desarrollando tecnologías para llevar a cabo el cultivo de *C. quadricarinatus* incluyendo el formulado de ensilados de menor de costo como suplemento alimentario. La reproducción se lleva a cabo bajo techo (hatchery), mientras que las fases de preeengorde y de engorde se realizan en tanques de cemento bajo sombreado y en estanques excavados en tierra a cielo abierto, respectivamente (Luchini 2004).

#### *Desafíos del cultivo de Cherax quadricarinatus*

Los requerimientos nutricionales de *C. quadricarinatus* han sido extensamente estudiados durante los últimos 10-15 años (Saoud *et al.* 2012). Gran parte de estas investigaciones se basaron en la formulación de dietas y evaluación de diferentes ingredientes. Sin embargo, estas formulaciones e ingredientes deberían ser evaluadas en las distintas etapas del desarrollo de la especie, dado que podrían cambiar a medida que el animal crece. Además, la formulación de dietas utilizando los ingredientes locales y/o regionales, conlleva a la disminución del costo de los alimentos y, por ende, la reducción de los costos de producción, que en algunos casos puede llegar alcanzar hasta el 80% (Thompson *et al.* 2010). Otras áreas que requieren mayor investigación incluyen el estudio de los requerimientos de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales; tecnología para producir “pellets” secos y manipulables de menores costos; estimación de óptimos regímenes alimentarios y requerimientos nutricionales para reproductores. Esta información podría ser útil en la formulación de dietas especie-específica y de esa manera mejorar la producción de *C. quadricarinatus* (Saoud *et al.* 2013).

## *Nutrición y alimentación*

Una adecuada nutrición es esencial para una acuicultura rentable y la efectividad de los alimentos suministrados depende de nuestro conocimiento sobre la manera en que los animales utilizan los componentes alimentarios (Carrillo-Farnés *et al.* 2006). Actualmente, los alimentos para la producción comercial de la langosta de pinzas rojas, están basados en formulaciones de otras especies acuáticas, principalmente de camarones peneidos, langostinos y peces (Cortés-Jacinto *et al.* 2003, 2004, 2005, García-Ulloa *et al.* 2003, Thompson *et al.* 2003a, 2003b). Los requerimientos dietarios de algunos nutrientes han sido determinados solo en la etapa de rápido crecimiento de los juveniles, pero existe una limitada información para animales adultos de peso comercial o de los reproductores (Saoud *et al.* 2013).

La mayoría de las especies requieren entre un 25-55% de proteína en su dieta, dependiendo de sus hábitos alimenticios, herbívoro, omnívoro o carnívoro (Lovell 1989, NRC 1993). La mayor fuente de proteína de un alimento utilizado en la acuicultura proviene de la harina de pescado (Lovell 1989) y las dietas formuladas contienen entre un 25-60% de este ingrediente (Wee 1992, Amaya *et al.* 2007, Pavasovic 2008). Saoud *et al.* (2012), basado en numerosos trabajos (Meade y Watts 1995, Anson y Rouse 1996, Jones y Ruscoe 1996a, D'Agaro *et al.* 2001, Hernández *et al.* 2001, Cortés-Jacinto *et al.* 2003, 2004, 2005, 2009, Thompson *et al.* 2005, Díaz *et al.* 2006, Pavasovic *et al.* 2007, Zenteno-Savín *et al.* 2008) recomendó que para un cultivo de tipo semi-intensivo de *C. quadricarinatus* el alimento debería contener 35% de proteína cruda y 6% de lípidos.

Teniendo en cuenta el costo del alimento, una forma inadecuada de alimentación en cantidad, calidad y/o momento del día, implica una pérdida del mismo, disminución en la calidad de agua y la eliminación innecesaria de nutrientes al ambiente, en particular en sistemas semi-intensivos. A su vez, las prácticas de alimentación en la mayoría de los criaderos son al voleo, manualmente o utilizando un equipo de aspersión mecánica o embarcaciones pequeñas (Casillas-Hernández *et al.* 2006). En general, se considera que las alimentaciones múltiples mejoran el crecimiento y el factor de conversión alimentario (Sedwick 1979, Wassenberg y Hill 1987, Chamberlain 1988, Wyban y Sweeney 1989, Dall *et al.* 1991) y reducen la acumulación de alimento sin consumir; sin embargo, esto no ha

sido estudiado con precisión en la mayoría de las especies de cultivo. Por estos motivos, es importante estudiar los procesos fisiológicos que pueden afectar la capacidad de consumo y digestión del alimento en los cuales la actividad enzimática tiene significativa importancia (Dall 1992, Molina *et al.* 2000).

### *Atractabilidad*

Los crustáceos a diferencia de los peces, tiene una alta capacidad de recepción sensorial a distancia mediante el uso de quimiorreceptores (Heinen 1980). Por lo tanto, la identificación del estímulo químico a distancia es clave para que los crustáceos puedan identificar el alimento (Molina-Poveda 2008). En general, los crustáceos poseen una actividad alimentaria relativamente baja e intermitente, lo que impacta sobre la captura y el procesamiento del alimento. Este comportamiento afecta directamente las propiedades de los alimentos como por ejemplo la estabilidad en el agua (hidroestabilidad) y durabilidad, lo que trae como consecuencia una pérdida en la calidad del agua en los sistemas de cultivo (Saoud *et al.* 2012) y de nutrientes esenciales para el organismo.

Dentro de la amplia gama de extractos orgánicos de animales acuáticos ensayados como atractantes se encuentran los desarrollados a partir de moluscos (*Mytilus edulis*, *Pernan canaliculus*, calamar, ostras, etc.) y crustáceos (*Euphausia superba*, *Penaeus monodon*, jaiba, etc.). Entre los extractos de moluscos, el que ha despertado mayor interés es el desarrollado a partir de calamar, el cual ha resultado fuertemente atractivo tanto para crustáceos como para peces (Leal 1995).

### *Ritmo Diario*

La mayor parte de la información sobre ritmo diario de crustáceos cultivados, se refiere a camarones peneidos, evaluando diversas frecuencias y horarios de alimentación (Robertson *et al.* 1992, Cortés-Jacinto 1998, Velasco *et al.* 1999, Smith *et al.* 2002). Los resultados de estos estudios indicaron que existe una considerable variación al respecto y sugieren la importancia de considerar factores bióticos como la actividad enzimática y

factores abióticos como el fotoperiodo, como moduladores del comportamiento alimentario. Estas investigaciones demostraron que los horarios de alimentación pueden ajustarse considerando la actividad circadiana de los organismos y se ha observado que la actividad de las enzimas digestivas constituye una parte importante de la fisiología y el comportamiento alimentario en camarones. Por este motivo, la determinación de la variación diaria de las enzimas digestivas y el tiempo de inducción de dicha actividad, resultan importantes en el establecimiento de frecuencias y horarios de alimentación (Molina-Poveda 2008).

#### *Indicadores de respuesta fisiológica al alimento*

Desde el punto de vista comercial, la formulación de la dieta óptima para un organismo se da en función del potencial de maximización de su desarrollo corporal (incremento en peso o maduración gonadal). Sin embargo, desde el punto de vista biológico, existen criterios fisiológicos que pueden utilizarse para establecer el efecto de variaciones nutricionales en la calidad del desarrollo. Por lo tanto, es fundamental establecer la relación existente entre la respuesta productiva y la respuesta biológica del organismo (Villarreal 2002). Los principales indicadores que se utilizan habitualmente como respuesta a alimentos son: variables morfométricas (peso, longitud, etc.), sobrevida, índice hepatosomático y gonadosomático, histología de la glándula digestiva o hepatopáncreas, niveles de reservas energéticas (lípidos, proteínas y glucógeno), actividad enzimática digestiva y digestibilidad *in vivo* e *in vitro* entre otros.

El peso, la longitud y la sobrevida de los animales juegan el papel fundamental. El peso y la longitud son buenos indicadores y por lo general, ocupan el eje central de cualquier estudio de nutrición y de cualquier sistema de control durante el cultivo (Carrillo-Farnés *et al.* 2006). Además, el tamaño relativo al peso corporal de un determinado órgano es habitualmente utilizado para estimar el estado fisiológico de dicho órgano.

Uno de los principales órganos monitores de la salud de los crustáceos en cultivo es el hepatopáncreas (Vogt *et al.* 1985, Díaz 2001). El análisis histológico de este órgano constituye un método práctico para evaluar el valor nutricional de las dietas y es muy

sensible para detectar tempranamente síntomas de deficiencia o efectos adversos de algún ingrediente de la dieta (Storch *et al.* 1984, Vogt *et al.* 1986). La glándula digestiva cumple un papel fundamental durante el crecimiento y es el principal órgano de síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción y almacenamiento de nutrientes, tales como lípidos y glucógeno (Icely y Nott 1992, Ong y Johnston 2006). Tales nutrientes junto con las proteínas son las principales macromoléculas que forman parte de los tejidos y órganos de los animales y por lo tanto, son buenos candidatos como indicadores del estado nutricional (Carrillo-Farnés *et al.* 2006).

A su vez, la importancia de estudiar las enzimas digestivas como una herramienta en los estudios nutricionales, se basa en que a partir de esta información es posible describir los patrones dietéticos, la capacidad de hidrolizar ingredientes y de responder a diferentes fuentes y niveles de nutrientes en la dieta. Asimismo, estos estudios permiten establecer de qué manera los cambios en la cantidad, calidad y disponibilidad del alimento, los hábitos de una especie, la temperatura, el fotoperiodo, entre otros, determinan las capacidades adaptativas de las especies a un determinado entorno ecológico (Lee *et al.* 1984, Takaii *et al.* 1985, Ueberschar 1988, Uys *et al.* 1987, Loya-Javellana *et al.* 1995, Carrillo 1997, Carrillo y González 1998, Forrellat 1998, González 1998).

Por otro lado, el estudio del estrés oxidativo y las defensas antioxidantes durante el desarrollo ontogénico de los crustáceos es importante para comprender la respuesta fisiológica de los organismos frente a una determinada situación; sin embargo, esta información es relativamente novedosa y sigue siendo limitada o escasa en la literatura (Fanjul-Moles y Gonsebatt 2012). El metabolismo oxidativo de las células genera continuamente especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés: reactive oxygen species) como productos tóxicos no deseados del metabolismo normal a partir de diferentes procesos endógenos. Una vez formadas, las ROS dañan biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, esenciales para las células (Halliwell y Gutteridge 2007).

Para mejorar la tasa de crecimiento de animales en condición de cultivo, se necesita que el alimento proporcione los requerimientos nutricionales de la especie, tanto en cantidad y calidad, pero para ello es indispensable que el mismo sea ingerido, digerido y asimilado de manera adecuada. Por lo tanto, la biodisponibilidad de nutrientes o energía en

los alimentos para organismos acuáticos, puede definirse principalmente en términos de digestibilidad, la cual representa la fracción del nutriente en el alimento ingerido que no es eliminado en las heces (Molina-Poveda 2008). La evaluación de la digestibilidad de las dietas se puede realizar de dos maneras: *in vivo* o *in vitro*. La primera de estas técnicas se basa en la utilización de un marcador inerte (óxido de cromo) que permite evaluar las cantidades de nutrientes que se incorporan o se excretan del animal (Cabanillas 1996). El método *in vitro* se utiliza mayormente para evaluar el grado de hidrólisis de las proteínas dietarias en presencia de las enzimas proteolíticas de la glándula digestiva (Fenucci 2008). Los métodos de digestibilidad *in vitro* se han desarrollado con el fin de contar con métodos rápidos que permitan brindar información sobre el grado de asimilación de los nutrientes y así sustituir los métodos *in vivo* (Marletta *et al.* 1992, Forrellat 1998); sin embargo, éstos hasta ahora han sido de mayor utilidad como herramientas complementarias para la predicción de la digestibilidad (Nolasco-Soria *et al.* 2006).

### *Objetivo general*

En el marco de los aspectos previamente mencionados, el objetivo general de la presente tesis es evaluar el estado nutricional de juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentando con diferentes dietas y determinar de qué manera ciertos factores como el horario de alimentación, la detección y la disponibilidad de alimento y el ayuno prolongado afectan la fisiología digestiva de la especie. De este modo se pretende aportar conocimiento y herramientas que mejoren su cultivo en Argentina.

### *Organización de la tesis*

La tesis está organizada comenzando en una introducción general, seguida de cuatro capítulos, una discusión y conclusión general.

En cada uno de los capítulos se aborda un objetivo particular de trabajo junto con las hipótesis correspondientes, de tal modo, que cada capítulo incluye su propia introducción, metodología, resultados y discusión.

Particularmente, en el Capítulo 1 se evalúa el efecto de tres alimentos sobre la actividad de las enzimas digestivas, digestibilidad *in vitro* de proteínas y estructura histológica de la glándula digestiva de juveniles de *C. quadricarinatus*.

En el Capítulo 2 se evalúa el efecto de la alimentación sobre el ritmo diario de las enzimas digestivas en juveniles de *C. quadricarinatus* luego de un período de ayuno breve y moderado.

En el Capítulo 3 se evalúa el efecto de la incorporación de harina de calamar como attractante y el efecto de la disponibilidad de alimento, sobre el comportamiento alimentario y las actividad de las enzimas digestivas de juveniles de *C. quadricarinatus* bajo una condición de ayuno breve y moderado.

En el Capítulo 4 se evalúa el efecto del ayuno prolongado y posterior alimentación sobre las respuestas bioquímicas y fisiológicas de juveniles de *C. quadricarinatus*.



El capítulo 1 fue retirado a pedido del autor

At author's request chapter 1 has been withdrawn



# Capítulo 1

---

Efecto de diferentes dietas sobre la actividad de las enzimas digestivas, digestibilidad *in vitro* de proteínas y estructura de la glándula digestiva en juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

**Los resultados de este capítulo están en revisión para su publicación como:**

Hernán J. Sacristán, Analía V. Fernández Gimenez, Anouk Chaulet, Luis M. Franco Tadic,  
Jorge L. Fenucci y Laura S. López Greco.

–Influence of different diets on digestive enzyme activities, *in vitro* digestibility, and midgut gland structure in juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus*”.

## 1.1 Introducción

En general, el alimento puede representar hasta el 80% del costo total de producción en el cultivo de tipo semi-intensivo o intensivo de crustáceos (Thompson *et al.* 2010). Para una acuicultura sustentable es esencial una nutrición adecuada y la eficacia de los alimentos suministrados va a depender del conocimiento sobre la forma en que los animales puedan utilizar los componentes de la dieta (Carrillo-Farnés *et al.* 2006). En particular la biodisponibilidad de los nutrientes va a depender de la habilidad para seleccionar y digerir y de la capacidad de las enzimas digestivas de un organismo (Bautista 1983).

Dado que una condición importante para el cultivo de crustáceos es la calidad del alimento, las investigaciones sobre nutrición utilizan índices de respuesta a tratamientos dietarios, como el incremento en peso y la supervivencia. Sin embargo, teniendo en cuenta que la dieta puede afectar la morfología y la estructura celular de varios tejidos, algunos estudios han utilizado la histología como una herramienta complementaria para evaluar el estado nutricional de los organismos (Johnston *et al.* 2003, Fernández Gimenez *et al.* 2008, López Greco *et al.* 2011, Sacristán *et al.* 2011, Calvo *et al.* 2011, 2012). Las investigaciones han demostrado que la histología contribuye a conocer la función y el valor nutricional de los ingredientes de la dieta, por lo tanto, se considera que los estudios histológicos constituyen un buen índice del estado nutricional de los crustáceos.

La glándula digestiva de los crustáceos es un órgano compacto bilobulado que ocupa la mayor parte del cefalotórax y posee numerosas funciones incluyendo la síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de los productos de la digestión, mantenimiento de las reservas minerales y sustancias orgánicas, metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, distribución de las reservas almacenadas durante el ciclo de la muda y catabolismo de algunos compuestos orgánicos (Ceccaldi 1997). Histológicamente, la unidad funcional de la glándula digestiva es el túbulo ciego, constituido por un epitelio cilíndrico simple (Sousa y Petriella 2006) que contiene diferentes tipos celulares entre los que se encuentran: las células E (embrionalenzellen), células R (resorptionzellen), células F (fibrillenzellen) y células B (blasensellen) (Gibson y Barker 1979, Al-Mohanna y Nott 1987).

El conocimiento de las enzimas digestivas constituye una importante herramienta en los estudios nutricionales, se basa en que a través de esta información es posible describir los patrones dietéticos, la capacidad de hidrolizar ingredientes y de responder a diferentes fuentes y niveles de nutrientes en la dieta (Forrellat y Gaxiola 2006).

Las proteínas constituyen un componente esencial, aunque de alto costo, en las dietas de los crustáceos y son necesarias para el crecimiento y el mantenimiento de los tejidos; también pueden ser catalizadas como fuente de energía. La utilización de las proteínas se ve afectada por la naturaleza de la fuente proteica de la dieta, los niveles de proteínas consumidos y de la habilidad del animal para utilizar otros componentes de la dieta como fuente de energía (Capuzzo 1981).

Por otro lado, es importante aclarar la terminología que se utilizará en la presente tesis con respecto a las proteasas. En general, las enzimas son clasificadas en función de la región catalizada, usando un sistema de códigos asignado por la Comisión de Enzimas (EC); sin embargo, frecuentemente son denominadas por términos no sistemáticos. El término proteasas incluye a las proteinasas y peptidasas. García-Carreño (1992) y García-Carreño y Navarrete del Toro (1997) denominan a las proteasas de acuerdo al sitio de hidrólisis de la cadena polipeptídica. Las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos entre un aminoácido y el extremo C- o N-terminal (exopeptidasas) se denominan peptidasas. Las enzimas que hidrolizan enlaces dentro de la cadena polipeptídica (endopeptidasas) se denominan proteinasas.

Para los estudios enzimáticos se han diseñado una serie de inhibidores sintéticos, como ejemplo: PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride): inhibidor de serino proteasas, TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone): inhibidor de quimotripsina, TLCK (N $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone): inhibidor de tripsina, además de los inhibidores naturales que se extraen de los sistemas biológicos como el SBTI: inhibidor de tripsina de la soja, del inglés: soybean trypsin inhibitor. Estos inhibidores sintéticos son utilizados para determinar los tipos de proteinasas presentes en los extractos enzimáticos. La forma de realizar esta determinación se basa en calcular la actividad residual del extracto después de haber sido preincubado con el inhibidor específico (Celis Guerrero 2003).

La composición de ácidos grasos de la dieta es importante ya que estos nutrientes son esenciales para el crecimiento, como componentes estructurales de las membranas biológicas y, en términos generales, para el correcto funcionamiento de todos los procesos fisiológicos (Capuzzo 1981, Lee *et al.* 2006). En los crustáceos, los lípidos son almacenados en la glándula digestiva y constituyen el mayor producto de reserva energética (Linton *et al.* 2009). La digestión de los lípidos de la dieta es realizada por lipasas y estererasas, siendo necesaria su emulsificación con compuestos derivados de la taurina, ácido cólico y desoxicólico (Cruz-Suarez *et al.* 1994).

Las carbohidrasas han sido ampliamente reportadas en crustáceos (Gamboa-Delgado *et al.* 2003), siendo la amilasa la carbohidrasa más común en los crustáceos marinos y de agua dulce (Pavasovic 2008). También existe evidencia de que algunas especies de cangrejos pueden hidrolizar carbohidratos complejos (celulosa y hemicelulosa), debido a la presencia de diversas enzimas en sus jugos digestivos (Linton y Greenaway 2004). Xue *et al.* (1999) han demostrado la presencia de celulasa endógena en *C. quadricarinatus*. Este resultado es particularmente interesante para la acuicultura, debido a que se podría incluir una mayor cantidad de polisacáridos derivados de plantas en el diseño de nuevos alimentos para esta especie y, de esta manera, bajar los costos de las dietas al reducir la composición en proteínas (Pavasovic 2008).

La actividad de las enzimas digestivas ha sido evaluada en varias especies de crustáceos y se ha demostrado que es afectada por la composición de la dieta, el ritmo diario, los hábitos alimenticios e incluso el hábitat, la ontogenia, la muda, el fotoperíodo y la calidad de luz, la temperatura y el ciclo reproductivo (Saoud *et al.* 2013). Actualmente, son necesarias más investigaciones sobre los mecanismos de la digestión del alimento y el impacto de la dieta sobre el crecimiento y la sobrevivencia de los crustáceos.

Por lo tanto, es importante estudiar la fisiología digestiva y la histología de la glándula digestiva, ya que esta información podría ser utilizada como una herramienta para formular alimentos específicos de acuerdo a los requerimientos metabólicos de las especies cultivadas. Además, es importante estudiar la digestibilidad de los alimentos que permiten entender la eficacia de absorción de los nutrientes.

La evaluación de la digestibilidad de las dietas se puede realizar de dos maneras: *in vivo* o *in vitro*. La primera de estas técnicas determina la digestibilidad de un alimento o sus componentes como proteínas, lípidos, etc., utilizando como referencia un marcador inerte como lo es el Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> que no se absorbe a lo largo del tracto digestivo de los animales (McGinnis y Kasting 1964, Divakaran *et al.* 2000, Campaña-Torres *et al.* 2005, Fenucci 2008).

El método de digestibilidad *in vitro* se utiliza mayormente para cuantificar la digestibilidad de las proteínas y se basa en la determinación del grado de hidrólisis que produce un extracto de la glándula digestiva sobre estos compuestos. Este método, si bien es rápido, no tiene en cuenta las condiciones ambientales en la que se encuentran los animales (Fenucci 2008). Los métodos de digestibilidad *in vitro* se han desarrollado con el fin de contar con métodos rápidos, que permitan brindar información sobre el grado de hidrólisis de los nutrientes y así sustituir los métodos *in vivo* (Marletta *et al.* 1992, Forrellat 1998). Sin embargo, éstos hasta ahora han sido de mayor utilidad como herramientas complementarias para la predicción de la digestibilidad, así como la obtención de la correlación con la digestibilidad *in vivo* de los alimentos y de los nutrientes utilizados para su formulación (Nolasco-Soria *et al.* 2006).

La langosta de pinzas rojas, *Cherax quadricarinatus*, es una especie omnívora oportunista, nativa de los ríos del norte de Queensland (Australia) y sudeste de Papua Nueva Guinea. Esta especie posee un gran potencial para la acuicultura debido a su alta tasa de crecimiento, fácil manejo y alta productividad. En la actualidad se cultiva en forma intensiva y semi-intensiva en varios países, entre los que se encuentran Australia, Estados Unidos, China, Ecuador y México (Ghanawi y Saoud 2012, Saoud *et al.* 2013).

Esta especie fue introducida en Argentina en la década del '90 y se cultiva de forma semi-intensiva. El comercio interno de esta langosta está basado principalmente en el consumo en restaurantes y con fines ornamentales, mientras que en el exterior es consumida en Europa (principalmente en los países Escandinavos, Italia, Francia y Alemania), Asia y Estados Unidos (Luchini 2004).

En la actualidad, las dietas para la producción comercial de la langosta de pinzas rojas se basan en formulaciones realizadas para otras especies acuáticas, principalmente para camarones peneidos, langostinos y peces (Saoud *et al.* 2013). Hay pocos alimentos comerciales formulados especialmente para la langosta de agua dulce. En la última década se ha avanzado en esta temática; sin embargo, es necesario contar con conocimientos adicionales sobre los requerimientos nutricionales, en especial, en la determinación de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Además, es indispensable contar con mayores conocimientos sobre tecnología para el mejoramiento de alimentos formulados para juveniles y reproductores, utilizando ingredientes regionales de bajo costo y manejo de las condiciones de cultivo, como horas de alimentación, etc. (Saoud *et al.* 2013). En relación a esto, en la Argentina, el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC) trabaja en diferentes líneas de investigación, siendo una de las más importantes el desarrollo de estudios de nutrición para aquellas especies de organismos acuáticos autóctonas o exóticas ya introducidas, que presentan condiciones aptas de cultivo. Específicamente se trabaja sobre la disminución del contenido de harinas y aceites de pescado en las dietas reemplazándolas en las diferentes fórmulas desarrolladas y probadas por una serie de ingredientes como son: aceite de soja, harinas de carne y hueso, de sangre, de pluma, de algodón, de sorgo, afrechillo de arroz y subproductos avícolas. Estas formulaciones basadas en insumos de origen vegetal y animal, fueron utilizadas en cultivos de peces como: carpa común, pacú, amur, randiá, tilapia y en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* (Luchini 2011).

A partir de la introducción presentada se plantea el siguiente objetivo.

## **1.2 Objetivo**

Evaluar y comparar los efectos de dos alimentos comerciales, de los cuales uno es usado en el cultivo de juveniles de *C. quadricarinatus* en Argentina, y un tercer alimento formulado especialmente para esta especie, sobre la actividad de las enzimas digestivas, la digestibilidad *in vitro* de las proteínas y la estructura histológica de la glándula digestiva.

En función de este objetivo la hipótesis planteada es la siguiente:

**Hipótesis:** Los juveniles de *C. quadricarinatus* alimentados con el alimento especialmente formulado para la especie presentarán una buena condición fisiológica, determinada por mayor actividad enzimática digestiva y digestibilidad proteica, así como también una estructura celular y tisular conservada de la glándula digestiva.

## 1.3 Materiales y métodos

### 1.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles de *C. quadricarinatus* fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio, a partir de un plantel de reproductores suministrado por el criadero Las Golondrinas, Entre Ríos, Argentina. Los grupos reproductores, formados por 4 o 5 hembras y un macho cada uno, fueron mantenidos en acuarios de 60x40x30 cm conteniendo 30 L de agua (pH 7,5-7,8), temperatura ( $27\pm 1$  °C, mediante calentadores ATMAN<sup>®</sup> de 100 W) y aireación constante, fotoperíodo (14:10hs; luz: oscuridad), 4 o 5 tubos de PVC (10 cm de diámetro y 25 cm de largo) como refugios (Jones 1995) y alimentación *ad libitum* con *Elodea* sp. y alimento comercial para peces disco Tetracolor, Tropical Granules de Tetra<sup>®</sup>, cuya composición proximal es: 47,5% proteína cruda min.; 6,5% lípidos totales min.; 6% humedad máx., 2,0% fibra cruda máx., 1,5% fosforo min. y 100 mg/Kg ácido ascórbico min. Estas condiciones de cría han sido puestas a punto previamente en el laboratorio para la obtención de juveniles (Vázquez y López Greco 2007a; 2007b; Sánchez De Bock y López Greco 2010; Tropea *et al.* 2010; 2011).

Los lotes de reproductores fueron revisados semanalmente para la detección de las hembras ovígeras. Al momento de detectar una hembra ovígera, se procedió a su separación en acuarios de plástico individuales de 33,5x25x19 cm, bajo las mismas condiciones de aireación, fotoperíodo y alimentación anteriormente descriptas.

Cuando los juveniles se independizaron de sus madres en el estadio III (Levi *et al.* 1999), fueron separados y mantenidos hasta alcanzar el peso requerido para los ensayos en las mismas condiciones descriptas previamente.

### 1.3.2 Ensayos de alimentación y diseño experimental

Se evaluaron dos dietas comerciales y una especialmente formulada y preparada en el laboratorio para la especie en estudio. En el primer tratamiento/dieta, las langostas fueron alimentadas con una dieta comercial (Fundus<sup>®</sup>) desarrollada por Fideos Don Antonio SA, que es generalmente utilizada para el cultivo de *C. quadricarinatus* en algunos criaderos de



Argentina, cuya composición se basa principalmente en harina y aceite de pescado como fuentes de proteínas y lípidos, respectivamente. En estudios previos del laboratorio se ha utilizado este mismo alimento, obteniendo buenos resultados en términos de crecimiento y sobrevivencia (Stumpf *et al.* 2011). La segunda dieta comercial utilizada fue desarrollada por Tetra Holding (US) para peces tropicales denominada TetraColor<sup>®</sup> Tropical Granules, y es la que se usa habitualmente en Laboratorio de la Reproducción y el Crecimiento de Crustáceos Decápodos para *C. quadricarinatus* (Vázquez y López Greco 2007a, 2007b, Bugnot y López Greco 2009a, 2009b, Sánchez De Bock y López Greco 2010, Stumpf *et al.* 2010, Tropea *et al.* 2010, 2011 entre otros), cuyas fuentes proteicas de origen animal y vegetal están basadas en la harina de pescado, camarón, cereales y levaduras. Es importante aclarar que, para ambos alimentos comerciales no conocemos los porcentajes de inclusión de las diferentes fuentes de proteína, debido a que son marca registrada.

El tercer alimento evaluado, utilizado como dieta de referencia (DR) en el presente estudio, consiste en una dieta especialmente formulada para esta especie por Gutiérrez y Rodríguez (2010). Esta formulación ya ha sido utilizada en investigaciones previas por Chaulet *et al.* (2012) y Álvarez *et al.* (2015), entre otros.

Específicamente, esta dieta se formuló utilizando ingredientes locales de bajo precio, tal como la harina de soja, como una forma tanto de reducir costos de producción como así también de aprovechar la significativa producción sojera de Argentina.

La dieta DR se preparó mezclando primero los ingredientes secos con el aceite y luego el agua y el almidón pre-gelificado hasta obtener una consistencia de tipo de masa (Tabla 1.1). La mezcla se colocó en un mezclador mecánico “tipo prensa ajo” para obtener pellets de aproximadamente 3 mm de diámetro, que fueron secados en estufa a 60°C por 24 hs. Para este experimento, los alimentos Fundus<sup>®</sup> y Tetracolor<sup>®</sup> fueron denominados en función a la cantidad relativa de lípidos como alto lípidos (AL) y bajo lípidos (BL) respectivamente. El contenido de proteína cruda, lípidos totales, cenizas y humedad de las dietas fueron determinadas por el Instituto Nacional de investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina, de acuerdo a AOAC (1990) y su composición proximal se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.1. Formulación de la dieta de referencia (DR) para *Cherax quadricarinatus*, preparada en base a Gutiérrez y Rodríguez (2010).

Ingredientes	Porcentaje
Harina de Pescado	28
Harina de Soja	39
Almidón Pre-gelificado	19
Aceite de Soja	6
Bentonita	6
Mineral premix <sup>a</sup>	1
Vitamina premix <sup>b</sup>	1

<sup>a</sup>Mezcla de minerales (mg/kg): ZnSO<sub>4</sub>, 50; MgSO<sub>4</sub>, 35; MnSO<sub>4</sub>, 15; CoSO<sub>4</sub>, 2.5; CuSO<sub>4</sub>, 3; KI, 3. <sup>b</sup>Mezcla de vitaminas (mg/kg): A (retinol), 3000 UI/kg; D, 600 UI/kg; E (alpha tocopheryl acetato), 60; K, 5; C (ácido ascorbico), 150; B1 (tiamina), 10; B (riboflavina), 10; Vitamina B6 (piridoxina), 7; B12, 0,02; Biotina, 0,4; Ácido pantoténico, 35; Ácido fólico, 6; Niacina, 80; Colina, 500; inositol, 100.

Tabla 1.2. Análisis proximal de los alimentos utilizados en juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

Nutrientes	Fundus <sup>®</sup> (AL)	Dieta de Referencia (DR)	TetraColor <sup>®</sup> (BL)
Proteína Cruda (%)	41,5 ± 1,7	37,9 ± 0,9	49,5 ± 0,1
Lípidos Totales (%)	21,3 ± 0,3	6,0 ± 0,1	4,6 ± 0,1
Cenizas (%)	6,8 ± 0,1	16,0 ± 0,1	8,7 ± 0,1
Humedad (%)	6,1 ± 0,1	4,0 ± 0,1	6,4 ± 0,1

Los juveniles fueron distribuidos en cuatro grupos en función de su peso medio: (A), 0,5±0,14 g (N=90); (B), 1,3±0,29 g (N=90); (C), 7,4±1,09 g (N=45); y (D), 14,1±2,35 g (N=36). Dentro de cada grupo, los animales fueron asignados al azar a los tres tratamientos (alimentos) descriptos anteriormente de la siguiente manera: para los grupos A y B, 30 juveniles por tratamiento fueron colocados al azar en 3 acuarios de plástico diferentes (10 animales por acuario); para el grupo C, 15 juveniles por tratamiento fueron colocados al azar en 3 acuarios diferentes de plástico (5 animales por acuario); y para el grupo D, 12 juveniles por tratamiento fueron colocados al azar en 4 acuarios diferentes de plástico (3 animales por tratamiento). Cada acuario plástico (32×26×19 cm) fue considerado una réplica y en todos los acuarios se colocaron 10 L de agua declorada con aireación continua. Se agregó 1 tubo de PVC por cada animal y una red de tipo cebollera de 35×20 cm como refugios. Las condiciones de fotoperíodo y temperatura fueron las mismas

que las descritas anteriormente en la obtención de juveniles. Las langostas fueron aclimatadas a las condiciones experimentales por una semana y luego comenzó el experimento. Los juveniles fueron alimentados una vez al día por la mañana durante 24 días al 7% (grupos A y B), 5% (grupo C) and 3% (grupo D) del peso medio de cada grupo (todas estas fueron condiciones *ad libitum* para cada grupo de diferente peso). En el caso de observar mudas y/o animales muertos, los mismos fueron retirados para que no interfirieran con el experimento. El crecimiento fue evaluado a través de la tasa de crecimiento específico (TCE) basada en la siguiente ecuación:  $TCE = 100 * (\ln \text{ peso corporal final} - \ln \text{ peso corporal inicial}) / \text{tiempo en días}$ .

Para el análisis histológico de la glándula digestiva, adicionalmente se agregaron 5 animales por tratamiento para cada grupo (N=60), que fueron mantenidos individualmente en frascos de vidrio de 13,5 cm de diámetro y 13,5 cm de alto, conteniendo 1,5 L de agua declorada y bajo condiciones similares a las anteriormente descritas respecto del porcentaje de alimento suministrado, tiempo de experimentación, fotoperíodo y temperatura.

Los parámetros de calidad de agua fueron medidos una vez a la semana en el tanque de reserva de agua del laboratorio (200 L), a partir del cual se obtuvo el volumen de agua necesario para los experimentos. Los parámetros fisicoquímicos estuvieron dentro de los rangos óptimos recomendados por Jones (1997) para *C. quadricarinatus*: oxígeno disuelto 5,4–8,0 mg/L, pH (7,3–8,4), dureza (65- 95 mg/L expresado como equivalentes de CaCO<sub>3</sub>), nitritos (<0,05 mg/L) y temperatura (26-27°C).

### *1.3.3 Extracción de la glándula digestiva y preparación de los extractos enzimáticos*

#### *Extracción de la glándula digestiva*

Al finalizar los experimentos (día 24), todos los animales fueron pesados (precisión 0,1 mg) y se midió el largo post orbital del cefalotórax (LPO; precisión 0,01mm), entre el margen posterior de la órbita y el extremo posterior del cefalotórax. Luego, los animales fueron anestesiados en agua fría durante 15 minutos y sacrificados entre las 09:00 h y las

12:00 h para evitar un posible efecto del ritmo diario sobre los parámetros a analizar. Una vez sacrificados, se removió el cefalotórax y se disecó la glándula digestiva, se pesó (precisión 0,01 mg) y rápidamente fue congelada a -80°C hasta su posterior uso. Se calculó el índice hepatosomático utilizando la siguiente fórmula: Índice hepatosomático (IHS) (%) = (peso húmedo de la glándula digestiva/peso total del cuerpo) x 100.

La glándula digestiva (GD) de los animales de una misma réplica/acuarios fueron agrupadas para asegurar el material suficiente para realizar todos los análisis. Para los grupos A y B (con 3 réplicas por tratamiento) se agruparon las 10 GD; para el grupo C (con 3 réplicas por tratamiento) se agruparon las 5 GD; y para el grupo D (con 4 réplicas por tratamiento) se agruparon las 3 GD. Luego se homogeneizaron en buffer Tris HCl (50mM, pH 7,5) (relación 1:4 p/v) y se centrifugaron durante 30 min (10.000 rpm a 4°C) de acuerdo a Fernández Gimenez *et al.* (2002). Luego, la capa de lípidos fue removida y los sobrenadantes (extractos enzimáticos) fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

#### *1.3.4 Ensayos de actividad enzimática*

##### *Proteína soluble*

La determinación de proteína de los extractos enzimáticos se realizó mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina (Sigma A9418) como estándar.

##### *Actividad de proteinasas*

La actividad proteolítica de las muestras, fue determinada de acuerdo a García-Carreño (1992) con modificaciones, usando azocaseína (Sigma A2765) como sustrato. La preparación de la mezcla de reacción consistió en 10 µL de extracto enzimático en un microtubo de 1,5 mL, añadiendo 250 µL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,2) y 500 µL de azocaseína (0,5 % en Tris-HCl). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se detuvo la reacción con 500 µL de ácido tricloroacético al 20 % (TCA) y

se clarificó por centrifugación (8.500 rpm por 10 min). La absorbancia de cada muestra fue registrada a 440 nm. Una unidad de actividad de proteinasas fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar el incremento de 0,01 de unidad de densidad óptica a 440 nm/min (López-López *et al.* 2005).

#### *Actividad de tripsina*

La actividad de tripsina fue evaluada utilizando el sustrato específico *N*benzoyl-DL-arginina *p*-nitroanilida (BAPNA) (Sigma B4875) a través de la medición de la tasa de hidrólisis a tiempo final. Se preparó una solución sustrato disolviendo BAPNA (1 mM) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agregó 100 mL de una solución buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, conteniendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Luego se agregó 0,75 mL de la solución sustrato a 37°C a 5µL de extracto enzimático y se registró el cambio de absorbancia a 410 nm a los 10 minutos (Erlanger *et al.* 1961). Se utilizó como control positivo tripsina comercial (Sigma T4665) (1 mg/mL). Una unidad de tripsina fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar el incremento de 0,01 de unidad de densidad óptica a 410 nm/min (López-López *et al.* 2005).

#### *Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteinasas*

Para evaluar el efecto de los inhibidores sobre la actividad de proteinasas, se incubaron los extractos enzimáticos con inhibidores específicos, con el fin de identificar los tipos de enzimas proteolíticas presentes en el extracto proteico (García-Carreño y Haard 1993). El inhibidor de tripsina de la soja (SBTI) (Sigma T9128) fue utilizado como inhibidor de proteinasas de la clase serino, mientras que como inhibidor específico de tripsina se utilizó TLCK (Sigma T7254). Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad residual, considerando la actividad en ausencia del inhibidor como el 100% de actividad.

### *Actividad de lipasas*

La actividad de lipasas de cada extracto enzimático fue determinada según Versaw *et al.* (1989). La mezcla de reacción consistió en colocar 100  $\mu\text{L}$  de taurocolato de sodio (100 mM), 920  $\mu\text{L}$  Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y 10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -naftil caprilato (Goldbio N-100) como sustrato (100 mM en dimetil sulfoxido (DMSO)). La mezcla se incubó a 25°C por 30 min, posteriormente, se agregó 10  $\mu\text{L}$  Fast Blue BB (100 mM en DMSO) y la mezcla se incubó a la misma temperatura por 5 min. Se detuvo la reacción con 100  $\mu\text{L}$  TCA (0,73 N), se clarificó con 1350  $\mu\text{L}$  acetato de etilo: etanol (1:1 V/V) y se registró la absorbancia a 540 nm. Los tubos de referencia o blanco fueron preparados de manera similar, pero el extracto crudo fue agregado posteriormente a la solución de TCA. Una unidad de lipasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar un incremento de 0,01 de unidad de densidad óptica a 540 nm/min (López-López *et al.* 2005).

### *Actividad de celulasas*

La actividad de celulasas fue evaluada determinando la producción de azúcares reductores provenientes de la hidrólisis de la  $\alpha$ -celulosa (Sigma C8002) de acuerdo con Linton y Greenaway (2004). Para ello, se mezcló 50  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático con 100  $\mu\text{L}$  de una solución sustrato de  $\alpha$ -celulosa 2% en una solución buffer de acetato 0,1 M, pH 5,5. Se incubó a 30°C por 60 min y se detuvo la reacción agregando 25  $\mu\text{L}$  de TCA 0,3 M. El exceso de ácido fue neutralizado con 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  2,5 M y las proteínas fueron precipitadas por centrifugación a 10.000 rpm por 10 min. Además, se preparó un blanco para cada muestra colocando 100  $\mu\text{L}$  de la solución buffer acetato y 50  $\mu\text{L}$  extracto enzimático. Inmediatamente, luego de la incubación, se determinó la actividad de celulasas por cuantificación en la producción de azúcares reductores de acuerdo a López-López *et al.* (2005). Se agregó 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 500  $\mu\text{L}$  de ácido dinitrosalicílico (DNS; del inglés: dinitrosalicylic acid) y la mezcla se colocó en baño de agua a 100°C por 15 minutos. El volumen final se ajustó hasta 5 mL y la solución de color se midió la absorbancia a 540 nm. Una unidad de celulasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar

el incremento de 0,01 de unidad de densidad óptica a 540 nm/min (López-López *et al.* 2005).

#### *Actividad de amilasas*

La actividad de amilasas de cada extracto enzimático fue determinada de acuerdo a Vega-Villasante *et al.* (1993). La mezcla de reacción consistió en agregar 500  $\mu$ L Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), 5  $\mu$ L de extracto enzimático, y 500  $\mu$ L de una solución de almidón (1 % en Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5). Luego se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La actividad de amilasa se determinó por la cuantificación de la producción de azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de almidón. Inmediatamente después de la incubación, se agregaron a la mezcla de reacción 200  $\mu$ L de carbonato de sodio (2 N) y 1,5 mL del reactivo DNS y se llevó a ebullición en baño de agua a 100°C por 15 minutos. Posteriormente, se ajustó el volumen a 10 mL con agua destilada y se midió la absorbancia a 550 nm. Los tubos de referencia o blanco fueron preparados de manera similar pero el extracto enzimático fue agregado posteriormente a la solución del reactivo DNS. Una unidad de amilasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar el incremento de 0,01 de unidad de densidad óptica a 540 nm/min (López-López *et al.* 2005).

#### *1.3.5 Digestibilidad in vitro de proteínas*

La digestibilidad de proteínas *in vitro* se evaluó de acuerdo a Divakaran *et al.* (2004). La mezcla de reacción consistió en agregar 100 mg de cada alimento a 3,5 mL de solución buffer trietanolamina a pH 8,5 con  $\text{CaCl}_2$  0,2 M y 0,5 mL del extracto enzimático. Luego se determinaron los grupos amino libres producto de la hidrólisis enzimática, usando el ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS; del inglés: trinitrobenzenesulfonic acid) (Fluka 92822) (Alder-Nissen 1979). El aminoácido leucina fue utilizado como estándar y los resultados fueron expresados como  $\mu$ M de leucina liberados por cada 100  $\mu$ g/mL de proteína en los extractos enzimáticos a partir de 100 mg de alimento por minuto. Este valor indica la cantidad de aminoácidos liberados y es un índice relativo de digestibilidad *in vitro*.

Todas las determinaciones enzimáticas y de digestibilidad fueron realizadas por triplicado.

#### *1.3.6 Análisis histológico*

Al finalizar el bioensayo, las langostas fueron crioanestesiadas (se las colocó en agua con hielo durante 15 minutos) y se disecó la glándula digestiva que rápidamente se fijó en solución de Bouin por 4 horas a temperatura ambiente. Los órganos fueron posteriormente deshidratados, incluidos en Paraplast (Leica Microsystems<sup>®</sup>) y coloreados con Hematoxilina-Eosina. Al menos 3 cortes (4-6  $\mu\text{m}$  de espesor) de cada animal fueron analizados bajo microscopio óptico (Imager A. 1, Zeiss<sup>®</sup>) y fotografiados con cámara Leica<sup>®</sup> ICC50 de 3 mpx. Se analizó cualitativamente la estructura de la glándula digestiva de cada animal para los diferentes alimentos.

#### *1.3.7 Análisis estadístico*

Se realizó un análisis de la varianza de 1 factor (ANOVA) para comparar entre dietas de una misma talla los pesos iniciales, largo postorbital (LPO) del cefalotórax, tasa de crecimiento específica (TCE) y el índice hepatosomático (IHS). Se realizó ANOVA de 2 factores para analizar la concentración de proteína soluble, actividad enzimática y digestibilidad *in vitro* de proteínas, con los siguientes factores fijos: dietas (DR, AL y BL) y grupo de peso (A, B, C y D). Cuando la interacción entre los factores fue significativa, se realizó un análisis de efectos simples para detectar diferencias entre los factores. Cuando la interacción no fue significativa, se utilizó el test de Tukey para analizar los efectos principales de cada grupo de peso y dieta. En todos los casos, fueron verificados los supuestos del ANOVA y se aplicaron transformaciones a los datos si se detectaron falta de normalidad y/o homogeneidad de varianza (Sokal y Rohlf 1995). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa InfoStat versión 2012. Cuando el número de réplicas por tratamiento fue desigual, dicho programa aplica modificaciones propuestas por Tukey-Cramer (Miller 1981) para realizar el análisis estadístico. El nivel de significancia que se consideró para todos los análisis fue 0,05.



## 1.4 Resultados

### 1.4.1 Ensayos de alimentación

La densidad de langostas, el peso inicial, la tasa de crecimiento específica, el largo postorbital y el índice hepatosomático para cada dieta y grupo se muestran en la Tabla 1.3. Los animales de menor peso medio (grupo A) alimentados con la dieta con alto contenido lipídico (AL) presentaron mayor TCE que los alimentados con la dieta de referencia (DR) y con la de bajo contenido lipídico (BL). A su vez, los grupos de peso B y C presentaron una mayor TCE cuando fueron alimentados con DR y AL, mientras que los juveniles de mayor tamaño (grupo D) registraron iguales TCE sin depender del tipo de dieta.

En los grupos de peso A y B, los juveniles alimentados con AL presentaron significativamente mayor IHS ( $p < 0,05$ ) que los animales alimentados con DR y BL. A su vez, los animales de mayores tamaños (grupos C y D) presentaron iguales IHS sin depender del tipo de dieta con la que fueron alimentados (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Densidad, peso inicial, largo postorbital (LPO), tasa de crecimiento específica (TCE) e índice hepatosomático (IHS) para cada dieta y grupo de peso de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentados durante 24 días.

Dieta	Grupo	Densidad (indiv/m)	Peso Inicial (g)	LPO (mm)	Peso Final (g)	TCE (%/día)	IHS (%)
DR	A	41,66	0,55±0,01 <sup>a</sup>	11,53±0,38 <sup>a</sup>	0,87±0,11 <sup>ab</sup>	1,34±0,30 <sup>b</sup>	7,31±0,15 <sup>a</sup>
	B	41,66	1,33±0,07 <sup>b</sup>	15,24±0,23 <sup>ab</sup>	2,16±0,13 <sup>b</sup>	2,04±0,13 <sup>a</sup>	7,33±0,20 <sup>a</sup>
	C	20,83	7,28±0,18 <sup>c</sup>	23,45±1,08 <sup>a</sup>	8,40±0,59 <sup>ab</sup>	0,73±0,04 <sup>a</sup>	6,75±0,34 <sup>a</sup>
	D	12,5	14,10±0,34 <sup>d</sup>	29,43±1,21 <sup>a</sup>	16,64±1,30 <sup>d</sup>	0,31±0,17 <sup>a</sup>	6,66±0,33 <sup>a</sup>
AL	A	41,66	0,54±0,01 <sup>a</sup>	12,35±0,42 <sup>a</sup>	1,02±0,10 <sup>b</sup>	2,53±0,32 <sup>a</sup>	9,10±0,26 <sup>b</sup>
	B	41,66	1,37±0,06 <sup>b</sup>	15,58±0,07 <sup>b</sup>	2,32±0,17 <sup>b</sup>	2,22±0,14 <sup>a</sup>	9,29±0,30 <sup>b</sup>
	C	20,83	6,87±0,08 <sup>c</sup>	23,12±0,16 <sup>a</sup>	7,78±0,37 <sup>a</sup>	0,56±0,04 <sup>a</sup>	7,34±0,55 <sup>a</sup>
	D	12,5	13,88±0,39 <sup>d</sup>	27,97±0,42 <sup>a</sup>	14,50±1,12 <sup>d</sup>	0,31±0,17 <sup>a</sup>	6,69±0,25 <sup>a</sup>
BL	A	41,66	0,48±0,04 <sup>a</sup>	11,01±0,11 <sup>a</sup>	0,73±0,05 <sup>a</sup>	1,68±0,15 <sup>b</sup>	7,88±0,27 <sup>a</sup>
	B	41,66	1,22±0,03 <sup>b</sup>	14,29±0,48 <sup>a</sup>	1,63±0,08 <sup>a</sup>	0,97±0,38 <sup>b</sup>	7,69±0,33 <sup>a</sup>
	C	20,83	8,08±0,08 <sup>c</sup>	24,46±0,62 <sup>a</sup>	9,23±0,31 <sup>b</sup>	0,31±0,12 <sup>b</sup>	6,57±0,29 <sup>a</sup>
	D	12,5	14,25±0,28 <sup>d</sup>	28,78±0,84 <sup>a</sup>	14,60±0,55 <sup>d</sup>	0,31±0,17 <sup>a</sup>	6,69±0,25 <sup>a</sup>

Los valores representan el valor promedio ± error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las comparaciones fueron realizadas entre dietas para un mismo grupo de peso. AL= alto lípidos (Fundus<sup>®</sup>); BL= bajo lípidos (TetraColor<sup>®</sup>); DR= Dieta de Referencia; LPO= largo postorbital del cefalotórax. Grupos de peso A, B and C: 3 réplicas (10, 10 y 15 animales por acuario); y grupo de peso D: 4 réplicas (12 animales por acuario).

#### 1.4.2 Análisis enzimáticos

Se registró actividad enzimática en los organismos alimentados con las tres dietas, aunque las actividades variaron entre tratamientos (Fig 1.1). Como se detalla a continuación, los perfiles de las actividades enzimáticas digestivas de proteinasas, lipasas y amilasas obtenidas a partir de extractos de las glándulas digestivas fueron influenciados significativamente ( $p < 0,05$ ) por la dieta y la talla de los animales, mientras que la actividad de celulasas no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Hubo una interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre el tipo de dieta y la talla de los animales, entre lo que se destaca, una actividad significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en langostas del grupo B (1 g) alimentadas con la dieta comercial con alto contenido de lípidos (AL) y una actividad significativamente menor en los juveniles del grupo C alimentados con BL y DR (Fig 1.1 A).

La actividad de lipasas mostró interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre las dietas y los grupos de peso (Fig 1.1 B). La actividad enzimática de organismos alimentados con AL fue significativamente diferente e inversamente proporcional al peso de los animales ( $p < 0,05$ ); es decir, a mayor peso de los juveniles menor actividad de lipasas. Las langostas de un peso aproximado de 7 g (grupo C) alimentadas con la dieta con bajo contenido de lipídico (BL) exhibieron mayor actividad de lipasas. Cuando los animales fueron alimentados con la dieta DR, las langostas del grupo A fueron las que registraron los niveles de actividad significativamente más elevados ( $p < 0,05$ ) que los otros grupos para la misma dieta.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la actividad de celulasas entre tratamientos (Fig 1.1 C); dicha actividad fluctuó entre  $0,94 \times 10^{-3}$  y  $6,47 \times 10^{-3}$  U/mg proteína.

La actividad de amilasas varió entre 0,19 y 0,65 U/mg proteína, sin embargo las langostas de los grupos B y C alimentados con dieta AL, evidenciaron mayor actividad (1,27 y 1,01 U/mg proteína respectivamente) (Fig 1.1 D).

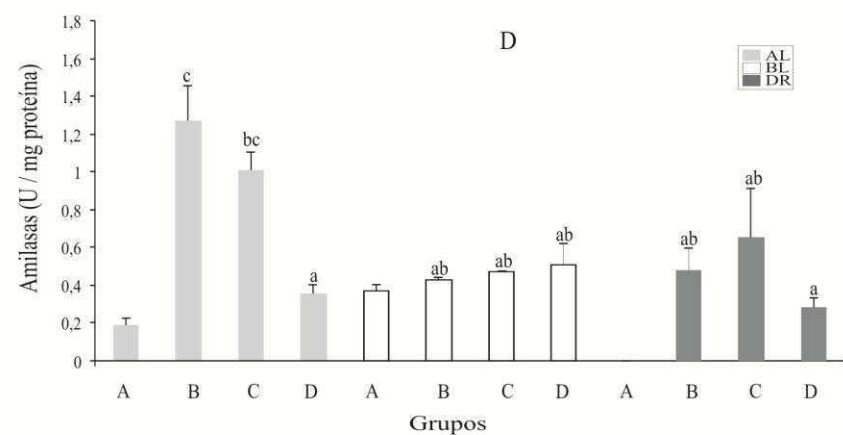
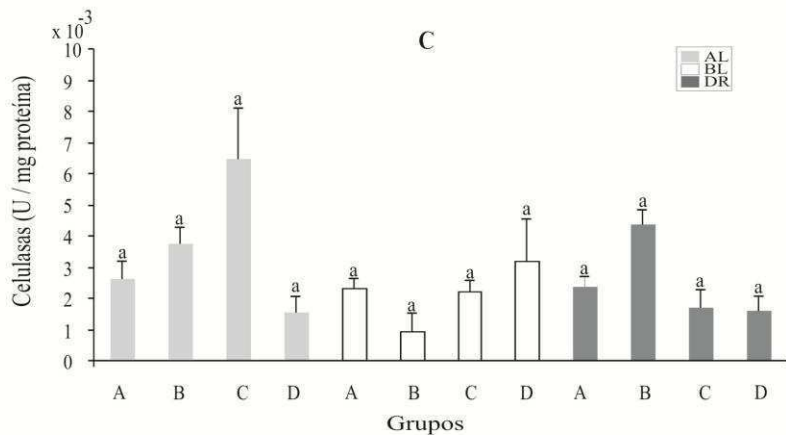
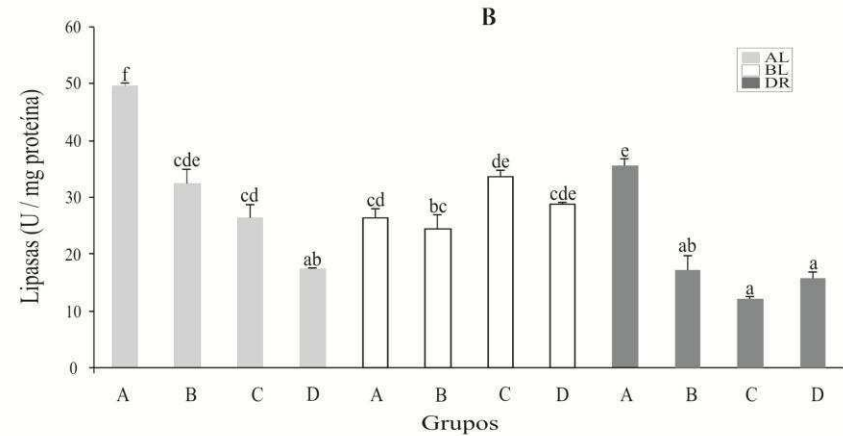
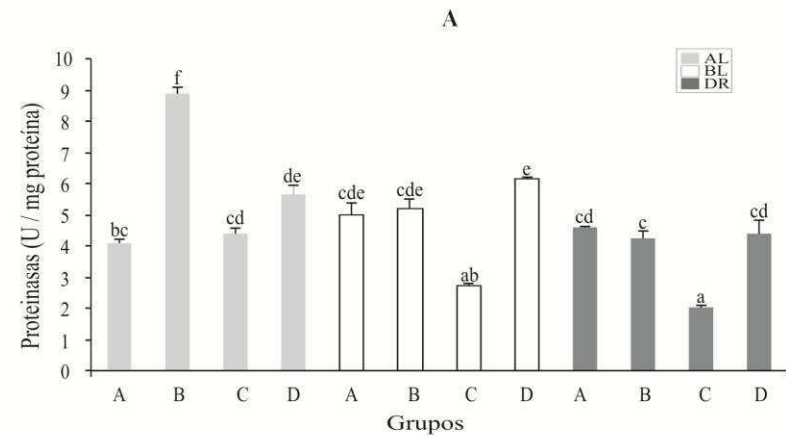


Figura 1.1. Actividad enzimática en los extractos enzimáticos de la glándula digestiva de juveniles de *Cherax quadricarinatus*. A: Actividad de Proteinasas. B: Actividad de Lipasas. C: Actividad de Celulasas. D: Actividad de Amilasas. Todas las actividades enzimáticas fueron expresadas como U mg/proteína. Los valores representan la media de tres réplicas  $\pm$  error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las comparaciones fueron realizadas entre los grupos de peso alimentados con la misma dieta y entre dietas para un mismo grupo de peso. AL= dieta con alto lípidos (Fundus<sup>®</sup>); BL= dieta con bajo lípidos (TetraColor<sup>®</sup>); DR= Dieta de Referencia.

La actividad específica de tripsina mostró interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre el tipo de dieta y el peso de los animales. Los valores de actividad de los animales alimentados con la dieta AL fueron significativamente mayores que para las langostas alimentadas con las otras dos dietas, registrándose mayor actividad en los grupos B y C (Fig 1.2).

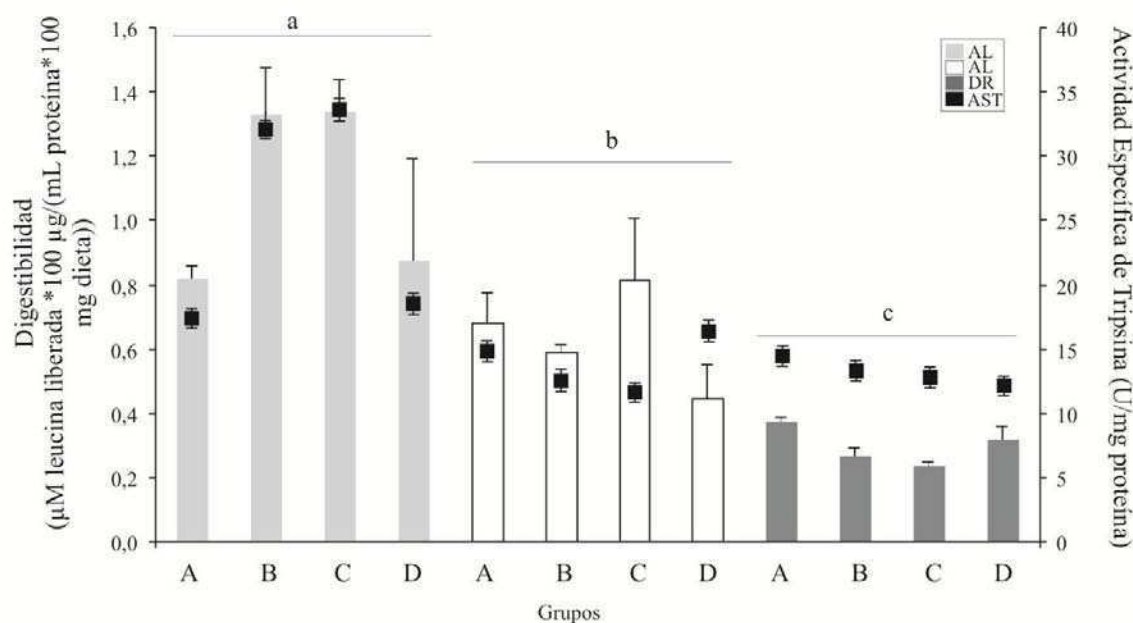


Figura 1.2. Digestibilidad *in vitro* de proteína (barras) y Actividad específica de Tripsina (AST) (cuadrados negros) de los extractos de la glándula digestiva de juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentados con las diferentes dietas. Los valores representan el promedio de tres réplicas  $\pm$  error estándar. La digestibilidad *in vitro* de proteínas fue expresada como  $\mu\text{M}$  leucine liberada por 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  proteína \* 100 mg dieta), y la actividad específica de tripsina expresada como U/mg proteína. AL= dieta con alto lípidos (Fundus<sup>®</sup>); BL= dieta con bajo lípidos (TetraColor<sup>®</sup>); DR= Dieta de Referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dietas para la digestibilidad *in vitro* de proteínas.

La Tabla 1.4 muestra la concentración de proteína soluble y los efectos de los inhibidores sobre la actividad digestiva de proteinasas de *C. quadricarinatus*. La concentración de proteína soluble en los extractos enzimáticos no mostró interacción significativa entre el tipo de dieta y el peso de los animales ( $p > 0,05$ ). Las langostas más pequeñas (grupos A y B) alimentadas con dieta comercial baja en lípidos tuvieron una

concentración de proteína soluble mayor que los animales más grandes (grupos C y D) ( $p<0,05$ ). Al comparar entre dietas para un mismo grupo de peso, no hubo diferencias significativas entre DR y BL, pero para ambos tratamientos se evidenció una concentración significativamente mayor de proteína soluble respecto de los organismos alimentados con dieta AL en todos los grupos de peso ( $p<0,05$ ).

La actividad de proteinasas en los extractos enzimáticos, usando azocaseína como sustrato y SBTI como inhibidor, mostró interacción significativa entre el tipo de dieta y los grupos de peso ( $p<0,05$ ). Utilizando TLCK como inhibidor específico de tripsina la actividad enzimática también mostró una interacción significativa entre las dietas y los grupos de peso ( $p<0,05$ ).

Tabla 1.4. Concentración de proteína soluble y efecto de los inhibidores específicos sobre la actividad de proteinasas en los extractos de la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

Dieta	Grupo	Proteína Soluble (mg/mL)	Actividad de Proteinasa residual	
			SBTI (%)	TLCK (%)
DR	A	35,15±1,90 <sup>a A</sup>	57,50±3,44 <sup>a A</sup>	13,96±4,38 <sup>c C</sup>
	B	23,01±4,49 <sup>b A</sup>	57,73±1,19 <sup>a A</sup>	74,91±7,15 <sup>a A</sup>
	C	19,95±4,32 <sup>b A</sup>	62,81±23,55 <sup>a A</sup>	48,76±4,37 <sup>b A</sup>
	D	23,80±3,18 <sup>ab A</sup>	49,63±2,38 <sup>a A</sup>	55,98±5,98 <sup>b B</sup>
AL	A	21,12±1,63 <sup>ab B</sup>	27,02±2,68 <sup>a C</sup>	53,28±7,21 <sup>b A</sup>
	B	8,91±1,50 <sup>b B</sup>	54,66±5,31 <sup>b A</sup>	36,44±7,73 <sup>b B</sup>
	C	8,58±1,00 <sup>b B</sup>	57,52±2,66 <sup>b A</sup>	5,90±5,90 <sup>d B</sup>
	D	21,35±5,73 <sup>a B</sup>	42,40±3,73 <sup>c B</sup>	78,73±6,06 <sup>a A</sup>
BL	A	35,90±0,57 <sup>a A</sup>	34,45±3,60 <sup>a B</sup>	26,99±0,37 <sup>cd B</sup>
	B	35,26±2,51 <sup>a A</sup>	34,06±1,79 <sup>a B</sup>	d C
	C	25,40±1,82 <sup>b A</sup>	37,35±2,16 <sup>a B</sup>	15,57±2,46 <sup>bc A</sup>
	D	26,19±2,50 <sup>b A</sup>	32,55±4,98 <sup>a B</sup>	34,23±6,13 <sup>ab B</sup>

La cantidad de proteína soluble fue expresada como mg proteína/mL. La actividad residual fue expresada como el % de actividad, considerando 100% la actividad de proteinasas sin inhibidor como el promedio de tres réplicas ± error estándar. Las diferentes letras pequeñas indican diferencias significativas entre los grupos de peso dentro de cada dieta. Mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre dietas para un mismo grupo de peso. AL= dieta con alto lípidos (Fundus®); BL= dieta con bajo lípidos (TetraColor®); DR= Dieta de Referencia. Grupos de peso A, B y C: 3 réplicas (10, 10 y 15 animales por acuario respectivamente); y grupo D: 4 réplicas (12 animales por acuario).

#### 1.4.3 Digestibilidad *in vitro* de proteínas

La digestibilidad *in vitro* de proteínas reveló un patrón similar al de la actividad de tripsina (Fig 1.2). Sólo se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dietas, siendo AL la dieta más digestible, seguida por BL y DR como la menos digestible. La dieta AL fue bien digerida por las langostas con valores entre 0,8 y 1,3  $\mu\text{M}$  leucina liberada/ $\text{mL}$  proteína\*100 mg dieta; BL mostró menores valores, y los más bajos fueron los obtenidos con DR (desde 0,3 hasta 0,4  $\mu\text{M}$  leucina liberada 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  proteína\*100 mg dieta. El peso de los animales no afectó significativamente la digestibilidad de la dieta ( $p > 0,05$ ).

#### 1.4.4 Análisis histológico

La estructura de la glándula digestiva de *C. quadricarinatus* es similar a la de otros crustáceos decápodos. Se compone por numerosos túbulos ciegos con cuatro tipos de células principales llamadas células E, F, B y R. Las células E son cuboidales con un núcleo prominente que ocupa la mayor parte del citoplasma basófilo; se localizan en la parte distal de los túbulos. Las células F son cilíndricas, con un núcleo central y citoplasma basófilo; se encuentran en la parte media y proximal del túbulo. Las células B son el tipo celular más grande, con una gran vacuola que desplaza al núcleo basalmente; son las más abundantes en la región media y distal de los túbulos. Las células R son las más numerosas, son cilíndricas y contienen gran cantidad de pequeñas vacuolas y el núcleo se localiza en la parte central o basal; son las más abundantes en la zona medial y proximal (Fig 1.3 A, B) (Al-Mohanna y Nott 1987, López Greco *et al.* 2011, Calvo *et al.* 2011, 2012, Sacristán *et al.* 2011).

Luego de 24 días de experimentación, los principales cambios observados en la glándula digestiva de los juveniles alimentados con AL fueron: pérdida estructural y desorganización de los túbulos (Fig 1.3 C), extensas regiones con una notoria reducción de la altura del epitelio (Fig 1.3 D y detalle, C), hipertrofia de las células B con una o más grandes vacuolas que tienden a coalescer en una sola gran vacuola (Fig 1.4 A, B), células R con grandes vacuolas (Fig 1.4 A, B), escasa diferenciación entre las células B y R (Fig 1.4 B), pérdida de los límites celulares (Fig 1.4 A, B), reducción en el número de células F por

túbulo (Fig 1.4 C) y pérdida de la típica luz estrellada de la luz del túbulo (Fig 1.4 D). No se observaron diferencias entre las dietas DR y BL (Fig 1.3 A, B), y a su vez los cambios estructurales no estuvieron relacionados con la talla de los juveniles.



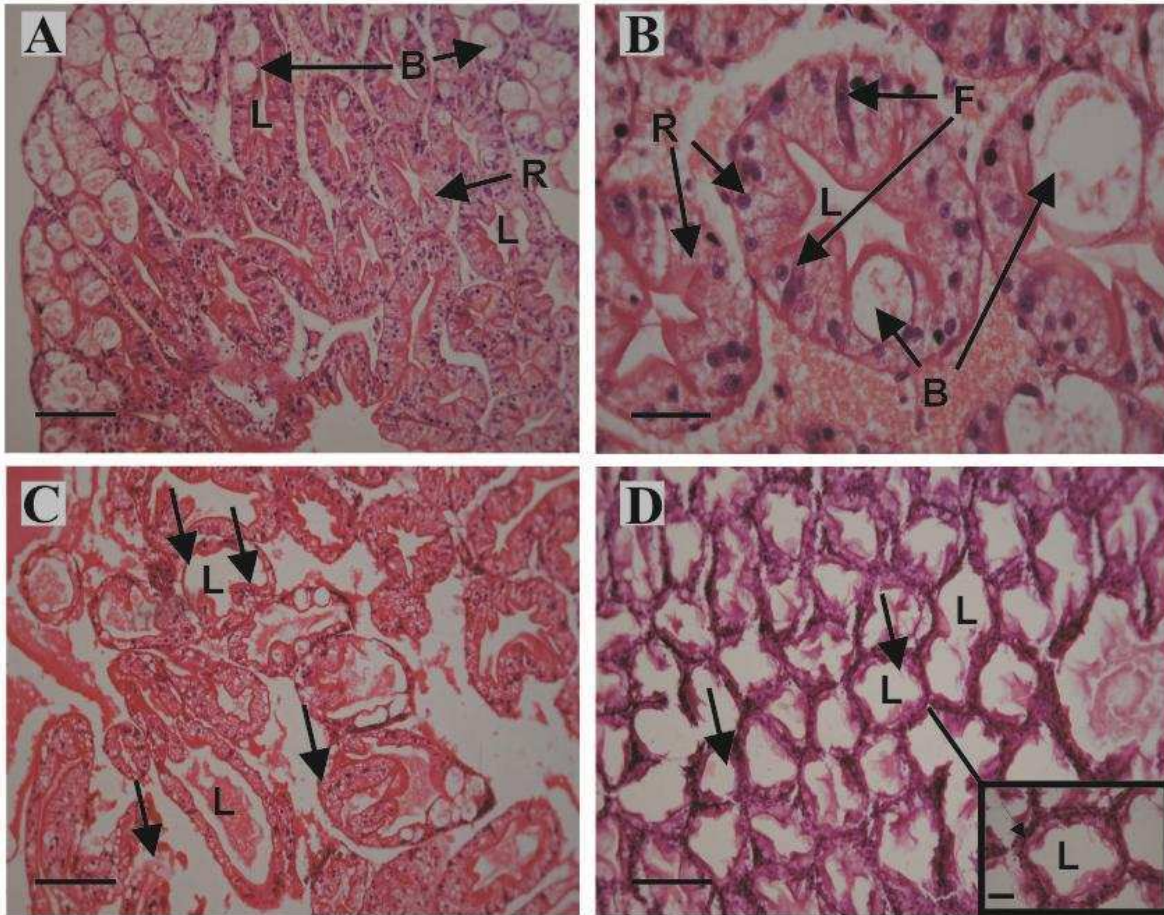


Figura 1.3. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentados con las diferentes dietas. A: Dieta de Referencia (DR); no se observan cambios estructurales; B: Bajo Lípidos (BL); no se observan cambios estructurales; C y D: Alto Lípidos (AL). C: pérdida de estructura y desorganización de los túbulos (flechas); D y detalle: extensas áreas con notoria reducción de la altura del epitelio (flechas). Barra de escala: A, B, C = 200  $\mu$ m; D, D detalle = 50  $\mu$ m. B: células B. F: células F; L: lumen del túbulo; R: células R.



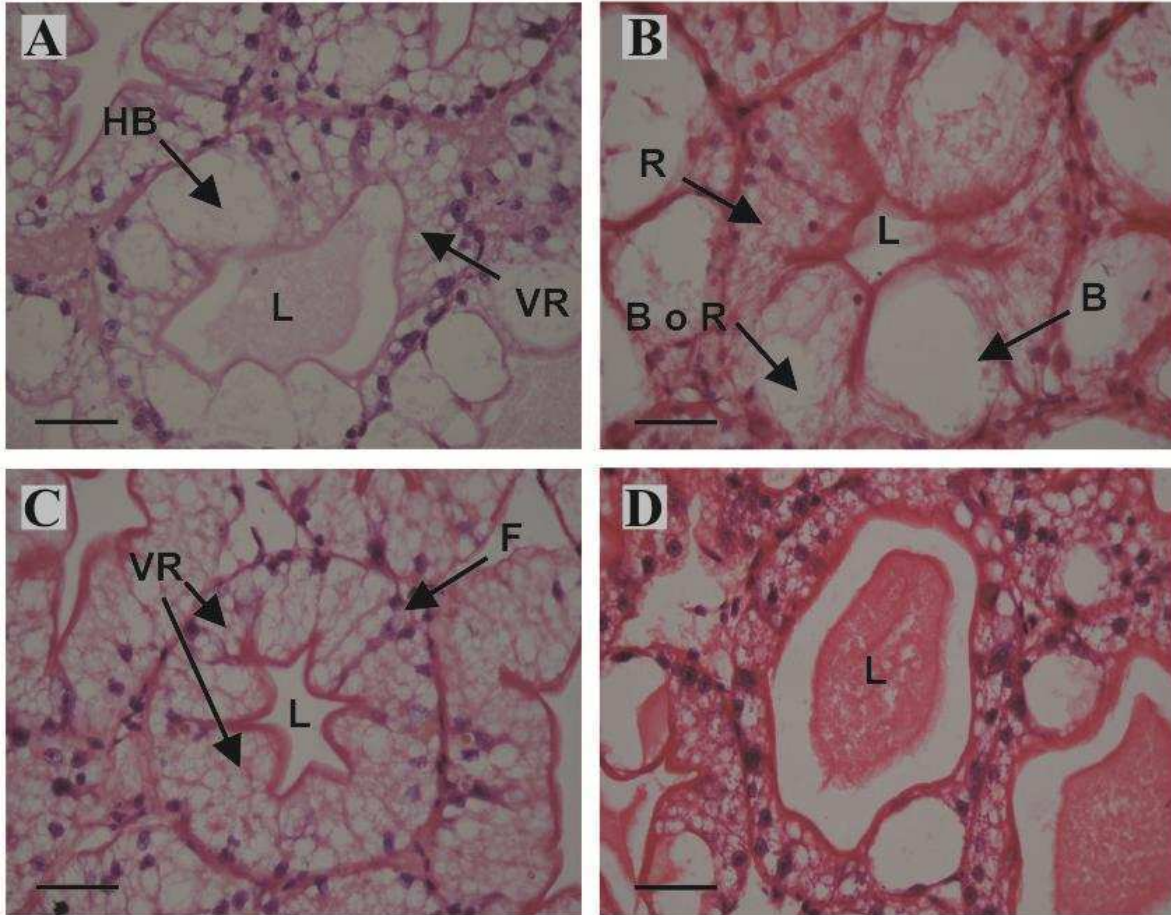


Figura 1.4. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentados con la dieta de alto lípidos (AL). A: hipertrofia de las células B con una o más vacuolas grandes que tienden a coalescer en una gran vacuola; células R con grandes vacuolas; escasa diferenciación entre las células B y R; F: escasa diferenciación entre las células B y R y pérdida de límites celulares; C: células R con grandes vacuolas; pérdida de límites celulares; y disminución en el número de células F por túbulo; D: pérdida de la típica luz estrellada del túbulo. Barra de escala: A, B, C, D = 50  $\mu$ m. B: células B. F: células F; HB: hipertrofia de las células B; L: lumen del túbulo; R: células R; VR: grandes vacuolas de las células R.

## 1.5 Discusión

Los juveniles de *C. quadricarinatus* mostraron actividad de las enzimas digestivas y digestibilidad *in vitro* de proteínas similares cuando fueron alimentados con la dieta de referencia y la dieta de bajo contenido lipídico.

El porcentaje de proteína cruda de la dieta DR se encuentra dentro del rango de 31 a 43 % que demostró los mejores resultados en términos de crecimiento, biomasa y sobrevivida en un estudio previo en juveniles de *C. quadricarinatus* de 1 g de peso promedio (Cortés-Jacinto *et al.* 2003). A su vez, Pavasovic (2008) propuso que las langostas de pinzas rojas pueden tolerar cantidades variables de lípidos en las dietas (7, 9 u 11%) cuando se incluyen en una dieta que contiene altos (>32%) o bajos (<19%) niveles de proteína. Es importante observar que los porcentajes de lípidos anteriormente señalados son similares al contenido de lípidos de las dietas DR y BL.

La presencia de una amplia variedad de enzimas en la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus*, está relacionada con la capacidad de esta especie para digerir una amplia gama de componentes en las dietas (Xue *et al.* 1999, Figueiredo *et al.* 2001, Figueiredo y Anderson 2003, López-López *et al.* 2005, Saoud *et al.* 2013). En la presente tesis, la actividad enzimática de proteinasas, lipasas y amilasas se modificó por el tipo de dieta y el peso de los animales. Los resultados de este experimento son coincidentes con los obtenidos por Lee *et al.* (1984) y Gamboa-Delgado *et al.* (2003), quienes observaron que la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* varía en función al nivel de proteína en la dieta y a la talla.

López-López *et al.* (2005) sostienen que cuando la calidad de la proteína en la dieta disminuye, se da un aumento progresivo en el uso de los carbohidratos-lípidos causando una disminución en el uso de las proteínas como fuente de energía. Pavasovic (2008) indicó que los cambios en la actividad de proteinasas relacionados al aumento del contenido lipídico de la dieta pueden estar asociados al ahorro de proteína. En este sentido, la actividad registrada de proteinasas del tipo serin-proteinasas en este estudio podría reflejar un bajo recambio y movilización de las proteínas debido a la presencia de altos niveles de lípidos. Las serin-proteinasas, como la tripsina y quimotripsina, son propuestas como

enzimas digestivas de mayor importancia en crustáceos y se cree que son las responsables del 40 al 60% de la digestión de la proteína en camarones peneidos (Hernández-Cortés *et al.* 1999a). Teschke y Saborowski (2005) demostraron que las proteinasas del tipo cisteína-proteinasa, son las enzimas que predominan en la glándula digestiva de *Crangon crangon* y *C. allmani*, pero su actividad es menor en *Euphausia superba*. De acuerdo con este resultado, Coccia *et al.* (2011) demostraron que las proteasas alcalinas tipo serino (tripsina y quimotripsina) de *Cherax albidus* fueron las enzimas activas a lo largo del tracto digestivo y que es una característica común a otros decápodos (Celis-Guerrero *et al.* 2004, Navarrete del Toro *et al.* 2006, Linton *et al.* 2009). Un estudio reciente (Rojo *et al.* 2010) sugiere que algunos grupos de crustáceos poseen una mayor proporción de serin-proteinasas, mientras que en otros predominan las proteinasas del tipo cisteino (catepsina L y B) o aspárticas (catepsina D). En esta tesis no se han evaluado las del tipo cisteino ni las aspárticas, sólo se han analizado las enzimas tipo serino en los juveniles de *C. quadricarinatus*.

La actividad de tripsina y quimotripsina ha sido reportada en otros crustáceos cuando se caracterizaron las clases de proteinasas presentes (García-Carreño *et al.* 1993) en función al desarrollo ontogenético (Lemos *et al.* 1999, Luo *et al.* 2008, Buarque *et al.* 2009) y el ciclo de muda (Fernández Gimenez *et al.* 2001, 2002). Luo *et al.* (2008) demostró la existencia de actividad de tripsina y quimotripsina en diferentes estadios del desarrollo embrionario de *C. quadricarinatus*; y la presente tesis confirmó que la glándula digestiva de juveniles de esta misma especie, de una amplia gama de peso, también evidencia una importante actividad de proteinasas de tipo serino.

En este trabajo, la actividad de serin-proteinasas, usando azocaseína como sustrato y SBTI como inhibidor, dependió principalmente del tipo de dieta. En contraste, la actividad residual cuando se utilizó TLCK y azocaseína, dependió del tipo de dieta y del peso de los animales, lo que indica que la actividad de tripsina estaría siendo afectada por ambos factores. El inhibidor de proteinasas TLCK mostró valores variables de inhibición, ya que se evidenció actividad residual de proteinasas al incubar con el inhibidor entre 13,96 y 55,98% (excepto en el grupo D y B alimentados con AL y DR respectivamente). Los bajos valores de inhibición podrían deberse a la presencia de otras enzimas proteolíticas como

proteinasas del tipo cisteínas y aspárticas que podrían tener mayor actividad (Rojo *et al.* 2010) y que no fueron evaluadas en esta tesis; por lo que serán necesarias más investigaciones para clarificar este punto. En términos de digestibilidad, la dieta AL mostró ser la más digestible, seguida por la BL y la DR. Allan *et al.* (2000) analizando el reemplazo de harina de pescado en dietas para la perca plateada australiana *Bidyanus bidyanus*, explicaron que la harina de carne y hueso poseen una baja digestibilidad de la materia seca, debido a su alto contenido de cenizas. En el estudio de Pavasovic *et al.* (2007) también se atribuyó la baja digestibilidad de una dieta a los niveles de ceniza (20,4%). Por lo tanto y de acuerdo con estos resultados, el 16% de cenizas de la dieta DR podría ser la causa de la baja digestibilidad *in vitro* de proteína. Por otro lado hay que destacar que la actividad específica de tripsina en los extractos enzimáticos mostró una tendencia similar a la digestibilidad de proteína *in vitro*. Esto concuerda con la mayoría de los autores que indican que la tripsina es la principal proteasa alcalina presente (Hernández-Cortés *et al.* 1999a).

Los resultados mostraron que los animales alimentados con las dietas con alto porcentaje de proteína (AL y BL, 41,58% y 49,51 respectivamente), poseen más actividad de tripsina que los animales alimentados con la dieta de menor porcentaje de proteína (DR, 37,98%). Esto podría estar relacionado con el hecho de que los organismos carnívoros (como algunos camarones peneidos) se alimentan principalmente de zooplancton o bentos y por lo tanto, producen mayor cantidad de enzimas proteolíticas y son capaces de digerir proteínas de origen animal más eficientemente que los herbívoros y omnívoros (García-Carreño *et al.* 1994). Sin embargo, la actividad de tripsina en las langostas alimentadas con la dieta AL fue mayor que con la dieta BL, lo que estaría indicando que la calidad de la proteína de la dieta también influye en la actividad enzimática. Es importante aclarar, que la calidad de la proteína para ambas dietas comerciales utilizadas es desconocida debido a que son de marca registrada, por lo que este efecto en este experimento aún está por confirmarse. Le Vay *et al.* (2001) y Fernández Gimenez *et al.* (2009) demostraron que la actividad enzimática digestiva en los crustáceos puede aumentar cuando son alimentados con alimentos de baja calidad nutricional. Por otro lado, Le Vay *et al.* (2001) explicó que un alto contenido de enzimas digestivas permite a las larvas de los peneidos extraer rápidamente los componentes más digestibles de un gran número de alimentos, con una

baja eficiencia de asimilación pero con una alta ganancia neta de energía. Esta estrategia es una adaptación al ambiente, donde el alimento tiene relativamente bajo contenido energético, permitiendo a los herbívoros maximizar la energía de asimilación. En contraste, las larvas de langostas marinas tienen un menor contenido de enzimas digestivas, pero pasan mucho más tiempo digiriendo la comida y en consecuencia, muestran una mayor eficiencia de asimilación. Esta estrategia es más adecuada para los carnívoros que se alimentan menos pero sus presas son más digeribles y ricas en energía (Le Vay *et al.* 2001).

La presencia de carbohidrasas sugeriría que las langostas de pinzas rojas son capaces de cubrir una cantidad sustancial de sus necesidades energéticas metabólicas a partir de los hidratos de carbono, a pesar que las investigaciones sugieren que solo una pequeña parte de sus necesidades energéticas se obtienen de éstos (Pavasovic *et al.* 2007, Saoud *et al.* 2013). En esta tesis, no se consideró la actividad de celulasas que podrían contribuir los microorganismos del sistema digestivo, debido a que no es claro si las celulasas endógenas de la langosta son productos de secreción de las células de la glándula digestiva o si provienen de bacterias simbiotas que residen en los lóbulos del intestino (Xue *et al.* 1999).

Comparando la actividad de celulasas entre las langostas de agua dulce (género *Cherax*) y los camarones marinos (género *Penaeus*), Crawford *et al.* (2005) propusieron que los altos niveles de actividad enzimática observada en las langostas eran de esperar, teniendo en cuenta que los crustáceos de agua dulce tienden a consumir mayor proporción de material vegetal en su dieta en comparación a las especies marinas. Además, la alta actividad de celulasas observada en *Cherax tenuimanus* podría indicar una adaptación genética específica a una dieta con alto contenido de materia vegetal, aunque es importante señalar que la actividad enzimática digestiva podría estar influenciado en cierta medida por la dieta. Estudios previos han demostrado que la actividad de celulasas en crustáceos puede aumentar en respuesta a altos niveles de polisacáridos en la dieta tales como celulosa y almidón (Gonzalez-Pena *et al.* 2002, Pavasovic *et al.* 2004). A su vez, una mayor disponibilidad de dichos sustratos ocurren en forma natural en estanques y también, puede provocar un aumento en los niveles de actividad de celulasas (Moss *et al.* 2001).

Estudios previos sugieren que *C. quadricarinatus* es tolerante a los altos niveles de lípidos de la dieta (Pavasovic 2008); sin embargo, en la presente tesis se observaron severos signos de mal nutrición en langostas alimentadas con dieta comercial con alto contenido lipídico (AL) (21,29%). Los juveniles de todos los grupos de peso estudiados, mostraron signos patológicos, como pérdida de estructura y desorganización de los túbulos de la glándula digestiva, junto con hipertrofia de las células B, células R con grandes vacuolas, escasa diferenciación entre las células B y R, pérdida de límites celulares, reducción del número de células F y la pérdida de la típica luz estrellada del túbulo. La mayor parte de estas alteraciones han sido observadas y descritas recientemente en nuestro laboratorio, en juveniles de *C. quadricarinatus* bajo diferentes periodos de ayuno (Calvo *et al.* 2011, 2012), lo que implicaría que no son específicas de la dieta y demuestra la capacidad de una rápida respuesta por parte de la glándula digestiva, en función a la composición de la dieta.

Teniendo en cuenta lo observado histológicamente para la dieta con alto contenido lipídico, podría estar relacionado con los valores del índice hepatosomático (IHS) registrados en los animales de menor peso (0,5 y 1 g de peso medio) para la misma dieta. Ello implicaría que los valores de IHS son más altos debido que los juveniles podrían estar almacenando, en la glándula digestiva, mayor cantidad de lípidos provenientes de la dieta, provocando alteraciones estructurales. A su vez, los juveniles de mayor peso (7 y 14 g de peso medio) no presentaron diferencias en los valores de IHS, pero se siguieron observando las mismas alteraciones estructurales que en los animales de menor peso.

En otras especies, como el langostino *Pleoticus muelleri*, niveles subóptimos de vitamina A en la dieta causan cambios histopatológicos en la glándula digestiva, como hiperplasia e hipertrofia celular, desorganización tisular y retracción celular (Fernández Gimenez *et al.* 2008). Juveniles de la langosta *Jasus edwardsii* alimentados con diferentes relación de hidratos de carbono: lípidos, mostraron una disminución de la vacuolización de las células R cuando esta relación disminuyó (Johnston *et al.* 2003). En juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de Cd y Zn se observó reducción en el número de células R y B, atrofia y desprendimiento de estas células, así como también infiltración hemocítica (Frias-Espericueta *et al.* 2008). Esto

demuestra la gran plasticidad de la glándula digestiva de los crustáceos, que lo ubica como un órgano monitor del estado fisiológico.

Esta tesis es el primer trabajo que demuestra que la composición de la dieta afecta directamente la estructura de la glándula digestiva en esta especie, reforzando el concepto de que la glándula digestiva de los crustáceos es una estructura que posee un funcionamiento dinámico y que funciona como un “espejo” en respuesta rápida a la dieta. Por lo tanto, la identificación de los principales cambios en la estructura de este órgano podría ser útil para evaluar los requerimientos nutricionales óptimos o subóptimos en el cultivo de esta especie.

A partir de todos los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo, la dieta comercial con alto contenido lipídico (Fundus<sup>®</sup>) no sería la más apropiada para el cultivo de *C. quadricarinatus*. Se sugiere que la dieta formulada para esta especie (DR) sería la más conveniente, si el contenido de cenizas fuera reducido permitiendo así aumentar la digestibilidad de la proteína. Será necesario realizar más investigaciones sobre esta dieta, como por ejemplo: utilización de aglutinantes, estabilidad en el agua, incorporación de atractantes y protocolos de alimentación. Además, es importante concluir que la actividad de enzimas digestivas, digestibilidad de proteínas *in vitro* y análisis histológicos de la glándula digestiva podrían utilizarse como herramientas integradas para evaluar los efectos de la dieta en juveniles de *C. quadricarinatus* o de otras especies cultivadas, además de los estudios usuales de crecimiento.

Los resultados discutidos muestran que los juveniles de *C. quadricarinatus*, alimentados con el alimento especialmente formulado, presentaron una buena condición fisiológica en función a la actividad enzimática digestiva y conservada estructura celular y tisular de la glándula digestiva. A su vez, la dieta diseñada para esta especie presentó baja digestibilidad de proteínas *in vitro*, por lo tanto, estos resultados apoyan parcialmente la hipótesis de trabajo.

# Capítulo 2

---

Influencia de la alimentación sobre el ritmo diario de las enzimas digestivas en juveniles de etapa de engorde de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

**Los resultados de este capítulo han sido publicados parcialmente como:**

Hernán J. Sacristán, Luis M. Franco Tadic y Laura S. López Greco, 2013.

–Influencia de la alimentación sobre el ritmo circadiano de las enzimas digestivas en juveniles de engorde de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae)”.  
*Latin American Journal of Aquatic Research* 41(4): 753-761.



## 2.1 Introducción

Como se mencionó en el Capítulo 1 el alimento es uno de los componentes principales en los costos de operación de un emprendimiento acuícola, por lo que su optimización es fundamental para la viabilidad de un cultivo. Además de su costo, una forma inadecuada de alimentación en cantidad, calidad o momento del día, implica una pérdida del mismo con una concomitante disminución en la calidad de agua y la eliminación innecesaria de nutrientes al ambiente, particularmente en sistemas semi-intensivos. Las prácticas de alimentación en la mayoría de los criaderos son al voleo, manualmente o utilizando un equipo de aspersión mecánica o embarcaciones pequeñas (Casillas-Hernández *et al.* 2006).

En general, se considera que las alimentaciones múltiples mejoran el crecimiento y el factor de conversión alimentario (Sedwick 1979, Wassenberg y Hill 1987, Chamberlain 1988, Wyban y Sweeney 1989, Dall *et al.* 1991) y reducen la acumulación de alimento sin consumir. Por lo tanto, es importante analizar los procesos fisiológicos que pueden afectar la capacidad de consumo y digestión del alimento, en los cuales la actividad enzimática tiene significativa importancia (Dall 1992, Molina *et al.* 2000).

La actividad de las enzimas digestivas ha sido estudiada en varias especies de crustáceos decápodos y se ha demostrado que la actividad se ve afectada por la ontogenia, estadio del ciclo de muda, composición de la dieta, ritmo circadiano, fotoperíodo y calidad de la luz, temperatura, hábitos alimentarios, el hábitat (Saoud *et al.* 2013) y el ayuno (Cuzon *et al.* 1980, Biesiot y Capuzzo 1990, García-Carreño 1992, Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002, Zhang *et al.* 2010, Calvo *et al.* 2013, Sacristán *et al.* 2014).

En particular, el ritmo diario fue estudiado no solamente en relación a la secreción de enzimas digestivas, sino que también en otros aspectos, desde bioquímicos relacionados con la concentración de proteínas, aminoácidos libres (Richard *et al.* 1979, Boghen y Ceccaldi 1987), ácidos grasos (Moureau *et al.* 1984), pigmentos y en la actividad de alimentación (Hernandez-Cortes *et al.* 1998, Molina *et al.* 2000) en langostinos, camarones y cangrejos.

Los primeros estudios sobre el ritmo diario de las enzimas digestivas en crustáceos fueron realizados en la langosta de agua dulce *Astacus leptodactylus* por Hirsch y Jacob (1929) y luego por van Weel (1960) en el cangrejo marino *Thalamita crenata*. El avance en este aspecto de la fisiología de los invertebrados fue importante cuando se demostró que las condiciones ambientales influyen sobre la actividad enzimática digestiva de los crustáceos (Vega-Villasante *et al.* 1999). De acuerdo con van Wormhoudt (1977), dos factores pueden modelar los ritmos de secreción de las enzimas digestivas: el factor trófico y el ritmo interno; ambos pueden ser ajustados por variaciones de los factores ambientales, particularmente la condición de luminosidad y el autor sugiere que los patrones de variación de las enzimas digestivas de camarones se mantienen incluso en condiciones de ayuno.

Estudios realizados por Seiffert (1997) y Nunes y Parsons (1999) demostraron que los camarones *Farfantepenaeus paulensis* y *F. subtilis* buscan activamente y consumen las mayores cantidades de alimento a la misma hora cada día, después del amanecer y al atardecer. Otros estudios sobre la alimentación de *Litopenaeus schmitti* (Díaz-Granda 1997) demostraron que el horario de alimentación más apropiado para el crecimiento de esta especie es a las 10:00 horas y además, se detectaron picos de actividad enzimática proteolítica asociados al horario de alimentación. Molina *et al.* (2000) hallaron las mayores actividades de proteinasas y lipasas en camarones (*Peneus vannamei*) alimentados en el horario de 12:00 y 20:00 horas, mientras que la actividad de amilasas resultó mayor a las 08:00 y 12:00 horas. A su vez, Casillas-Hernández *et al.* (2006) trabajando en el camarón blanco *L. vannamei*, hallaron que la actividad proteolítica posee un ritmo bifásico, con un periodo aproximado de 12 horas entre dos picos de máxima actividad enzimática. Este patrón bifásico fue encontrado por varios autores como González *et al.* (1995) en *L. schmitti* para la actividad de proteinasas y Vega-Villasante *et al.* (1999) en el cangrejo *Callinectes arcuatus* para la actividad de proteinasas, amilasas y lipasas durante las primeras horas de la noche y después del amanecer.

*Cherax quadricarinatus* es una especie de rápido crecimiento y en la etapa de engorde el consumo diario de alimento es muy significativo. Habitualmente esta especie se alimenta por la tarde como protocolo de suministro diario de alimentación (Jones 1995b),

considerando el mayor grado de actividad de los animales, pero ningún estudio ha evaluado si se registran ciclos de actividad de las enzimas digestivas asociados a esos momentos de alimentación. Por lo tanto, para optimizar el uso del alimento y disminuir los costos de producción, así como también evitar el suministro de alimento que no será ingerido, es importante conocer el ritmo diario de la actividad de las enzimas digestivas y su posible modificación de acuerdo a los horarios de alimentación.

A partir de la introducción presentada se plantea el siguiente objetivo.

## **2.2 Objetivo**

Estudiar el ritmo diario de los niveles de proteína soluble y la actividad de proteinasas, tripsina, lipasas y amilasas en juveniles de *C. quadricarinatus* en etapa de engorde y su posible modificación en función del momento de alimentación y el período de ayuno.

En función de este objetivo las hipótesis planteadas son las siguientes:

**Hipótesis 1:** El ritmo diario de las enzimas digestivas y la cantidad de proteína soluble presentarán picos de actividad y cantidad asociados al grado de actividad locomotora de *C. quadricarinatus*.

**Hipótesis 2:** El momento de alimentación matutino o vespertino provocará modificaciones en el patrón de ritmo diario de actividad de las enzimas digestivas y de los niveles de proteínas solubles.

**Hipótesis 3:** El ayuno provocará modificaciones en el patrón de ritmo diario de actividad de las enzimas digestivas y de los niveles de proteínas solubles.

## 2.3 Materiales y métodos

### 2.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles de *C. quadricarinatus* fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio, a partir de lotes de reproductores suministrados por el criadero Pinzas Rojas, Tucumán, Argentina. Cada hembra ovígera obtenida en laboratorio fue mantenida bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas en el Capítulo 1. Cuando los juveniles se independizaron en el estadio III (Levi *et al.* 1999) fueron separados de sus madres y mantenidos hasta alcanzar el peso deseado para los ensayos en las mismas condiciones de crecimiento anteriormente descriptas en el Capítulo 1. Los parámetros de calidad de agua tanto durante la etapa de crecimiento como durante los ensayos fueron los descriptos en el Capítulo 1.

### 2.3.2 Diseño Experimental

En primer lugar se realizaron dos ensayos para caracterizar el ritmo diario de actividad de las enzimas digestivas con un ayuno previo de 24 horas (ayuno breve) y otro de 16 días de ayuno (ayuno moderado) (experimentos 1 y 2: Ritmo diario).

En segundo lugar se realizaron otros dos experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la alimentación por la mañana o por la tarde sobre la actividad de las enzimas digestivas con un ayuno previo de 24 horas o 16 días de ayuno (experimentos 3 y 4: Pulso de alimentación).

#### *Experimentos 1 y 2: Ritmo Diario.*

Para el *Experimento 1*, en el cual los animales estuvieron previamente ayunados por 24 hs, se seleccionaron 48 juveniles en intermuda de *C. quadricarinatus* ( $6,67 \pm 0,61$  g de peso medio) que fueron asignados al azar en recipientes individuales de vidrio (13,5 cm diámetro x 13,5 cm alto) conteniendo 1,5 L de agua declorada, aireación continua y fotoperiodo 14:10 (L: O). Posteriormente los envases conteniendo los juveniles fueron

distribuidos al azar en cuatro acuarios de vidrio de 60×40×30 cm con agua mantenida a temperatura constante de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Altman 100 W, precisión  $1^{\circ}\text{C}$ ) (Fig 2.1). Ese mismo día los animales fueron alimentados a las 15:00 horas con TetraColor<sup>®</sup> Tropical Granules al 5% de su peso. A las 08:00 hs del día siguiente fueron alimentados al mismo porcentaje y cuatro horas después fueron colocados en otros recipientes individuales de vidrio con agua limpia y en las mismas condiciones anteriormente descritas. De esta manera los animales fueron mantenidos sin alimentación por un período de 24 horas (desde las 12:00 horas de un día hasta las 12:00 horas del día siguiente). Al cumplirse las 24 horas de ayuno, seis animales al azar fueron anestesiados y sacrificados; y posteriormente se realizaron siete muestreos consecutivos (se sacrificaron 6 animales en cada tiempo) con un intervalo de tres horas entre ellos durante las siguientes 24 horas (Fig 2.2 A).

Para el *Experimento 2* en el cual los animales estuvieron previamente ayunados por 16 días, se seleccionaron 56 juveniles en intermuda de *C. quadricarinatus* ( $6,09 \pm 1,11$  g de peso medio) que fueron asignados al azar en recipientes individuales de vidrio de la misma manera y en iguales condiciones experimentales descritas para el Experimento 1. Al cumplirse los 16 días de ayuno siete animales al azar fueron anestesiados y sacrificados cada tres horas durante las siguientes 24 horas a partir de las 12:00 hs (la cantidad total de muestras evaluadas fueron ocho) (Fig 2.2 A).

#### *Experimento 3 y 4: Pulso de alimentación.*

Para realizar el *Experimento 3* se seleccionaron 72 juveniles en intermuda que fueron colocados al azar en recipientes de vidrio (13,5 cm diámetro x 13,5 cm alto) y asignados al azar a dos grupos: Grupo 1 ( $6,89 \pm 0,52$  g; N = 36) y Grupo 2 ( $6,67 \pm 0,66$  g; N = 36).

En cada grupo, se acondicionaron cuatro acuarios de vidrio para colocar los envases individuales de la misma manera que en el Experimento 1. En estas condiciones los animales fueron ayunados por 24 horas. Luego de este periodo, a cada grupo se les suministró un pulso de alimento TetraColor<sup>®</sup> Tropical Granules al 5% de su peso por una hora: a las 08:00 horas para el Grupo 1 (alimentación matutina) y a las 17:00 horas para el

Grupo 2 (alimentación vespertina). Se utilizaron como control de la condición enzimática inicial (antes del pulso de alimento) seis animales de cada grupo que fueron sacrificados.

Para cada grupo a las 09:00 horas (Grupo 1) y a las 18:00 horas (Grupo 2), seis animales al azar fueron anestesiados y sacrificados luego cada tres horas durante las siguientes 12 horas (Fig 2.2 B y C).

Para llevar a cabo el *Experimento 4* se seleccionaron 84 juveniles en intermuda que fueron colocados al azar en recipientes de vidrio (13,5 cm diámetro x 13,5 cm alto) y asignados al azar a dos grupos: Grupo 3 ( $5,07 \pm 1,02$  g; N = 42) y Grupo 4 ( $5,66 \pm 1,06$  g; N = 42). En cada grupo, se acondicionaron cuatro acuarios de vidrio para colocar los envases individuales de la misma manera que en el Experimento 1. En estas condiciones los animales fueron ayunados por 16 días. Luego de este periodo, a cada grupo se les suministró ~~un~~ pulso de alimento” con el mismo alimento y a las mismas horas para cada grupo que lo descrito para el Experimento 3.

Para cada grupo a las 09:00 horas (Grupo 3) y a las 18:00 horas (Grupo 4), siete animales al azar fueron anestesiados y sacrificados luego cada tres horas durante las siguientes 12 horas (Fig 2.2 B y C).

Es importante indicar que el tiempo de ayuno de 16 días fue estimado a partir de un experimento previo con el objetivo de evaluar si con una semana de ayuno era suficiente para provocar variaciones en los niveles de actividad de las enzimas digestivas (datos no publicados).

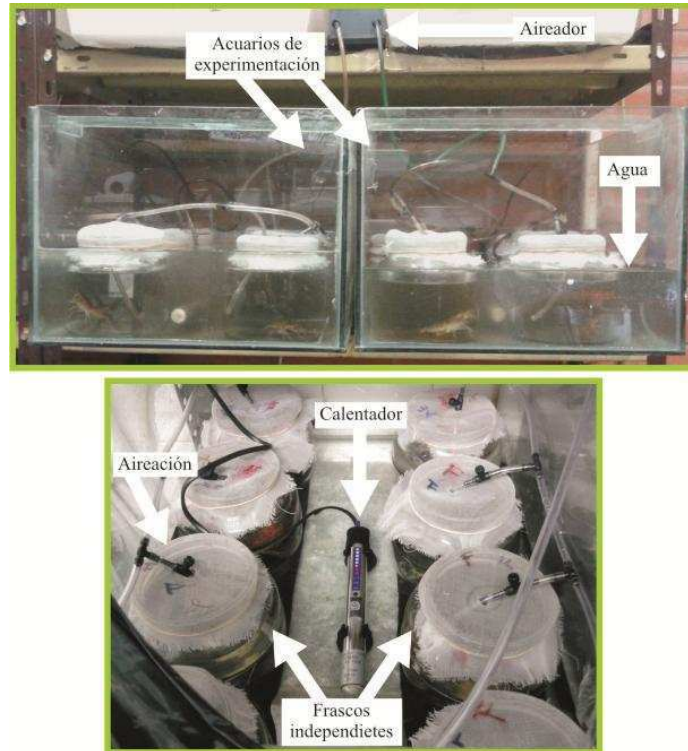


Figura 2.1. Disposición experimental de los frascos (réplicas) dentro de los acuarios en condiciones controladas de temperatura, aireación y fotoperiodo en juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

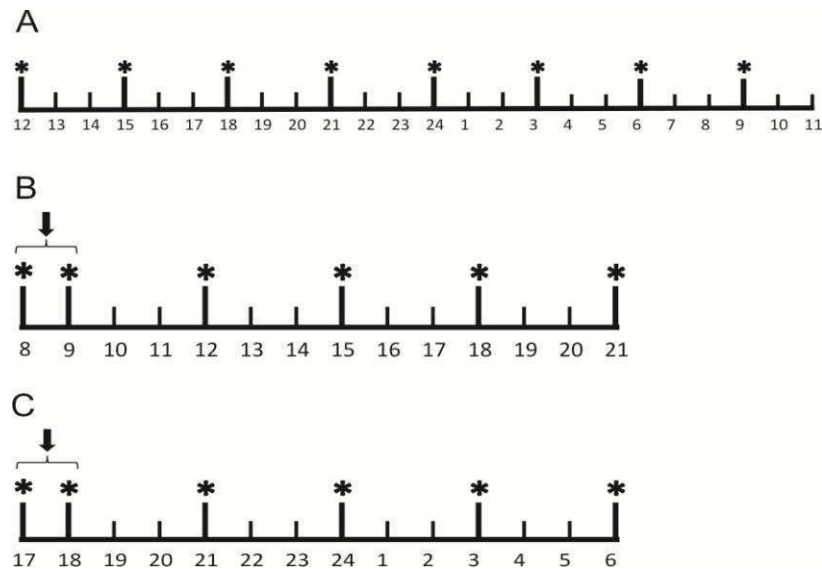


Figura 2.2. Esquema de los diseños experimentales luego de 24 hs o 16 días de ayuno en juveniles de engorde de la langosta *Cherax quadricarinatus*. A: Ritmo diario, B: Pulso de alimentación matutino y C: Pulso de alimentación vespertino. Los números corresponden a las horas del día, las flechas indican el momento de alimentación y los asteriscos (\*) indican los tiempos a los cuales se sacrificaron los animales en cada experimento.



### *2.3.3 Extracción de la glándula digestiva y preparación de los extractos enzimáticos*

Al finalizar los experimentos, los animales fueron anestesiados en agua fría, se disecó la glándula digestiva, se pesó (precisión 0,01 mg) y rápidamente se almacenó a -80°C hasta su posterior uso. El extracto enzimático fue realizado tal como se describió en el Capítulo 1.

### *2.3.4 Ensayos de actividad enzimática*

La cuantificación de proteína soluble y la actividad de proteinasas, tripsina, lipasas, y amilasas de los extractos se determinó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1.

### *2.3.5 Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2012 a través del análisis de la varianza (ANOVA de un factor) seguido de comparaciones *a posteriori* de medias entre los diferentes tiempos para un mismo grupo (test de Tukey). Además, para los cuatro experimentos se comparó el estado inicial (24 horas de ayuno) y se analizaron los resultados del Grupo 1 y Grupo 2 en función a las horas de post- alimentación. Previamente se verificaron los supuestos del ANOVA y se aplicaron transformaciones de datos cuando fue necesario (Sokal y Rohlf 1995). El nivel de significancia en todos los análisis fue de 0,05.

## **2.4 Resultados**

Los niveles de proteína soluble de la glándula digestiva de los juveniles de los experimentos 1 y 2, no variaron significativamente ( $p > 0,05$ ) a lo largo de 24 horas (Fig 2.3 A y D). Del mismo modo, en los animales pertenecientes a los Grupos 2 y 4 (pulso de alimentación vespertino) tampoco se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Fig 2.3 C y F).

Por otro lado, en el Grupo 1 (pulso de alimentación matutino) se registró un incremento significativo entre las 09:00 y las 18:00 hs ( $p < 0,05$ ) (Fig 2.3 B). Sin embargo este incremento no se observó en las langostas a las que se les ofreció alimento a las 08:00 hs luego de 16 días de ayuno (Grupo 3).

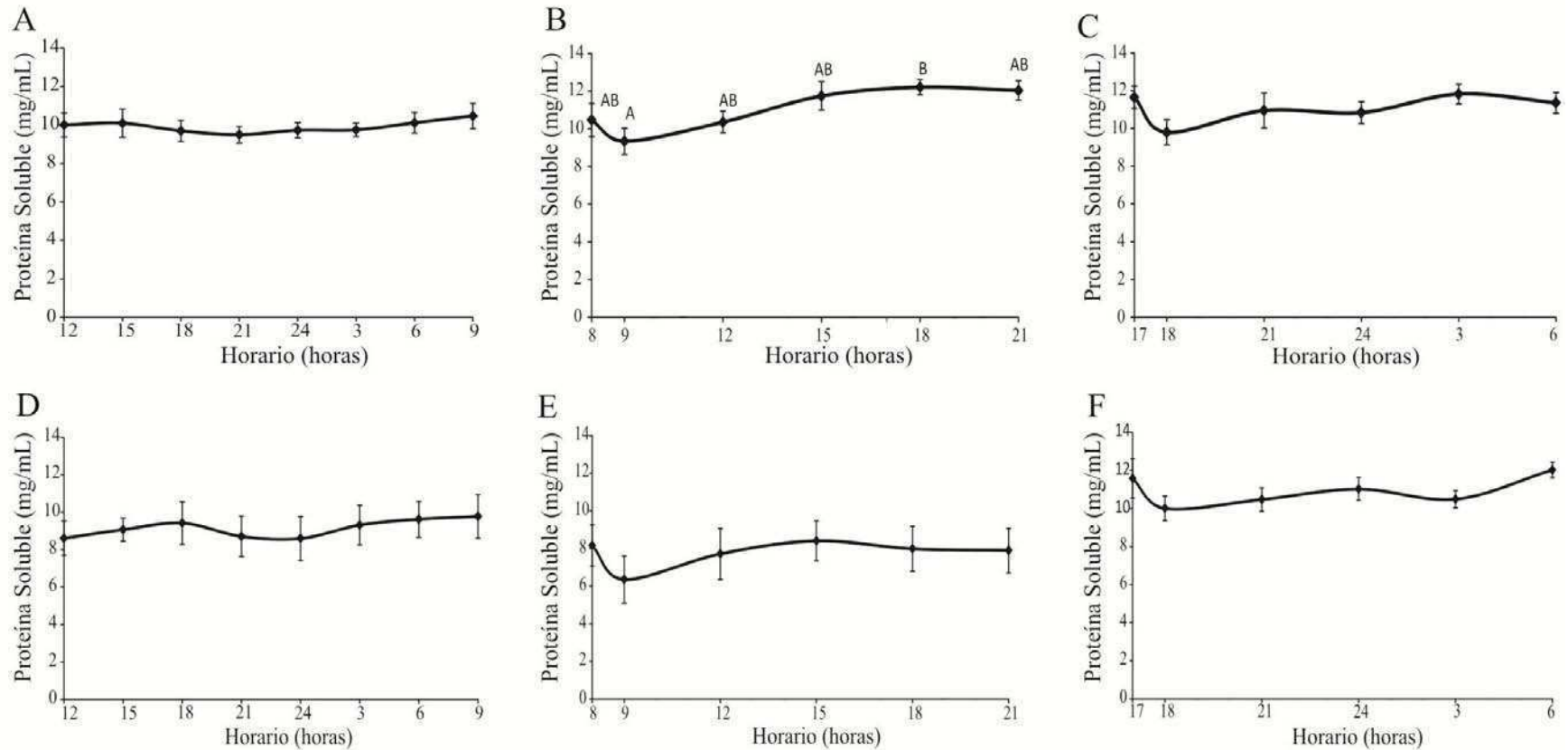


Figura 2.3. Niveles de proteína total en la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* ayunados por 24 hs o 16 días. A: Experimento 1 [(24 hs de ayuno) (Ritmo diario)]; B: Experimento 3, Grupo 1 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; C: Experimento 3, Grupo 2 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]; D: Experimento 2 [(16 días de ayuno) (Ritmo diario)]; E: Experimento 4, Grupo 3 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; y F: Experimento 4, Grupo 4 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las horas de cada experimento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar.

Los niveles de actividad de proteinasas registrado en los organismos del experimento 1 mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Fig 2.4 A), evidenciando un pico de actividad enzimática a las 21:00 hs. En cambio, en el experimento 2, se observan fluctuaciones en la actividad de proteinasas pero sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) a lo largo de las 24 hs (Fig 2.4 D).

La respuesta de las langostas del Grupo 1 y 2 luego de un ayuno previo de 24 hs, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en respuesta a los pulsos de alimentación correspondiente (Fig 2.4 B y C). En cambio, la respuesta al pulso de alimentación matutina de los animales ayunados por 16 días fue una disminución significativa de la actividad de proteinasas ( $p < 0,05$ ) desde las 09:00 hasta las 15:00 hs (Fig 2.4 E). De manera similar respondieron los animales cuyo pulso de alimentación fue vespertino (17:00 hs), disminuyendo la actividad proteolítica en forma significativa ( $p < 0,05$ ) desde las 18:00 hs hasta las siguientes 12 hs (Fig 2.4 F).

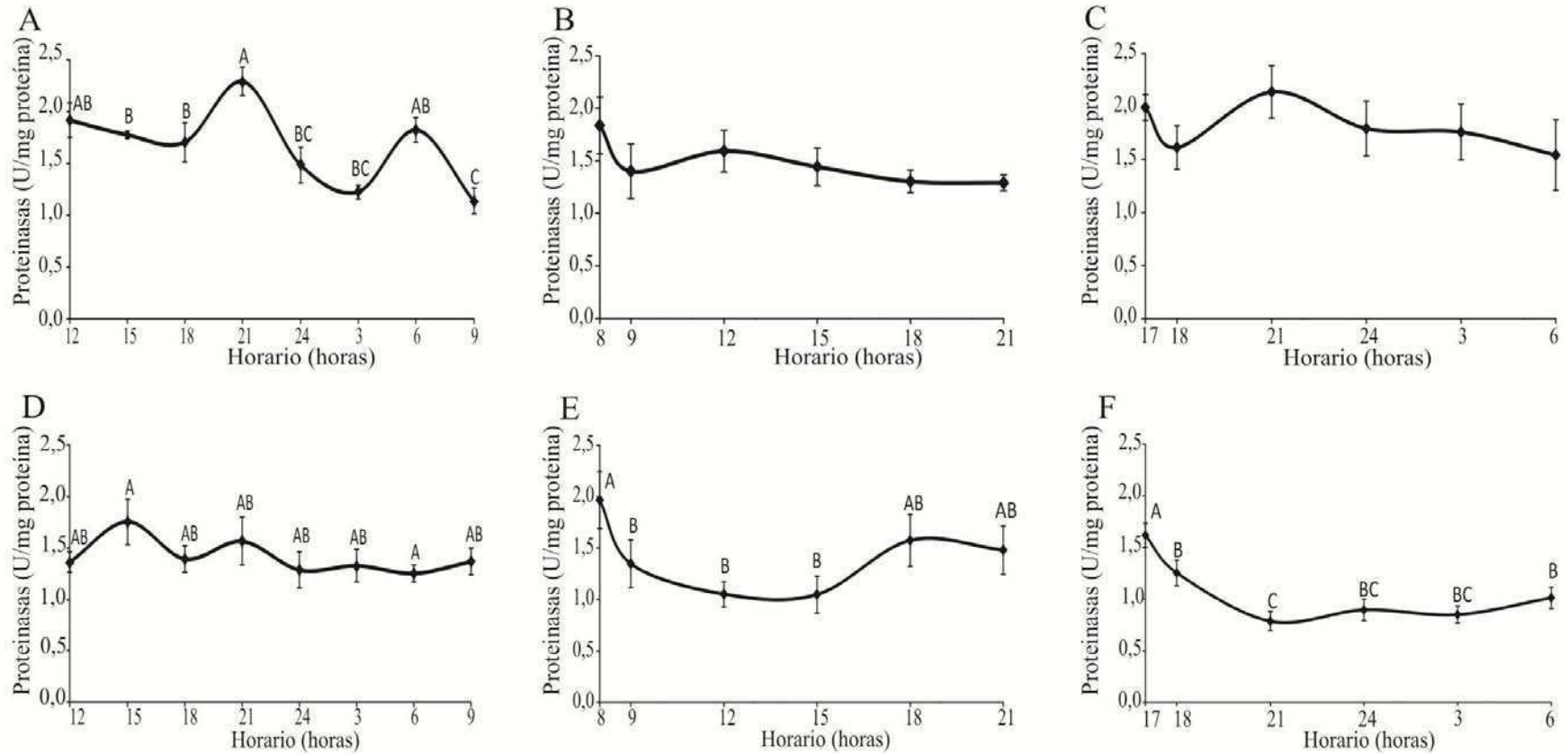


Figura 2.4. Niveles de actividad de proteinasas en la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* ayunados por 24 hs y 16 días. : Experimento 1 [(24 hs de ayuno) (Ritmo diario)]; B: Experimento 3, Grupo 1 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; C: Experimento 3, Grupo 2 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]; D: Experimento 2 [(16 días de ayuno) (Ritmo diario)]; E: Experimento 4, Grupo 3 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; y F: Experimento 4, Grupo 4 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las horas de cada experimento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar.

La actividad de tripsina registrada en las langostas del experimento 1 y 2; y experimento 3 (grupo 1 y 2) no fue significativa entre las distintas horas del día ( $p > 0,05$ ) (Fig 2.5 A, B, C y D). En la Figura 2.5 E y F, se puede observar una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad de tripsina a partir de las 09:00 hs para el grupo 3 ( $p < 0,05$ ) y las 18:00 hs para el grupo 4 ( $p < 0,05$ ), manteniéndose esas diferencias luego de 6 y 9 hs post-alimentación.

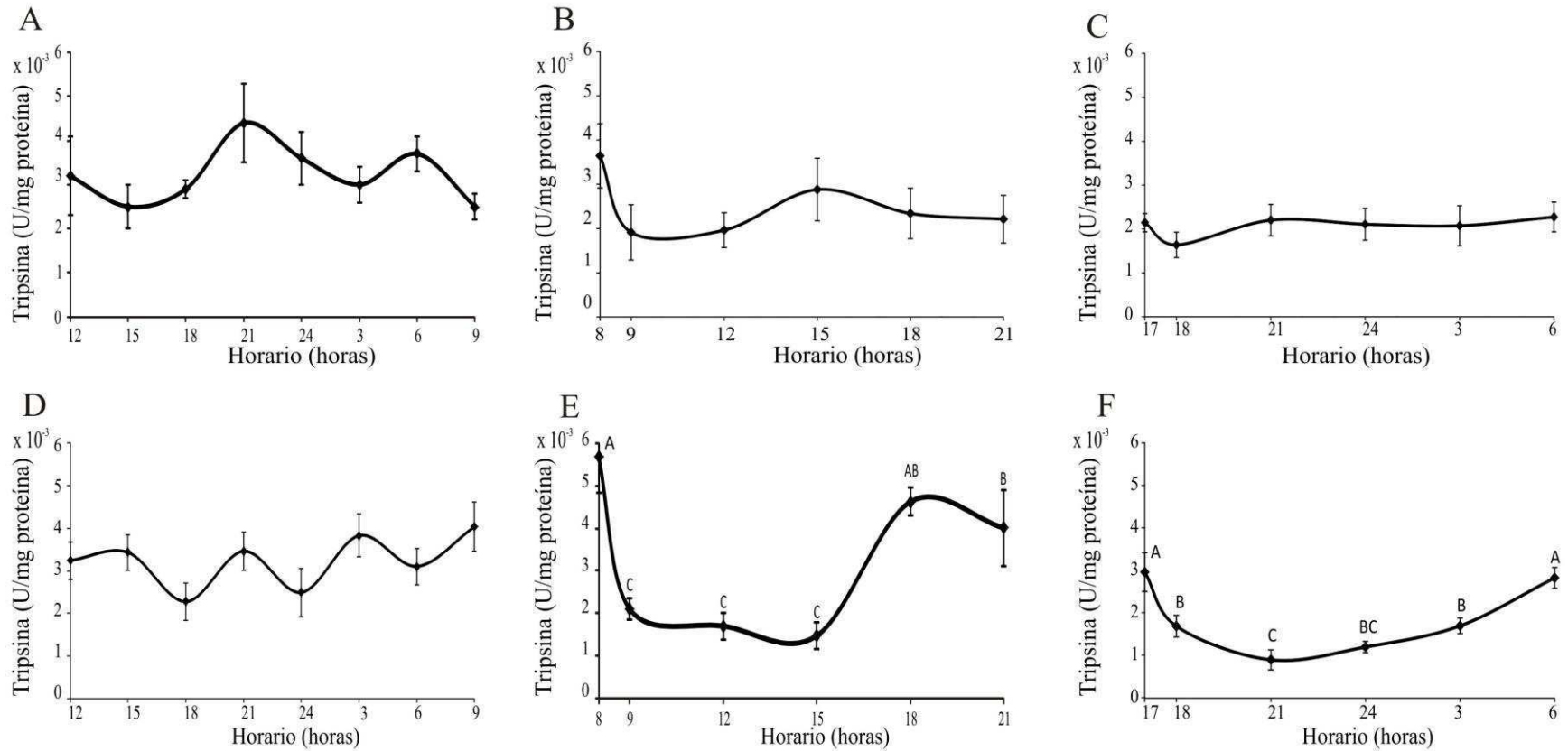


Figura 2.5. Niveles de actividad de tripsina en la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* ayunados por 24 hs y 16 días. : Experimento 1 [(24 hs de ayuno) (Ritmo diario)]; B: Experimento 3, Grupo 1 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; C: Experimento 3, Grupo 2 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]; D: Experimento 2 [(16 días de ayuno) (Ritmo diario)]; E: Experimento 4, Grupo 3 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; y F: Experimento 4, Grupo 4 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las horas de cada experimento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar.

La actividad de lipasas en los animales del experimento 1 (ritmo diario, 24 hs de ayuno) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a las 15:00 y 18:00 horas, donde se alcanzan los máximos valores de actividad (155,03 y 150,74 U mg/proteína respectivamente) con respecto a las 12:00, 03:00, 06:00 y 09:00 hs (Fig 2.6 A). Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la actividad de lipasas durante 24 hs luego de 16 días de ayuno (Fig 2.6 D).

En los animales del grupo 1, a los que se les suministró el pulso de alimentación matutino, se registró un aumento significativo de la actividad de lipasa ( $p < 0,05$ ) a las 09:00 hs respecto a los demás horarios (Fig 2.6 B). A su vez, los juveniles alimentados con el pulso de alimento vespertino, también mostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad de lipasa posterior a la alimentación (18:00 hs) respecto al resto de los horarios (Fig 2.6 C).

La respuesta de las langostas frente a los pulsos de alimentación matutinos y vespertinos (grupos 3 y 4) previamente ayunados durante 16 días, mostraron variaciones en la actividad de lipasa, pero sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Fig 2.6 E y F).



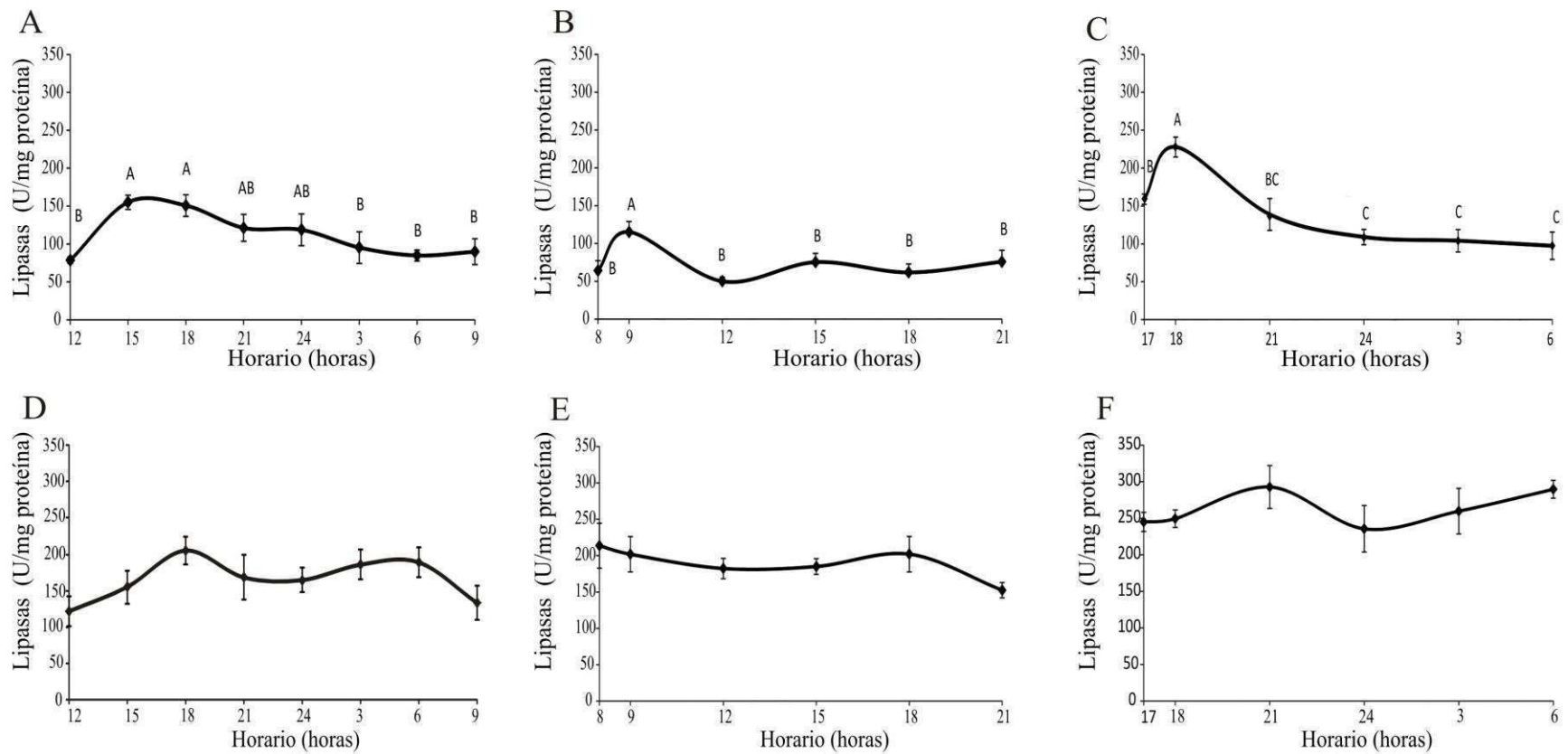


Figura 2.6. Niveles de actividad de lipasas en la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* ayunados por 24 hs y 16 días. : Experimento 1 [(24 hs de ayuno) (Ritmo diario)]; B: Experimento 3, Grupo 1 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; C: Experimento 3, Grupo 2 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]; D: Experimento 2 [(16 días de ayuno) (Ritmo diario)]; E: Experimento 4, Grupo 3 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; y F: Experimento 4, Grupo 4 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las horas de cada experimento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar.

Por otro lado, los niveles de actividad de amilasas de la glándula digestiva en los juveniles de *C. quadricarinatus*, no mostraron diferencias significativas en los experimentos 1 y 2 de ritmo diario ( $p>0,05$ ), pulso de alimentación matutino de los grupos 1 y 3 ( $p>0,05$ ) y vespertino del grupo 2 ( $p>0,05$ ) entre los diferentes horarios (Fig 2.7 A, B, C, y E). En cambio, se observaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la actividad de amilasa de los animales del grupo 4 entre las 18:00 y 03:00 hs.

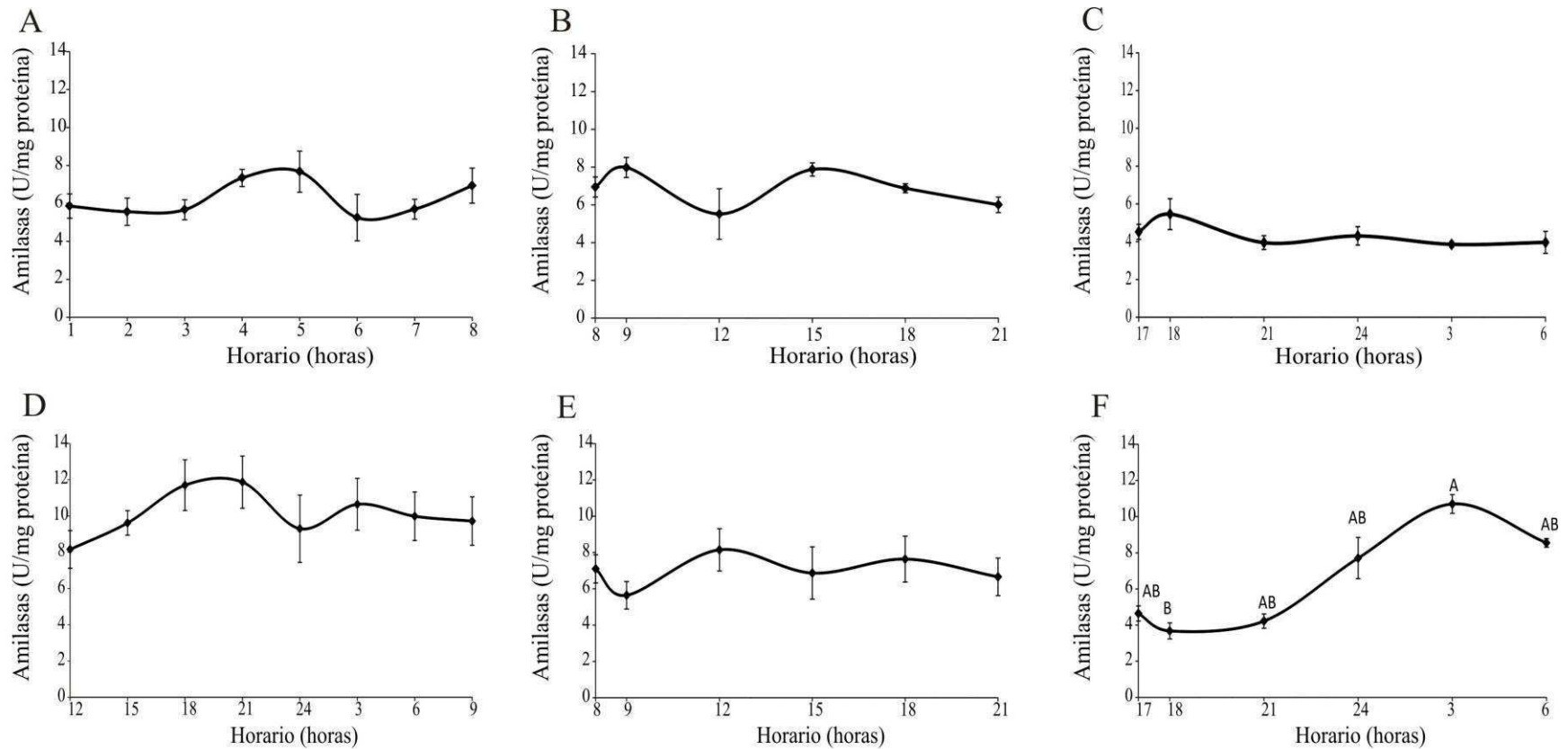


Figura 2.7. Niveles de actividad de amilasas en la glándula digestiva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* ayunados por 24 hs y 16 días. : Experimento 1 [(24 hs de ayuno) (Ritmo diario)]; B: Experimento 3, Grupo 1 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; C: Experimento 3, Grupo 2 [(24 hs de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]; D: Experimento 2 [(16 días de ayuno) (Ritmo diario)]; E: Experimento 4, Grupo 3 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación matutino)]; y F: Experimento 4, Grupo 4 [(16 días de ayuno) (Pulso de alimentación vespertino)]. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las horas de cada experimento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar.

## 2.5 Discusión

Los niveles de proteína soluble registrada en la glándula digestiva, permanecieron prácticamente inalterados en los seis experimentos, por lo que podemos concluir que, un período de ayuno de 24 horas y un pulso de alimentación de 1 hora no modifica el contenido de proteína dentro de dicha glándula. Barclay *et al.* (1983), trabajando con el camarón tigre *Penaeus esculentus*, propone que los lípidos son la fuente principal de energía utilizada durante el ayuno y la muda; la rápida respuesta de las lipasas al pulso de alimentación apoyaría también esta hipótesis para los juveniles de *C. quadricarinatus*.

La actividad de las enzimas digestivas de los juveniles en etapa de engorde de *C. quadricarinatus* no mostraron un patrón de ritmo diario con picos de secreción. La ausencia de un patrón bifásico de las enzimas digestivas se contrapone con los resultados obtenidos por Vega-Villasante *et al.* (1999) en *Callinectes arcuatus* donde observaron un ritmo bifásico de la actividad de proteinasas, lipasas y amilasas durante las primeras horas de la noche y después del amanecer. Del mismo modo se contrapone con los resultados de González *et al.* (1995) en *L. schmitti* para la actividad de proteinasas.

Al analizar la actividad de proteinasas de los animales ayunados por 24 hs, los niveles fueron similares tanto en los animales alimentados con el pulso de alimento matutino como vespertino, es decir, la actividad es independiente del horario de alimentación. También se observa una tendencia no significativa hacia la disminución de la actividad luego de la alimentación. En cambio, cuando las langostas fueron ayunadas por 16 días y luego se les ofreció alimento (experimento 4), se comprobó que la actividad disminuyó en forma significativa y se mantuvo por algunas horas posteriores a la alimentación.

Por otro lado hay que destacar la similitud del perfil de actividad de proteinasas y tripsina en las langostas ayunadas durante 16 días. Esto concuerda con que las proteinasas de tipo serino, como la tripsina y quimotripsina, son propuestas como las enzimas digestivas de mayor importancia en crustáceos, y se cree que son las responsables del 40 al 60% de la digestión de la proteína en camarones peneidos (Hernández-Cortes *et al.* 1999).

En la presente tesis, también se pudo observar un pico de la actividad de lipasas 1 hora después de suministrar el alimento, independientemente de que el pulso fuera matutino o vespertino. En los juveniles alimentados con el pulso de alimentación matutino se observó disminución de los niveles de actividad hacia valores iniciales a partir de la hora 12 y un leve aumento (no significativo) hacia las horas nocturnas (21 horas). Con el pulso de alimentación vespertino, también se registró una disminución de la actividad de lipasa hacia los valores iniciales a partir de la hora 21 y este decaimiento se mantuvo hacia las primeras horas de la mañana (6 horas). Ambas tendencias también fueron observadas en el ritmo diario. De esta manera, los picos de actividad post-alimentación con un ayuno de 24 hs, parecerían una evidente respuesta al estímulo alimenticio.

Si bien este tipo de evaluaciones no han sido analizadas en langostas de agua dulce, varios estudios en este sentido han sido realizados en camarones peneidos. Robertson *et al.* (1993) trabajando en el camarón *Litopenaeus vannamei* sugieren que sería mejor una alimentación diurna que nocturna en base a un mayor crecimiento. A su vez, Pontes y Arruda (2005) demostraron que *L. vannamei* accede a las bandejas de alimento e inicia un consumo rápido mostrando un mayor contenido en el tracto digestivo durante las horas de luz, por lo tanto, estos resultados indican que el alimento debe ser ofrecido en la fase de luz y en una mayor proporción 7 horas después del amanecer (Pontes *et al.* 2006). Molina *et al.* (2000) demostraron en la misma especie, que la máxima actividad de proteinasas, amilasas y lipasas ocurría dos horas después (14:00 horas) de la mayor tasas de ingestión de alimento (12:00 horas).

Casillas-Hernández *et al.* (2006) analizando los horarios de alimentación y variación circadiana de las enzimas proteolíticas en *L. vannamei*, proponen que el alimento debe ser ofrecido dos horas antes del pico de actividad, ya que genera mayores tasas de crecimiento, biomasa y sobrevivencia. Estos mismos autores, analizaron la variación circadiana de la actividad proteolítica en camarones de diferentes tallas (5, 10, 25 y 30 g) mantenidos en condiciones de fotoperíodo natural y ayuno (24 horas); y observaron que el patrón de actividad de los animales de 5 y 10 g fue muy similar, del mismo modo que entre los individuos de 25 y 30 g. También se ha demostrado en camarones peneidos (Nolasco-Soria y Vega-Villasante 2000) que a pesar de contar con un ritmo generalmente bifásico de

actividad enzimática, es posible ejercer una estimulación exógena a través de los diferentes horarios de alimentación y de esta manera, ajustar tales actividades a la programación de la alimentación del estanque. Sin embargo, no está claro si la modificación de los ritmos fisiológicos de alimentación puede influenciar negativamente el crecimiento o salud de los organismos (Casillas-Hernández *et al.* 2006).

Tomando como base el tipo de análisis realizados en peneidos y en función de la actividad enzimática de las proteinasas y lipasas estudiada en esta tesis, se podría sugerir que lo más conveniente para *C. quadricarinatus* sería alimentar por la tarde-noche, dado que observamos picos de actividad enzimática entre las 18 y 21 hs y entre las 15 y 18 hs en las enzimas mencionadas anteriormente. En cambio la actividad de tripsina y amilasa y la cantidad de proteína soluble presentaron pequeñas fluctuaciones no significativas a lo largo de 24 hs, por lo que no estarían brindando información sobre el mejor momento para alimentar.

Otra información que surge del análisis de los resultados en función del tiempo de ayuno breve o moderado, es que este último acentuó más la respuesta post-alimentación que el ayuno breve en la actividad de proteinasas y tripsina. En cambio, luego de un ayuno corto se observó una mayor respuesta de la actividad de lipasas post-alimentación. A su vez, la actividad de amilasas se vio afectada por el efecto del ayuno moderado y posterior alimentación vespertina. Finalmente, ninguno de los dos tiempos de ayuno ensayados tuvo efecto sobre la cantidad de proteína soluble. Por lo tanto, dado las diferentes respuestas de cada enzima al ayuno y pos alimentación sería interesante seguir estudiando ambos factores, que podrían tener un impacto directo sobre el cultivo de *C. quadricarinatus*.

Analizando los trabajos de alimentación en *C. quadricarinatus* sobre nutrición de juveniles, Jones (1995b) utilizó en su protocolo de experimentación, la alimentación por la tarde basándose exclusivamente en la mayor actividad locomotora de éstos. A su vez, Cortés-Jacinto *et al.* (2003) en su estudio del efecto de la frecuencia alimenticia en juveniles tempranos de *C. quadricarinatus* recomienda alimentar con una frecuencia de cuatro veces al día, aunque estos estudios se basan en el crecimiento y sobrevida y no en el análisis de actividad enzimática digestiva.

Considerando los antecedentes y resultados obtenidos, sería interesante continuar evaluando la actividad enzimática digestiva a tiempos más cortos a los ensayados en el presente trabajo, para poder detectar la presencia de pequeñas fluctuaciones intermedias que podrían ser claves para mejorar la eficiencia en el uso de alimento en juveniles para la producción sustentable de esta especie. Finalmente, es importante destacar que la especie *C. quadricarinatus* es de tipo omnívoro-oportunista y proviene de ambientes de agua dulce donde la disponibilidad de alimento puede ser fluctuante y escasa (Jones 1995b, Calvo *et al.* 2012). Por esta razón no puede descartarse que la ausencia de ritmos circadianos de actividad enzimática digestiva se vincule con una fisiología enzimática diferente a la observada en camarones peneidos.

Los resultados discutidos muestran que *C. quadricarinatus* no presenta picos de actividad asociados al grado de actividad locomotora, por lo tanto se rechaza la primera hipótesis de trabajo. Respecto al efecto de la alimentación matutina o vespertina sobre la actividad de las enzimas digestivas se vieron modificadas pero no así los niveles de proteína soluble, por lo tanto la segunda hipótesis de trabajo es apoyada parcialmente. Finalmente, el ayuno provocó modificaciones en el patrón de ritmo diario de las enzimas digestivas y niveles de proteína soluble, entonces la tercera hipótesis de trabajo no es rechazada.

# Capítulo 3

---

Efecto de un atractante, período de ayuno y disponibilidad de alimento sobre las enzimas digestivas de la langosta de agua dulce  
*Cherax quadricarinatus*

**Los resultados de este capítulo han sido publicados parcialmente como:**

Hernán J. Sacristán, Héctor Nolasco-Soria y Laura S. López Greco, 2014.

–Effect of attractant stimuli, starvation period, and food availability on digestive enzymes in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae)”. *Aquatic Biology* **23: 87-89**



### 3.1 Introducción

Como se describió en el Capítulo 1 *Cherax quadricarinatus* posee numerosas características biológicas favorables para la acuicultura, entre las cuales se pueden resaltar los hábitos flexibles de alimentación. En el ambiente natural, las langostas de agua dulce tienen hábitos de alimentación politróficos y han sido descritas como predadores, omnívoros y/o detritívoros, que consumen una numerosa variedad de macrófitas, invertebrados bentónicos, algas y detritos (Saoud *et al.* 2013). Los hábitos flexibles de alimentación sugieren que podrían responder a un espectro muy amplio de señales químicas (Tierney y Atema 1988). Los organismos acuáticos usan las señales químicas como fuente de información para “tomar decisiones” ecológicas como la localización del alimento (Moore y Grills 1999), búsqueda de pareja (Ameyaw-Akumfi y Hazlett 1975, Tierney y Dunham 1982, Dunham y Oh 1992), detección de predadores (Hatzlett 1989), elección de refugios (Tamburri *et al.* 1996) y determinación del estatus social (Karavanich y Atema 1998, Zuland-Schneider *et al.* 1999, Kozlowski *et al.* 2003) entre otras.

Los quimiorreceptores de los invertebrados acuáticos pueden dividirse en dos grupos: los de bajo umbral o quimiorreceptores de distancia; o de alto umbral o quimiorreceptores de contacto, haciendo una analogía entre los receptores del olfato y del gusto (Laverack 1975, Shepheard 1974, Fernandez 1995). De acuerdo con Barber (1961), el sabor provoca respuestas estereotipadas durante la alimentación. En los crustáceos el movimiento de las anténulas permite una mayor exposición a los componentes disueltos, que se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente que lo rodea; así también, mejora el tiempo de respuesta de los receptores a olores débiles (Schmitt y Ache 1979). Por su parte, los pereiópodos son los responsables de llevar las partículas de alimento hacia las piezas bucales (Barber 1961, Hindley 1975). Por lo tanto, estos comportamientos implican que los quimiorreceptores de las anténulas intervienen en la búsqueda de un potencial alimento, mientras que los pereiópodos se encargan de manipular y transportar el alimento hacia la boca y es ahí donde los quimiorreceptores de las piezas bucales participan en la aceptación o rechazo del potencial alimento (Robertson y Laverack 1978).

En general los crustáceos poseen una actividad alimentaria relativamente baja e intermitente, lo que impacta sobre la captura y el procesamiento del alimento. Este

comportamiento afecta directamente las propiedades de los alimentos, como por ejemplo estabilidad en el agua (hidroestabilidad) y durabilidad, lo que trae como consecuencia una pérdida en la calidad del agua en los sistemas de cultivo (Saoud *et al.* 2012) y de nutrientes esenciales para el organismo. Como se mencionó en capítulos anteriores, la alimentación es un gasto significativamente elevado en los sistemas de producción acuícola, por lo que existe la necesidad de maximizar el consumo y de disminuir la pérdida de alimento, lo que es fundamental para el éxito económico de un cultivo (Lee y Meyers 1996).

Teniendo en cuenta la importancia de las señales químicas durante el desarrollo de los crustáceos, se podría suponer que la incorporación de atractantes en los alimentos permitiría encontrar la comida en un tiempo más corto aumentando la posibilidad de ingestión (Mendoza *et al.* 1997). Además, se reduciría la pérdida de alimento así como también mejoraría la calidad de agua.

En varios trabajos se ha demostrado que la harina de calamar actúa como estimulante, incrementando el consumo del alimento en las especies: *Homarus gammarus* (Mackie y Shelton 1972), *Penaeus stylirostris* y *P. setiferus* (Fenucci *et al.* 1980), *P. monodon* (Smith *et al.* 2005) y *Litopenaeus vannamei* (Nunes *et al.* 2006). De manera similar en *Cherax quadricarinatus*, los hidrolizados de camarón estimulan el consumo de alimento (Arredondo-Figueroa *et al.* 2012). A su vez, existen pocos estudios sobre la incorporación de sustancias quimioattractantes en los alimentos para el cultivo de crustáceos decápodos de agua dulce (Arredondo-Figueroa *et al.* 2012) y los efectos que podría tener sobre la alimentación (Tierney y Atema 1988, Lee y Meyers 1996, Kreider y Watts 1998).

En condiciones naturales las langostas de agua dulce se alimentan *ad libitum* a partir del alimento que existe en diversas formas y composiciones, por lo que es posible que conlleve a diferentes procesos de digestión (Kurmaly *et al.* 1990). También se debe considerar que los crustáceos alternan episodios de alimentación y no alimentación durante su desarrollo, como resultado de las sucesivas mudas (crecimiento) (Vega-Villasante *et al.* 1999). La muda involucra varias etapas con diferentes comportamientos de alimentación, por lo tanto, son necesarios diferentes requerimientos energéticos a partir del alimento disponible. El ayuno artificialmente inducido podría permitir esclarecer las vías metabólicas utilizadas durante la muda y explicar los mecanismos bioquímicos y

fisiológicos de adaptación durante el ayuno (Barclay *et al.* 1983, Comoglio *et al.* 2008) que involucrarían tanto el uso diferencial de las reservas energéticas como la actividad de las enzimas digestivas (Cuzon *et al.* 1980, Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002, Calvo *et al.* 2013).

Como se describió en el Capítulo 1, la glándula digestiva de los crustáceos es el principal órgano de síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción y almacenamiento de nutrientes (lípidos y glucógeno), que pueden ser movilizados durante los periodos de no alimentación (Icely y Nott 1992, Ong y Johnston 2006). Los niveles de las enzimas digestivas de los crustáceos decápodos no permanecen constantes durante el crecimiento (Van Wormhoudt 1974) como resultado de factores internos y externos, como por ejemplo el ayuno, la disponibilidad, la cantidad y calidad del alimento. Loya-Javellana *et al.* (1995) demostraron que *C. quadricarinatus* tiene la capacidad de regular sus procesos digestivos de acuerdo con la disponibilidad de alimento.

A partir de la introducción presentada se plantean los siguientes objetivos.

### **3.2 Objetivos**

**Objetivo 1:** Evaluar la harina de calamar como atractante para *Cherax quadricarinatus*. En caso de confirmarse su efecto atractante, determinar la concentración óptima a ser incorporada en la dieta.

**Objetivo 2:** Analizar el efecto de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas luego de un período de ayuno de corta duración.

**Objetivo 3:** Evaluar el efecto de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas luego de un período de ayuno moderado.

En función de estos objetivos las hipótesis planteadas son las siguientes:

**Hipótesis 1:** La harina de calamar actúa como atractante para *C. quadricarinatus* a una baja concentración.

**Hipótesis 2:** La actividad de las enzimas digestivas de *C. quadricarinatus* es alterada dependiendo de la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno de corta duración.

**Hipótesis 3:** La actividad de las enzimas digestivas de *C. quadricarinatus* es modificada dependiendo de la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno moderado.

### 3.3 Materiales y métodos

#### 3.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles de *C. quadricarinatus* fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio, a partir de lotes de reproductores suministrados por el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Corrientes, Argentina. Los procedimientos realizados con cada hembra ovígera obtenida en laboratorio, los juveniles independizados y los parámetros de la calidad de agua fueron los mismos que se describieron en los Capítulos 1 y 2.

#### 3.3.2 Comportamiento de respuesta de *C. quadricarinatus* a la presencia de alimento

La descripción del comportamiento alimentario fue registrada en 20 juveniles de *C. quadricarinatus* (rango de peso 1,15-3,76 g) de manera independiente. Se seleccionaron sólo los animales con sus apéndices intactos (antenas, anténulas, etc.). Los animales fueron divididos al azar en dos grupos (A y B); las langostas del grupo A fueron aclimatadas por una semana en un acuario de 60x40x30 cm (ancho x largo x alto) conteniendo 30 L de agua declorada, aireación continua, temperatura constante ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y alimentación diaria con TetraColor de TETRA<sup>®</sup>. Los animales de este grupo fueron privados de alimento por 48 hs antes del experimento.

Por otro lado, las langostas del grupo B fueron ayunadas individualmente durante 16 días en recipientes plásticos de 500 cm<sup>3</sup> de capacidad, conteniendo 350 mL de agua filtrada y aireación continua. Dichos recipientes fueron colocados en bandejas plásticas de 53x40x12 cm (ancho x largo x alto) con agua a una temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El número de días de ayuno fue estimado a partir de estudios preliminares. Además durante este período, los recipientes fueron lavados y el agua fue renovada totalmente 3 veces a la semana.

La descripción del comportamiento alimentario de cada langosta fue realizada en un acuario de vidrio (30x40x30 cm; ancho x largo x alto) conteniendo 15 L de agua filtrada. Cada animal fue aclimatado por 10 minutos en el acuario experimental y cuando se ofreció el alimento (TetraColor<sup>®</sup>) al 5% del peso de los animales en la parte central de acuario, se

registró visualmente el comportamiento durante 10 minutos. Luego de cada evaluación el agua fue reemplazada completamente con agua filtrada. Para describir el comportamiento y la respuesta al alimento se utilizaron como criterio los trabajos de Zimmer-Faust *et al.* (1984), Lee y Meyers (1996) y Kreider y Watts (1998). Se observó específicamente: A) el movimiento de las anténulas; B) el movimiento del dactilo (sondeo y/o rastrillaje); C) la locomoción y D) la alimentación o no alimentación (captura o no del alimento).

### *3.3.3 Efecto de la harina de calamar sobre la respuesta de los juveniles de C. quadricarinatus*

Para llevar a cabo el experimento comportamental se diseñó un acuario de vidrio de 30x40x20 cm (ancho x largo x alto) sin flujo de agua (Fig 3.1 A), basado en el trabajo de Jaime-Ceballos *et al.* (2007). El acuario fue dividido en tres compartimientos de igual tamaño donde el del medio fue usado como compartimiento de aclimatación, mientras que el de la derecha y el de la izquierda fueron utilizados como compartimientos donde se ofreció el alimento. El acuario se colocó dentro de una caja blanca (telgopor) para reducir al mínimo posibles perturbaciones que podrían interferir en el comportamiento de las langostas. A su vez, también se diseñaron contenedores para el alimento (4,5x4,5x6 cm; ancho x largo x alto) (Fig 3.1B). Básicamente el contenedor de alimento es una estructura rígida de acrílico rodeada por una malla de nylon (1 mm de poro). Dentro del contenedor se colocó un tubo realizado con otra malla de nylon (1,5x4,5 cm; diámetro x largo), donde fue colocado el alimento de cada ensayo para evitar la manipulación del alimento por parte de los animales, y así evitar también la ingestión.

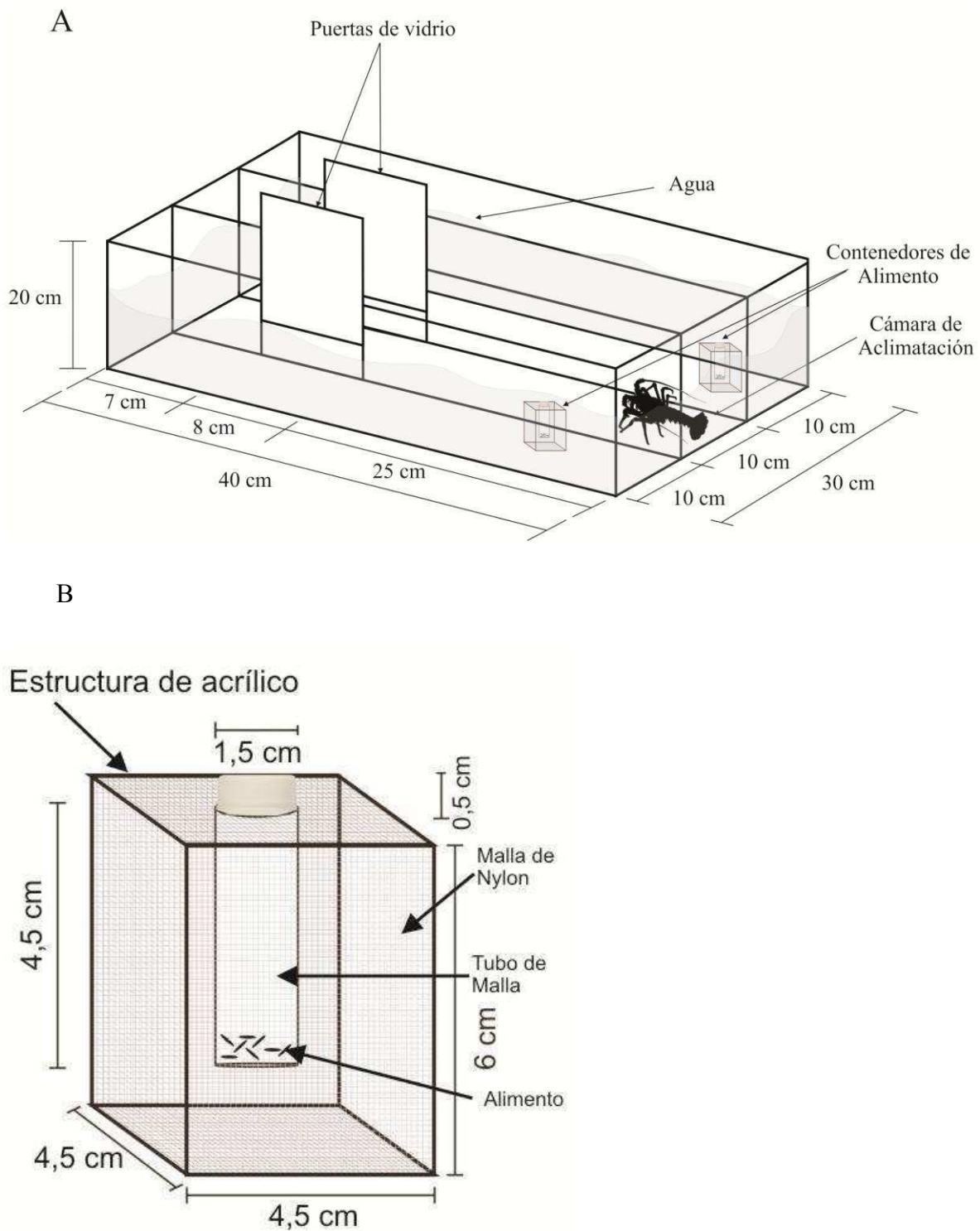


Figura 3.1. Diseño del acuario y del contenedor de alimento para los experimentos de respuesta al atrayente en juveniles de *Cherax quadricarinatus*. A) Esquema del acuario de vidrio diseñado mostrando la posición de las puertas, la cámara de aclimatación, el nivel del agua y la posición de los contenedores de alimento. B) Esquema del contenedor de alimento diseñado.

Para este experimento el alimento base (AB) fue el mismo que se utilizó como dieta de referencia en el Capítulo 1. Este alimento fue formulado especialmente para *C. quadricarinatus* por Gutiérrez y Rodríguez (2010) y la metodología de preparación y su composición proximal fue detallada en el Capítulo 1 (1.3.2).

La harina de calamar (*Illex argentinus*) fue el ingrediente utilizado en la dieta AB como posible atractante para juveniles de *C. quadricarinatus*. A través del método Soxhlet se obtuvo un concentrado proteico de HC, utilizando alcohol isopropílico como solvente. Para realizar el secado del residuo proteico (80°C por 24 horas) y la inclusión de HC en AB se procedió de acuerdo con la técnica descrita por Díaz *et al.* (1999).

El atractante HC fue incorporado a la dieta AB en distintos porcentajes, siendo 0 (control); 0,25; 1; 2,5; 10% (p/p) y como control positivo se utilizó TetraColor®. Los diferentes porcentajes de HC fueron evaluados por comparaciones de a pares de la siguiente manera:

- a) 0% (control alimento): sin alimento vs. AB
- b) 0,25%: AB + 0,25% HC vs. AB
- c) 1%: AB + 1% HC vs. AB
- d) 2,5%: AB + 2,5% HC vs. AB
- e) 10%: AB + 10% HC vs. AB
- f) Control positivo: TetraColor® vs. sin alimento.

El comportamiento de búsqueda del alimento fue evaluado en dos condiciones experimentales: individual y grupal. El comportamiento individual de 20 langostas (rango de peso 1,35-3,25 g) por tratamiento (N=110); excepto para el control positivo en el que se usaron 10 animales, fue observado en el acuario de vidrio anteriormente descrito. También se evaluó el comportamiento grupal de 4 juveniles (rango de peso: 1,21-3,75 g) con 5 réplicas por tratamiento (N=60). El experimento de comportamiento grupal fue solamente realizado para los tratamientos a), c) y e), en función de los resultados de los experimentos de comportamiento individual.

Previo a los ensayos, los animales fueron aclimatados por una semana al alimento AB y los experimentos de comportamiento se realizaron siempre entre las 9:00 y las 13:00 hs con



el fin de evitar cambios en la conducta debido a los efectos del ritmo diario (Sacristán *et al.* 2013, Capítulo 2) y en presencia de luz artificial. Además, los animales fueron ayunados por 48 hs y todos se encontraban en el estadio de intermuda, debido a que el nivel de capacidad de respuesta varía de etapa en etapa del ciclo de muda (Harpaz *et al.* 1987).

Antes de comenzar los ensayos, los juveniles fueron mantenidos en la cámara de aclimatación por 10 minutos de acuerdo con Nunes *et al.* (2006). Luego de cada evaluación, el agua fue descartada completamente, se lavó el acuario y se llenó con nueva agua filtrada. A su vez, los parámetros del agua fueron monitoreados con el fin de evitar posibles efectos de la calidad del agua sobre las respuestas de las langostas al attractante (Lee y Meyers, 1996). Dichos parámetros se encontraban dentro de los rangos recomendados para el cultivo de *C. quadricarinatus* por Jones 1997 y Boyd y Tucker 1998: oxígeno disuelto (5,4–8,0 mg/L), pH (7,3–8,4), dureza (60–100 mg/L como equivalentes de CaCO<sub>3</sub>) y temperatura (26–29°C).

#### 3.3.4 Determinaciones de la respuesta comportamental al estímulo alimenticio (ensayos individuales y grupales)

La respuesta comportamental a la presencia de HC y/o AB fue registrada visualmente y la localización de los alimentos fue elegida al azar en cada ensayo (cámara de la derecha o izquierda). La cantidad de alimento (AB, HC+AB o TetraColor<sup>®</sup>) ofrecida en cada ensayo fue del 5% del peso medio de todos los animales. Luego de la aclimatación, se abrieron las puertas de vidrio de ambas cámaras y se registraron las siguientes variables: A) primera elección realizada (cámara con o sin HC) y B) el tiempo de residencia de los juveniles en cada cámara durante un tiempo total de 10 minutos (este tiempo fue establecido por ensayos preliminares). Se definió como elección positiva a la primera cámara elegida por la/s langosta/s donde se encontraba la HC.

El porcentaje de elecciones positivas fue calculado como: elecciones positivas (%) = (número total de elecciones positivas/número total de comparaciones) × 100, de acuerdo al trabajo de Nunes *et al.* (2006). El tiempo de residencia (%) fue calculado como: (el tiempo total de residencia en la cámara con HC/el tiempo total del ensayo) × 100.

### *3.3.5 Efecto de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas*

Para evaluar el efecto de la disponibilidad de alimento sobre las enzimas digestivas, se diseñaron dos experimentos de acuerdo al período de ayuno de los animales (ayuno corto o moderado). En ambos experimentos los tratamientos fueron: 1) sin AB (control); 2) AB disponible (ABD) y 3) AB presente pero no disponible (alimento base no disponible: ABND). Para cada tratamiento se utilizaron acuarios plásticos de 18x35x9 cm (ancho x largo x alto) y para el tratamiento 3, además se utilizaron los contenedores de alimento descritos anteriormente (punto 3.3.3). La cantidad de alimento ofrecido en los tratamientos 2 y 3 fue del 5 % del peso medio de todos los animales (Fig 3.2).

#### *Experimento 1: período corto de ayuno*

Para este experimento se seleccionaron 144 juveniles en estadio de intermuda de un rango de peso 1,14 a 3,99 g. Los animales fueron ayunados previamente por 48 hs y cada tratamiento fue realizado con cuatro réplicas (acuarios) (n=48). Antes del comienzo del experimento las langostas fueron colocadas al azar en cada acuario y aclimatadas por 1 h. En cada tratamiento las langostas fueron anestesiadas, sacrificadas y se extrajo la glándula digestiva a 0, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos. Cada glándula fue almacenada individualmente en microtubos a -80°C para analizar la actividad de las enzimas digestivas.

#### *Experimento 2: período moderado de ayuno*

Setenta y dos juveniles en estadio de intermuda de un rango de peso de 1,75 a 5,17 g, fueron ayunados por 16 días en recipientes plásticos de 500 cm<sup>3</sup> con 350 mL de agua filtrada y aireación continua. Estos recipientes fueron colocados en bandejas plásticas de 53x40x12 cm (ancho x largo x alto) con agua a una temperatura constante de 27±1°C. El tiempo de ayuno fue establecido a partir de ensayos preliminares. Durante este período, se renovó el agua en su totalidad y se limpiaron los recipientes de plásticos tres veces a la semana; durante el experimento no se observaron animales que hayan mudado. A partir de

entonces se realizó el mismo procedimiento que en el experimento 1, pero los tiempos ensayados fueron 0, 30 y 120 minutos.

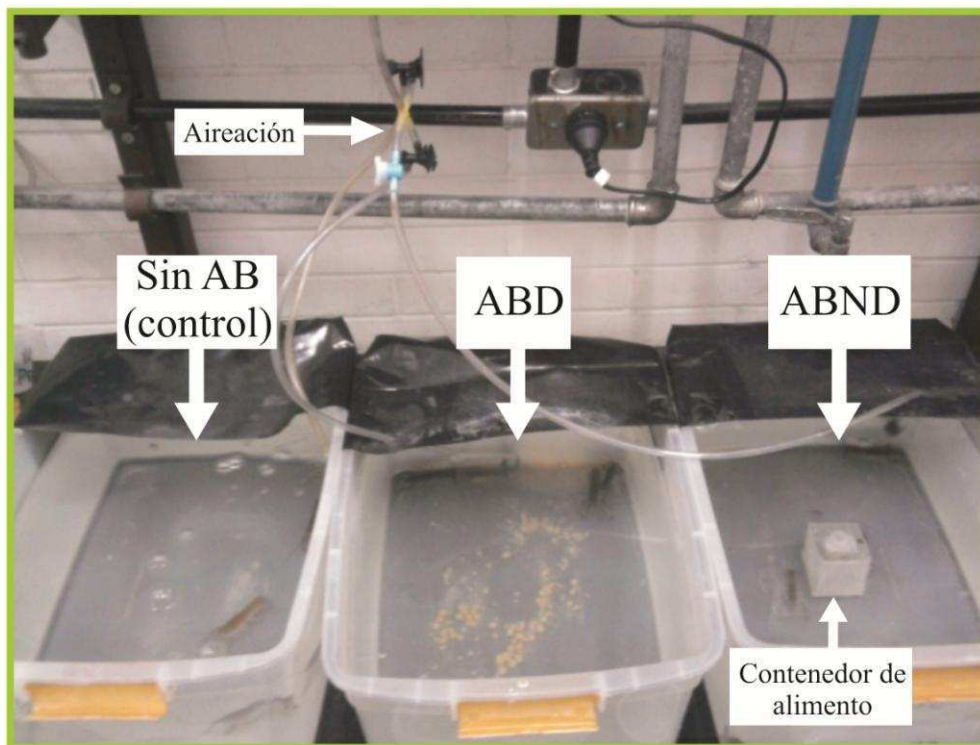


Figura 3.2. Juveniles de *Cherax quadricarinatus* en los tratamientos experimentales. AB: alimento base; ABD: alimento base disponible; ABND: alimento base no disponible.

### 3.3.6 Preparación de los extractos enzimáticos y ensayos de actividad enzimática

Los extractos enzimáticos, la concentración de proteína soluble y la actividad enzimática de proteinasas, lipasas, amilasas y tripsina fueron realizados del mismo modo descrito en el Capítulo 1.

### 3.3.7 Análisis estadístico

El número de elecciones positivas y el tiempo de residencia obtenida a partir de comportamiento alimentario fueron analizados estadísticamente utilizando el test de independencia Chi-cuadrado (Zar 1999). Para analizar los resultados de actividad enzimática de los experimentos de ayuno corto y largo se utilizó el modelo Lineales Generalizados Mixtos [del inglés: Generalized Linear Mixed Models (GLMMs)], con el programa estadístico R y el paquete de datos de GLMMs (Zuur *et al.* 2009) incluyendo a los tratamientos (sin AB; ABD y ABND) y el tiempo como factores fijos. El nivel de significancia fue fijado en 0,05.

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Descripción comportamental de respuesta de *C. quadricarinatus* a la presencia de alimento

Previo al ofrecimiento de comida la mayoría de las langostas exploraron el acuario, con leves movimientos de las anténulas y limpieza de las mismas. Además, algunos individuos exhibieron movimientos de los pereiópodos asociados a la locomoción o limpieza de las antenas y anténulas. En solo dos casos los animales estuvieron inactivos en una esquina del acuario, sin mostrar movimiento de los apéndices.

Cuando el alimento fue ofrecido a langostas ayunadas por 48 hs, éstas aumentaron el movimiento de las anténulas y las orientaron hacia el fondo del acuario. A su vez, incrementaron el movimiento de los quelípedos sondeando y “astrillando” el fondo del acuario a medida que caminaban sin una orientación directa hacia donde se encontraba el alimento. Algunos juveniles de *C. quadricarinatus* que encontraron el alimento, lo llevaban hacia la boca con sus quelípedos.

Cinco animales que estuvieron ayunados por 16 días cuando se les fue ofrecido el alimento, no mostraron mayor voracidad ni un incremento en el movimiento de los apéndices (antenas, anténulas, piezas bucales y pereiópodos). El resto de las langostas

ayunadas, estuvieron estáticas en una esquina del acuario o exhibieron el comportamiento de limpieza de las antenas y anténulas.

### 3.4.2 Efecto de la harina de calamar sobre la respuesta de los juveniles de *C. quadricarinatus*

Los resultados de los comportamientos individuales y grupales se muestran en la Tabla 3.1. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre los diferentes porcentajes de inclusión de HC en la respuesta individual de las langostas. El tiempo de residencia en ambas cámaras no fue significativo ( $p>0,05$ ) entre tratamientos. La evaluación grupal mostró una tendencia a un mayor porcentaje de elecciones positivas en el tratamiento 10%, pero no fue estadísticamente significativo ( $p>0,05$ ). Además, grupalmente las langostas no residieron más tiempo en la cámara con HC ( $p>0,05$ ).

Tabla 3.1: Número de comparaciones, elecciones positivas y tiempo de residencia del comportamiento individual y grupal de *Cherax quadricarinatus*. Alimento base (AB). Harina de calamar (HC).

Tratamiento (% de HC en AB)	Comportamiento Individual			Comportamiento Grupal		
	Número de comparaciones	Elecciones positivas(%)	Tiempo de residencia(%)	Número de comparaciones	Elecciones positivas(%)	Tiempo de residencia(%)
0	20	55	41,28±4,18	5	50	38,02±10,96
0,25	20	50	52,94±4,24	-	-	-
1	20	40	47,99±6,33	5	40	40,23±5,35
2,5	20	50	42,36±3,62	-	-	-
10	20	40	38,90±5,61	5	70	37,70±3,30
Control Positivo	10	20	34,36±8,39	-	-	-

Tratamientos: 0 % (control alimento): sin alimento vs. AB; 0,25%: AB + 0,25% HC vs. AB; 1%: AB + 1% HC vs. AB; 2,5%: AB + 2,5% HC vs. AB; 10%: AB + 10% HC vs. AB; Control Positivo: TetraColor de TETRA® vs. sin alimento.

### 3.4.3 Efecto de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las enzimas digestivas.

#### *Experimento 1: período corto de ayuno*

Los resultados de la actividad de amilasas, lipasas, proteinasas y tripsina y los niveles de proteína soluble del experimento de ayuno corto se muestran en la Figura 3.3. En general, el perfil de las enzimas digestivas y proteína soluble de los hepatopáncreas mostraron un patrón similar entre los tratamientos. Específicamente, las langostas del tratamiento ABND presentaron niveles significativamente menores ( $p < 0,05$ ) de amilasas a 5 y 120 minutos (5,24 U/mg proteína y 5,14 U/mg proteína, respectivamente) que el grupo control y ABD (Fig 3.3 A). A su vez, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ABD y el control. La actividad de lipasas no fue afectada significativamente ( $p > 0,05$ ) por los tratamientos luego de 120 minutos de experimentación (Fig 3.3 B). La actividad de proteinasas del hepatopáncreas de los juveniles de ABND (1,02U/mg proteína) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el control y ABD a los 5 minutos (Fig 3.3 C). Además, las langostas de ABD mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto del control sólo a los 30 minutos. Por otro lado, la actividad de tripsina mostró sólo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control y los tratamientos ABD y ABND a los 120 minutos (Fig 3.3 D). Por su parte, los niveles de proteína soluble no fueron afectados significativamente ( $p > 0,05$ ) por los tratamientos durante los 120 minutos que duró el experimento (Fig 3.3 E). Resultados similares fueron obtenidos cuando se calculó la actividad enzimática por mg de hepatopáncreas (resultados no mostrados).

#### *Experimento 2: período moderado de ayuno*

El efecto de la disponibilidad de alimento luego de un ayuno moderado sobre la actividad de las enzimas digestivas de *C. quadricarinatus* se muestra en el Figura 3.4. La actividad de amilasas no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos a lo largo del experimento. La actividad de lipasas de ABD mostró actividad significativamente ( $p < 0,05$ ) menor que ABND a 30 y 120 minutos (61,52 U/ mg proteína y 48,31 U/mg proteína, respectivamente) (Fig 3.4 B). La actividad de proteinasas exhibió diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a tiempo 0 entre ABND y los tratamientos control y

ABD (Fig 3.4 C). A los 30 minutos, la actividad de proteinasas de ABND (1,15 U/mg proteína) y ABD (1,18 U/mg proteína) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que en el grupo control mientras que ABD decreció significativamente ( $p < 0,05$ ) hasta 0,70 U/mg proteína a los 120 minutos. Por otro lado, la actividad de tripsina de ABD se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento, siendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a tiempo final respecto del control y ABND (Fig 3.4 D). Finalmente, los niveles de proteína soluble de las langostas sólo fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ABDN y los tratamientos control y ABD a tiempo 0 (Fig 3.4 E). Resultados similares fueron obtenidos cuando se calculó la actividad enzimática por mg de hepatopáncreas (resultados no mostrados).

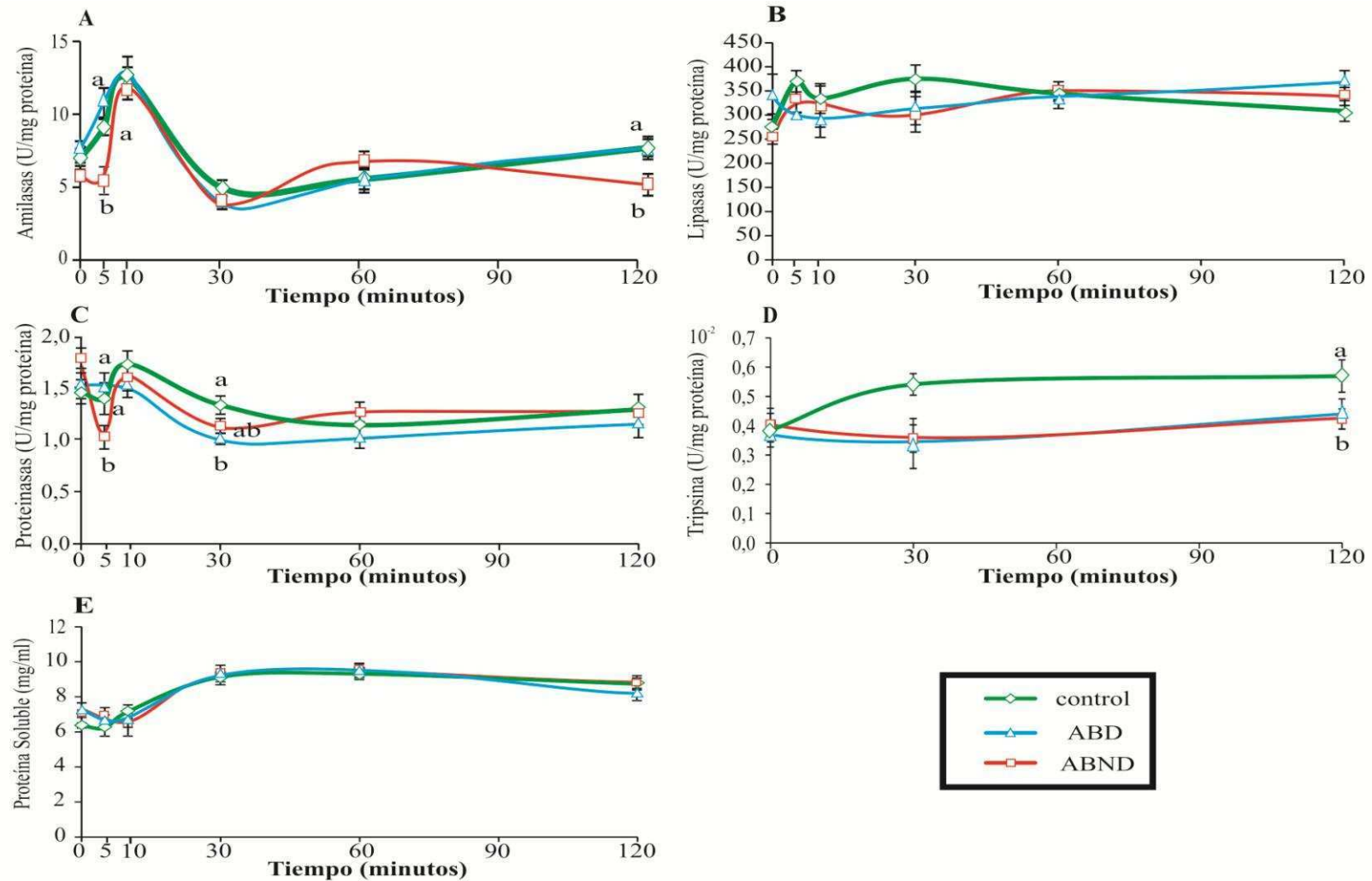


Figura 3.3. Actividad enzimática del hepatopáncreas de *Cherax quadricarinatus* en función a la disponibilidad de alimento luego de un ayuno corto. A: Amilazas. B: Lipasas. C: Proteinasas. D: Tripsina. E: Proteína soluble. Los valores se muestran como media  $\pm$  error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Control: sin alimento base; ABD: alimento base disponible; ABND: alimento base no disponible.



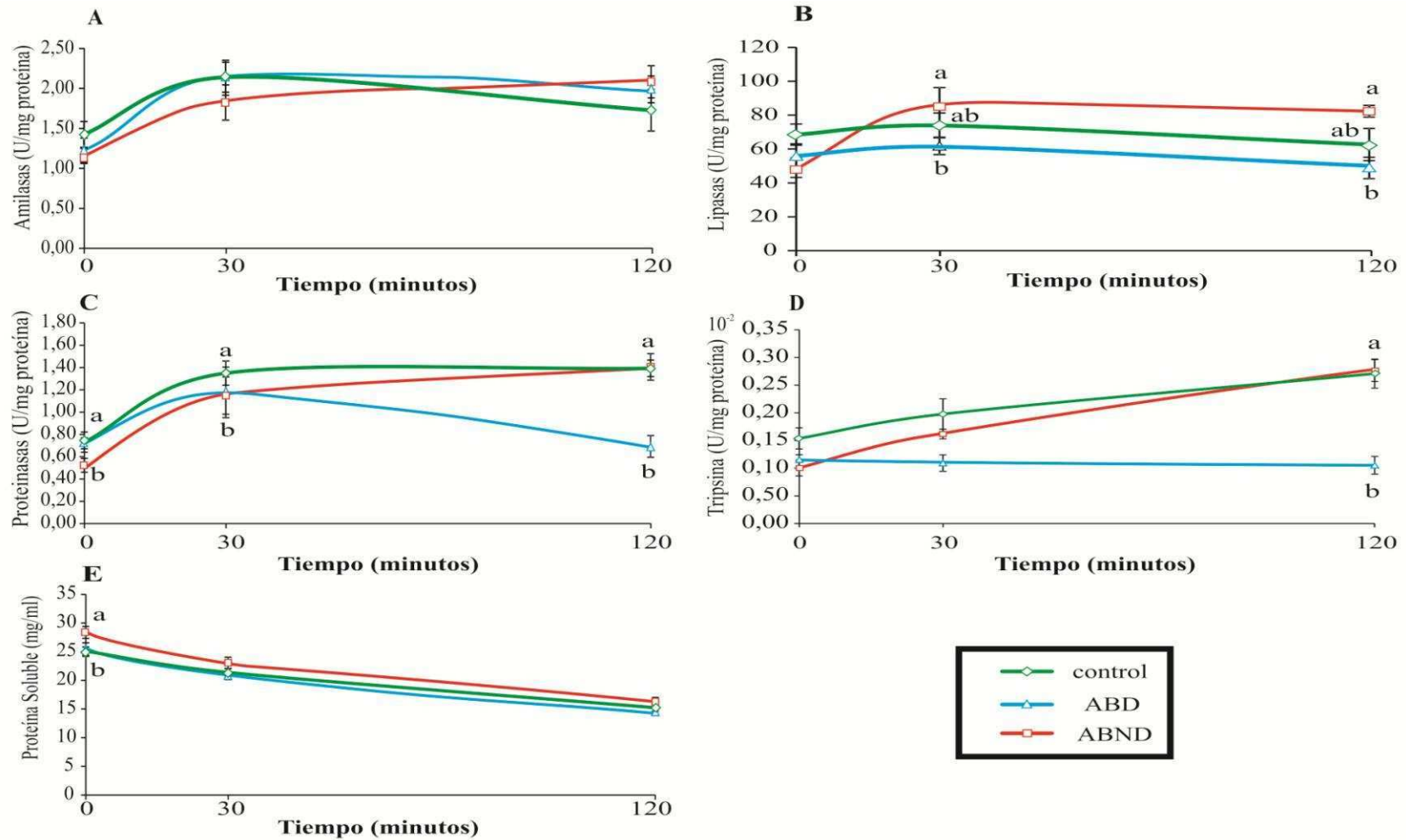


Figura 3.4. Actividad enzimática del hepatopáncreas de *Cherax quadricarinatus* en función a la disponibilidad de alimento luego de un ayuno moderado. A: Amilasas. B: Lipasas. C: Proteasas. D: Tripsina. E: Proteína soluble. Los valores se muestran como media  $\pm$  error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Control: sin alimento base; ABD: alimento base disponible; ABND: alimento base no disponible.

### 3.5 Discusión

Los resultados del presente capítulo mostraron que el extracto proteico de la harina de calamar no actúa como attractante para *C. quadricarinatus* en el rango de concentraciones ensayadas. Este resultado se contrapone con otros trabajos realizados en diferentes especies de crustáceos: *Pleoticus muelleri*, *Homarus gammarus*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* (Díaz *et al.* 1999, Mackie y Shelton 1972, Nunes *et al.* 2006, Smith *et al.* 2005, Fenucci *et al.* 1980). Sin embargo es importante resaltar; primero, que los estudios mencionados anteriormente fueron realizados en crustáceos marinos (langostas y camarones); segundo, que la harina de calamar y la integración en el alimento fue realizada de manera similar a la metodología realizada en estudios con especies marinas (ver materiales y métodos); y tercero, ésta sería la primera vez que se ensaya con harina de calamar como attractante para langostas de agua dulce. Por otro lado, debemos tener en cuenta que el experimento de comportamiento de búsqueda de alimento se realizó sin flujo de agua ni aireación y que las “plumas” de olor son fuertemente afectadas por la dinámica de flujo para la detección de las señales químicas (Weissburg 2011). Por lo tanto, la detección del alimento podría ser nuevamente estudiada usando un flujo de agua. A su vez, se podría analizar el comportamiento de búsqueda de alimento usando un diseño de acuario de tipo Y-maze para mejorar la sensibilidad del diseño experimental.

Mackie (1973) determinó que extractos solubles de calamar son ricos en prolina, glicina, alanina y arginina. De acuerdo con Heinen (1980), la glicina y la arginina actúan como attractantes en los crustáceos decápodos. Tierney y Atema (1988) encontraron que la celobiosa y la sacarosa actúan como estimulante en la langosta de agua dulce *Orconectes rusticus*; mientras que los aminoácidos glicina y glutamato provocan movimientos alimentarios en *O. rusticus* y *O. virilis*. Los aminoácidos son muy abundantes en los tejidos de los organismos marinos y probablemente guían a los depredadores y carroñeros hacia el alimento. Asimismo, los aminoácidos son señales de disponibilidad de alimento para las langostas de agua dulce (Tierney y Atema, 1988). Por lo tanto, serán necesarias más investigaciones para determinar si el uso de ingredientes complejos como la harina de krill,

o componentes simples como aminoácidos, podrían actuar como señales para la detección del alimento en *C. quadricarinatus*.

Las descripciones comportamentales de la respuesta de *C. quadricarinatus* al alimento concuerdan con los de otras especies de crustáceos (Zimmer-Faust *et al.* 1984, Lee y Meyers 1996, Kreider y Watts 1998). En general, la secuencia comportamental observada comienza con un incremento en el movimiento antenular, seguido por movimientos de búsqueda de alimento con los quelípedos (sondeo y/o rastrillaje) y el movimiento de los quelípedos hacia la boca. Las langostas estimuladas por la presencia del alimento no se orientaron o movieron en dirección a la fuente de alimento. Entonces, teniendo en cuenta los hábitos alimentarios de *C. quadricarinatus* y los resultados comportamentales registrados en la presente tesis, proponemos que *C. quadricarinatus* encuentra principalmente el alimento debido al tiempo que invierte en sondear y/o recorrer el ambiente más que a una respuesta a un attractante en particular.

También se ha observado en la langosta *O. virilis*, que el ayuno de una semana provoca un incremento de la locomoción y agresión, pero estos comportamientos decrecen luego de 2 semanas de ayuno (Hazlett *et al.* 1975). En la presente tesis se ha evidenciado que animales no alimentados por 16 días mostraron una disminución del 50% en la respuesta de alimentación y no se observó un incremento en la voracidad. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Lee y Meyer (1996), quienes sugieren que el ayuno prolongado es un caso de condicionamiento extremo y la privación del alimento provoca un aumento en el umbral de alimentación, por lo tanto, los animales no responden más rápidamente al estímulo de alimento en términos de iniciar la alimentación e incremento en la voracidad.

Loya-Javellana *et al.* (1995) estudiaron la evacuación del intestino, el retorno del apetito y el fluido gástrico en animales adultos de *C. quadricarinatus* alimentados a diario y alimentados cada dos días. Estos autores demostraron que las langostas de agua dulce poseen la capacidad de regular los procesos digestivos en función de la disponibilidad de alimento.

En la presente tesis, la actividad de amilasas y los niveles de proteína soluble en función de la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno corto o moderado, no se vieron afectados. En nuestro laboratorio Calvo *et al.* (2013) trabajando en juveniles de 1 g de *C. quadricarinatus*, observaron que el ayuno no afectó la actividad de amilasas; pero se evidenció una tendencia al decrecimiento luego de 50 días de ayuno y un incremento luego de 40 días de realimentación. Los resultados de esta tesis difieren de Clifford y Brick (1983), quienes demostraron que ejemplares de *Macrobrachium rosenbergii* ayunados, utilizan la energía proveniente de la oxidación de los hidratos de carbono.

Otra conclusión que se desprende de los resultados de la presente tesis es que los juveniles de *C. quadricarinatus* presentan una respuesta diferencial a la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno moderado. Esto concuerda con los resultados de Calvo *et al.* (2013) en esta misma especie, quienes observaron una disminución de la actividad de lipasas luego de 50 días de ayuno, sugiriendo que estas enzimas no son sintetizadas cuando el alimento no está presente. Trabajando también con la langosta de pinzas rojas, Yudkovski *et al.* (2007) hallaron que los transcriptos de lipasa decrecen en el hepatopáncreas durante períodos de no alimentación. A su vez, Rivera-Pérez y García-Carreño (2011) estudiando los efectos del ayuno sobre la expresión de transcriptos de lipasa en *Litopenaeus vannamei*, demostraron que existen dos tipos de lipasas, una lipasa digestiva y una lipasa intracelular (lisosomal). La lipasa digestiva fue encontrada sólo en la glándula digestiva y es regulada negativamente durante el ayuno por ausencia de alimento. La lipasa intracelular es expresada en varios tejidos (glándula digestiva, urópodos, pleópodos, tubo digestivo, branquias, hemocitos, músculo y gónadas) y es regulada positivamente durante el ayuno, sugiriendo que es la responsable de la movilización de lípidos a partir de sus depósitos (reservas energéticas). En base a estos estudios y los obtenidos en esta tesis, se propone una posible vía de regulación de la actividad de la lipasa digestiva que es resumida en la Figura 3.5.

Se propone que la detección de la presencia de alimento promueve la síntesis *de novo* de la lipasa digestiva (tratamientos ABD y ABND). Posteriormente, la manipulación, ingesta, contenido de alimento en el estómago y moléculas nutritivas en el hepatopáncreas,

estimulan la secreción de la lipasa digestiva dentro de los conductos del hepatopáncreas y el estómago, interactuando con el alimento y llevando a cabo la degradación en ambas secciones del tracto digestivo (tratamiento ABD). Por lo tanto, la lipasa digestiva secretada (al estómago, intestino y conductos del hepatopáncreas) actúa sobre el alimento y no podría ser cuantificada cuando es medida solamente en el hepatopáncreas (Fig 3.5 A). Esto concuerda con el hecho de que la actividad de lipasas no aumenta cuando la comida está disponible (ABD). Entonces, la presencia de alimento en el interior del estómago y luego los productos de digestión en el tracto digestivo (hepatopáncreas e intestino) estimulan su propia degradación. Por otro lado, la detección de la presencia de alimento inhibiría la vía de síntesis *de novo* de la lipasa intracelular y por lo tanto, los lípidos de reserva no son utilizados como fuente de energía

Cuando no hay alimento por un período prolongado, se estimularía la síntesis *de novo* de la lipasa intracelular y como consecuencia, los lípidos almacenados como reserva serían movilizadas. La vía de la lipasa digestiva estaría inhibida, encontrándose en niveles de actividad basal (Fig 3.5 B). En esta tesis, esto estaría avalado por la actividad de lipasa digestiva registrada en el control luego de 16 días de ayuno.

Sin embargo, cuando el alimento está presente pero no disponible (sólo en condiciones experimentales), la lipasa digestiva es sintetizada y almacenada dentro de las células del hepatopáncreas y no sería secretada (tratamiento ABND). Esto podría ser debido a la falta de los estímulos de manipulación, ingestión, contenido estomacal y de productos de digestión del alimento en el hepatopáncreas. Por otro lado la síntesis de lipasa intracelular estaría inhibida al menos por corto plazo, aunque podría existir o no un mecanismo para contrarrestar este efecto de condición experimental (Fig 3.5 C). Es decir, cuando *C. quadricarinatus* detecta la presencia de alimento, inhibe la síntesis de lipasa intracelular para restringir la movilización de reservas y también, estimula la síntesis de lipasa digestiva a pesar de la presencia o ausencia de alimento en el estómago y hepatopáncreas. Esta explicación estaría siendo apoyada por el aumento de la actividad de lipasas en el tratamiento ABND que se observó en esta tesis. Para experimentos futuros sería interesante poder evaluar la actividad de lipasa intracelular y los niveles de reserva de lípidos para confirmar esta posible vía de regulación.

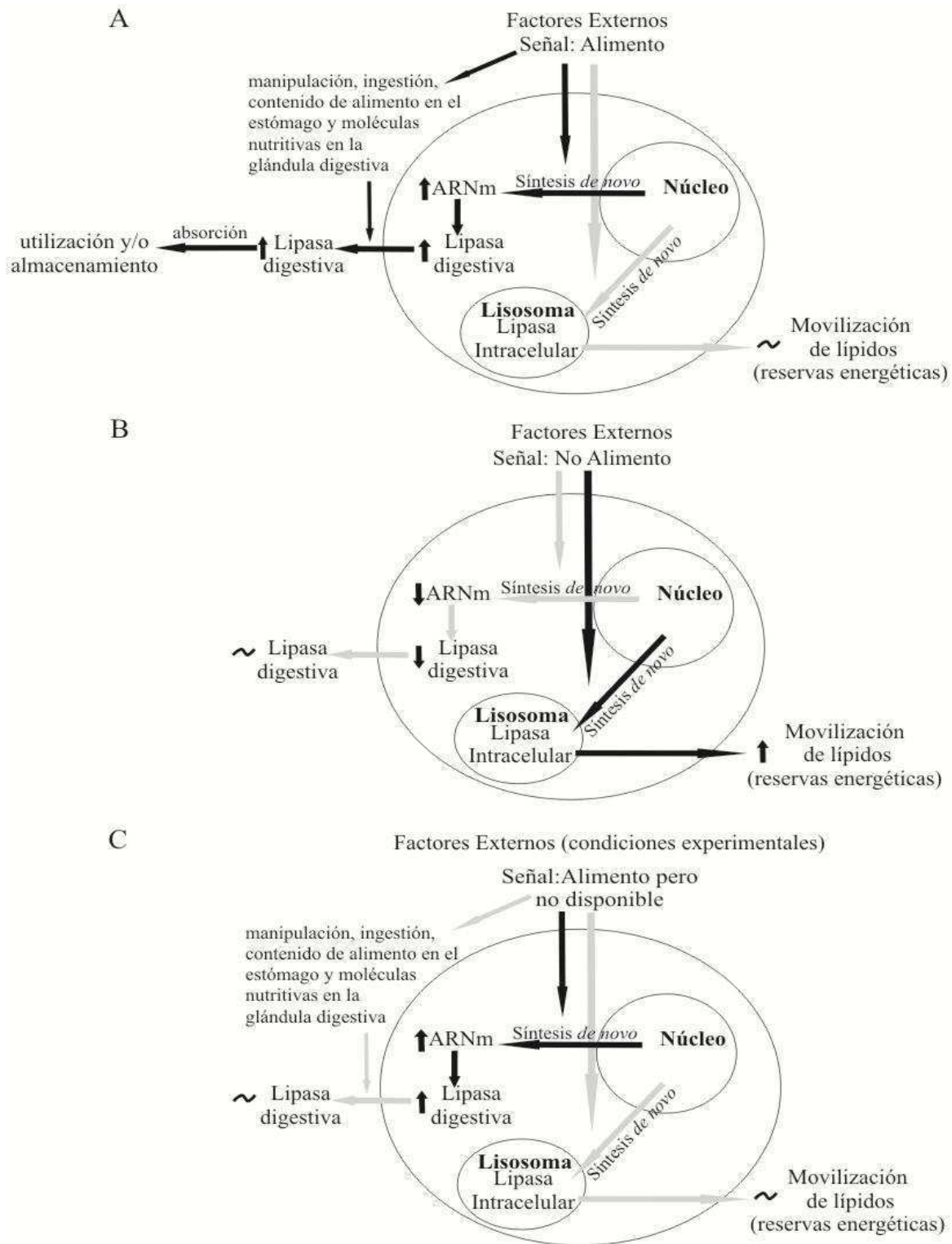


Figure 3.5. Diagrama de la posible regulación de la lipasa digestiva e intracelular del hepatopáncreas de *Cherax quadricarinatus*, de acuerdo con los resultados de los trabajos de Yudkovski *et al.* (2007); Rivera-Pérez y García-Carreño (2011); Calvo *et al.* (2013) y la presente tesis. A) Alimentación, B) Ayuno prolongado, C) Estímulo alimentario pero sin ingestión. Las flechas negras y grises indican vías de estimulación e inhibición respectivamente.

La actividad de tripsina y proteinasas en respuesta a la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno moderado, fue menor a los 120 minutos. A su vez, ambas enzimas presentaron una respuesta similar frente a la disponibilidad de alimento. Este resultado concuerda con el concepto de que la tripsina (junto con la quimotripsina) es una de las principales proteinasas del hepatopáncreas en los crustáceos decápodos siendo responsable de la digestión del 40 al 60% de las proteínas en camarones peneidos (Hernández-Cortés *et al.* 1999a).

Los resultados de los experimentos de ayuno moderado mostraron que la disponibilidad de alimento estimula la secreción de tripsina (a los 120 minutos); sin embargo, no es afectada durante un ayuno corto. El resultado de la respuesta diferencial de la secreción de tripsina bajo diferentes períodos de ayuno, se relaciona con los hallados por Muhlia-Almazan y Garcia-Carreño (2002) en *L. vannamei*, quienes reportaron que la tripsina del hepatopáncreas disminuye en respuesta al ayuno. Cuzon *et al.* (1980) demostraron que la actividad de tripsina en camarones se reduce durante el ayuno. A su vez, los juveniles de *C. quadricarinatus* ayunados por 16 días y expuestos a la presencia de alimento pero no disponible, mostraron un incremento en la actividad de tripsina respecto a ABD, lo que indicaría que podría ser almacenada dentro de las células del hepatopáncreas hasta el ingreso de comida al sistema digestivo. Esto también está relacionado con los resultados reportados por Hernández-Cortés *et al.* (1999b) en la langosta *Pacifastacus leniusculus*, donde se demostró la presencia de tripsinógeno en el hepatopáncreas. A su vez, Sainz *et al.* (2004) estudiando la síntesis de tripsina y almacenamiento como zimógeno en animales alimentados y ayunados de *L. vannamei*, demostraron que el tripsinógeno no es secretado totalmente de las células B y es secretado parcialmente como resultado de la ingestión. Hay que considerar también, que el tripsinógeno puede ser activado espontáneamente durante la preparación de los extractos enzimáticos y por lo tanto, ser cuantificado como enzima activa, es decir que no se podría distinguir de la enzima que es activada y secretada por la digestión del alimento por causas naturales (Sánchez-Paz *et al.* 2003). Por lo tanto, serán necesarios más estudios en *C. quadricarinatus* para determinar si posibles cambios en la expresión de mensajeros y estudios histoquímicos del tracto digestivo y del hepatopáncreas, se relacionan con los cambios fisiológicos como la secreción de las enzimas digestivas.

Analizando las diferentes respuestas de actividades de lipasas, proteinasas y tripsina luego del ayuno moderado, se puede destacar que las lipasas responden en forma significativa a la presencia o ausencia de alimento a corto plazo (30 minutos). En cambio, las proteinasas y tripsina se manifiestan de manera significativa a largo plazo (120 minutos). Entonces, teniendo en cuenta los diferentes tipos de respuestas observados, la actividad enzimática podría ser utilizada como herramientas útiles para analizar el estado nutricional de *C. quadricarinatus*.

Finalmente, durante el ayuno los crustáceos deben utilizar sus reservas para satisfacer las necesidades, por lo que la actividad enzimática debe estar finamente regulada para degradar las reservas energéticas necesarias, preservando lo más posible la integridad la celular (Sánchez-Paz *et al.* 2006).

Los resultados muestran que la harina de calamar no actuaría como attractante para *C. quadricarinatus*, por lo tanto se rechaza la primera hipótesis de trabajo. Respecto al efecto de la disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno corto, la actividad de las enzimas digestivas no se vio modificada, por lo tanto se rechaza la segunda hipótesis de trabajo. En cambio, la actividad de las enzimas digestivas se vio alterada por disponibilidad de alimento, cuando los animales fueron expuestos previamente un ayuno moderado, por consiguiente los resultados apoyan la tercera hipótesis de trabajo.





El capítulo 4 fue retirado a pedido del autor

At author's request chapter 4 has been withdrawn

# Capítulo 4

---

Efecto del ayuno prolongado y posterior alimentación sobre las respuestas bioquímicas y fisiológicas de juveniles de *Cherax quadricarinatus*

**Los resultados de este capítulo están en revisión para su publicación como:**

Hernán J. Sacristán, Martín Ansaldo, Luis M. Franco Tadic, Analía V. Fernández Gimenez  
y Laura S. López Greco.

“Long-term starvation and posterior feeding effects on biochemical and physiological responses of midgut gland of *Cherax quadricarinatus* juveniles (Parastacidae)”

## 4.1 Introducción

Los crustáceos atraviesan períodos de ayuno durante su crecimiento como consecuencia de las sucesivas mudas. Sin embargo, la habilidad de algunas especies como *Cherax quadricarinatus*, para sobrevivir durante largos períodos sin alimento y/o agua, está relacionada con una respuesta comportamental y fisiológica a dichas condiciones. Por lo tanto, el tiempo de supervivencia probablemente está asociado a la capacidad de almacenamiento de nutrientes y a la conservación de energía (Jones y Obst 2000).

La glándula digestiva de los crustáceos cumple un papel fundamental durante el crecimiento y la muda. Como se mencionó en los capítulos precedentes, es el principal órgano de síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción y almacenamiento de nutrientes, tales como lípidos y glucógeno, que pueden ser utilizados durante los períodos de no alimentación (Icely y Nott 1992, Ong y Johnston 2006). Por lo tanto, su función está íntimamente relacionada con numerosos parámetros ambientales y podría ser utilizada para evaluar el estado nutricional de los animales (Papathanassiou y King 1984, Vogt *et al.* 1986, Whyte *et al.* 1986, Jones y Obst 2000). Se ha propuesto que el ayuno provoca la relocalización de los recursos energéticos, en favor de los principales procesos de mantenimiento y supervivencia con un alto costo metabólico. Además de la falta de alimento, los cambios en la salinidad y componentes de la dieta han sido informados como causales de alteraciones estructurales de la glándula digestiva (Storch y Anger 1983, Jones y Obst 2000, Ong y Johnston 2006, Li *et al.* 2008, Díaz *et al.* 2010, Calvo *et al.* 2011, 2012).

Como resultado de factores internos y externos como el ayuno, la disponibilidad, cantidad y calidad de alimento, la actividad de las enzimas digestivas de los crustáceos decápodos no permanece constante durante su desarrollo (Van Wormhoudt 1974). Loya-Javellana *et al.* (1995), Sacristán *et al.* (2014) y capítulo 3 demostraron que las langostas de agua dulce poseen la capacidad de regular su proceso digestivo de acuerdo a la disponibilidad de alimento. A su vez, numerosos estudios comprobaron que el ayuno afecta la actividad de las enzimas digestivas (Cuzon *et al.* 1980, Biesiot y Capuzzo 1990, García-Carreño 1992, Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002, Zhang *et al.* 2010, Calvo *et al.*

2013, Sacristán *et al.* 2014), pero se desconoce cómo actúan estas enzimas durante el ayuno prolongado. En particular, Sacristán *et al.* (2014) y capítulo 3 demostraron que la actividad de proteinasas de *C. quadricarinatus* no es afectada por la falta de alimento, mientras que la actividad de lipasa disminuye luego de 16 días de ayuno.

El estudio del estrés oxidativo y las defensas antioxidantes durante el desarrollo ontogenético de los crustáceos es importante para comprender la respuesta fisiológica de un organismo, sin embargo esta información es relativamente nueva y sigue siendo limitada o escasa en la literatura (Fanjul-Moles y Gonsebatt 2012). El metabolismo oxidativo de las células es una fuente continua de generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés: reactive oxygen species) resultante de la reducción univalente de la molécula de O<sub>2</sub> (Morales *et al.* 2004). Todos los animales presentan dos tipos de defensas antioxidantes para contrarrestar la generación de ROS, defensas de tipo enzimáticas [Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT)] y defensas de tipo no enzimáticas [Glutación reducido (GSH) y vitaminas C y E]. Las defensas enzimáticas y no enzimáticas actúan en conjunto para eliminar o transformar las ROS en metabolitos menos tóxicos (Halliwell y Gutteridge 2007, Hermes-Lima 2004). Por lo tanto, cuando la tasa de formación de ROS supera la capacidad antioxidante de un organismo, se produce la situación de estrés oxidativo (Sies 1986). Esta situación conlleva a un incremento en el daño oxidativo en diferentes células blanco (Almeida *et al.* 2005) como por ejemplo la oxidación del ADN, lípidos y proteínas, que puede modificar las funciones de la células (Halliwell y Gutteridge 2007).

Se ha demostrado que el ayuno posee efectos como pro-oxidante, debido a una inadecuada neutralización de las ROS generadas por el metabolismo aeróbico y la reducción de los niveles de defensas antioxidantes. Una condición desfavorable de alimentación provoca la disminución de la síntesis de proteína, reduciendo los niveles de las enzimas implicadas directamente en la neutralización de ROS y en la reutilización de moléculas importantes como el glutación reducido (GSH) (Morales *et al.* 2012). Hasta el momento se han realizado algunos estudios en cangrejos, langostas de agua dulce, camarones y langostinos sobre el efecto de la privación de alimento sobre diferentes variables bioquímicas y fisiológicas (Vinagre y Da Silva 1992, Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002, Comoglio *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2004, Ong y Johnston 2006, Pascual *et*

*al.* 2006, Sánchez-Paz *et al.* 2006, Comoglio *et al.* 2008, Rivera-Pérez *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2010, Calvo *et al.* 2013, Sacristán *et al.* 2014), pero se sabe relativamente poco acerca de los efectos que puede causar el ayuno prolongado sobre los parámetros de estrés oxidativo y la funcionalidad de la glándula digestiva.

A partir de la introducción presentada se plantean los siguientes objetivos.

## 4.2 Objetivo

Evaluar el efecto del ayuno prolongado y posterior alimentación sobre los niveles de reservas energéticas, estrés oxidativo, actividad enzimática digestiva y estructura de la glándula digestiva en juveniles de *Cherax quadricarinatus*.

En función de este objetivo las hipótesis planteadas son las siguientes:

**Hipótesis 1:** El ayuno prolongado provocará la disminución de los niveles de glucógeno y lípidos de reserva en la glándula digestiva de *C. quadricarinatus* y la posterior alimentación restablecerá dichos niveles a valores similares a los animales alimentados.

**Hipótesis 2:** La OP, TBARS y la actividad de CAT en la glándula digestiva será mayor en los juveniles ayunados, mientras que la posterior alimentación restablecerá parcialmente el daño oxidativo y el nivel de actividad enzimática antioxidante.

**Hipótesis 3:** Los niveles de GSH serán menores en los juveniles privados de alimento y la posterior alimentación provocará que los niveles de GSH sean similares a los animales alimentados.

**Hipótesis 4:** La actividad de proteinasas y lipasas de los juveniles en situación de ayuno prolongado irá disminuyendo a medida que el tiempo de ayuno sea mayor. La posterior alimentación hará que la actividad digestiva se restablezca completamente.

**Hipótesis 5:** La glándula digestiva presentará alteraciones estructurales por efecto del ayuno prolongado, mientras que la posterior alimentación promoverá la reestructuración parcial de dicha glándula.

### 4.3 Materiales y métodos

#### 4.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles de *C. quadricarinatus* fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio, a partir de lotes de reproductores suministrado por Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Corrientes, Argentina. Cada hembra ovígera obtenida en laboratorio fue mantenida bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas en el Capítulo 1. Cuando los juveniles se independizaron en el estadio III (Levi *et al.* 1999), fueron separados de sus madres y mantenidos hasta alcanzar el peso deseado para los ensayos en las mismas condiciones anteriormente descriptas en el Capítulo 1.

#### 4.3.2 Diseño Experimental

Se seleccionaron 109 langostas en estadio de intermuda de peso promedio  $6,27 \pm 1,24$ g. Fueron mantenidas individualmente en frascos de vidrio (13,5 cm de diámetro y 13,5 cm de alto) conteniendo 1,5 L de agua dechlorada, que a su vez, fueron colocados en bandejas plásticas (capacidad para 6 frascos por bandeja) a baño de María a temperatura constante a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por medio de calentadores Altman (100 W, precisión  $1^\circ\text{C}$ ) y fotoperiodo de 14:10 (L:O). Dos veces por semana se renovó totalmente el agua de cada frasco con agua del tanque de reserva del laboratorio. Los parámetros de calidad del agua fueron los indicados en el Capítulo 2. En estas condiciones experimentales los animales fueron aclimatados por 1 semana y alimentados a diario *ad libitum* con Tetra Color Tropical Granules (TETRA<sup>®</sup>). Al cumplirse el tiempo de aclimatación (T<sub>0</sub>), se extrajo la glándula digestiva de 10 langostas previamente anestesiadas en agua fría y sacrificadas; y las muestras fueron almacenadas individualmente en microtubos a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Las langostas que no fueron sacrificadas a T<sub>0</sub>, fueron distribuidas al azar en dos grupos: 43 en el grupo alimento (AL, control) y 56 en el grupo ayuno (AY). Los animales del grupo AL fueron alimentados a diario *ad libitum* con Tetra Color<sup>®</sup> durante 80 días de experimentación. A su vez, los animales del grupo AY no fueron alimentados hasta el día 50, a partir del cual, la mitad de los juveniles siguieron sin ser alimentados por el resto del

tiempo experimental, mientras que la otra mitad se alimentó hasta el día 80 [grupo ayuno-alimento (AY-AL)]. Durante el tiempo experimental se registró el número de mudas.

A diferentes tiempos: 15, 30 y 50 días (T15, T30 y T50 respectivamente) se pesaron, anestesiaron y sacrificaron 10 animales de los grupos AL y AY, a los que se les disecó la glándula digestiva, éstas fueron almacenadas individualmente a -80 C. De la misma manera, 10 juveniles de los tres grupos (AL, AY y AY-AL) fueron anestesiados y sacrificados al final del experimento (T80). El diseño experimental de este capítulo se resume esquemáticamente en la Figura 4.1.

Es importante indicar que el tiempo de ayuno prolongado se basó en primer lugar en el experimento previo de ayuno moderado mencionado en el Capítulo 2. En este experimento se determinó el daño oxidativo a lípidos y proteínas, la actividad de CAT y los niveles de GSH. Los resultados de estas determinaciones mostraron un efecto parcial del ayuno sobre los parámetros anteriormente mencionados (datos no publicados). En segundo lugar, los 50 días de ayuno corresponden a un valor previamente estimado para juveniles de menor peso para esta misma especie, donde se detectaron modificaciones en los niveles de reserva y de las enzimas digestivas (Calvo *et al.* 2013).

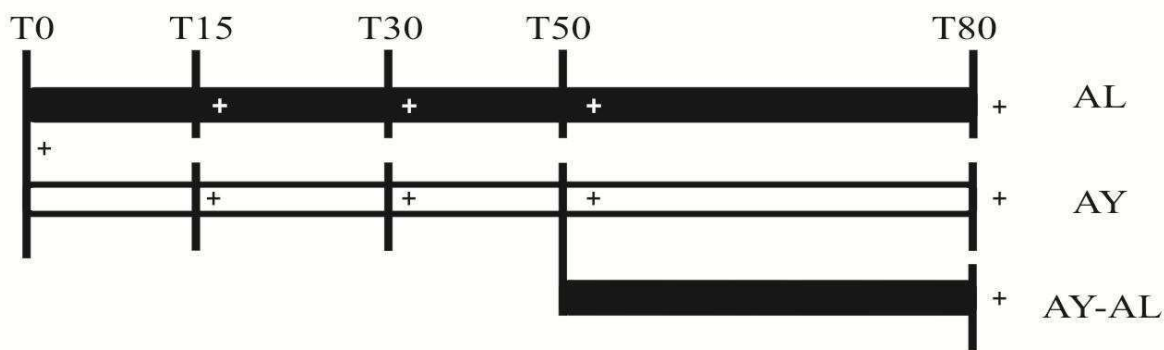


Figura 4.1: Esquema del diseño experimental utilizado para analizar el efecto del ayuno prolongado en juveniles de *Cherax quadricarinatus*. Tratamientos: AL: grupo alimento; AY: grupo ayuno; y AY-AL: grupo ayuno-alimento. T0: día 0 (inicio del experimento); T15: 15 días de iniciado el experimento; T30: 30 días de iniciado el experimento; T50: 50 días de iniciado el experimento; y T80: 80 días de iniciado el experimento. El —<sup>+</sup> indica el sacrificio de 10 animales.



El crecimiento de los animales fue evaluado a través de la tasa de crecimiento específico (TCE), según la siguiente ecuación:  $TCE (\%/día) = 100 (\ln Pf - \ln Pi) / \text{tiempo (días)}$ , donde Pf es el peso final y Pi es el peso inicial. A su vez, se determinó el índice hepatosomático (IHS) usando la siguiente ecuación:  $IHS (\%) = (\text{peso de la glándula digestiva} / \text{peso total}) \times 100$ .

Además, se analizó histológicamente la glándula digestiva a los 80 días, a partir de 3 juveniles de cada grupo (AL, AY y AY-AL). El procedimiento de fijación, inclusión en parafina y coloración se realizó de la misma manera que se describió en el Capítulo 2.

#### *4.3.3 Reservas energéticas, estrés oxidativo y actividad enzimas digestivas*

Para llevar a cabo este punto, una pequeña porción de cada glándula digestiva (HP) se utilizó para cuantificar los niveles de lípidos y glucógeno de reserva y glutatión reducido. El resto del órgano se utilizó para realizar un extracto enzimático (homogenato), a partir del cual se determinó la cantidad de proteína soluble, la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas y la actividad de enzimática de catalasa, proteinasas y lipasas.

#### *Glucógeno*

Se determinaron los niveles de reserva de glucógeno de la glándula digestiva a través del método de Lo *et al.* (1970). Para ello se colocó en tubos de vidrio 1 mL de KOH al 30% saturado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y entre 30 y 50 mg de HP. Se colocó a baño maría a 100°C por 60 minutos y posteriormente los tubos se enfriaron en agua fría. Se adicionó 1 mL de etanol 96°, se mezcló bien y se dejó reposar por 30 minutos en agua fría. Luego se centrifugó a 6.000 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar sobre un papel absorbente. Después, cada precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente y se agregó 200 µL de fenol al 8%. Rápidamente, se agregó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se dejó reposar durante 10 minutos y luego se colocó en baño de agua entre 25 y 30°C durante 20 minutos. Se registró la absorbancia de cada muestra a 490 nm y se utilizó glucógeno de conejo (Fluka 50576) como estándar.

## *Lípidos*

Se determinaron los niveles de reserva de lípidos de la glándula digestiva a través de la extracción de lípidos según Folch *et al.* (1957) y posterior cuantificación siguiendo el método de Frings y Dunn (1970). Para ello se colocaron en tubos de vidrio entre 40 y 20 mg de HP y una mezcla de cloroformo: metanol (2:1) en una relación 1:80 (p/v) y se dejó a 4°C por 24 horas. Al día siguiente, se filtró cada muestra, se recogió el filtrado en tubos graduados y se adicionó cloruro de sodio 0,9% en una relación 10:2 (v/v). Se agitó bien y se centrifugó a 4.000 g por 10 minutos. La fase superior (acuosa) fue descartada, se repitió nuevamente el agregado de cloruro de sodio como se indicó anteriormente, y se guardó a 4°C por 24 horas. Luego se adicionó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se colocó en baño maría a 100°C por 10 minutos y se dejó enfriar en agua con hielo. Finalmente se agregó 2,5 mL de Vainillina (Merck 8.18718.0100) 0,016 M en fosfato de potasio monobásico 0,44 M y se registró la absorbancia de cada muestra a 530 nm en cubeta de cuarzo. Como solución patrón de lípidos se utilizó aceite de oliva extra virgen (marca: Indalo Clásico, desarrollado por Promet S.A.) en etanol (1mg de lípidos en 1 mL de etanol).

## *Glutati6n reducido (GSH)*

Los niveles de GSH fueron determinados según el método de Moron *et al.* (1979). Las glándulas digestivas fueron homogenizadas (relación 1:10 p/v) en tetracetato de etilendiaminadisódica (EDTA) 0,02 M. A 500 µL de homogenato se le agregaron 500 µL de ácido tricloroacético (TCA 10%), para precipitar las proteínas de las muestras, se centrifugaron durante 10 minutos a 7.000 g y se separó el sobrenadante. Los SH-no proteicos endógenos libres fueron determinados colocando en las cubetas de medición 500 µL del sobrenadante al que se le agregaron 1.000 µL de buffer Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9), se mezcló bien y se llevó la lectura al valor 0 de absorbancia. Luego se agregaron 25 µL ácido 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, 0,5 mM). La absorbancia fue registrada a 412 nm luego de transcurridos 5 minutos. GSH fue usado como estándar para realizar la curva de calibración y los resultados se expresaron en nmol/mg de tejido húmedo.

### *Preparación de extractos enzimáticos*

El extracto enzimático fue preparado a partir de la homogenización de la glándula digestiva de cada organismo en buffer Tris-HCl (120 mM, pH 7) en relación 1:4 utilizando un homogeneizador teflón-vidrio (Vijayavel *et al.* 2004). Posteriormente se centrifugaron en frío (2-4 °C) durante 30 minutos a 10.000 g, se separaron los sobrenadantes, se colocaron en tubos rotulados y se congelaron en forma inmediata a -80°C.

### *Proteína soluble*

La cuantificación de proteína soluble de los extractos se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo 1.

### *Peroxidación de Lípidos (TBARS)*

Los niveles de peroxidación de lípidos se estimaron mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege y Aust 1978). Los homogenatos frescos fueron agregados a la mezcla de reacción (ácido tricloroacético 15% (w/v), ácido 2-tiobarbitúrico 0.375% (w/v) y butilhidroxitolueno 0.147mM) en una relación de 1:5 (v/v). La mezcla se agitó en vortex, se mantuvo en agua hirviendo durante 45-60 minutos e inmediatamente después se enfrió en baño de hielo durante 5 minutos (Ohkawa *et al.* 1979). Por último se centrifugó a 5.000 g (10 min) y el sobrenadante se midió espectrofotométricamente a 535 nm.

### *Oxidación de proteínas (OP)*

El nivel de oxidación de proteínas fue medido de acuerdo con el protocolo desarrollado por Reznick y Packer (1994), que se basa en la detección de la formación de hidrazonas proteicas como resultado de la reacción de la dinitrofenilhidrazina (DNPH) con los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas. Algunas modificaciones menores fueron

realizadas al protocolo original (Ansaldo *et al.* 2007), luego de la formación de las hidrazonas proteicas, las mismas fueron precipitadas usando TCA 30% (Fagan *et al.* 1999), se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 g y los precipitados fueron lavados 3 veces con etanol: acetato de etilo (1:1). Luego del último lavado, las proteínas fueron resolubilizadas en 1 mL de urea 6 M en fosfato de potasio (pH 2,5) en vez de clorhidrato de guanidina. Para acelerar el proceso de solubilización, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 60 minutos en baño de agua. La solución final fue centrifugada para remover cualquier material insoluble. El contenido de carbonilos fue calculado a partir de la medición de la absorbancia a 375 nm, utilizando un coeficiente de absorción  $\epsilon = 22.000/M \cdot cm$ . Se verificó que los blancos de urea registraran los mismos picos de absorbancia que los blancos de clorhidrato de guanidina a 375 nm.

#### *Actividad de Catalasa (CAT)*

La enzima Catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:  $2 H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$

La velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno es directamente proporcional a la actividad enzimática y obedece a una cinética de pseudo primer orden con respecto al peróxido de hidrógeno (ecuaciones 1 y 2).

$$\frac{-d [H_2O_2]}{dt} = k [catalasa] * [H_2O_2] = k' \cdot [H_2O_2] \quad (1)$$

en su forma integrada

$$k' = t^{-1} \cdot \ln \frac{[H_2O_2]_0}{[H_2O_2]_t} \quad (2)$$

$[H_2O_2]_0$  es la concentración de peróxido de hidrógeno inicial y  $[H_2O_2]_t$  es la concentración al tiempo estudiado.

El valor de  $k$  (constante específica de reacción) es de  $4,6 \times 10^7/\text{M s}$ , y fue calculado considerando que la molécula posee cuatro grupos hemo (Chance 1954). El ensayo desarrollado originalmente por Chance (1954) y modificado por Aebi (1984), consiste en medir la disminución de la absorción a 240 nm (longitud de onda a la que absorbe el peróxido de hidrógeno). La medición espectrofotométrica de la cinética enzimática de CAT se realizó colocando en la cubeta el medio de reacción (buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7) con diferentes alícuotas de los extractos enzimáticos. Se graficó una línea de base y luego se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  300 mM. La reacción se expresó en unidades de CAT/mg de proteínas. Cada unidad de CAT es la cantidad de enzima necesaria para degradar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto.

#### *Actividad de proteinasas y lipasa*

La determinación de la actividad enzimática digestiva de proteinasas y lipasa de los extractos se realizaron siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo 1.

#### *4.3.4 Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos (AL, AY, AY-AL) en cada tiempo evaluado (T15, T30, T50, T80). El análisis del número de mudas fue realizado con el test Chi-cuadrado. Para realizar el análisis proveniente de los resultados de la tasa de crecimiento específica (TCE), índice hepatosomático, proteína soluble, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, glutatión reducido, glucógeno, lípidos y la actividad de catalasa, proteinasas y lipasa, fue realizado usando el Modelo Lineales Generalizados Mixtos [del inglés: Generalized Linear Mixed Models (GLMMs)], con el programa estadístico R y el paquete de datos de GLMMs (Zuur *et al.* 2009). El nivel de significancia fue fijado en 0,05.

#### 4.4 Resultados

El índice hepasomático, el número de mudas y la cantidad de proteína soluble se muestran en la Tabla 4.1. Las langostas ayunadas presentaron menores valores de IHS ( $p<0,05$ ) y menor número de mudas ( $p<0,05$ ) respecto a las del grupo AL durante todo el experimento. Los niveles de proteína soluble del grupo AY fueron menores que los del AL ( $p<0,05$ ) solo en el día 30.

La TCE mostró menores valores ( $p<0,05$ ) en los animales privados de alimento a los 15, 30 y 80 días comparado con los alimentados. A su vez, los juveniles del grupo AY-AL registraron menores valores de TCE que los AL a tiempo final (Fig 4.2).

Tabla 4.1: Índice hepasomático, número de mudas y proteína soluble de juveniles de *Cherax quadricarinatus* luego del ayuno prolongado y posterior alimentación. El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos para cada tiempo. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

Tratamiento	Días	IHS (%)	Mudas	Proteína Soluble (mg/mL)
Inicial	0	6,93±0,28	-----	11,79±0,57
Alimento	15	7,25±0,26	17	11,99±0,42
	30	6,75±0,26	7	12,43±0,43
	50	6,68±0,29	7	12,37±0,41
	80	6,86±0,39	9	9,52±0,57
Ayuno	15	5,16±0,24*	5*	10,82±0,50
	30	4,25±0,20*	1*	10,65±0,52*
	50	4,48±0,23*	0*	11,80±0,40
	80	4,61±0,22*	0*	8,05±0,52
Ayuno-Alimento	80	7,07±0,38	9	9,09±0,47

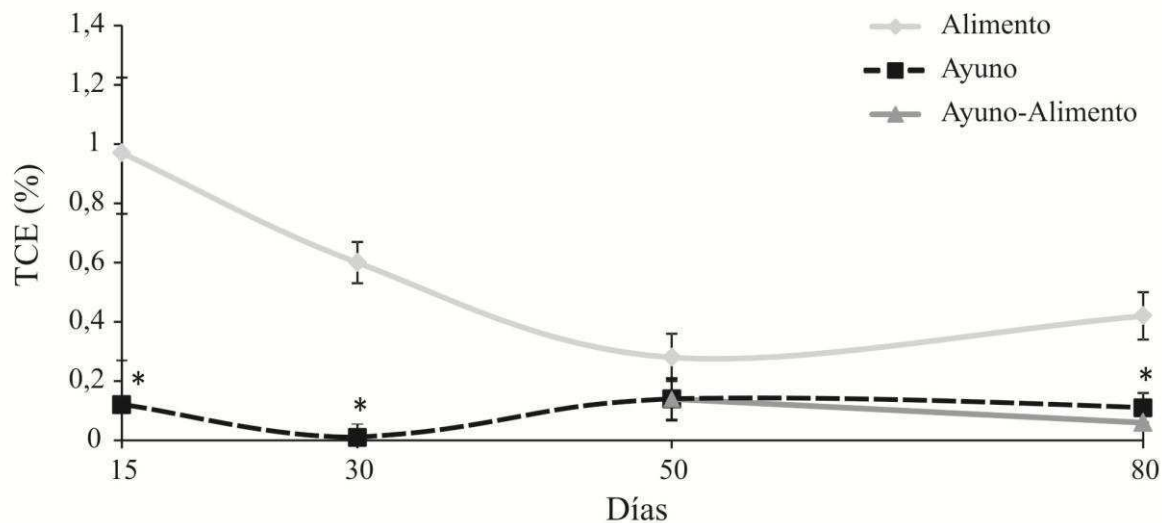


Figura 4.2. Tasa de crecimiento específica de juveniles de *Cherax quadricarinatus* luego del ayuno prolongado y posterior alimentación. El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos a cada tiempo. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.1 Reservas energéticas, estrés oxidativo y actividad enzimas digestivas

Los animales ayunados presentaron menores ( $p < 0,05$ ) niveles de glucógeno y lípidos de reserva en comparación con los alimentados a 15, 30, 50 y 80 días. A los 80 días, los niveles de glucógeno en los juveniles del grupo AY-AL fueron similares ( $p > 0,05$ ) a los alimentados, mientras que los niveles de lípidos fueron menores ( $p < 0,05$ ) (Fig4.3 A, B).

La peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y actividad de CAT se muestran en la Tabla 4.2. Estadísticamente no se observaron diferencias entre los tratamientos para TBARS, PO y CAT.

Luego de 80 días de ayuno, la actividad de lipasa digestiva disminuyó en forma significativa ( $p < 0,05$ ) en los juveniles privados de alimento respecto de los alimentados, alcanzando una actividad mínima al día 50 y 80 ( $24,20 \pm 2,92$  y  $38,27 \pm 3,14$  U/mg proteína respectivamente). Además, los animales del grupo AY-AL recuperaron los niveles de actividad a valores similares a los de AL ( $207,44 \pm 22,02$  y  $237 \pm 19,19$  U/mg proteína respectivamente) (Fig 4.4 A). A su vez, la actividad de proteinasas decreció significativamente ( $p < 0,05$ ) en AY respecto a AL a los 80 días. En cambio la actividad de

proteinasas del grupo AY-AL no mostró diferencias significativas en comparación al control (Fig 4.4 B).

Los niveles de GSH del grupo AY fueron menores ( $p < 0,05$ ) a los de AL en todos los tiempos ensayados. A los 80 días, el grupo AY-AL presentó niveles de GSH similares ( $p > 0,05$ ) al grupo AL (Fig4.5).

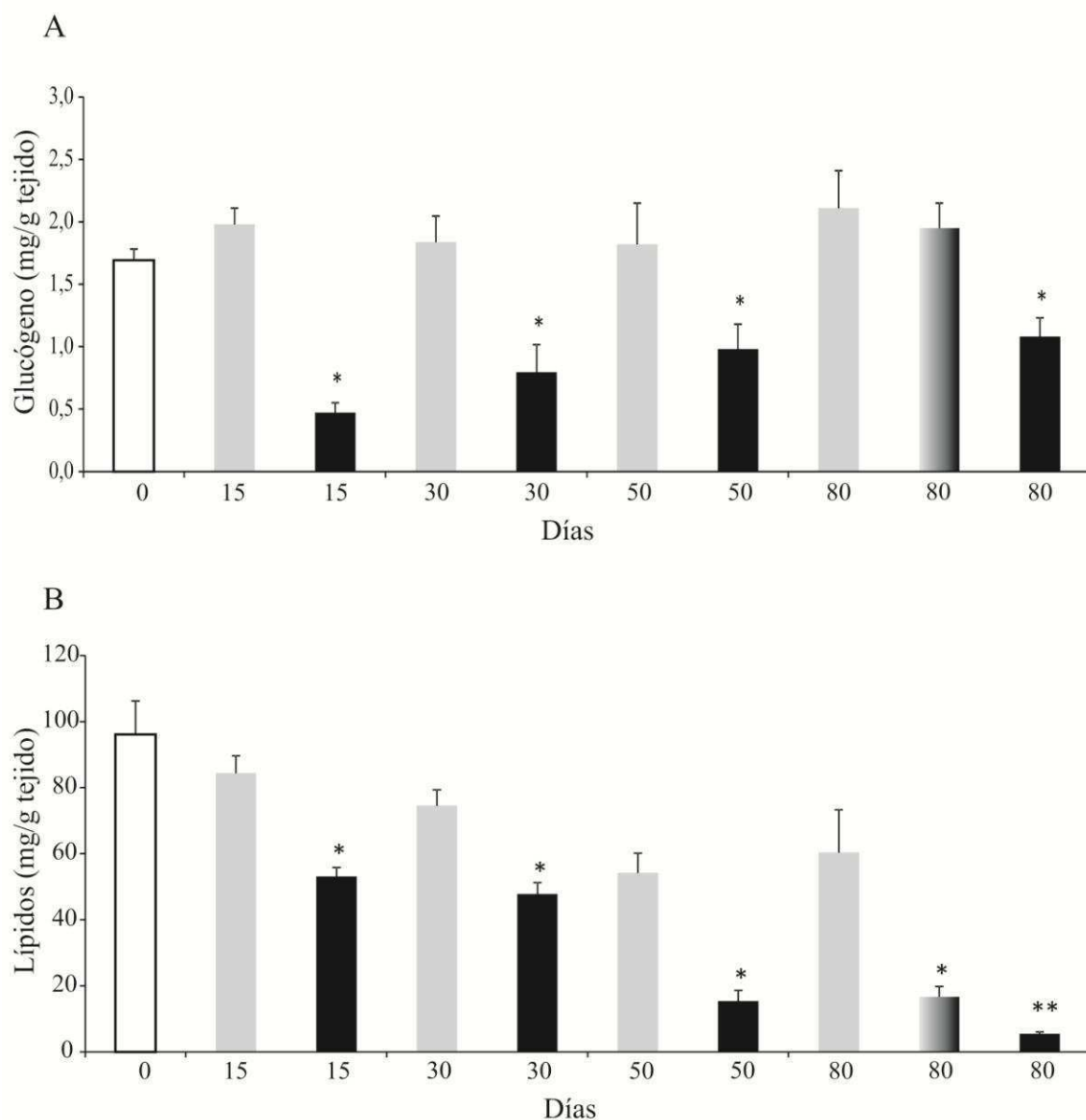


Figura 4.3. Niveles de glucógeno y lípidos en juveniles de *Cherax quadricarinatus* luego del ayuno prolongado y posterior alimentación. El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos a cada tiempo. Barra blanca: control inicial; barras grises: grupo alimento; barras negras: grupo ayuno y barra degradé: grupo ayuno-alimento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



Tabla 4.2. Niveles de peroxidación de lípidos [MDA (nmol/cm)/mg peso húmedo], oxidación de proteínas [nmol DNPH/mg proteína] y actividad de Catalasa (nmoles/mg proteína) en juveniles de *Cherax quadricarinatus* luego del ayuno prolongado y posterior alimentación. El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos a cada tiempo. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Días	TBARS	PO	CAT
Inicial	0	102,46±5,34	8,33±0,52	2,14±0,53
Alimento	15	91,53±6,45	8,57±0,53	2,14±0,30
	30	90,56±5,44	8,42±0,59	2,59±0,48
	50	78,94±6,21	7,53±0,68	2,29±0,65
	80	106,98±15,23	8,58±1,13	2,25±0,32
	Ayuno	15	86,01±6,79	9,07±0,81
30		99,11±5,74	8,87±0,79	2,84±0,53
50		90,47±6,55	8,14±0,93	1,45±0,41
80		83,70±15,23	11,91±1,70	2,16±0,47
Ayuno-Alimento	80	104,64±15,23	9,15±1,82	2,56±0,26

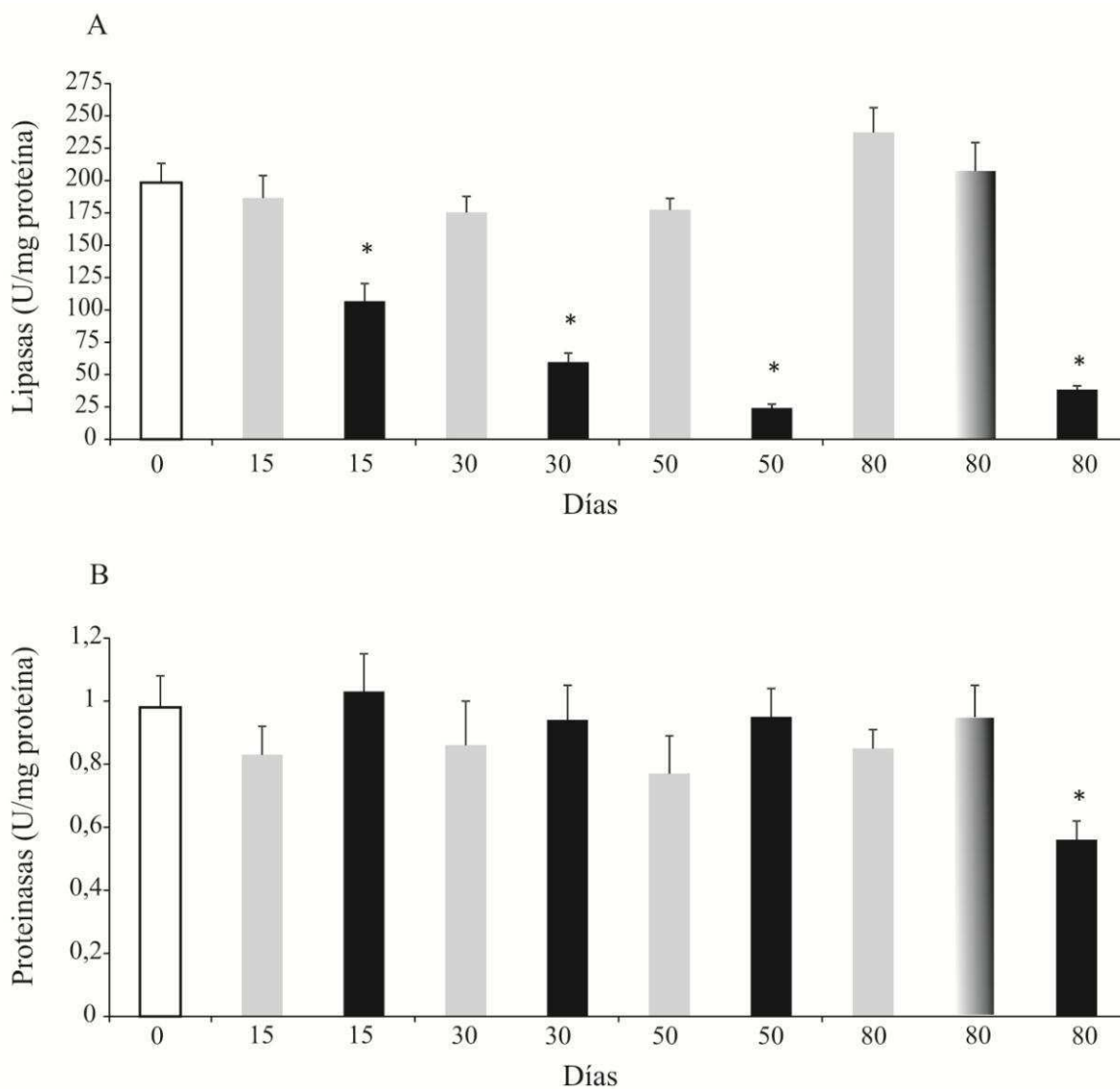


Figura 4.4. Actividad de lipasa y proteinasa en juveniles de *Cherax quadricarinatus* luego del ayuno prolongado y posterior alimentación. El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos a cada tiempo. Barra blanca: control inicial; barras grises: grupo alimento; barras negras: grupo ayuno y barra degradé: grupo ayuno-alimento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

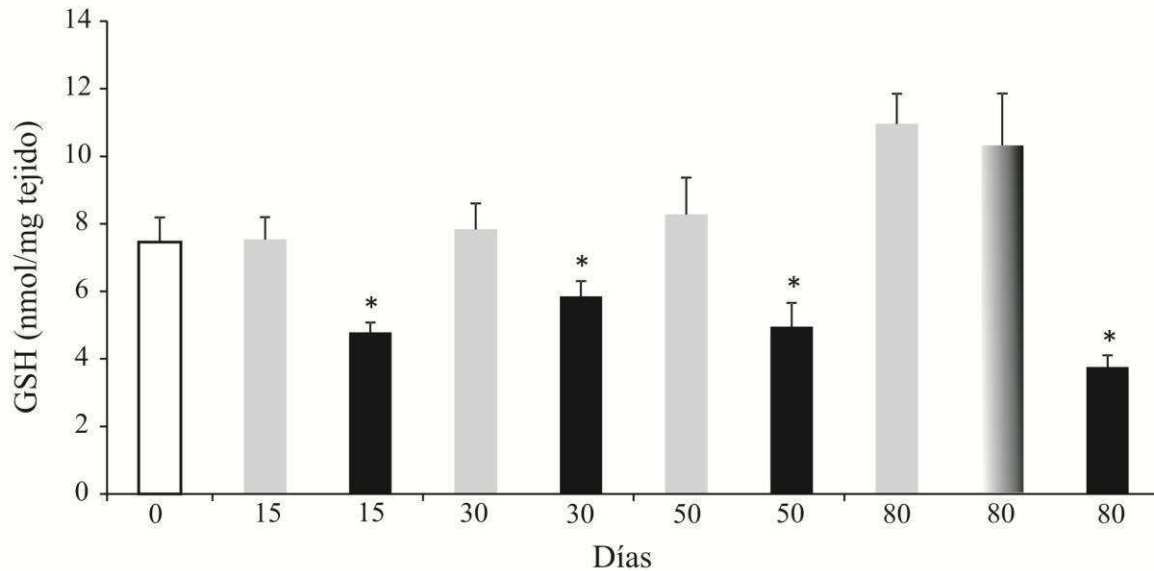


Figura 4.5. Niveles de glutatión reducido en juveniles de *Cherax quadricarinatus* luego del ayuno prolongado y posterior alimentación. El análisis estadístico se realizó entre los tratamientos a cada tiempo. Barra blanca: control inicial; barras grises: grupo alimento; barras negras: grupo ayuno y barra degradé: grupo ayuno-alimento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Las observaciones del análisis histológico de la glándula digestiva entre los tratamientos a los 80 días se muestran en la Figura 4.6 y 4.7. La estructura del hepatopáncreas de los animales alimentados estuvo preservada [Fig 4.6 y 4.7, (A, B)]. En cambio, luego 80 días de ayuno las principales alteraciones observadas fueron: la pérdida de estructuras y desorganización de los túbulos [Fig 4.6 y 4.7, (C, D)]; desorganización del tejido conectivo [Fig 4.6 y 4.7, (C, D)]; reducción de la altura del epitelio (Fig 4.7 D); hipertrofia de las células B con una o más vacuolas que tienden a coalescer en una vacuola más grande (Fig 4.7D); células R sin vacuolas [Fig 4.6 D, Fig 4.7 C]; escasa diferenciación entre las células B y R (Fig 4.7 C); pérdida de límites celulares (Fig 4.6 D); reducción en el número de células F por túbulo (Fig 4.6 D) y pérdida de la luz estrellada de la luz del túbulo [Fig 4.6 D, Fig 4.7, (C, D)]. Los animales AY-AL mostraron una importante recuperación [Fig 4.6y Fig 4.7, (E, F)] y las principales alteraciones fueron: desorganización parcial del tejido conectivo [Fig 4.6 (F), Fig 4.7 (E)]; hipertrofia de las células B [Fig 4.6 y 4.7 (F)]; células R con algunas vacuolas (Fig 4.7 E) y reducción en el número de células F por túbulo [Fig 4.6 (F), Fig 4.7 (E)].

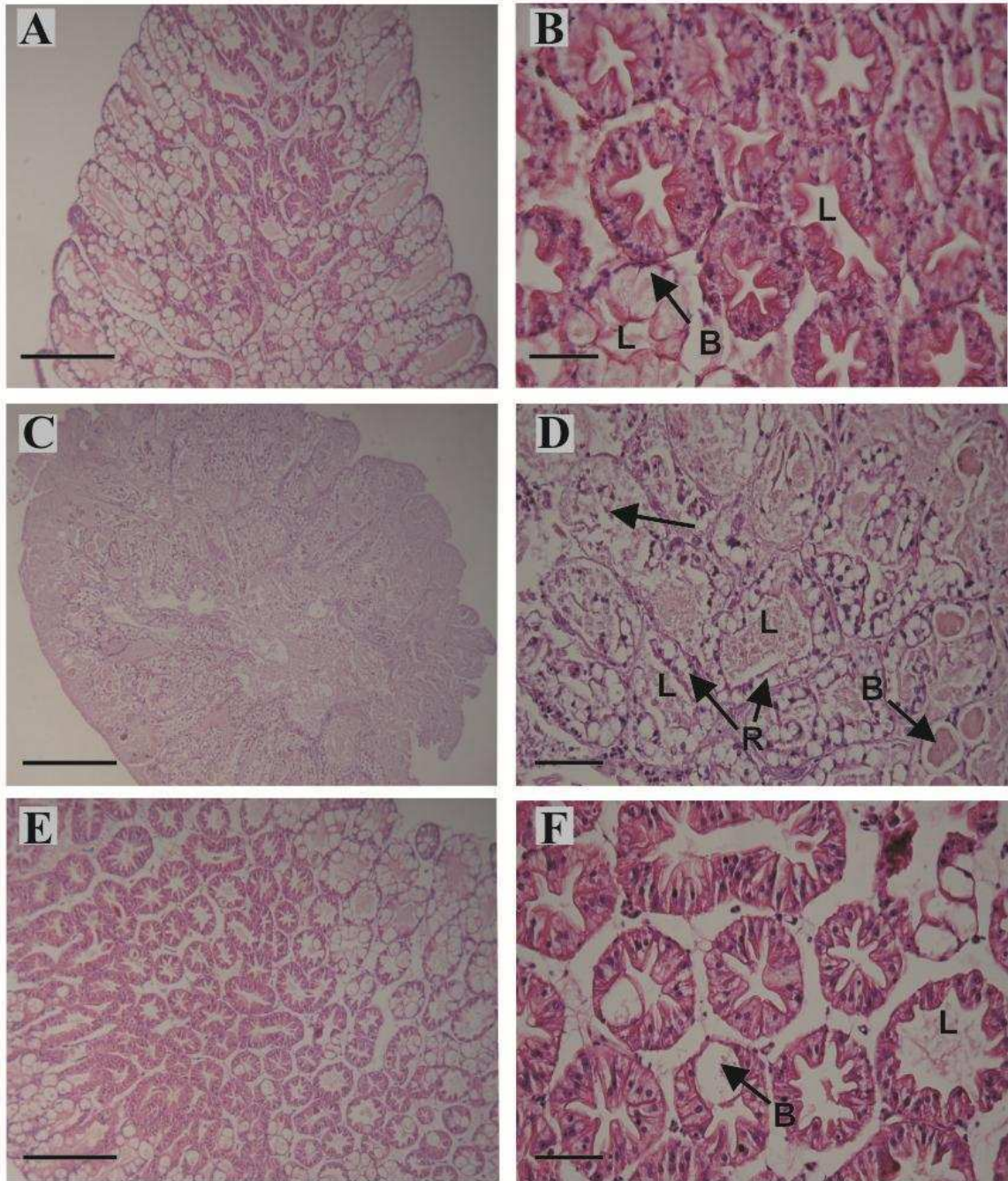


Figura 4.6. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles de *Cherax quadricarinatus* bajo alimentación continua (A, B), alteraciones luego del ayuno prolongado (C, D) y alteraciones luego del ayuno prolongado y posterior alimentación (E, F). (A, C, E): sección longitudinal de la porción apical de la glándula digestiva; (B, D, F): sección transversal de los túbulos. (C): pérdida de estructura y desorganización de los túbulos. (D): epitelio no diferenciado (flechas), desorganización del tejido conectivo, reducción de la altura del epitelio, hipertrofia de las células B, células R sin vacuolas y escasa diferenciación entre las células B y R, pérdida de límites celulares, disminución del número de células F por túbulo y pérdida de la típica luz estrellada del túbulo. (E, F): hipertrofia de las células B, células R con algunas vacuolas y disminución en el número de células F por túbulo. Barra de escala: (A, C, E) = 500  $\mu\text{m}$ , (B, D, F) = 100  $\mu\text{m}$ . B: célula B; L: lumen del túbulo; R: célula R.



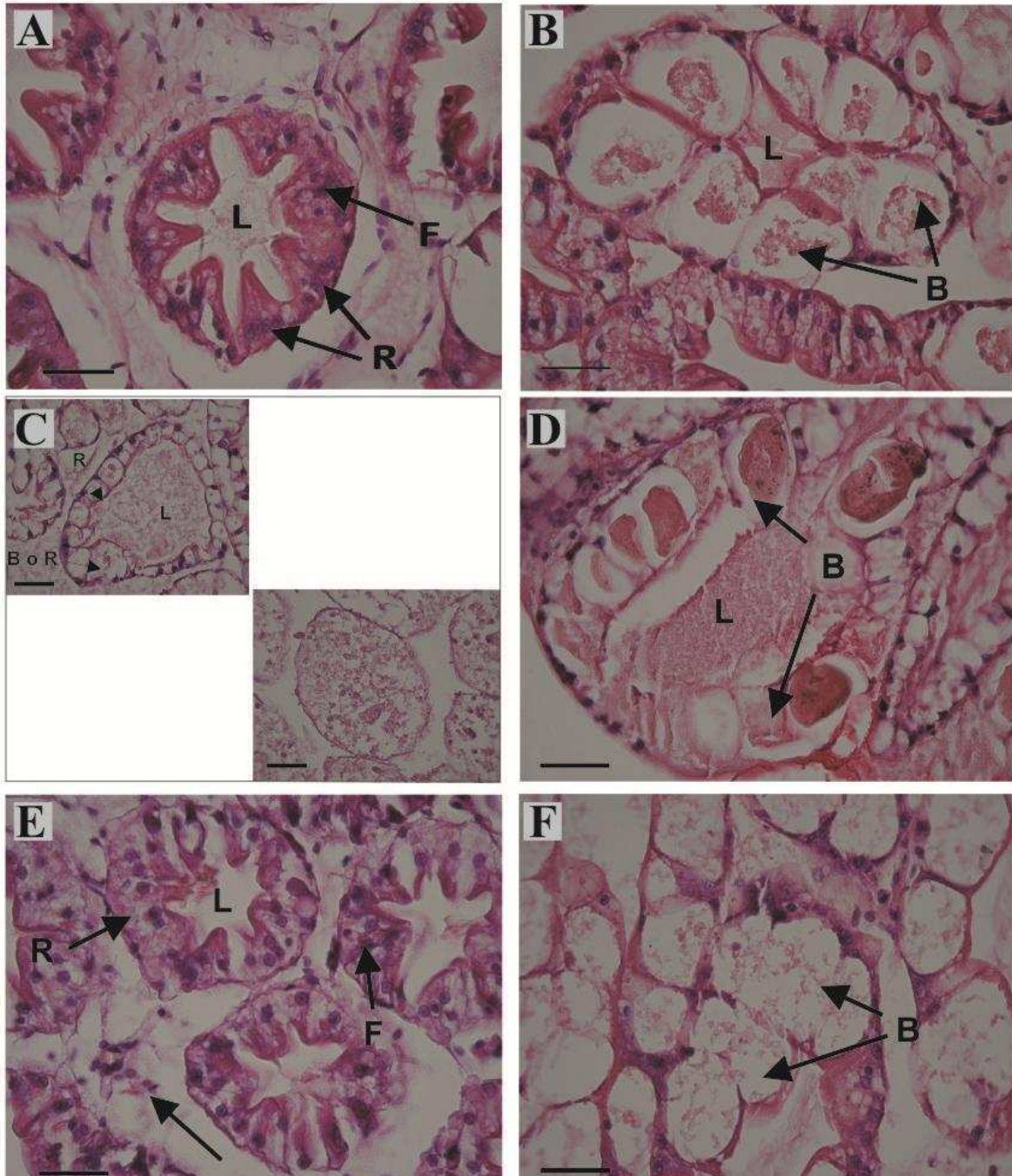


Figura 4.7. Detalle de secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles de *Cherax quadricarinatus* bajo alimentación continua (A, B), alteraciones luego del ayuno prolongado (C, D) y alteraciones luego del ayuno prolongado y posterior alimentación (E, F). (A-F): secciones transversales de los túbulos. (C): epitelio no diferenciado, células R sin vacuolas, escasa diferenciación entre las células B y R. (D): hipertrofia de las células B. (E): desorganización parcial del tejido conectivo (flechas), células R con algunas vacuolas y reducción en el número de células F por túbulo. (F): hipertrofia de las células B. Barra de escala: 50  $\mu$ m. B: célula B; L: lumen del túbulo; R: célula R.

## 4.5 Discusión

La glándula digestiva de *C. quadricarinatus* mostró claras respuestas frente al ayuno prolongado y recuperación en función de diferentes parámetros como el IHS, número de mudas, TCE, reservas energéticas, niveles de GSH, actividad de enzimas digestivas e histología.

La glándula digestiva presentó alteraciones severas por el ayuno, lo que se reflejó en el IHS que disminuyó en animales no alimentados desde los 15 días. Este resultado concuerda con otros estudios realizados en camarones, cangrejos y langostas de agua dulce (Cuzon *et al.* 1980, Barclay *et al.* 1983, Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002, Comoglio *et al.* 2004, 2008, Calvo *et al.* 2013). También se pudo observar que los animales alimentados por 30 días luego del ayuno, recuperaron completamente el peso de la glándula digestiva. Además, los estudios histológicos de los juveniles ayunados mostraron varios signos de alteraciones como pérdida de estructura y desorganización de los túbulos, junto con hipertrofia de las células B, células R sin vacuolas, escasa diferenciación entre las células B y R, pérdida de límites celulares, reducción del número de células F y pérdida de la luz estrellada de la luz del tubo. La mayoría de estas alteraciones han sido observadas en los trabajos de Calvo *et al.* 2011, 2012 en juveniles tempranos (primer estadio de vida libre, juvenil III de 20 mg) y avanzados (aproximadamente 1 g) de *C. quadricarinatus* bajo diferentes períodos de ayuno.

El ayuno prolongado inhibió el proceso de muda y la posterior alimentación demostró que este proceso se puede revertir, es decir, los animales no perdieron la capacidad de mudar. De esta manera, los juveniles de *C. quadricarinatus* pueden tolerar largos periodos de ayuno ahorrando la energía necesaria para mudar. La inhibición de la muda fue observada en otros trabajos realizados en camarones y langostas de agua dulce (Comoglio *et al.* 2004, Stuck *et al.* 1996, Pascual *et al.* 2006, Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002, Cuzon *et al.* 1980). En los crustáceos, el proceso de la muda es consecuencia del crecimiento y esto se vio reflejado en la falta de variación de la TCE de AY, lo que concuerda con estudios previos (Calvo *et al.* 2011, 2013). Observando la respuesta de los juveniles alimentados luego de 50 días de ayuno, éstos no recuperaron los valores de la TCE. Además, se observó en los animales ayunados una disminución de la actividad

locomotora y una coloración amarillenta del pleon (observación personal), lo que concuerda con Calvo *et al.* (2013) en juveniles de menor tamaño.

Como consecuencia del control hormonal del metabolismo y de las actividades que requieren energía como la muda, existe una relación entre el metabolismo, la regulación endócrina y el estado oxidativo a lo largo del ciclo de vida de los animales. La inhibición de la muda puede deberse a factores de estrés ambiental (como por ejemplo la hipoxia, salinidad y temperatura) y es regulada por la hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH, del inglés: crustacean hyperglycemic hormone). Además, la síntesis y degradación del glucógeno varía a través del ciclo de muda y es también regulada hormonalmente por la CHH (Fanjul-Moles y Gonsebatt 2012). Estos mismos autores sugieren que el incremento de los niveles de glucosa provocan un aumento en la producción de ROS, debido a un aumento en el flujo de equivalentes reductores (NADH, del inglés: reduced nicotinamide adenine dinucleotide) en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Nishikawa *et al.* 2000, Brownlee 2001). Considerando que la reducción de glucosa a sorbitol requiere del consumo de NADPH y que el NADPH es requerido para regenerar el glutatión reducido (GSH) a partir de la forma oxidada (GSSH), este consumo de NADPH puede exacerbar el estrés oxidativo intracelular. Por lo tanto, basado en la descripción metabólica anterior y los resultados obtenidos en este capítulo de tesis, se propone una posible modificación de los diagramas de regulación propuestos por Fanjul-Moles y Gonsebatt (2012) y Hermes-Lima (2004) durante una situación de estrés ambiental y producción de ROS que se resume en la Figura 4.8.

La restricción de alimento por tiempo prolongado (condición ambiental extremadamente estresante) podría estar causando un aumento en los niveles de la CHH, lo cual concuerda con los resultados observados en la inhibición de la muda. A los 15 días, como consecuencia de la acción de la CHH, los niveles de glucógeno disminuyen para obtener energía durante el ayuno. A su vez, también disminuyen los niveles de glucosa, por lo que la vía de reducción a sorbitol se inactiva y esto trae aparejado una reducción de los niveles de NADPH y GSH [la reacción del glutatión es catalizada por la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR)]. De acuerdo con esta vía de regulación, en los resultados se observó que los animales ayunados mostraron muy bajos niveles de GSH, respecto a los

juveniles alimentados durante todo el tiempo de experimentación, lo cual estaría avalando lo dicho anteriormente (Fig 4.8).

Por otro lado, Morales *et al.* (2004) trabajando en peces ayunados (*Dentex dentex*) por 5 semanas, demostraron que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cumple un papel fundamental para el mantenimiento del estado *redox* de la célula y en la modulación de las defensas antioxidantes a través de la generación de NADPH. Una menor disponibilidad de NADPH provocaría una reducción de la actividad de GR y por lo tanto, no se puede regenerar GSH a partir de GSSG. Esta reducción en la tasa de reutilización de GSH, junto con el agotamiento del resto de GSH endógeno ha sido observado durante la privación de alimento (Benuck *et al.* 1995, Papadopoulos *et al.* 1997, Robinson *et al.* 1997, Vendemiale *et al.* 2001, Pascual *et al.* 2003) y esto da lugar a un deterioro en el sistema de reciclaje de GSH (Morales *et al.* 2004). Esta vía de regulación actúa en respuesta a la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) a través de la actividad de la Catalasa y Glutación Peroxidasa (Gpx). Los resultados obtenidos sustentan la hipótesis de que esta vía de regulación no estaría actuando dado que la actividad de CAT fue similar entre los tratamientos, además de los bajos niveles de GSH (Fig 4.8). Este resultado concuerda con estudios previos que demostraron que el ayuno no induce cambios en la actividad de CAT en el hígado de la trucha arco iris (Hidalgo *et al.* 2002). Otro resultado del presente capítulo que avala la hipótesis de que las ROS no se generan durante un ayuno prolongado, es que no se observaron diferencias entre los tratamientos en los niveles de OP y TBARS. Resumiendo, el ayuno prolongado no causaría un aumento en la producción de glucosa (a través de CHH a partir de glucógeno) y ROS. Cuando los juveniles de *C. quadricarinatus* son alimentados luego de una restricción prolongada de alimento, recuperan los niveles de glucógeno y de GSH, por lo tanto se activa nuevamente la vía de reducción a sorbitol y las ROS no se generarían debido que no están en una situación de estrés.



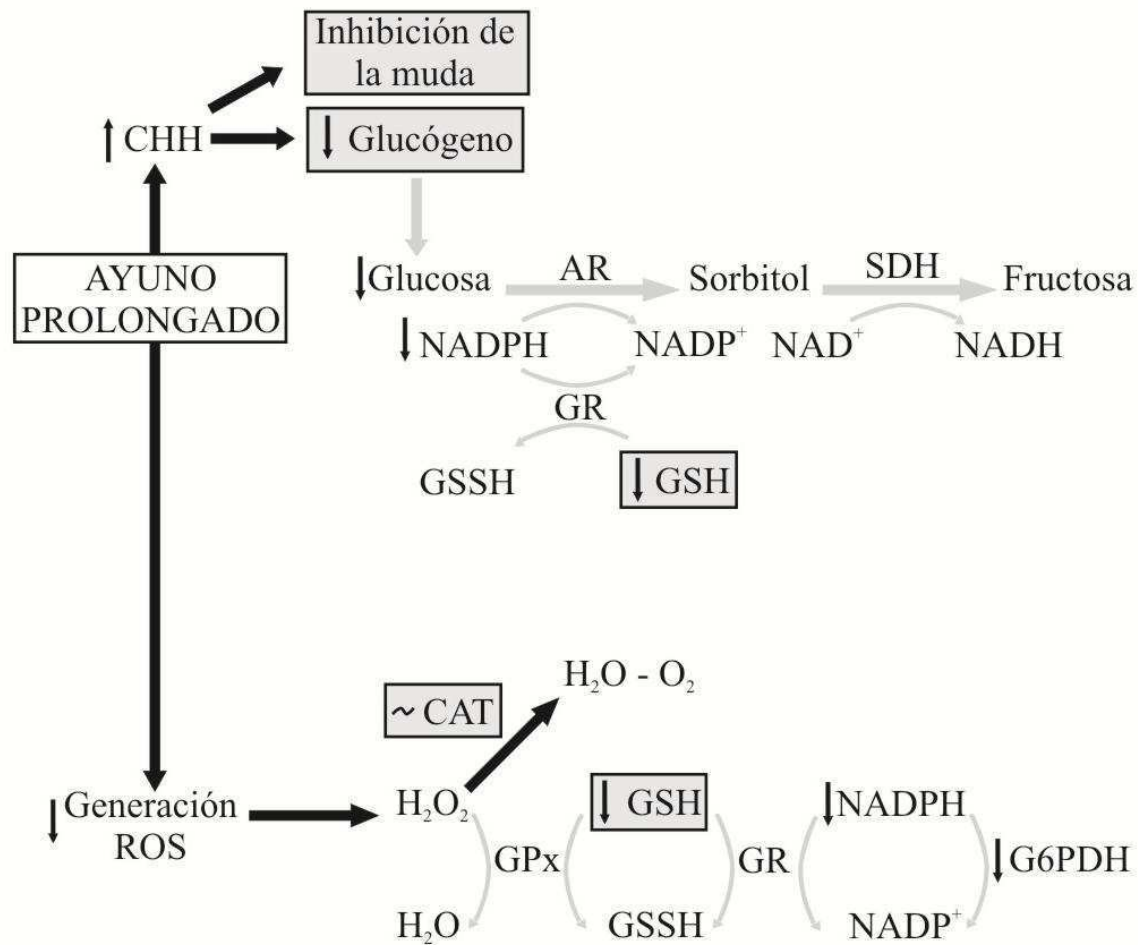


Figura 4.8. Ayuno prolongado y posible modificación en los diagramas de regulación propuestos por Fanjul-Moles y Gonsebatt (2012) y Hermes-Lima (2004) durante una situación de estrés ambiental y producción de ROS. Las flechas negras y grises indican vías activas e inactivas de regulación. Las cajas grises indican los parámetros cuantificados en el presente capítulo. AR: aldosa reductasa; CAT: Catalasa; CHH: hormona hiperglucemiante; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSSH: glutatión reducido; GSH: glutatión reducido; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; NADH: nicotinamida adenina dinucleotido reducido; NADPH: nicotinamida adenina fosfato dinucleotido reducido; ROS: especies reactivas del oxígeno; SDH: sorbitol deshidrogenasa.

Otro resultado que se observó a partir de este experimento es que las proteínas no son afectadas por el ayuno prolongado ni por la posterior alimentación. Esto estaría indicando que *C. quadricarinatus* no utilizaría la proteínas como principal fuente de energía aún durante el ayuno prolongado. Este resultado se contrapone con los realizados en camarones y cangrejos: *Hemigrapsus nudus* (Neiland y Scheer 1953), *Marsupenaeus japonicus* (Cuzon *et al.* 1980), *Penaeus esculentus* (Smith y Dall 1991), *Litopenaeus vannamei* (Comoglio *et al.* 2004) y *Lithodes santolla* (Comoglio *et al.* 2008), pues estas especies utilizan las proteínas como fuente principal de energía.

En este capítulo se ha demostrado que los niveles de glucógeno decrecen rápidamente en los animales ayunados y que son completamente restablecidos luego de una posterior alimentación de 30 días. Este resultado concuerda con los de Mendez y Wieser (1993) en juveniles del pez *Rutilus rutilus*. Se ha propuesto que la rápida recuperación de los niveles de glucógeno es una estrategia para almacenar energía rápidamente y puede ser utilizado posteriormente para la síntesis de tejidos (Calvo *et al.* 2013).

Con respecto a los lípidos de reserva, éstos fueron consumidos gradualmente a medida que aumentaban los días de ayuno y la posterior alimentación no fue suficiente para restablecer completamente los niveles. De acuerdo con los resultados obtenidos los juveniles de *C. quadricarinatus* durante una situación de ayuno prolongado, utilizan primero las reservas de glucógeno y lípidos, sin utilizar la energía proveniente de las proteínas. En *C. destructor*, Jones y Obst (2000) demostraron que los lípidos son movilizados luego de las reservas de proteínas e hidratos de carbono.

La actividad de proteinasas no se vio afectada por el ayuno hasta el día 50. A su vez, la actividad de proteinasas de los animales AY-AL tampoco se modificó. Hernández-Cortés *et al.* (1999b) demostraron en la langosta de agua dulce *Pacifastacus leniusculus*, la presencia de tripsinógeno en la glándula digestiva. Además, Sainz *et al.* (2004) estudiando la síntesis de tripsina y almacenamiento como zimógeno en animales ayunados de *Litopenaeus vannamei*, observaron que el tripsinógeno no es secretado totalmente de la célula y parece que se secreta parcialmente como resultado de la ingestión. Por lo tanto, la disminución significativa de la actividad de proteinasas a los 80 días pudo deberse a la

pérdida de estructura como se ha demostrado histológicamente en los animales privados de alimento.

En los juveniles de *C. quadricarinatus* ayunados la actividad de lipasa decreció a medida que el tiempo de restricción de alimento aumentaba. Este resultado concuerda con los estudios previos realizados en esta misma especie (Yudkovskiet *al.* 2007, Calvo *et al.* 2013, Sacristán *et al.* 2014 y capítulo 3 de la presente tesis). Considerando la actividad de lipasa digestiva de los animales alimentados como el 100% en cada tiempo ensayado, la actividad residual de los juveniles ayunados fue 57,27%, 33,98%, 13,65% y 16,14% a T15, T30, T50 y T80 respectivamente. Estos valores indican que la actividad de lipasa decrece aproximadamente a la mitad de su actividad cada 15 días de ayuno y entre los 50 y 80 días la actividad alcanzó los niveles basales. Otro interesante resultado es que en los animales ayunados y posteriormente alimentados, la actividad de lipasa digestiva se restablece a niveles similares al grupo control. Esta respuesta coincide con la hipótesis de la regulación de la actividad de lipasa propuesta en el capítulo 4 y Sacristán *et al.* (2014). En esta regulación se propuso que cuando no hay alimento por un tiempo prolongado, se estimula la síntesis *de novo* de la lipasa intracelular y como consecuencia, los lípidos almacenados como reservas energéticas son movilizados. La vía de síntesis de la lipasa digestiva se encuentra inhibida, encontrándose en los niveles basales de actividad. A su vez, se propuso que la detección de la presencia de alimento promueve la síntesis *de novo* de la lipasa digestiva. La detección de la presencia de alimento estaría inhibiendo la vía de síntesis de la lipasa intracelular y de ese modo, los lípidos no son utilizados como fuente de energía durante el ayuno. Además, los resultados en los niveles de lípidos de reserva registrados en este experimento concuerdan con dicha regulación.

El presente capítulo aporta información biológica nueva e importante sobre la respuesta fisiológica de la langosta de agua dulce durante un ayuno prolongado. Analizando conjuntamente todos los resultados, cuando la langosta de pinzas rojas *C. quadricarinatus* se encuentra en una situación de restricción de alimento prolongada, fisiológicamente responden “frenando” su crecimiento (no mudan y no se modifica la TCE), reduciendo el peso de la glándula digestiva (IHS) y presentando alteraciones estructurales. Utilizan el glucógeno y los lípidos de reserva como fuente de energía, reducen la actividad de lipasa

digestiva y los niveles de GSH, sin modificar los niveles de actividad de Catalasa, OP y TBARS. Por lo tanto, estos parámetros podrían ser utilizados como herramientas para analizar el estado nutricional de *C. quadricarinatus*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo, el ayuno provocó la disminución de las reservas energéticas de glucógeno y lípidos en los juveniles de *C. quadricarinatus*. Además, la posterior alimentación provocó que se restablezcan completamente las reservas de glucógeno pero parcialmente las de lípidos, por lo tanto, se rechaza parcialmente la primera hipótesis de trabajo. Por otro lado, la no alimentación no causó un incremento en el daño oxidativo (OP y TBARS) ni en la actividad de CAT en la glándula digestiva de la especie estudiada, por lo que se rechaza la segunda hipótesis de trabajo. Así mismo, el ayuno produjo la disminución de los niveles de GSH, mientras que la posterior alimentación restableció completamente dichos niveles de manera que la tercera hipótesis de trabajo no es rechazada.

La actividad de proteinasas no decreció paulatinamente a medida que el tiempo de ayuno se incrementaba. En cambio, sí se observó una disminución gradual en la actividad de lipasa durante el ayuno y un restablecimiento completo de dicha actividad en las langostas posteriormente alimentadas. Por lo tanto, se rechaza parcialmente la cuarta hipótesis de trabajo. Finalmente, el ayuno provocó alteraciones estructurales sobre la glándula digestiva de *C. quadricarinatus* y la posterior alimentación promovió la restructuración de este órgano. Por consiguiente, estos resultados apoyan la quinta hipótesis de trabajo.

# Discusión General

---

La acuicultura presenta ventajas significativas respecto de la pesca tradicional, ya que proviene de una producción totalmente controlada y continua, con trazabilidad desde su inicio, obteniendo productos de mayor calidad y además, se pueden realizar cosechas parciales o totales según la demanda existente en el mercado objeto. La producción acuícola provee la posibilidad de modificar los productos cultivados en beneficio de la salud humana dado que, se podrían modificar ciertos componentes (ej. ácidos grasos) de los alimentos suministrados a los animales durante su cultivo (Luchini y Panné Huidobro 2008).

En nuestro país, desde el Estado Nacional, se promueve el desarrollo de tecnologías tanto para especies autóctonas como exóticas existentes. El avance de la producción acuícola en Argentina desde 1992 en adelante, ha sido mayormente el resultado del propio esfuerzo de los productores, que contaron con el apoyo técnico necesario brindado desde el Estado Nacional y Provincial (Luchini y Panné Huidobro 2008). En particular, la mayor dificultad que enfrenta la industria de la langosta de pinzas rojas, *Cherax quadricarinatus*, es la falta de un volumen considerable de producción lo que imposibilita su exportación. También se ha sugerido que si se logra manipular genéticamente dicha especie, se podría mejorar la tasa de crecimiento, beneficiando la producción individual de cada productor y de esta manera, atraerá una mayor inversión debido al aumento en la rentabilidad (Jones and Ruscoe 2001). Aunque nuestro país pueda utilizar los resultados de las investigaciones que se realicen en otros países en el campo de la acuicultura, no siempre las mismas estarán disponibles desde el inicio y solamente la investigación y el desarrollo tecnológico propio logrará producir un avance en el sentido deseado y correcto (Luchini y Panné Huidobro 2008). Por lo tanto, el foco central de la presente tesis fue analizar que herramientas podrían ser las más apropiadas para conocer el estado nutricional de juveniles de *C. quadricarinatus* en etapa de engorde y avanzar sobre el conocimiento de su fisiología digestiva para optimizar su producción.

La presente tesis demostró que la dieta especialmente formulada por Gutiérrez y Rodríguez (2010) para esta especie, podría ser utilizada para su cultivo y reemplazar al alimento actualmente utilizado (Fundus<sup>®</sup>) en los criaderos de Argentina (Capítulo 1). Serán necesarias más investigaciones para intentar reducir los niveles de cenizas, que podrían ser los responsables de la baja digestibilidad hallada para la dieta formulada, como ya ha sido

observado para otros alimentos (Allan *et al.*, 2000, Pavasovic *et al.* 2007). Además, dado que la preparación del alimento peletizado se llevó a cabo manualmente en el laboratorio, se necesitaran más estudios sobre la tecnología necesaria para la fabricación del pellet a mayor escala. A su vez, relacionando los resultados del Capítulo 3 sobre la inclusión de harina de calamar en dicho alimento, este atrayente no debería ser tenido en cuenta para el diseño de alimentos específicos para *C. quadricarinatus*, sin embargo, no se descarta la posibilidad de evaluar otros atrayentes para la especie que pudieran mejorar la palatabilidad del alimento.

Es importante aclarar, que la evaluación de los alimentos fue llevada a cabo bajo condiciones de laboratorio, por lo que sería interesante evaluar el desempeño del alimento formulado en estanques, donde conjuntamente con la producción natural, podría favorecer aún más el crecimiento de los juveniles de la langosta de agua dulce.

Actualmente, en los estanques de cultivo de *C. quadricarinatus* del CENADAC, Provincia de Corrientes se utiliza la práctica de alimentación diaria y en horas de la tarde, distribuyendo el alimento en forma homogénea y manualmente por toda la superficie del estanque (Gustavo Wicki comunicación personal). Esto concuerda con lo sugerido en el Capítulo 2, en el cual en función a las respuestas fisiológicas enzimáticas, lo más conveniente sería alimentar por la tarde-noche. De esta forma, se optimiza el momento de alimentación de la langosta de pinzas rojas para disminuir los costos de producción y así también, evitar el desmejoramiento de la calidad de agua por la acumulación de alimento no ingerido.

Los estudios sobre la respuesta fisiológica de *C. quadricarinatus* frente a la disponibilidad de alimento luego de un ayuno corto o moderado y la exposición a condiciones de ayuno prolongadas y posterior alimentación, permitieron plantear una posible vía de regulación de la actividad de lipasa digestiva y una posible modificación de los diagramas de regulación durante una situación de estrés ambiental y producción de ROS. Ambas propuestas, generan un significativo avance en el conocimiento de la biología y la fisiología de *C. quadricarinatus* y deja la "puerta abierta" para plantear nuevos objetivos e hipótesis, para intentar comprender aspectos bioquímicos y fisiológicos de los requerimientos nutricionales de los crustáceos. Esto es especialmente interesante en este

modelo dado el alto grado de flexibilidad de su fisiología digestiva, como parte esencial de su habilidad para crecer, sobrevivir y reproducirse durante fluctuaciones de disponibilidad de alimento o ausencia completa del mismo (Rodríguez *et al.* 1994, Icely y Nott 1992, Sánchez-Paz *et al.* 2006).

Es importante destacar que el modelo de la regulación de lipasa digestiva propuesta en el Capítulo 3 también concuerda con los resultados de los niveles reserva de lípidos y la actividad de lipasa del Capítulo 4. De esta manera, existe otra evidencia que apoya la vía de regulación propuesta conjuntamente con los trabajos de Yudkovski *et al.* (2007). Por lo tanto, la inducción artificial del ayuno en crustáceos en estadio de intermuda, es probablemente un buen modelo para intentar comprender los cambios moleculares y enzimáticos que ocurren naturalmente durante su proceso de crecimiento, sin dejar de tener en cuenta los efectos hormonales (Sánchez-Paz *et al.* 2006). En esta línea del conocimiento es un aspecto fundamental el avanzar en el estudio de la expresión de los genes involucrados en la síntesis y secreción de las enzimas digestivas y su regulación asociada.

A partir de la exposición de juveniles de *C. quadricarinatus* frente a una situación de restricción de alimento moderada y prolongada, se demostró que animales de aproximadamente 6 gramos de peso (juveniles en etapa de engorde), poseen gran resistencia al ayuno (Capítulo 4). Trabajos previos realizados en el laboratorio (Stumpf *et al.* 2010, 2011, 2014 a, 2014b, Calvo *et al.* 2011, 2012) en juveniles tempranos (primer estadio de vida libre, juvenil III de aproximadamente 20 mg) y más avanzados (1 g) de esta misma especie, demostraron que presentan crecimiento compensatorio durante un régimen de alimentación intermitente y toleran periodos de ayuno prolongado (50 días). Esta es una importante adaptación para sobrevivir en ambientes fluctuantes y un atributo que podría ser utilizado para la producción de esta especie (Stumpf *et al.* 2011), ya que es posible reducir la cantidad de alimento ofrecido en un sistema de cultivo y de esta manera, reducir los costos de producción. Además, se debe considerar que en un sistema de cultivo la producción natural del estanque puede aportar otra fuente de alimento, que en el caso de los experimentos realizados bajo condiciones de laboratorio no es posible evaluar ni mantener. Por lo tanto, si no se realiza una alimentación diaria del cultivo, no significa que los animales estén en condiciones de ayuno estricto. En relación a esta temática, personal del



CENADAC argumentó que los estanques de cultivo poseen abundante alimento natural (referido a la producción natural del estanque) y no han registrado diferencias en el crecimiento utilizando un protocolo de alimentación cada dos días. Por lo tanto, resulta sumamente importante la interacción entre las investigaciones y los productores nacionales para avanzar en forma conjunta hacia una acuicultura sustentable y rentable.

Finalmente, en función de las variadas herramientas y parámetros evaluados a lo largo de los diferentes capítulos, se ha demostrado que la actividad de las enzimas digestivas, en particular de lipasas y proteinasas, digestibilidad *in vitro* de proteínas, niveles de reserva energética, niveles de GSH, número de mudas y análisis histológico, pueden ser utilizados como herramientas integradoras para evaluar el estado nutricional de *C. quadricarinatus*. Además, los resultados y conocimientos de la presente tesis, son de gran utilidad para la reducción de los costos operativos del cultivo de esta especie de interés comercial, ya que se podría usar un alimento especie-específico con ingredientes locales (menor costo), sin la necesidad de suplementar con harina de calamar como attractante al alimento, e incorporando la práctica de alimentación habitual hacia la tarde-noche. Asimismo, demostrada la robustez de la especie para soportar condiciones de ayuno moderadas y prolongadas, no sería necesaria la alimentación diaria.

# **Conclusiones Generales**

---

La langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*, presenta numerosas características biológicas y comerciales que la convierten en una especie apropiada para la acuicultura. Sin embargo, el crecimiento productivo ha sido poco significativo en la Argentina debido a diferentes motivos ya mencionados en los capítulos precedentes. Por lo tanto, la presente tesis abordó el estudio de diferentes factores que impactan directamente sobre la producción de esta especie, y de esa manera, pueden contribuir al mejoramiento de la actividad económica de nuestro país a través de la transferencia del conocimiento científico a la producción acuícola.

Los experimentos que se llevaron a cabo para cumplir con los objetivos planteados evidenciaron resultados que aportan nuevos conocimientos sobre el cultivo y la fisiología, lo que contribuye a ampliar la información disponible sobre la biología de *C. quadricarinatus*. Particularmente, se demostró lo siguiente:

A) Los animales alimentados con el alimento formulado a base de harina de pescado (fuentes proteicas: harina de pescado y harina de soja; fuente lipídica: aceite de soja) presentaron una buena condición fisiológica en función de la actividad enzimática digestiva y una estructura tisular conservada de la glándula digestiva. Sin embargo, esta dieta, especialmente formulada para la especie en estudio, presentó baja digestibilidad *in vitro* de proteínas, por lo que sería beneficioso disminuir el contenido de cenizas para aumentar la digestibilidad de este alimento. A su vez, no es conveniente utilizar la dieta comercial con alto contenido lipídico (Fundus<sup>®</sup>), debido a las numerosas alteraciones estructurales que causa sobre la glándula digestiva. Esta información contribuye directamente sobre la producción de *C. quadricarinatus*, dado que se podría reemplazar el alimento comercial Fundus<sup>®</sup> por el alimento formulado con ingredientes locales y de esta manera, se reducirían los costos de alimentación y los efectos adversos sobre la fisiología digestiva de esta especie. Es importante aclarar, que la evaluación de los alimentos fue llevada a cabo en condiciones de laboratorio y por lo tanto, sería importante evaluar el desempeño de este alimento formulado en estanques, donde conjuntamente con la producción natural, podría favorecer aún más el crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus*. De esta manera, se podría demostrar si el alimento formulado puede ser utilizado a gran escala.

B) La actividad de las enzimas digestivas de los juveniles no mostró un ritmo diario con picos de secreción. Sin embargo, el momento de alimentación (matutino o vespertino) afectó la actividad de las enzimas digestivas y el ayuno provocó modificaciones en el patrón diario de las enzimas digestivas y niveles de proteína soluble. A partir de estos resultados y, en particular, los resultados de la actividad de proteinasas y lipasas (ver discusión Capítulo 3), lo más conveniente sería optar por una alimentación por la tarde-noche para optimizar la utilización de alimentos, lo que es fundamental para la viabilidad del cultivo de *C. quadricarinatus*.

C) La harina de calamar no funcionó como attractante para *C. quadricarinatus* y por lo tanto, no sería necesaria su inclusión en la formulación de alimentos al menos en las concentraciones evaluadas en este estudio.

La disponibilidad de alimento luego de un período de ayuno corto no causó modificaciones en la actividad de las enzimas digestivas. Por el contrario, dicha actividad se vio alterada por la disponibilidad de alimento cuando los animales fueron expuestos previamente a un ayuno moderado. En base estos resultados y a los estudios de Yudkovski *et al.* (2007), Calvo *et al.* (2013) y Rivera-Pérez y García-Carreño (2011), se propuso una posible vía de regulación de la actividad de la lipasa digestiva y, de esta manera, queda abierta la posibilidad de plantear nuevas hipótesis y objetivos para estudios futuros.

D) Cuando la langosta de pinzas rojas *C. quadricarinatus* se encuentra en una situación de restricción prolongada de alimento, fisiológicamente responde disminuyendo su tasa de crecimiento (no mudan y no se modifica la TCE); disminuyendo el peso de la glándula digestiva (IHS) y presentado alteraciones estructurales; utilizan el glucógeno y los lípidos de reserva como fuente de energía; reducen la actividad de lipasa digestiva y los niveles de GSH, sin modificar los niveles de actividad de catalasa, OP y TBARS. A partir de estos resultados y de los diagramas de regulación propuestos por Fanjul-Moles y Gonsebatt (2012) y Hermes-Lima (2004), se planteó una posible modificación de dichos diagramas durante una situación de estrés ambiental (ayuno prolongado) y producción de ROS. De esta manera, del mismo modo que en el punto anterior, se ha avanzado en el conocimiento sobre la biología, fisiología y el cultivo de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

## REFERENCIAS

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Meths. Enzymol.* 105, 121-126.
- Allan G., Parkinson S., Booth M., Stone D., Rowland S., Frances J. y Warner-Smith R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186, 293-310.
- Alder-Nissen J. 1979. Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agricult. Food Chem.* 27, 1256-1266.
- Almeida E., Dias Bairy A., Dafre A., Gomes O., Medeiros, M. y Di Mascio P. 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21-30.
- Al-Mohanna S. y Nott J. 1987. M-~~m~~idget" cells and the moult cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 67, 803-13.
- Amaya E., Davis D. y Rouse D. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* 262, 393-401.
- Ameyaw-Akumfi C. y Hazlett B. 1975. Sex recognition in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Science* 190, 1225-1226.
- Ansaldo M., Sacristán H. y Wider E. 2007. Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 118-123.
- Anson K. y Rouse D. 1996. Evaluation of several commercial feeds and a crustacean reference diet for juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *J. Appl. Aquacult.* 6, 65-76.
- Álvarez N., Avigliano L., Mac Loughlin C. y Rodríguez E. 2015. Atrazine impairs reproduction in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Reg. Studies Mar. Science*. En prensa.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist) (1990) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Inc, Arlington, Virginia 69.
- Arredondo-Figueroa J., Ponce-Palafoz J., Shirai-Matsumoto K., Pérez-Zavaleta A., Barriga-Sosa I. y Luna A. 2012. Effects of including shrimp protein hydrolysate in practical diets on the growth and survival of redclaw crayfish hatchlings *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868). *Aquaculture Res.* 44, 966-973.
- Barber S. 1961. Chemoreception and thermoreception. En: *The Physiology of the Crustacea* (ed. Waterman T.), vol. II, pp 109-131. *Sense Organs, Integration and Behavior*. Academic Press, New York.

- Barclay M., Dall W. y Smith D. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68, 229-244.
- Bautista M. 1983. The response of *Penaeus monodon* juvenile to varying protein/energy ratios in test diets. Aquaculture 53, 229-242.
- Benuck M., Banay-Schwartz M., DeGuzman T. y Lajtha A. 1995. Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats. Brain Res. 678, 259-264.
- Biesiot P. y Capuzzo J. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 136, 107-122.
- Boghren A. y Ceccaldi H. 1987. Cycle Circadien des Amines Libres et des Proteines de l'Hemolymph chez *Cancer pagurus*. Biochem. Syst. Ecol. 15, 479-486.
- Boyd C. y Tucker C. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers Group, Norwell, Massachusetts 02061. pp 700.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-253.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414, 813-820.
- Buarque D., Castro F., Santos S., Lemos D., Carvalho Júnior L. y Bezerra R. 2009. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquacult. Res. 40, 861-870.
- Buege J. y Aust S. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302-309.
- Bugnot A. y López Greco L. 2009a. Sperm production in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Aquaculture 295, 292-299.
- Bugnot A. y López Greco L. 2009b. Structural alterations in the male reproductive system of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). J. Invertebr. Pathol. 102, 160-166.
- Cabanillas H. 1996. Estudio de la digestibilidad de la harina de soja en dietas prácticas a diferentes temperaturas y salinidades en el camarón blanco, *Penaeus vannamei*, BOONE, 1931. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.-Unidad Mazatlán, Sinaloa, México.
- Calvo N., Stumpf L., Pietrokovsky S. y López Greco L. 2011. Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture 319, 355-362.

- Calvo N., Tropea C., Anger K. y López Greco L. 2012. Starvation resistance in juvenile freshwater crayfish. *Aquat. Biol.* 16, 287-297.
- Calvo N., Stumpf L., Sacristán H. y López Greco L. 2013. Energetic reserves and digestive enzyme activities in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* nearby the point-of-no-return. *Aquaculture* 416-417, 85-91.
- Campaña-Torres A., Martínez-Córdova L., Villarreal-Colmenares H. y 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.
- Capuzzo J. 1981. Crustacean Bionergetics: The role of environmental variables and dietary levels of macronutrients on energetic efficiencies. En: Second international conference on aquaculture nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Special publication 2, 71-86.
- Carrillo O. 1997. Regulación de la digestión en camarones. En: 2<sup>do</sup> Taller La Bioquímica en la Biotecnología Marina. 10 al 13 diciembre. La Habana. Cuba.
- Carrillo O. y Gonzalez R., 1998. Control de la Digestión en camarones. Manuscrito del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15 al 18 noviembre. La Paz, Baja California Sur, México. I Parte.
- Carrillo-Farnés O., Zaldívar C. y Rosas C. 2006. Marcadores de situación nutricional y de salud. Cap. 1: Digestión, absorción y utilización de nutrientes. En: Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (eds. Rosas C., Carrillo O., Wilson R. y Andreatta E.), pp 107-126. México.
- Carrillo-Farnés O., Forrellat-Barrios A., Guerrero-Galván S. y Vega-Villasante F. 2006. A review of digestive enzyme activity in Penaeid shrimps. *Crustaceana* 80, 257-275.
- Casillas-Hernández R., Magallón-Barajas F., Portillo Clark G. y Páez-Osuna F. 2006. Nutrient mass balances in semiintensive shrimp ponds from Sonora, México using two feeding strategies: Trays and mechanical dispersal. *Aquaculture* 258, 289-298.
- Ceccaldi H. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. *Crustacean Nutrition*. En: *Crustacean nutrition: Advances in World Aquaculture* (eds. D'Abramo L., Conklin D., Akiyama D.), vol. 6, pp 261-291. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Celis-Guerrero L. 2003. Caracterización de proteasas en el sistema digestivo de la langosta roja (*Panulirus interruptus*). Programa de estudios de posgrado. Tesis de Maestría, pp 68. La Paz, B.C.S.
- Celis-Guerrero L., García-Carreño F. y Navarrete Del Toro M. 2004. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). *Mar. Biotechnol.* 6(3), 262-269.
- Chamberlain G. 1988. Rethinking shrimp ponds management. *Coastal Aquaculture* 5, 19.

- Chance B., 1954. Special methods: Catalase. En: Methods of Biochemical Analysis (ed. Glick R.). New York: Wiley-Interscience, pp 408-424.
- Chaulet A., Medesani, D., Freitas J., Cervino A., Cervino N., Rodríguez E. 2012. Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae) by ecdysone and insulin growth factor. *Aquaculture* 370-371, 1-6.
- Clifford H., y Brick R. 1983. Nutritional physiology of the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* (De Man): I. Substrate metabolism in fasting juvenile shrimp. *Comp. Biochem. Physiol. A* 74, 561-568.
- Coccia E., Varricchio E. y Paolucci M. 2011. Digestive enzymes in the crayfish *Cherax albidus*: Polymorphism and partial characterization. *Int. J. Zoo. art. no.* 310371.
- Comoglio L., Gaxiola G., Roque A., Cuzon G. y Amin O. 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Shellfish Res.* 23, 243-249.
- Comoglio L., Goldsmit J. y Amin O. 2008. Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 43, 345-353.
- Cortés-Jacinto E. 1998. Frecuencia y distribución alimenticia en el cultivo intensivo de juveniles del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias, pp 96. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Cortés-Jacinto E., Villarreal-Colmenares H., Civera-Cerecedo R. y Martínez-Córdova L. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquacult. Nutr.* 9, 207-213.
- Cortés-Jacinto E., Villarreal-Colmenares H., Civera-Cerecedo R. y Naranjo-Páramo, J. 2004. Effect of dietary protein level on the growth and survival of pre-adult freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) in monosex culture. *Aquacult. Res.* 35, 71-79.
- Cortés-Jacinto E., Villarreal-Colmenares H., Cruz-Suárez L.E., Civera-Cerecedo R., Nolasco-Soria H. y Hernandez-Llamas A. 2005. Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquacult. Nutr.* 11, 283-291.
- Cortés-Jacinto E., Campa-Córdova A., Ascencio F., Villarreal-Colmenares H. y Holguín-Pena R. 2009. The effect of protein and energy levels in diet on the antioxidant activity of juvenile redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868). *Hidrobiologica*, 19, 77-83.
- Crawford C., Richardson N. y Mather P. 2005. A comparative study of cellulase and xylanase activity in freshwater crayfish and marine prawns. *Aquacult. Res.* 36, 586-592.



- Cruz-Suarez E., Ricque-Marie D., Pinal-Mansilla J. y Wesche-Ebelling P. 1994. Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture* 123, 349-360.
- Curtis M. y Jones C. 1995. Observations of monosex culture of redclaw *Cherax quadricarinatus* von Martens (Decapoda: Parastacidae) in earthen ponds. *J. World Aquac. Soc.* 26, 154-159.
- Cuzon G., Cahu C., Aldrin J., Messenger J., Stephan G. y Mevel M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proc. World Maric. Soc.* 11, 410-423.
- D'Agaro E., Lanari D. y Massimo M. 2001. Effects of stocking rate and dietary protein content on growth performance of redclaw (*Cherax quadricarinatus*). *Freshwater Crayfish* 13, 80-87.
- Dall W., Smith Q. y Moore L. 1991. Biochemical composition of some prey species of *Penaeus esculentus* Haswell (Penaidea: Decapoda). *Aquaculture* 96, 151-166.
- Dall W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. En: *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop* (eds. Allan G. y Dall W.), pp 57-63. Australia.
- Díaz A. 2001. Estudio sobre la fisiología de la muda y la maduración gonadal del langostino *Pleoticus muelleri* Bate. Tesis Doctoral, pp 171. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Díaz A., Sousa, L. y Petriella A. 2010. Functional Cytology of the Hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) Under Osmotic Stress. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 53, 599-608.
- Díaz C., Fernández Gimenez A. y Fenucci J. 1999. Evaluación del extracto proteico de calamar en la nutrición del langostino argentino *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea). *Mem. Acuicult.* 99, 184-192.
- Díaz F., Escalante G., Re A. y Sierra E. 2006. Fisiología energética de *Cherax quadricarinatus* alimentado con dos dietas, expuesto a un régimen constante y fluctuante de temperatura. *Hidrobiologica* 16, 35-44.
- Díaz-Granda A. 1997. Horarios de alimentación del camarón *Penaeus schmitti* en condiciones de cultivo semi-intensivo. Tesis de Maestría, pp 120. Centro de Investigaciones Marinas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
- Divakaran S., Forster I. y Velasco M. 2004. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of in vitro protein digestibility. *Aquaculture* 239, 323-329.
- Divakaran S., Velasco M., Beyer E., Forster I. y Tacon A. 2000. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. En: *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (eds. Cruz-Suárez L., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M.,

- Olvera-Novoa M. y Civera-Cerecedo R.), pp 19-22. Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Dunham D. y Oh J. 1992. Chemical sex discrimination in the crayfish, *Procambarus clarkii*: role of antennules. J. Chem. Ecol. 18, 2363-2372.
- Erlanger B., Kokowsky N. y Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95, 271-279.
- Fagan J., Slecicka B. y Sohar I. 1999. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31, 751-757.
- Fanjul-Moles M. y Gonsebatt M. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Systems in Crustacean Life Cycles. En: Oxidative stress in aquatic ecosystems (eds. Abele, D., Vázquez-Medina, J.P. y Zenteno-Savín, T.), pp 208-223, First ed. Blackwell Publishing, Oxford.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008. The state of World Fisheries and Aquaculture. Disponible en [www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm](http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2010. The state of World Fisheries and Aquaculture. Disponible en [www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf](http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf).
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. The state of World Fisheries and Aquaculture. Disponible en [www.fao.org/3/a-i3720e/index.html](http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html)
- Fenucci J., Zein-Eldin Z. y Lawrence A. 1980. The nutritional response of two penaeid species to various levels of squid meal in a prepared feed. Proc. World Maricul. Soc. 11, 403-409.
- Fenucci J. 2008. Método utilizado por la Universidad Nacional de Mar del Plata para la medición de digestibilidad *in vivo* en camarón. En: Manual de metodologías de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para ingredientes y dietas para camarón (eds. Cruz Suárez, E., Villarreal Colmenares, H., Tapia Salazar, M., Nieto López, M., Villarreal Cavazos, D.A. y Ricque Marie, D.), pp 18-34. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty., N.L., México. ISBN: 978-607-433-020-5.
- Fernandez C. 1995. Chemoreception studies in relation to feeding responses in the marine shrimps *Penaeus indicus* H. Milne Edwards and *Metapenaeus dobsoni* Miers. PhD thesis, pp 281. Cochín University of Science and Technology.
- Fernández Gimenez A., Díaz A., Velurtas S., Petriella A. y Fenucci J. 2008. Effects of different dietary vitamin A levels in the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda, Solenoceridae). Rev. Biol. Mar. Oceano. 43(3), 483-490.

- Fernández Gimenez A., Díaz A., Velurtas S. y Fenucci J. 2009. Partial substitution of fishmeal by meat and bone meal, soybean meal, and squid concentrate in feeds for the prawn, *Artemesia longinaris*: Effect on digestive proteinases. *Isr. J. of Aquacult. Bamidgeh* 61(1), 48-56.
- Fernández Gimenez A., García-Carreño F., Navarrete del Toro M. y Fenucci J. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comp. Biochem. Phys. B* 130, 331-338.
- Fernández Gimenez A., García-Carreño F., Navarrete del Toro M. y Fenucci J. 2002. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae): partial characterization and relationship with molting. *Comp. Biochem. Phys. B* 132, 593-598.
- Figueiredo M., Kricker J. y Anderson A. 2001. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *J. Crust. Biol.* 21, 334-344.
- Figueiredo M. y Anderson A. 2003. Ontogenetic changes in digestive proteases and carbohydrases from the Australian freshwater crayfish, redclaw *Cherax quadricarinatus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Aquacult. Res.* 34, 1235-1239.
- Folch J., Lees M. y Stanley G. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Forrellat A, 1998. El hepatopáncreas de camarón: Fuente de enzimas digestivas para la camaronicultura. Tesis doctoral. Universidad de La Habana.
- Forrellat A. y Gaxiola G. 2006. Enzimas digestivas y control de la digestión. En: Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (eds. Rosas C., Carrillo O., Wilson R. y Andreatta E.), pp 27-60. México.
- Frias-Espericueta M., Abad-Rosales S., Nevárez-Velázquez A., Osuna-López I., Páez-Osuna F., Lozano-Olvera F. y Voltolina D. 2008. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquat. Toxicol.* 89, 152-157.
- Frings C. y Dunn R., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *Am. J. Clin. Pathol.* 53, 89-91.
- Gamboa-Delgado J., Molina-Poveda C. y Cahu C. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Res.* 34, 1403-1411.
- García-Carreño F. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of fed on their composition. *Comp. Biochem. Phys. B* 103, 575-578.

- García-Carreño F. y Haard N. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17, 97-113.
- García-Carreño F., Dimes N. y Haard N. 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65-69.
- García-Carreño F., Hernández Cortes M. y Haard N. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive system of a freshwater and a marine decapod. *J. Agr. Food Chem.* 42, 145-146.
- García-Carreño F. y Navarrete del Toro M. 1997. Clasificación de proteasas sin lágrimas. *Biochemical Education* 25(3), 161-168.
- García-Ulloa G., López-Chavarín H., Rodríguez-González H. y Villarreal-Colmenares H. 2003. Growth of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868) (Decapoda: Parastacidae) juveniles fed isoproteic diets with partial or total substitution of fish meal by soya bean meal: preliminary study. *Aquacult. Nutr.* 9, 25-31.
- Ghanawi J. y Saoud P. 2012. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquaculture* 358-359, 83-195.
- Gibson O. y Barker P. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 17, 285-346.
- González R., Gómez M. y Carrillo O. 1995. Variaciones cronobiológicas en la actividad de las principales enzimas proteolíticas en *Penaeus schmittii* y *Penaeus notialis*. *Rev. Invest. Mar.* 16(3), 177-183.
- González R. 1998. Variación de la actividad proteolítica y amilolítica en el hepatopáncreas de *P. schmittii*: ontogenia y efecto de algunos factores externos. Tesis Doctoral, pp 100. Universidad de La Habana.
- Gonzalez-Pena M., Anderson A., Smith D. y Moreira G. 2002. Effect of dietary cellulose on digestion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 211, 291-303.
- Gutiérrez M. y Rodríguez E. 2010. Effect of protein source on growth of early juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Freshwater Crayfish* 17, 23-29.
- Halliwell B. y Gutteridge J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Four Ed. Oxford University Press, New York, pp 888.
- Harpaz S., Kahan D., Galun R. y Moore I. 1987. Responses of fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*, to chemical attractants. *J. Chem. Ecol.* 13, 1957-1965.

- Hazlett B. 1989. Additional sources of disturbance pheromone affecting the crayfish *Orconectes virilis*. J. Chem. Ecol. 15, 381-385.
- Hazlett B., Rubenstein D. y Rittschof D. 1975. Starvation, energy reserves, and aggression in the crayfish *Orconectes virilis* (Hagen 1870) (Decapoda, Cambaridae). Crustaceana 28, 11-16.
- Heinen J. 1980. Chemoreception in decapod crustacea and chemical feeding stimulants as potential feed additives. Proc. World Maricul. Soc. 11, 319-334.
- Hermes-Lima M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. En: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation (ed. Storey K.), pp 319-368. John Wiley & Sons.
- Hernández-Cortés P., Cerenius L., García-Carreño F. y Soderhall K. 1999b. Trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas: purification and cDNA cloning of the synthesized zymogen. Biol. Chem. 380, 499-501.
- Hernández-Cortés P., Quadros-Seiffert W., Navarrete del Toro M., Portillo G., Colado G. y García-Carreño F. 1998. Time series in food ingestion and proteolytic activity of digestive system of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. Resúmenes del IV Simposium de Nutrición Acuícola, 15 al 18 noviembre 1998, La Paz, Baja California Sur, México. II Parte.
- Hernández-Cortés M., Quadros W., Navarrete A., Portillo G., Colado G. y García-Carreño F. 1999a. Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system during continuous feeding of juveniles shrimps. J. Appl. Aquacult. 9, 35-45.
- Hernández M., Rouse D. y Olvera-Novoa M. 2001. Effect of dietary protein-lipid ratios on survival and growth of Australian crayfish (*Cherax quadricarinatus*) hatchlings and juveniles. Freshwater Crayfish 13, 97-106.
- Hidalgo M., Expósito A., Palma J. y de la Higuera M. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 183-193.
- Hindley J. 1975. The detection, location and recognition of food by juvenile banana prawns, *Penaeus merguensis* de man. Mar. Behav. Physiol. 3, 193-210.
- Hirsch G. y Jacob W. 1929. Der arbeitorrhythmus der mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. Zeitsch. F. Vergl. Physiol. 8, 102-144.
- Icely J. y Nott J. 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. En: Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod, Crustacea (eds. Harrison, F.W. y Humes, A.G.), vol 10, pp 147-201. Wiley-Liss, New York.
- Jaime-Ceballos B., Civera Cerecedo R., Villarreal H., Galindo López J. y Pérez-Jar L. 2007. Use of *Spirulina platensis* meal as feed attractant in diets for shrimp *Litopenaeus schmitti*. Hidrobiológica 17, 113-117.

- Johnston D., Calvert K., Crear C. y Carter C. 2003. Dietary carbohydrate/lipid ratios and nutritional condition in juvenile southern rock lobster *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* 220, 667-682.
- Jones C. 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. 1995b. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae) II. Juvenile nutrition and habitat. *Aquaculture* 138, 239-245.
- Jones C. 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries, Queensland, pp 109.
- Jones C., McPhee C. y Ruscoe I. 2000. A review of genetic improvement in growth rate in redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture Res.* 31, 61-67.
- Jones C. y Ruscoe M. 1996a. Evaluation of six diets fed to redclaw, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae), under laboratory conditions. En: Production technology for Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*), pp 20-31. Final Report FRDC Project 92/119. Fisheries Research and Development, Canberra.
- Jones C. y Ruscoe M. 1996b. Evaluation of six diets fed to redclaw, *Cherax quadricarinatus* (von Martens), (Decapoda: Parastacidae) held in pond enclosures. En: Production technology for Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*), pp 8-19. Final Report FRDC Project 92/119. Fisheries Research and Development, Canberra.
- Jones C. y Ruscoe M. 1996c. Assessment of carbohydrate source in five diets fed to redclaw, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae), under earthen pond conditions. En: Production technology for Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*), pp 32-44. Final Report FRDC Project 92/119. Fisheries Research and Development, Canberra.
- Jones M. y Ruscoe M. 1996d. Production technology for redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), pp 155. Final Report FRDC Project 92/119. Fisheries Research and Development, Canberra.
- Jones C. y Ruscoe M. 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. y Ruscoe M. 2001. Assessment of five shelter types in the production of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) under earthen pond conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 189, 41-52.

- Jones P. y Obst J. 2000. Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *J. Crustac. Biol.* 20, 431-441.
- Karavanich C. y Atema J. 1998. Individual recognition and memory in lobster dominance. *Animal Behav.* 56, 1553-1560.
- Kreider J. y Watts S. 1998. Behavioral (Feeding) responses of the crayfish, *Procambarus clarkii*, to natural dietary items and common components of formulated crustacean feeds. *J. Chem. Ecol.* 24(1), 91-111.
- Kozłowski O., Voigt R. y Moore P. 2003. Changes in odour intermittency influence the success and search behaviour during orientation in the crayfish (*Orconectes rusticus*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 36(2), 97-110.
- Kurmaly K., Jones D. y Yule A. 1990. Acceptability and digestion of diets fed to larval stages of *Homarus gammarus* and the rule of dietary conditioning behavior. *Mar. Biol.* 14, 181-190.
- Laverack M. 1975. Properties of chemoreceptors in marine crustacea. En: *Olfaction and Taste* (eds. Denton D.A. y Coghlan J.P.), pp 141-146. Academic Press, New York.
- Le Vay L., Jones D., Puello-Cruz A., Sangha R. y Ngamphongsai C. 2001. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp. Biochem. Phys. A* 128, 623-630.
- Leal M. 1995. Uso de feromonas y aminos biógenas como atractantes en alimento para langostinos, *Macrobrachium rosenbergii*. Tesis de Maestría, pp 94. Monterrey, N.L., México.
- Lee F., Hagen W. y Kattner G. 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 307, 273-306
- Lee P., Smith L. y Lawrence A. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture* 42, 225-239.
- Lee P. y Meyers S. 1996. Chemotraction and feeding stimulation in crustaceans. *Aquacult. Nutr.* 2, 157-164.
- Lemos D., Hernández-Cortés M., Navarrete A., García-Carreño F. y Phan V. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Mar. Biol.* 135, 653-662.
- Levi T., Barki A., Hulata G. y Karplus I. 1999. Mother-offspring relationships in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *J. Crust. Biol.* 19, 477-484.
- Li E., Chen L., Zeng C., Yu N., Xiong Z., Chen X. y Qin J. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and

- hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture* 274, 80-86.
- Linton S. y Greenaway P. 2004. Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of the gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. *J. Exp. Biol.* 207, 4095-4104.
- Linton S., Allardyce B., Hagen W., Wencke P. y Saborowski R. 2009. Food utilisation and digestive ability of aquatic and semi-terrestrial crayfishes, *Cherax destructor* and *Engaeus sericatus* (Astacidae, Parastacidae). *J. Comp. Phys. B* 179, 493-507.
- Lo S., Russell J. y Taylor A. 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28(2), 234-236.
- López Greco L., Tropea C., Sacristán H., Calvo N., Stumpf L., Franco Tadic L., Castillo Díaz F., Arias M. y Tomas A. 2011. Estructura del hepatopáncreas de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). 17 al 18 diciembre. Proceedings of Primeras Jornadas de Ciencias Morfológicas de las Sierras de Tandil, Argentina.
- López-López S., Nolasco H., Villarreal-Colmenares H. y Civera Cerecedo R. 2005. Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Nutr.* 11, 79-85.
- Lovell R. 1989. Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 162.
- Loya-Javellana G., Fielder D. y Thorne M. 1995. Foregut evacuation, return of appetite and gastric fluid secretion in the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 134, 295-306.
- Luchini L. 2004. Algo más sobre el cultivo de la redclaw (*Cherax quadricarinatus*). Ed. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), pp 15. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura. Buenos Aires. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>.
- Luchini L. 2011. Acuicultura y nutrición: fórmulas y raciones formuladas para especies de clima subtropical y templado: pacú, randia, amur, tilapia y langosta de pinzas rojas.. MAGYP-Dirección de Acuicultura Nación-CENADAC, pp 9.
- Luchini L. y Panné Huidobro S. 2008. Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. Dirección de Acuicultura Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, pp 98.
- Luo W., Zhao Y., Zhou Z., Na C. y Ma Q. 2008. Digestive enzyme activity and mRNA level of trypsin in embryonic redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 26, 62-68.



- Mackie A. 1973. The chemical basis of food detection in the lobster *Homarus gammarus*. Mar. Biol. 21, 103-108.
- Mackie A. y Shelton R. 1972. A whole animal bioassay for the determination of the food attractants of the lobster *Homarus gammarus*. Mar. Biol. 14, 217-221.
- Marletta L., Carbonaro M. y Carnovale E. 1992. In-vitro protein and sulphur amino acid availability as a measure of bean protein quality. J. Sci. Food Agric. 59, 497-504.
- Masser M. y Rouse D. 1997. Australian Redclaw crayfish. SRAC Publication No. 244, pp 8.
- McGinnis A. y Kasting R. 1964. Digestion in insects, colorimetric analysis of chromic oxide used to study food utilization by phytophagous insects. J. Agric. Food Chem. 12, 259-262.
- Meade M. y Watts S. 1995. Toxicity of ammonia and nitrite to juvenile Australian crayfish, *Cherax quadricarinatus*. The Journal of Shellfish Research 14, 341-346.
- Mendez, G. y Wieser, W. 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). Environ. Biol. Fish. 36, 73-81.
- Mendoza R., Montemayor J. y Verde J. 1997. Biogenic amines and pheromones as feed attractants for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture Nut. 3, 167-173.
- Miller R. 1981. Simultaneous Statistical Inference. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag, Heidelberg and Berlin.
- Moore P. y Grills J. 1999. Chemical orientation to food by the crayfish, *Orconectes rusticus*: influence of hydrodynamics. Anim. Behav. 58, 953-963.
- MINAGRI 2013. Boletín Dirección de Acuicultura Marzo 2013. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, pp 19. Disponible en <http://www.minagri.gov.ar/site/pesca/acuicultura/index.php>
- Molina C., Cadena E. y Orellana F. 2000. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. En: V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (eds. Cruz-Suárez L., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M. y Civera-Cerecedo R.), pp 358-380. Mérida Yucatán, México.
- Molina-Poveda C. 2008. Alimento artificial. En: Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón (eds. Molina-Poveda C. y Villarreal Colmenares H.), pp 110. Ciencia y tecnología para el desarrollo. La Paz, B.C.S., México
- Morales A., Pérez-Jiménez A., Furné M. y Guderley H. 2012. Starvation, energetics, and antioxidant defenses. En: Oxidative stress in aquatic ecosystems (Abele, D.,

- Vázquez-Medina, J.P. y Zenteno-Savín, T.), pp 281-294, First ed. Blackwell Publishing, Oxford.
- Morales A. Pérez-Jiménez A., Hidalgo M., Abellán E., Cardenete G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 153-161.
- Moron M., Depierre J., Mannervik B. 1979. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S transferase activities in rat lung and liver. *Biochim. Biophys.* 582, 67-78.
- Moss S., Divakaran S. y Kim B. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Res.* 32, 125-131.
- Moureau C., Boucard, C. y Ceccaldi, H. 1984. Variations circadienes des activites esterases de l'hémolymph de *Penaeus japonicus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 12, 103-107.
- Muhlia-Almazan A. y García- Carreño F. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 133, 383-394.
- Navarrete Del Toro M., García-Carreño F., López M., Celis-Guerrero L. y Saborowski R. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *J. Exp. Zool. A* 305, 645-654.
- Neiland K. y Scheer B. 1953. The influence of fasting and of sinus gland removal on body composition of *Hemigrapsus nudus*. *Physiol. Comp. Oecol.* 3, 321.
- Nishikawa T., Edelstein D., Du X., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M., Beebe D., Oates P., Hammes H., Giardino I. y Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.
- Nolasco-Soria H. y Vega-Villasante F. 2000. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. En: *Avances en Nutrición Acuícola IV* (eds. Civera-Cerecedo R., Pérez-Estrada C.J., Ricque-Marie D. y Cruz-Suárez L.E.), pp 149-165. *Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15 al 18 de noviembre. La Paz, B.C.S., México.
- Nolasco-Soria H., del Monte Martínez A., Hinojosa P., Civera-Cerecedo R. y Vega-Villasante F. 2006. Digestibilidad *in vitro* de lípidos alimentarios para el camarón. En: *Avances en Nutrición Acuícola VIII* (eds. Cruz-Suárez L., Ricque D., Salazar M., Nieto López M., Villarreal Cavazos D., Puello Cruz A. y Ortega A.), pp 377-395. *VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15 al 17 de noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- NRC 1993. *Nutrient requirements of fish*, National Research Council, National Academy Press, Washington D.C. pp 128.

- Nunes A. y Parsons G. 1999. Feeding levels of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* in response to food dispersal. J. World Aquacult. Soc. 30, 331-348.
- Nunes A., Sá M., Andriola-Neto F. y Lemos D. 2006. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 260, 244-254.
- Ohkawa, H., Ohishi, N y, Yagi, K. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351-358.
- Oliveira G., Rossi I., Kucharski L. y Da Silva R. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. Comp. Biochem. Physiol. A 137, 383-390.
- Ong B. y Johnston D. 2006. Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. J. Shellfish. Res. 25(1), 113-121.
- Papadopoulos M., Koumenis I., Dugan L. y Giffard R. 1997. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. Brain Res. 748, 151-156.
- Papathanassiou E. y King P. 1984. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant). Comp. Biochem. Physiol 77, 243-249.
- Pascual C., Sánchez A., Sánchez A., Vargas-Albores F., LeMoullac G. y Rosas C. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. Aquaculture 218, 637-650.
- Pascual C., Sánchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gabriela G., Brito R. Gelabert R., Hidalgo H. y Rosas C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 251, 416-429.
- Pavasovic A., Richardson N., Anderson A., Mann D. y Mather P. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. Aquaculture 242, 641-654.
- Pavasovic A., Anderson A., Mather P. y Richardson N. 2007. Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Aquacul. Res. 38, 644-652.
- Pavasovic A. 2008. Evaluation of the Nutritional requirements of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. PhD Dissertation, pp 165. Queensland University of Technology.
- Pontes C. y Arruda M. 2005. Acesso ao alimento artificial e enchimento do trato digestivo de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) durante as fases clara e escura do período de 24 horas. Rev. Bras. Zool. 22, 1039-1043.

- Pontes C., Arruda M., De Lara Menezes A. y De Lima P. 2006. Daily activity pattern of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) juveniles under laboratory conditions. *Aquacult. Res.* 37, 1001-1006.
- Reznick A. y Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357-363.
- Richard P., Wormhoudt A. y Ceccaldi H. 1979. Variations circadiennes des acides amines libres du muscle de *Penaeus kerathurus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 7, 65-67.
- Rivera-Pérez C. y García-Carreño F. 2011. Effect of fasting on digestive gland lipase transcripts expression in *Penaeus vannamei*. *Mar. Genomics* 4, 273-278.
- Rivera-Pérez C., García-Carreño F. y Saborowski R. 2010. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. *Mar. Biotechnol.* 13, 284-295.
- Robertson L., Addison L. y Castille F. 1992. Effect of feeding frequency and feeding time on *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture and Fisheries Management* 14, 1-6.
- Robertson L., Lawrence A. y Castille F. 1993. Effect of feeding frequency and feeding time in growth of the *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Fish. Manage.* 24, 1-6.
- Robertson R. y Laverack M. 1978. Inhibition of oesophageal peristalsis in the lobster after chemical stimulation. *Nature* 271, 239-240.
- Robinson M., Rustum R., Chambers E., Rounds J., Wilmore D. y Jacobs D. 1997. Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *J. Surg. Res.* 69, 325-330.
- Rodgers L. Saoud I. y Rouse D. 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 A., Le Vay L., Mourente G. y Jones D.A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.* 118, 45-51.
- Rojo L., Muhlia-Almazan A., Saborowski R. y García-Carreño F. 2010. Aspartic Cathepsin D Endopeptidase Contributes to Extracellular Digestion in Clawed Lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Mar. Biotechnol.* 12, 696-707.
- Romero X. y Murillo P. 1997. Acclimation procedures for the Australian Redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *J. App. Aquacul.* 7, 109-113.
- Rouse D., Austin C. y Medley P. 1991. Progress towards profits? Information on the Australian crayfish. *Aquaculture Magazine* 17, 46-56.
- Sacristán H., Franco Tadic L. y López Greco L. 2011. Efecto de la dieta sobre la estructura del hepatopancreas en la langosta *Cherax quadricarinatus* (Decapoda). 17 al 18

- diciembre. Proceedings of Primeras Jornadas de Ciencias Morfológicas de las Sierras de Tandil, Argentina.
- Sacristán H., Franco Tadic L. y López Greco L. 2013. Influence of feeding on the circadian rhythm of digestive enzymes in cultivated juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41, 753-761.
- Sacristán H., Nolasco-Soria H. y López Greco L. 2014. Effect of attractant stimuli, starvation period, and food availability on digestive enzymes in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). *Aquatic Biol.* 23, 87-89.
- Sainz J., García-Carreño F., Sierra-Beltrán S. y Hernández-Cortes P. 2004. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Crust. Biol.* 24, 266-273.
- Sánchez De Bock M. y López Greco L., 2010. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish “red claw” *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae) by effect of temperature and androgenic gland included on food. *Aquacult. International* 18, 231-243.
- Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Mulhia-Almazán A., Hernández-Saavedra N. y Yepiz-Plascencia G. 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 292, 1-17.
- Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Muhlia-Almazán A., Peregrino-Uriarte A., Hernández-López J. y Yepiz-Plascencia G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 241-249.
- Saoud I., Garza De Yta A. y Ghanawi J. 2012. A review of nutritional biology and dietary requirements of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquacult. Nutr.* 18, 349-368.
- Saoud I., Ghanawi J., Thompson K. y Webster C. 2013. A Review of the Culture and Diseases of Redclaw Crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *J. World Aquacult.* 44, 1-29.
- Schmitt B. y Ache B. 1979. Olfaction: responses of a decapod crustacean are enhanced by flicking. *Science* 205, 204-206.
- Sedwick R. 1979. Effect of ration size and feed frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis* De Man. *Aquaculture* 16, 279-298.
- Seiffert Q. 1997. Efeito do horario de distribuicao de alimento sobre o consumo de matria seca no cultivo do camarao “rosa” *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967). Tesis Mestre, pp 88. Universidad Federal de Santa Catarina.
- Shepherd P. 1974. Chemoreception in the antennule of the lobster, *Homarus americanus*. *Mar. Behav. Physiol.* 2, 261-273.

- Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058-1071.
- Smith, D. y Dall, W. 1991. Metabolism of proline by the tiger prawn *Penaeus esculentus*. *Mar. Biol.* 110, 85-91.
- Smith D., Tabrett S., Barclay M. y Irvin S. 2005. The efficacy of ingredients included in shrimp feeds to stimulate intake. *Aquac. Nutr.* 11, 263-271.
- Smith D., Burford M., Tabrett S., Irvin S. y Ward L. 2002. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 207, 125-136.
- Sokal R. y Rohlf F. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, third ed. W. H. Freeman and Co., New York.
- Sousa L. y Petriella A. 2006. Morphology and histology of *Paleomonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. *Biocell* 30, 287-294.
- Storch, V. y Anger, K. 1983. Influence of starvation and feeding on the hepatopancreas of larval *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgol. Meeresunters* 36, 67-75.
- Storch V., Juario J. y Pascual F. 1984. Early effects of nutritional stress on the liver of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), and on the hepatopancreas of the tiger prawn *P. monodon* (Fabricius). *Aquaculture* 36, 229-236.
- Stuck K., Watts S. y Wang S. 1996. Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 125, 33-45.
- Stumpf L., Calvo N., Castillo Díaz F., Valenti W. y López Greco L. 2011. Effect of intermittent feeding on growth in early juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 319, 98-104.
- Stumpf L., Calvo N., Pietrokovsky S. y López Greco L. 2010. Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the "redclaw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 304, 34-41.
- Stumpf L., Castillo Díaz F., Viau V., Valenti W. y López greco L. 2014b. Effect of food shortage on growth, energetic reserves mobilization and water quality in juveniles of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared in groups. *J. Crust. Biol.* 30:1-8.
- Stumpf L., Tropea C. y López Greco L. 2014a. Recovery growth of *Cherax quadricarinatus* juveniles fed on two high-protein diets: effect of daily feeding following a cyclic feeding period on growth, biochemical composition and activity of digestive enzymes. *Aquaculture* 433, 404-410.
- Takaii K., Shimeno S. y Takeda M. 1985. Changes in digestive enzyme activities in eel after feeding. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 51, 2027-2031.

- Tamburri M., Finelli C., Wetthey D., Zimmer-Faust R. 1996. Chemical induction of larval settlement behaviour in flow. *Biol Bull* 191, 367-373.
- Teschke M. y Saborowski R. 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 316, 213-229.
- Thompson K., Bailey T., Metts L., Brady Y. y Webster C. 2010. Growth response and fatty acid composition of juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) fed different sources of dietary lipid. *Aquacult. Nutr.* 16, 604-615.
- Thompson K., Muzinic L., Christian T., Webster C., Manomaitis L. y Rouse D. 2003a. Lecithin requirements of juvenile Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nut.* 9, 223-230.
- Thompson K., Muzinic L., Christian T., Webster C., Manomaitis L. y Rouse D. 2003b. Effect on growth, survival, and fatty acid composition of Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* fed practical diets with and without supplemental lecithin and/or cholesterol. *J. World Aquacult. Soc.* 34, 1-10.
- Thompson K., Muzinic L., Engler L. y Webster C. 2005. Evaluation of practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, for juvenile on Australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 244, 241-249.
- Tierney A. y Dunham D. 1982. Chemical communication in the reproductive isolation of the crayfishes, *Orconectes propinquus* and *Orconectes virilis* (Decapoda, Cambaridae). *J. Crust. Biol.* 2, 544-548.
- Tierney A. y Atema J. 1988. Behavioral responses of crayfish (*Orconectes virilis* and *Orconectes rusticus*) to chemical feeding stimulants. *J. Chemical. Ecol.* 14, 123-133.
- Tropea C., Hermida G. y López Greco L. 2011. Effects of androgenic gland ablation on growth and reproductive parameters of *Cherax quadricarinatus* males (Parastacidae, Decapoda). *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 211-218.
- Tropea C., Piazza Y. y López Greco L. 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the "redclaw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 302, 49-56.
- Ueberschar B. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforsch* 32, 144-155.
- Uys W., Heth T. y Walters M. 1987. Changes in digestive enzyme activity of *Clarias gariepinus* (Pices: Clariidae) after feeding. *Aquaculture* 63, 243-250.
- van Weel P. 1960. On the secretion of digestive enzymes by the marine crab, *Thalamita Crenata*. *Zeitsch. Vergl. Physiol.* 43, 567-577.

- van Wormhoudt A. 1974. Variations of the level of the digestive enzymes during the intermolt cycle of *Palaemon sereratus*: influence of the season and effect of eyestalk ablation. *Comp. Biochem. Phys. B* 49, 707-715.
- van Wormhoudt A. 1977. Activites enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus*: Variations annuelles de l'acrophase des rythmes circadiens. *Biochem. Sys. Ecol.* 5, 301-307.
- Vázquez F. y López Greco L. 2007a. Sexual differentiation in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Revista de Biología Tropical (Internacional Journal of Tropical Biology and Conservation)* 55, 33-38.
- Vázquez F. y López Greco L. 2007b. Intersex females in the red claw freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Revista de Biología Tropical (Internacional Journal of Tropical Biology and Conservation)* 55, 25-32.
- Vega-Villasante F., Nolasco-Soria H. y Civera R. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I- Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Phys. B* 106, 547-550.
- Vega-Villasante F., Fernández I., Oliva M., Preciado M. y Nolasco-Soria H. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863. *Bull. Mar. Sci.* 65, 1-9.
- Velasco M., Lawrence A., y Castille F. 1999. Effects of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 179, 142-148.
- Vendemiale G., Grattagliano I., Caraceni P., Caraccio G., Domenicalli M., Dall'Agata M., Trevisani F., Guerrieri F., Bernardi M. y Altomare E. 2001. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33, 808-815.
- Versaw K., Cupper L., Winters D. y Williams E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food. Sci.* 54(6), 1557-1568.
- Vijayavel K., Gomathi R., Durgabhavani K. y Balasubramanian M. 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible crab *Scylla serrata*. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 429-433.
- Villarreal H., 2002. Avances en la nutrición de *Cherax quadricarinatus*. En: Avances en Nutrición Acuícola VI (eds. Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N.). Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre. Cancún, Quintana Roo, México.
- Vinagre A. y Da Silva R. 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A* 102, 579-583.



- Vogt G., Quintio E. y Pascual, F. 1986. *Leucaena leucocephala* leaves in formulated feed for *Penaeus monodon*: a concrete example of the application of histology in nutrition research. *Aquaculture* 59, 209-234.
- Vogt G., Storch V., Quintio E. y Pascual, F. 1985. Midgut gland as a monitor organ for the nutritional value of diets in *P. monodon* (Decapoda). *Aquaculture* 48, 1-12.
- Wassenberg T. y Hill B. 1987. Natural diet of the tiger prawn *Penaeus sculentus* and *Penaeus semisulcatus*. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 38, 169-182.
- Wee K. 1992. Aquaculture nutrition research in Australia. En: Proceeding of aquaculture nutrition workshop (eds. Allan G. y Dall W.). 15-17 april 1991. NSW Fisheries Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander Bay. Australia.
- Weissburg M. 2011. Waterborne chemical communication: stimulus dispersal dynamics and orientation strategies in crustaceans. En: Chemical communication in crustaceans (eds. Breithaupt T. y Thiel M.), pp 63-83. Springer-Verlag, New York, NY.
- Whyte J., Englar J., Carswell B. y Medic K. 1986. Influence of starvation and subsequent feeding on body composition and energy reserves in the prawn *Pandalus platyceros*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 1142-1148.
- Wicki G., Rossi F., Merino O. y Luchini L. 2008. Engorde de la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*) en el subtrópico argentino: primeros resultados. Disponible en [www.minagri.gov.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01-especies/index.php](http://www.minagri.gov.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01-especies/index.php)
- Wickins J. y Lee D. 2002. Crustacean farming ranching and culture. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Wyban J. y Sweeney J. 1989. Intensive shrimp growth trials in a round pond. *Aquaculture* 76, 215-225.
- Xue X., Anderson A., Richardson N., Anderson A. y Xue G. 1999. Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 180, 373-386.
- Yudkovski Y., Shechter A., Chalifa-Caspi V., Auslander M., Ophir R., Dauphin Villemant C., Waterman M., Sagi A. y Tom M. 2007. Hepatopancreatic multitranscript expression patterns in the crayfish *Cherax quadricarinatus* during the moult cycle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 16, 661-674.
- Zar J. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA. pp 663.
- Zenteno-Savin T., Cortes-Jacinto E., Vazquez-Medina J. y Villarreal-Colmenares H. 2008. Oxidative damage in tissues of juvenile crayfish (*Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868) fed different levels of proteins and lipid. *Hidrobiologica*, 18, 147-154.
- Zhang P., Zhang X., Li J. y Gao T. 2010. Effect of refeeding on the growth and digestive enzyme activities of *Fenneropenaeus chinensis* juveniles exposed to different periods of food deprivation. *Aquacult. Int.* 18, 1191-1203.

- Zimmer-Faust R., Michel W., Tyre J. y Case J. 1984. Chemical induction of feeding in California spiny lobster, *Panulirus interruptus* (Randall): Responses to molecular weight fractions of abalone. *J. Chem. Ecol.* 10, 957-971.
- Zuur A., Ieno E., Walker N., Saveliev A. y Smith G. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer Verlag 13, 323-332.
- Zulandt-Schneider R., Schneider R. y Moore P. 1999. Recognition of dominance status by chemoreception in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *J. Chem. Ecol.* 25, 781-794.