

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MODULACIÓN DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LA
CENTOLLA *LITHODES SANTOLLA* DEL CANAL BEAGLE**

por

Lic. Natasha Schvezov

Directora: Dra. M. Carolina Romero

Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET)



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Carolina Romero, Centro Austral de Investigaciones Científicas – CONICET, Tierra del Fuego.

Dra. Laura Susana López Greco, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Dra. Verónica Nolan, Facultades de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A CADIC y CONICET por permitirme realizar este trabajo. Como también a la Agencia Nacional de Promoción Científica, Tecnológica e Innovación, y a Sigma-Xi por otorgar el financiamiento que hizo posible realizar este trabajo.

A la Administración de CADIC, especialmente la de los años 2009-2010, que ayudaron a que pudiera empezar esta tesis, y terminarla también.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNC, que permitió que pueda realizar este doctorado, teniendo en cuenta las grandes distancias.

A mi directora, la Dra. Carolina Romero, por la paciencia a una química en el mundo de los biólogos. Por darme una segunda oportunidad.

Al Dr. Gustavo Lovrich, por los consejos durante esta tesis, por su paciencia y tiempo. Quien me abrió las puertas al laboratorio en tiempos de cambios, aun sabiendo las consecuencias.

Al grupo del Laboratorio de Biología de Crustáceos, Gustavo, Caro, Fede, Pau, María, Mariano, Clara, Ari, Olga, Pablo, Rodrigo y Ceci. Entre mates, muestreos y eppendorfs compartimos buenas charlas, risas, y enojos también...pero créanme, pusieron su granito de arena para que esto sea posible.

A Marcelo, que siempre le puso buena onda a las salidas, aunque el clima nunca era el mejor o no pescábamos nada.

A Naty, Marce, Clau y Eri, las primeras compañeritas de oficina con quienes compartimos muchos momentos, y me recibieron con los brazos y corazones abiertos aun siendo la Pequeña Lulú.

A Lore y Marce, por las risas compartidas entre brazadas.

A Mariano, compañerito de laboratorio y de rumores, quien siempre logró hacerme reír con sus comentarios, pero también supo dar buenos consejos que lograron que esta tesis sea escrita.

A Olga, quien nos cuida a cada uno de los becarios, siempre dando una mano y sabiendo donde esta todo, pero mas importante aún, ayudándonos en todo momento, ya sea de crisis o no, con la paciencia y amor que sólo ella puede tener. Extrañaré los mates matutinos...

A Yovi, Julián, Manuel y Hernán, que nos veíamos poco, pero los momentos en que nos reencontramos en la calurosa Posa'a fueron muy valiosos para seguir adelante, sin juzgar y siempre con una sonrisa.

A Gastón, Naty, Coty, Andre, Ova y Javi, compañeros de baile y actuaciones, aceptaron mi locura y compartieron la suya. Espero que tengamos muchas terapias de risas más.

A la flia. Tardioli, me abrieron sus puertas y me adoptaron dando su apoyo y ayuda cuando lo necesitaba.

A Emi, por aguantarse las ausencias por horas de muestreo y laboratorio, y por acompañarme en gran parte de esta tesis. Siempre tendrás un lugar en mi corazón.

A Lali, Nati, María y Vero, supieron estar en el momento justo e indicado ya sea para reír o llorar, pero siempre dispuestas a escuchar y dar buenos consejos, ya sea en una tarde de mates o en una noche de Dublin.

A la Anto, la Yani y la Meli, quienes me acompañaron durante la carrera, compartiendo largas horas de laboratorios y estudio, pero más importante aún, compartiendo su tiempo, sus risas y sus consejos.

A Bismarck, mi catalizador, me recordó quién era y qué quería. Aceptó y me acompañó en las decisiones que hicieron que la vida tome este rumbo.

A mis hermanos, Sergio, Daniel y Carlitos que siempre aguantaron mis caprichos y mis locuras.

A mis padres, Neco y Mima, por el apoyo incondicional en todas mis decisiones y locuras.

A la personita que ahora pateo dentro de mí.

LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

N. Schvezov, G. Lovrich, F. Tapella, C. Romero. *Daily variations of the antioxidant defense system of the lithodid crab* *Lithodes santolla*. *Comparative Biology and Physiology. Part A.* 164: 605-611. 2013.

N. Schvezov, G.A. Lovrich, O. Florentín, M.C. Romero. Baseline defense system of commercial male king crabs *Lithodes santolla* from the Beagle Channel. *Comparative Biology and Physiology. Part A.* 181: 18-26. 2015.

INDICE

Índice de Tablas y Figuras.....	4
Abreviaciones y símbolos.....	7
Resumen	10
Summary	11
Capítulo 1 Introducción General	12
Especies reactivas de oxígeno	13
Defensas Antioxidantes.....	14
Superóxido dismutasa (SOD).....	15
Catalasa (CAT).....	15
Glutación Peroxidasa (GPx)	16
Glutación S-transferasa (GST).....	16
Glutación (GSH)	16
Ácido ascórbico (AA)	17
Daño oxidativo	17
Lipoperoxidación	17
Oxidación de proteínas.....	18
Biología y Pesquería de la centolla <i>Lithodes santolla</i>	19
Ciclo de vida	20
Pesca de centolla	22
Transporte vivo de animales	23
Objetivo general	26
Objetivos Específicos.....	26
Hipótesis	27
Capítulo 2 Materiales y Métodos	28
Área de estudio	29
Obtención de los animales	31
Sistema de acuarios	33
Obtención de tejidos.....	34
Homogenización	35
Concentración de proteínas	36
Concentración de glucosa	36
Actividad enzimática.....	36

Superóxido Dismutasa.....	37
Catalasa	37
Glutación peroxidasa	37
Glutación transferasa	38
Antioxidantes no-enzimáticos	38
Glutación (GSH-eq= 2 GSH + GSSG)	38
Ácido ascórbico.....	39
Daño oxidativo.....	39
Peroxidación de lípidos (LPO).....	39
Oxidación de proteínas (OP).....	40
Capítulo 3 Variaciones diarias del sistema de defensas antioxidantes de <i>Lithodes santolla</i>	42
Introducción	43
Materiales y Métodos.....	46
Experimentación.....	46
Análisis estadístico.....	46
Análisis de Cosinor	47
Resultados	48
Branquias.....	48
Músculo.....	49
Hemolinfa.....	51
Hepatopáncreas	53
Discusión.....	61
Capítulo 4 Estacionalidad de las defensas antioxidantes en <i>Lithodes</i> <i>santolla</i>.....	66
Introducción	67
Materiales y métodos	68
Obtención de muestras	68
Análisis estadístico.....	69
Resultados	70
Enzimas antioxidantes.....	70
Antioxidantes no-enzimáticos	74
Proteínas, glucosa y pH.....	76
Parámetros de estrés oxidativo	78
Discusión.....	79

Sistema de defensas antioxidantes	79
Antioxidantes no-enzimáticos	82
Estado metabólico de <i>Lithodes santolla</i>	84
Daño oxidativo	86
Capítulo 5 El sistema de defensas antioxidantes de <i>Lithodes santolla</i> frente a la exposición aérea y reinmersión	88
Introducción	89
Materiales y Métodos.....	91
Aclimatación y condiciones del ensayo	91
Análisis estadístico	91
Resultados	92
Branquias.....	92
Músculo.....	93
Hemolinfa.....	94
Hepatopáncreas	95
Discusión.....	102
Capítulo 6 Exposición aérea a diferentes temperaturas y reinmersión	108
Introducción	109
Materiales y Métodos.....	111
Aclimatación y condiciones del ensayo	111
Análisis estadístico	112
Resultados	113
Supervivencia y estado de vigor.....	113
Glucosa, proteínas y pH	115
Sistema de defensas antioxidantes	121
Discusión.....	124
Supervivencia y estado de vigor.....	124
Glucosa, proteínas y pH	126
Sistema de defensas antioxidantes	127
Consideraciones finales.....	130
Bibilografía.....	136

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.1. Rutas del oxígeno metabólico.....	13
Figura 1.2. <i>Lithodes santolla</i> (vista dorsal).....	20
Figura 1.3. Ciclo de vida de la centolla <i>Lithodes santolla</i> del Canal Beagle.....	21
Figura 1.4. Mapa de la zona de estudio.....	23
Figura 2.1. Temperatura del agua del Canal Beagle.....	30
Figura 2.2. Pesca de centolla en el Canal Beagle.	32
Figura 2.3. Sistema de acuarios de trabajo.....	34
Figura 3.1. Ilustración gráfica de los parámetros circadianos.....	44
Figura 3.2. Actividad enzimática en branquias de machos <i>L. santolla</i> en un período de 24 h.....	50
Figura 3.3. Actividad enzimática en músculo de machos <i>L. santolla</i> en un período de 24h.....	52
Figura 3.4. Actividad enzimática en hemolinfa de <i>L. santolla</i> en un período de 24 h.....	53
Figura 3.5. Actividad enzimática en hepatopáncreas de machos <i>L. santolla</i> en un período de 24h.....	55
Tabla 3.1. Análisis Cosinor analizados en <i>Lithodes santolla</i>	56
Tabla 3.2. Variaciones diarias de ácido ascórbico (AA) y glutatión reducido (GSH-eq) en tejidos de machos de <i>Lithodes santolla</i>	58
Tabla 3.3. Variaciones diarias en la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas en tejidos de machos de <i>Lithodes santolla</i>	59
Tabla 3.4 Concentración de glucosa en tejidos de machos <i>Lithodes santolla</i> en un período de 24h.....	60

Tabla 3.5. Variaciones diarias de pH en hemolinfa de <i>Lithodes santolla</i>	61
Figura 4.1. Variación estacional de la actividad enzimática de SOD de <i>L. santolla</i>	71
Figura 4.2. Variación estacional de la actividad enzimática de CAT de <i>L. santolla</i>	72
Figura 4.3. Variación estacional de la actividad enzimática de GPx de <i>L. santolla</i>	73
Figura 4.4. Variación estacional de la actividad enzimática de GST de <i>L. santolla</i>	74
Tabla 4.1. Concentración estacional de glutatión de <i>L. santolla</i>	75
Tabla 4. 2. Concentración estacional de ácido ascórbico de <i>L. santolla</i>	75
Tabla 4.3. Variaciones estacionales en la concentración de proteínas y glucosa en <i>L. santolla</i>	77
Tabla 4.4. Variaciones estacionales del pH en hemolinfa de <i>L. santolla</i>	77
Tabla 4.5. Variaciones estacionales de la peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas de <i>L. santolla</i>	78
Figura 5.1. Actividad enzimática de SOD y CAT en branquias de <i>L. santolla</i> expuestos a aire por 24h y reinmersos.....	97
Figura 5.2. Valores de concentración de ácido ascórbico de <i>L. santolla</i> expuestos a aire por 24h y reinmersos.....	98
Tabla 5.1. Sistema de glutatión de <i>L. santolla</i> expuestos a aire por 24h y reinmersos.....	99
Tabla 5.2. Niveles de peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas de <i>L. santolla</i> expuestos a aire por 24h y reinmersos.....	100
Tabla 5.3. Concentración de glucosa en tejidos de <i>L. santolla</i> expuestos a aire por 24h y reinmersos.....	101
Tabla 5.4. Valores de pH en la hemolinfa de <i>L. santolla</i> expuestos a aire por 24h y reinmersos.....	101
Figura 6.1. Vitalidad de los machos de <i>L. santolla</i> luego de 24 h de exposición aérea a 4°C, 8°C y 12°C, y 12 h de reinmersión en agua a 8°C.....	114
Figura 6.2. Concentración de glucosa en hemolinfa de <i>L. santolla</i> luego de 24 h de exposición aérea a 4°C, 8°C y 12°C, y 12 h de re-inmersión en agua a 8°C.....	116

Figura 6.3. Concentración de proteínas totales en hemolinfa de <i>L. santolla</i> luego de 24 h de exposición aérea a 4°C, 8°C y 12°C, y 12 h de re-inmersión en agua a 8°C.....	117
Figura 6.4. Actividad enzimática de SOD, CAT, GPx y GST en hemolinfa de <i>L. santolla</i> luego de 24 h de exposición aérea a 4°C, 8°C y 12°C, y 12 h de re-inmersión en agua a 8°C.....	122
Figura 6.5. Concentración de ácido ascórbico en hemolinfa de <i>L. santolla</i> luego de 24 h de exposición aérea a 4°C, 8°C y 12°C, y 12 h de re-inmersión en agua a 8°C.....	123
Tabla 6.1. Escala de vitalidad de cangrejos.....	112
Tabla 6.2. Tabla de resultados de los análisis de ANOVA de 2-vías de medidas repetidas para comparar los efectos de la temperatura y los tratamientos (<i>exposición y recuperación</i>) en <i>L. santolla</i> en los parámetros bioquímicos analizados en hemolinfa.....	118
Tabla 6.3. Tabla de resultados de los análisis de ANOVA del efecto de Tratamiento en aquellos parámetros que demostraron tener interacción significativa.....	119
Tabla 6.4. Tabla de resultados de los análisis de ANOVA del efecto de Temperatura en aquellos parámetros que demostraron tener interacción significativa.....	120
Tabla 6.5. pH hemolinfático de <i>L. santolla</i> expuestas al aire por 24 h (<i>exposición</i>) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de re-inmersión a 8°C (<i>recuperación</i>).....	120
Tabla 6.6. Oxidación de proteínas en la hemolinfa de <i>L. santolla</i> expuestas al aire por 24 h (<i>exposición</i>) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de re-inmersión a 8°C (<i>recuperación</i>).....	124

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

ϕ	acrofase
A	Amplitud
AA	ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianzas
BHT	Butilhidroxitolueno
Br	Branquias
°C	grado centígrado
Cap.	Capítulo
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
DE	Desvío estándar
DNPH	2,4-dinitrofenil hidracina
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzoico
ϵ	coeficiente de absortividad molar
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
F	estadístico del ANOVA
Fig.	Figura
ω	frecuencia angular
GPx	Glutación Peroxidasa
GS-DNB	complejo de glutación y dinitro benceno
GST	Glutación-S-transferasa
GSH	Glutación reducido
GSH-eq	Concentración de glutación total
GSSG	Glutación oxidado
H	estadístico del Kruskal-Wallis
H ₂ O	agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HO•	Radical hidroxilo
HOO•	Radical peróxido
h	hora

HL Hemolinfa
HP Hepatopancreas
L litro
LC Largo de caparazón
LOOH hidroperóxidos de ácidos grasos
LPO Peroxidación de lípidos
L. santolla Lithodes santolla
μ micro
m metro
M Mesor
M molar
Mc Músculo
mg miligramo
min minutos
mL mililitro
mM milimolar
NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O₂ oxígeno
O₂⁻ radical superóxido
¹ΣO₂ Oxígeno singlete
OP Oxidación de proteínas
τ período de tiempo
P_{CO2} presión de dióxido de carbono
P_{O2} presión de oxígeno
PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
% p/V porcentaje peso en volumen
R-CH[•] radical alquílico
R-COOH peróxido lipídico
RO[•] radical alcóxido
ROO[•] o R-COO[•] radical peróxido
ROS Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés- *reactive oxygen species*)
SH Grupo sulfhídrico
SOD Superóxido dismutasa
t tonelada

T temperatura

t_0 tiempo cero

TBA ácido tiobarbitúrico

TNB 2-nitrobenzoato

TRIS Trisaminometano

U Unidad enzimática

ups unidades prácticas de salinidad

RESUMEN

La centolla *Lithodes santolla* del Canal Beagle es un crustáceo explotado comercialmente en Argentina y Chile, con potencial a ser transportado en vivo en seco para su comercialización a otros centros urbanos. El transporte en seco implica factores estresantes (p. ej. hipoxia, cambios de temperatura y reperfusión), por lo que es necesario el estudio fisiológico y de supervivencia de la centolla. Se determinaron las defensas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa), no-enzimáticas (glutatión y ácido ascórbico) y los parámetros de estrés (oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos) en machos comerciales. Además, se determinaron parámetros fisiológicos como la concentración de glucosa, de proteínas totales y el pH hemolinfático. Primeramente se analizaron las variaciones diarias y estacionales de las defensas antioxidantes. Las variaciones diarias podrían estar relacionadas con aumentos del consumo de O₂ debido a la actividad locomotora. Por otro lado, las variaciones estacionales se debieron principalmente a las variaciones ambientales y también relacionadas a la muda y reproducción. En una segunda instancia, se estudió el sistema de defensas antioxidantes ante la exposición aérea a 8°C por 24 h y reinmersión en agua durante 24 h. Se observó que la centolla llega a un estado hipometabólico durante la exposición aérea, con la disminución de algunas enzimas antioxidantes, pero dejando otras activas, durante el cual los parámetros de estrés oxidativo no aumentaron. Una vez resurgidos, las defensas antioxidantes se encuentran altamente activas, con una recuperación del sistema luego de 8 h de reinmersión. En una tercera instancia se estudió el sistema de las defensas antioxidantes ante la exposición aérea por 24 h a tres temperaturas (4, 8 y 12°C), y la reperfusión en agua a 8°C luego de 12 h de reinmersión. Las centollas expuestas a 12°C que presentaron 100% de mortalidad luego de la exposición aérea. La recuperación de las centollas a 4°C y 8°C se logró durante el período de reinmersión, y no se observaron altos parámetros de estrés oxidativo.

Estos resultados indican que la centolla es capaz de sobrevivir a 24 h de exposición aérea, y de recuperarse una vez reinmersos, teniendo en cuenta las temperaturas de trabajo. El sistema de defensas antioxidantes en la centolla, en general, trabaja de manera concertada en respuesta a variaciones naturales (diarias y estacionales) como artificiales (exposición aérea y reperfusión) previniendo la generación del estrés oxidativo en la centolla *L. santolla* del Canal Beagle.

SUMMARY

The king crab *Lithodes santolla* from the Beagle Channel is a crustacean commercially exploited in Argentina and Chile, with the potential to be transported alive in dry for marketing to other urban centers. The dry transport involves stressors (e.g. hypoxia, changes in temperature and reperfusion), so that the physiological and survival of the crab study is necessary. In commercial males, the enzymatic antioxidant defenses (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase), non-enzymatic (glutathione and ascorbic acid) and stress parameters (protein oxidation and lipid peroxidation) were determined. Furthermore, physiological parameters such as glucose and protein concentration and pH were determined. First, the daily and seasonal variations of the antioxidant defenses were analyzed. Daily variations could be related to increases in consumption of O₂ due to locomotor activity. On the other hand, seasonal variations were mainly due to environmental variations and related to molting and reproduction. In a second instance, king crabs were air-exposed at 8°C and re-immersed in water for 24 h. It was observed that the king crab enters in a hypometabolic state during air exposure, with decreases in some antioxidant enzymes, but leaving others active, during which oxidative stress parameters did not increase. Once re-submerged, antioxidant defenses are highly active, with a system recovery after 8 h of re-immersion. In a third instance, the antioxidant defenses in king crabs exposed to air at three temperatures (4, 8 and 12°C) were studied, and the reperfusion in water at 8°C after 12 h of re-immersion. Crabs exposed to 12°C showed 100% mortality after air exposure. The recovery of crabs at 4°C and 8°C was achieved during the period of re-immersion, with low oxidative damage.

These results indicate that the crab is able to survive for 24 h to air exposure, and recover once re-immersed, considering the temperatures. The antioxidant defense system in the king crab generally works in concerted way in response to natural variations (daily and seasonal) and artificial (aerial exposure and reperfusion) preventing the generation of oxidative stress in *L. santolla* from Beagle Channel.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La paradoja de la vida aeróbica se basa en que los organismos no pueden existir sin el oxígeno, a pesar de que el oxígeno es inherentemente peligroso para su existencia (Gutteridge, 1995; Gutteridge & Halliwell, 2000; Hermes-Lima, 2004). El destino normal de la mayoría de las moléculas de oxígeno consumidas por los animales es la reducción tetravalente a agua, acoplada a la oxidación del alimento y producción de energía. En este proceso, la reducción univalente del oxígeno es posible generando intermediarios reactivos como el radical superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete ($^1\Sigma O_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^\bullet) y agua (H_2O - Fig. 1.1. Hermes-Lima, 2004; Lushchak, 2011). A estas especies químicas comúnmente se las denominaban como especies de radicales de oxígeno, pero como no todas son radicales, se los empezó a denominar como especies reactivas de oxígeno o ROS (siglas en inglés *reactive oxygen species*) (Lesser, 2006). Con esta denominación se los utilizará a lo largo de la presente tesis.

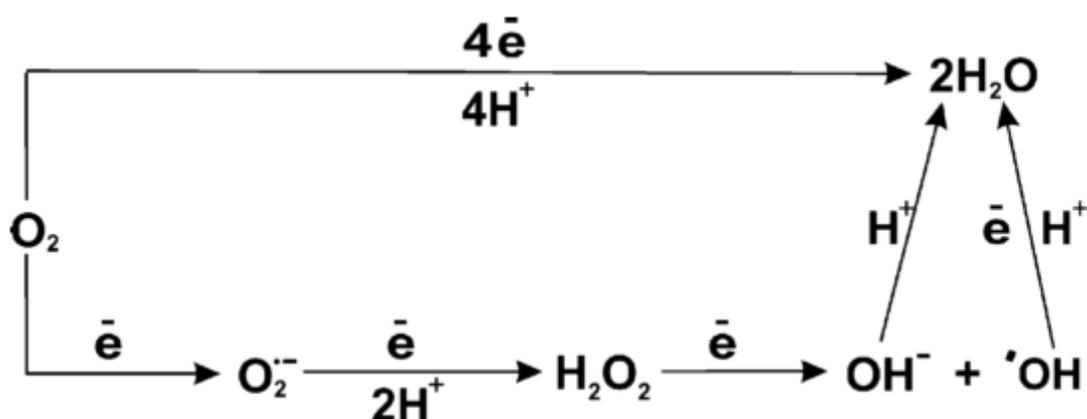


Figura 1.1. Rutas del oxígeno metabólico (Lushchak, 2011).

En la célula existen varios sitios de formación de ROS, como en las mitocondrias durante la respiración, en sistemas de citocromo P450, o en procesos de autooxidación de pequeñas moléculas en el citosol y peroxisomas (Buttemer *et al.*, 2010; Lushchak, 2011). Otra fuente de ROS es la cadena de transporte de electrones en el retículo endoplasmático (Kamata & Hirata, 1999; Hermes-Lima, 2004; Lushchak, 2011). La producción de ROS se da a diferentes ritmos en los diferentes tejidos, modulado por la oxigenación de los tejidos (Buttemer *et al.*, 2010). Además, los niveles de ROS pueden aumentar (o incrementarse)

por la influencia de radiaciones ultravioleta, rayos gamma, y xenobióticos (p. ej. poliaromáticos y metales. Livingstone, 2003).

Se debe tener en cuenta que las ROS están continuamente siendo generadas y eliminadas, es decir, la concentración de ROS es un parámetro dinámico, y se encuentra en un estado de equilibrio dentro de las células (Lushchak, 2011). Muchas especies reactivas de oxígeno se ven implicadas en la regulación del estado redox (Kamata & Hirata, 1999) por mecanismos de retroalimentación (Finkel & Holbrook, 2000; Lushchak, 2011). Además, las ROS y sus derivados regulan diferentes procesos para mantener la homeostasis celular, como en células fagocitarias en caso de infecciones o en la regulación de respuestas proliferativas (Finkel & Holbrook, 2000; Haddad, 2002; Manduzio *et al.*, 2005). Las ROS, siendo relativamente poco específicas, podrían también estar involucradas en mecanismos celulares particulares por la especificidad de sensores moleculares especiales y señales transductoras (Sohal, 2002; Lushchak, 2011).

Bajo ciertas circunstancias, el balance de la concentración de ROS puede llegar a ser perturbado y ocasionar cambios en el estado redox de las células, llegando a producir lo que se denomina estrés oxidativo (Lushchak, 2011). El estrés oxidativo se produce cuando el equilibrio de la concentración de ROS es momentánea o crónicamente aumentado, produciendo disturbios en el metabolismo celular, específicamente en la señalización redox, causando daños en los constituyentes celulares (Jones, 2006). Las ROS están involucradas en la iniciación de la peroxidación de lípidos en las membranas celulares, como así también en la oxidación y daño a proteínas, ADN nuclear y mitocondrial (Halliwell & Gutteridge, 1984; Halliwell, 1994). Cuando el estrés es severo, la supervivencia depende de la habilidad de la célula a adaptarse o resistir el estrés, y de la reparación o reemplazo de las moléculas dañadas (Finkel & Holbrook, 2000).

DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensas antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas, diseñados para mantener en estado de equilibrio la concentración de ROS. Halliwell (2005) definió antioxidante como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato”. El sistema de defensas

antioxidantes es un sistema complejo que incluye moléculas tanto endógenas como aquellas derivadas de la dieta (Hermes-Lima, 2004).

El análisis de antioxidantes individuales sirve para comprender el modo de acción de los agentes estresantes. Por ejemplo, es posible observar la depleción de algunos antioxidantes junto a la inducción de otros, ya que los antioxidantes pueden variar mucho en su biosíntesis, localización intracelular, naturaleza química y modo de acción, por tanto su respuesta a estresores puede ser muy diferente (Moncheva *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista químico biológico, se clasifican en antioxidantes enzimáticos (p. ej. catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, etc.) y antioxidantes no enzimáticos (glutatión, melanina, ácido úrico, etc.). A continuación se describirán las enzimas antioxidantes y las moléculas antioxidantes de bajo peso molecular que han sido analizados en este trabajo.

SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

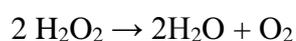
Esta enzima constituye la primera defensa al daño oxidativo que pueden causar el ion superóxido y las especies reactivas que derivan de su presencia. Es una metaloenzima que cataliza la reacción que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno (McCord & Fridovich, 1969; Halliwell, 1994).



SOD acelera en cuatro órdenes de magnitud la reacción espontánea de dismutación del radical anión superóxido por un mecanismo cíclico de oxidación-reducción de un sitio activo iónico y metálico (Bartosz, 2005).

CATALASA (CAT)

La catalasa participa en la detoxificación de peróxido de hidrógeno a través de una reacción que produce agua y una molécula de oxígeno (Bartosz, 2005).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Za *et al.*, 1999), si bien se ha descrito cierta actividad de esta enzima en mitocondrias y citosol (Hermes-Lima, 2004).

GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

La glutatión peroxidasa cataliza la descomposición de H₂O₂, como la enzima anteriormente descrita; y a algunos hidroperóxidos orgánicos, como los hidroperóxidos de ácidos grasos (LOOH) (Hermes-Lima, 2004).



Esta enzima utiliza al glutatión como sustrato de tiol, aunque también se ha observado el uso de tioredoxina como sustrato en algunas circunstancias (Brigelius-Flohé, 1999).

GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

La glutatión S-transferasa es una enzima que cataliza la adición de glutatión (GSH) a través de su grupo sulfhídrico (-SH= nucleófilo) a un carbono electrofílico de un sustrato lipofílico, resultando en un producto más hidrosoluble (Habig *et al.*, 1974; Sherratt & Hayes, 2001). La formación del conjugado con GSH luego es removido de la célula por una bomba de la membrana dependiente de ATP (Keppler, 1999; Sherratt & Hayes, 2001). Es importante en la detoxificación de epóxidos y peróxidos (Hermes-Lima, 2004).

GLUTATIÓN (GSH)

El glutatión, además de ser un sustrato para GPx y GST, también tiene capacidad antioxidante, conferida por la presencia de grupos tioles de los residuos de cisteínas (Manduzio *et al.*, 2005). Puede reaccionar con varios radicales de carbono, oxígeno singlete y especies reactivas de nitrógeno, formando un radical tiol entre otros productos (Hermes-Lima, 2004).

ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)

El ácido ascórbico (o vitamina C), además de tener funciones metabólicas, es un potente compuesto no enzimático antioxidante. Es capaz de reciclar la vitamina E, la cual también es un poderoso antioxidante, y además elimina peroxinitrito, ozono, oxígeno singlete, O_2^- , HOO^* y *OH . Existen evidencias que el ascórbico inhibe la peroxidación de lípidos y reacciones de oxiradicales con proteínas y ADN (Hermes-Lima, 2004).

DAÑO OXIDATIVO

LIPOPEROXIDACIÓN

Los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poli-insaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son el OH^* y el RO_2^* (Halliwell & Chirico, 1993; Hermes-Lima, 2004).

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica. Comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell & Gutteridge, 1984; Halliwell & Chirico, 1993). Esta reacción se produce significativamente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poli-insaturados, ya que los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $R-COO^*$. Los radicales peróxido pueden reaccionar a su vez con cadenas laterales de otros ácidos grasos poli-insaturados adyacentes, se forma un radical alquílico ($R'-CH^*$) y un peróxido lipídico ($R-COOH$), con lo que se propaga la reacción radicalaria (Halliwell & Chirico, 1993).

Esta es una reacción en cadena, de modo que el ataque por un sólo radical da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual deriva en la oxidación de una gran cantidad de sustancias, sobre todo hidrocarburos de cadena corta como etano, pentano y aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal (Hermes-Lima, 2004; Lushchak, 2011). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando mutaciones en el ADN, y además, produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Manduzio *et al.*, 2005).

OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

La oxidación de proteínas en general, y no a una enzima en particular, está relacionada con el proceso general de estrés oxidativo. Como en el caso de la peroxidación de lípidos, ha sido relacionada con varias enfermedades y proceso patológicos, como el envejecimiento, el Alzheimer y la diabetes. Las proteínas pueden ser atacadas principalmente por el radical hidroxilo, que puede oxidar cualquier aminoácido en la proteína (Hermes-Lima, 2004), y en segunda instancia, de manera indirecta con radicales alcoxilo (RO^{*}) o peroxilo (ROO^{*}) generados en la peroxidación de lípidos (Manduzio *et al.*, 2005).

La fuente más importante de oxidación de proteínas estaría mediada por la unión de bajas cantidades de hierro y cobre a las estructuras proteicas. Esto favorece la formación de las ROS, que al reaccionar con H₂O₂ o peróxidos alquílicos, inducen el daño proteico en sitios específicos. La oxidación de proteínas catalizada por metales está involucrada en el daño de la mayoría de las enzimas, receptores de membranas y proteínas estructurales (Sohal, 2002; Hermes-Lima, 2004). Además, aquellos aminoácidos con grupos sulfhídricos –SH son muy susceptibles a la oxidación. Las oxidaciones en las proteínas producen cambios en las conformaciones, generan puentes entre proteínas y entre proteínas y lípidos, o cortan la cadena proteica (Das *et al.*, 2001; Manduzio *et al.*, 2005).

Los derivados de carbonilos de las proteínas son los productos más relevantes en el ataque por las ROS a las proteínas y además pueden formarse a partir de la reacción con aldehídos (formados en la peroxidación de lípidos y oxidación de azúcares. Hermes-Lima, 2004). Sin embargo, se debe tener en cuenta que todas las proteínas tienen grupos carbonilos, y la oxidación por las ROS adiciona nuevos grupos. Aún así, es un parámetro de estrés extensamente empleado y aceptado para evaluar la intensidad de procesos radicalarios, sabiendo que es un parámetro dinámico puesto que las proteínas, especialmente las oxidadas, pueden ser catabolizadas (Lushchak, 2011).

BIOLOGÍA Y PESQUERÍA DE LA CENTOLLA *LITHODES SANTOLLA*

La ubicación taxonómica de *Lithodes santolla*, cuyo nombre vulgar es centolla o *Southern King Crab* en inglés, según Martin y Davis (2001) es la siguiente:

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea Brunnich, 1772
Clase	Malacostraca Latreille, 1802
Subclase	Eumalacostraca Grobben, 1892
Superorden	Eucarida Calman, 1904
Orden	Decapoda Latreille, 1802
Suborden	Pleocyemata Burkenroad, 1963
Infraorden	Anomura Mac Leay, 1838
Superfamilia	Paguroidea Latreille, 1802
Familia	Lithodidae Samouelle, 1819
Subfamilia	Lithodinae Samouelle, 1819
Genero	Lithodes
Especie	<i>Lithodes santolla</i> (Molina, 1782) (Fig. 1.2).



Figura 1.2. *Lithodes santolla* (vista dorsal).

La centolla se distribuye alrededor del extremo sur de América del Sur. En el Océano Pacífico, está desde aproximadamente los 38°S, por aguas chilenas hasta el Cabo de Hornos, incluyendo el Estrecho de Magallanes, canales y fiordos alrededor de Tierra del Fuego (Macpherson, 1988). Al sur del Océano Atlántico, *L. santolla* presenta una distribución disjunta: con altas concentraciones poblacionales en el Golfo San Jorge (46°S 66°O) y en el Canal Beagle (54°S 68°O) (Lovrich & Tapella, 2014). Más al norte, la centolla se encuentra a lo largo de la plataforma continental y talud hasta la latitud de Uruguay (Anger *et al.*, 2004). Los individuos de esta especie se encuentran entre el intermareal y los 700 m de profundidad (Boschi *et al.*, 1984), aunque entre los 10 y 50 m están las mayores concentraciones de ejemplares (Macpherson, 1988).

CICLO DE VIDA

El ciclo reproductivo de la centolla *Lithodes santolla* del Canal Beagle es anual (Fig. 1.3), iniciándose con el apareamiento a fines de la primavera (noviembre-diciembre),

y la fertilización de los huevos. El apareamiento ocurre entre un macho con un exoesqueleto viejo y una hembra recientemente mudada (Lovrich & Vinuesa, 1999). Las hembras acarrear los huevos durante la embriogénesis, que dura aproximadamente 9-10 meses, hasta la eclosión en septiembre-octubre (Lovrich & Vinuesa, 1999). Las larvas pasan por cuatro estadios: tres estadios zoea y un estadio megalopa, que no ingieren alimento, sino que se nutren de sus propias reservas (Lovrich & Tapella, 2014).

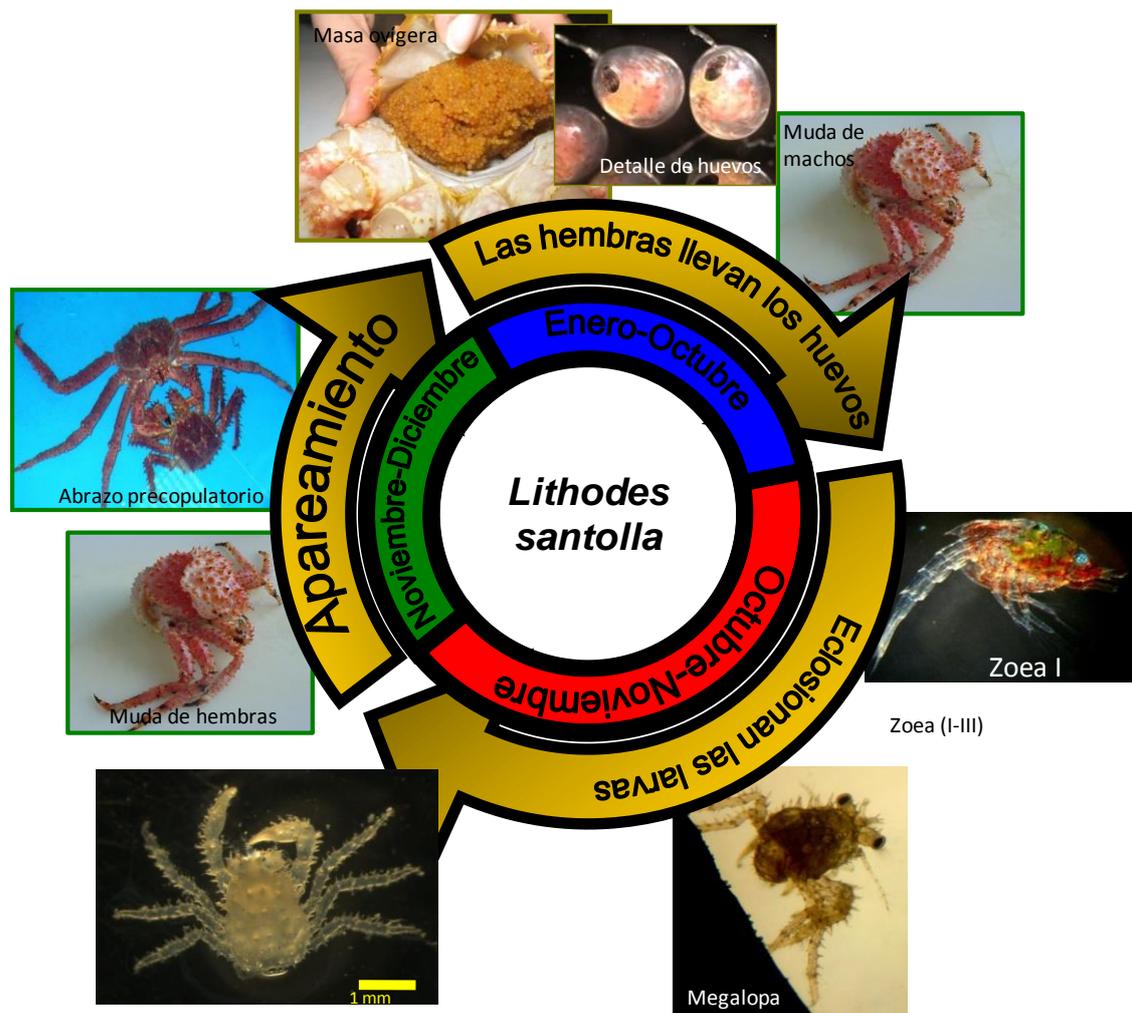


Figura 1.3. Ciclo de vida de la centolla *Lithodes santolla* del Canal Beagle.

Durante el primer año los cangrejos mudan entre 6 y 7 veces, la cual disminuye con la edad. A partir del cuarto año de vida, las hembras comienzan a mudar anualmente ya que derivan energía al desarrollo de los ovarios. Las hembras llegan a la madurez gonadal

entre los 65 y 75 mm de largo de caparazón (LC. 5-6 años). Los machos mudan dos veces al año hasta alcanzar la madurez morfométrica a los 75,4 mm LC (4-5 años). Luego, los machos mudan anualmente, entre abril-mayo, alcanzando tamaños mayores a 130 mm LC, a partir de cuando podrían tener una muda bianual (Lovrich & Tapella, 2014). Los machos alcanzan la madurez sexual a los 5 años aproximadamente, a partir del cual se aparean y cierran el ciclo biológico.

PESCA DE CENTOLLA

Las altas concentraciones de *L. santolla* alrededor de Tierra del Fuego impulsaron su explotación comercial desde la década de 1930. Desde entonces, la pesca de la centolla ocurre en el Estrecho de Magallanes y fiordos chilenos, y en el área del Canal Beagle y Cabo de Hornos, donde los desembarques de pesca en los últimos años han alcanzado las 3.000 a 4.000 toneladas (Lovrich & Tapella, 2014).

En el sector argentino del Canal Beagle, la pesca de *L. santolla* llegó al máximo rendimiento de casi 400 tn al año en 1977. El recurso se vio sobre-explotado, cuando en la década de 1990 los desembarques se vieron reducidos a menos de 50 t por año (Lovrich & Tapella, 2014). Hasta fines de la década de 1970 la centolla se pescaba con redes de enmalle y ya en 1982 se comenzó la pesca con trampas cebadas. La pesca ha sido siempre artesanal, con embarcaciones pequeñas, de unos 10 m de eslora, que regresan a puerto al final del día de pesca (Boschi *et al.*, 1984). Esta es una pesquería mixta porque las trampas también capturan el centollón *Paralomis granulosa*, cuyos máximos desembarques coincidieron con la prohibición de la pesca de centolla, entre 1995 y 2007 (Lovrich, 1997; Lovrich & Tapella, 2014).

El manejo de la pesquería de centollas del Canal Beagle está basada en el principio de las “3S”, del inglés *sex, size, season* (sexo, tamaño y temporada). Como en otras pesquerías similares se permite el desembarque de machos solamente, a partir de una talla legal y en una temporada acotada. Hasta mediados del 2013 la pesca estuvo regida por la Ley Provincial N° 114/93 vigente desde 1994, abarcando la etapa experimental de esta tesis. La ley 114 permitía la extracción exclusiva de machos de talla legal (> 110 mm LC), e imponía una veda temporal durante la temporada de reproducción de la centolla (noviembre y diciembre), y una veda espacial en el sector del Canal Beagle comprendido

entre Punta Segunda y el límite occidental con Chile (Fig. 1.4). A partir del 2014, la pesca empezó a regirse bajo la Ley Provincial N°931, cambiando principalmente la veda temporal entre marzo y junio, periodo que coincide con la época de muda de los machos de centolla, y levantando la veda espacial en el sector cercano a Ushuaia.

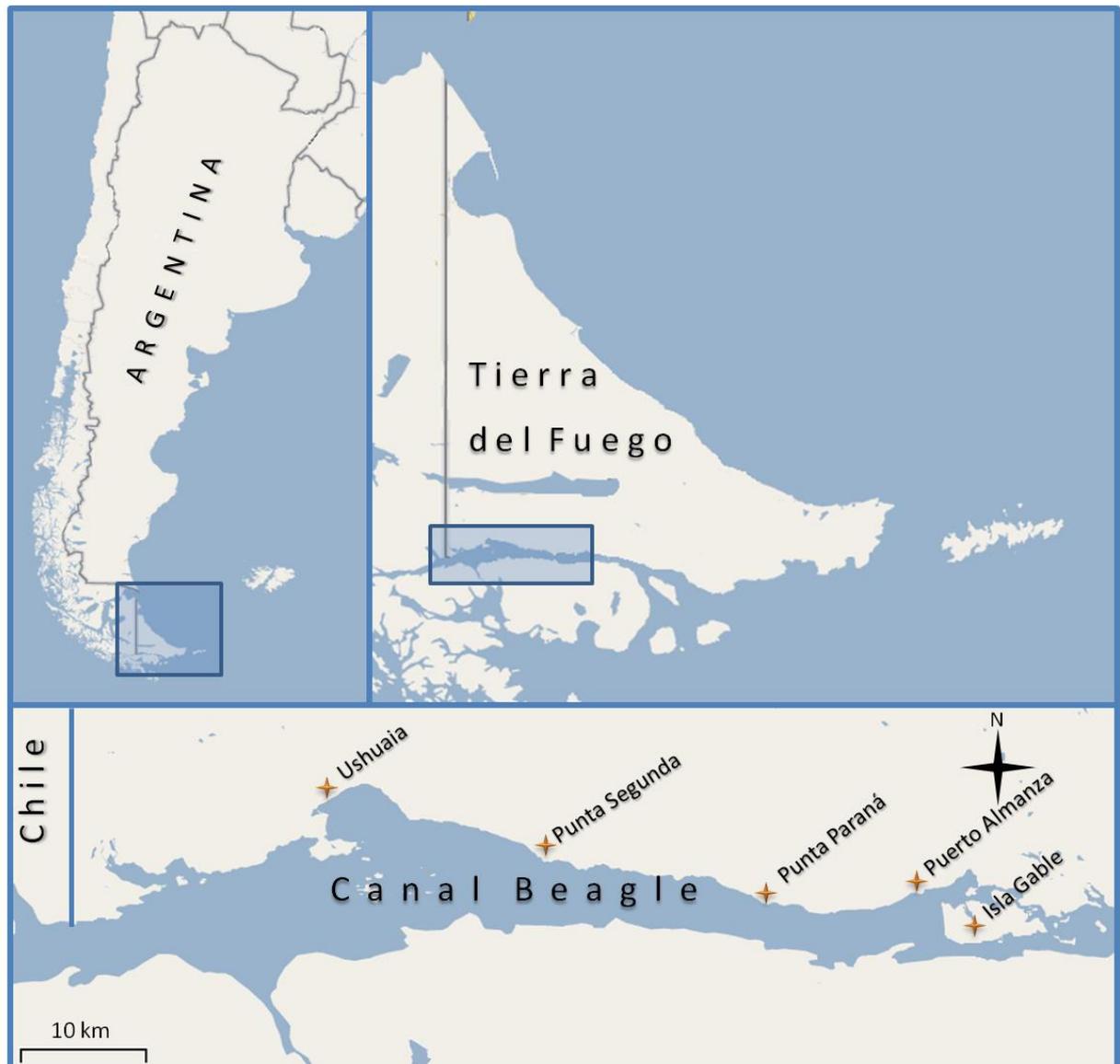


Figura 1.4. Mapa de la zona de estudio. Mapa cedido por Sotelano.

TRANSPORTE VIVO DE ANIMALES

En las últimas décadas, la pesquería en el mundo se ha enfocado en buscar nuevas maneras alternativas de comercialización del producto, siendo el transporte en vivo de animales una de ellas. Así, se garantiza desde la pesca hasta la preparación culinaria

frescura y mejor sabor del producto. Actualmente, varias especies de crustáceos comerciales son o tienen potencial a ser transportadas vivas, como por ejemplo: el langostino *Nephrops norvegicus* (Ridgway *et al.*, 2006a), la langosta *Jassus edwardsii* (Speed *et al.*, 2001), y los cangrejos *Cancer pagurus* (Barrento *et al.*, 2010) y *Paralomis granulosa* (Romero *et al.*, 2011), entre otros.

La centolla *L. santolla* también es un posible recurso a ser comercializado vivo (Urbina *et al.*, 2013). Actualmente, el producto final comercializado de la centolla del Canal Beagle se da en su mayoría como congelado o ahumado. El costo de un kilo de centolla congelada actualmente ronda los 700 pesos (unos \$US 80) para lo cual se requieren por lo menos 4-5 ejemplares comerciales, dado que el rendimiento en carne es entre el 20 y 24%. Un individuo vivo se vende a alrededor de \$200 a los restaurantes de la zona. El transporte vivo de centollas puede constituir una oportunidad para los pescadores locales de la zona del Canal Beagle a diversificar su mercado local y externo e incrementar sus ganancias sin aumentar el esfuerzo pesquero (Romero *et al.*, 2011) y también reduciendo costos de decorticado y envasado.

En el contexto del transporte vivo de animales los potenciales factores de estrés incluyen la captura, el manipuleo, daños físicos (p. ej.: pérdida de extremidades o hemolinfa), emersión, hipoxia, anoxia, cambios de temperatura y mala calidad del agua en los tanques comerciales (Barrento, 2010). Estos factores estresantes producen modificaciones en la fisiología de los crustáceos, que incluyen cambios en el consumo de oxígeno, pH de la hemolinfa y concentración de metabolitos, hormonas e iones, entre otros (Whiteley & Taylor, 1990; Ridgway *et al.*, 2006a,b; Stoner, 2012).

La industria pesquera de crustáceos vivos ha mostrado un gran interés en la posibilidad de realizar el transporte de crustáceos sin agua, ya que de esta manera la distribución puede ser extendida a lugares más lejanos, por ejemplo transportándolos en avión. Además, el principal interés se debe a razones económicas, puesto que transportar agua tiene el mismo costo que los animales (Barrento, 2010). Los efectos estresantes de la exposición aérea pueden aumentar la mortalidad (Abele *et al.*, 2007), debido a que el animal sufre una deshidratación y además causa la reducción de su peso y calidad del músculo comestible (Lorenzon *et al.*, 2013), al producirse una oxidación de tejidos que afectan el sabor de la carne (Romero *et al.*, 2007). La mortalidad de hasta un 50% ha sido asociada a factores de estrés durante el transporte en vivo, pero principalmente durante la

recuperación en los acuarios de los importadores (Barrento *et al.*, 2008). Por consiguiente, no solamente es importante que el animal sobreviva al transporte en vivo, sino que también hay que considerar si su recuperación es posible en los tanques o acuarios de reinmersión. Para poder estimar o predecir la mortalidad resultante de los diferentes factores estresantes del transporte en vivo se requiere información de las condiciones generales y vitalidad de las especies (Stoner, 2012).

OBJETIVO GENERAL

El estudio de las defensas antioxidantes de la centolla *L. santolla* es necesario para generar información básica de la especie. Por tanto, la presente tesis estudia en una primera instancia las variaciones naturales que pueden influir en las defensas antioxidantes de la centolla, específicamente las variaciones dadas por el ciclo circadiano que presenta la especie y por las fluctuaciones estacionales que se producen en el Canal Beagle. Además, se plantea estudiar los efectos de la exposición aérea en la fisiología antioxidante de la especie, y su posterior recuperación en el agua. Esta información promoverá una alternativa de comercialización a la práctica habitual, otorgándole al producto final un valor adicional. Conjuntamente, podría ayudar en el futuro en decisiones relacionadas al manejo pesquero de la centolla.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se plantea analizar en diferentes tejidos de machos comerciales de la centolla *Lithodes santolla*:

1. las variaciones diarias producidas en las actividades enzimáticas de SOD, CAT, GPx y GST; las concentraciones de AA y GSH-eq; la OP y LPO, la concentración de glucosa y el pH hemolinfático. Capítulo 3.
2. las variaciones estacionales de las actividades enzimáticas de SOD, CAT, GPx y GST, las concentraciones de AA y GSH-eq, la OP y LPO, y la concentración de glucosa, proteínas y el pH hemolinfático en diferentes tejidos de *L. santolla*. Capítulo 4.
3. la recuperación del sistema de defensas antioxidantes, los parámetros de estrés oxidativo, la concentración de glucosa y pH hemolinfático una vez reinmersos luego de 24 h de exposición aérea a 8°C. Capítulo 5.
4. el efecto de la temperatura durante la exposición aérea y posterior reinmersión en el metabolismo de defensas antioxidantes, además de las variaciones en la concentración de glucosa y proteínas totales, y en el pH hemolinfático. Capítulo 6.

HIPÓTESIS

Se proponen las siguientes hipótesis según los objetivos específicos planteados:

1. Durante un período de 24 horas los machos adultos de centollas *L. santolla* experimentarían variaciones circadianas en los sistemas de defensas antioxidantes, producto de la generación diferencial de ROS.
2. A lo largo de un período anual los machos adultos de centolla *L. santolla* experimentan variaciones en los sistemas de defensa antioxidante producto de la generación diferencial de ROS en las distintas estaciones del año.
3. Los machos adultos de centolla *L. santolla* generan un estado de estrés oxidativo durante la reperfusión, debido a la exposición aérea, y durante el período de reinmersión el sistema de defensas antioxidantes es capaz de disminuir el estrés oxidativo y recuperar el estado fisiológico basal del organismo.
4. En los machos adultos de centolla *L. santolla* el estado de estrés oxidativo durante la reperfusión y su posterior recuperación en la reinmersión son dependientes de la temperatura de exposición aérea.

La tesis que se presenta a continuación consta de siete capítulos, este primero de Introducción general, un capítulo de Materiales y Métodos generales, y luego cuatro capítulos en los que se presentan los resultados y discusiones de cada experiencia realizada, y un capítulo final con las Consideraciones Finales del trabajo.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El Canal Beagle se encuentra en el extremo austral de Sudamérica (55°S) conectando el extremo sur de los océanos Pacífico y Atlántico (Fig. 1.4). Las costas corresponden a la Isla Grande de Tierra del Fuego al norte, y a las Islas Hoste y Navarino hacia el sur (Isla *et al.*, 1999). El Canal Beagle se extiende en una dirección O-E por aproximadamente 300 km (Colizza, 1991), y sus profundidades varían aumentando de Este a Oeste, alcanzando 250-300 m en los lugares más profundos (Balestrini *et al.*, 1998).

En general, el fondo del Canal se caracteriza por presentar, en los sectores de aguas someras, arena gruesa y conchillas, mientras que es de fango o fango arenoso en los sectores con más profundidad (Brambati *et al.*, 1991). Los afloramientos rocosos en aguas someras de menos de 30 m de profundidad están cubiertos por bosques de macroalga *Macrocystis pyrifera* (conocido como cachiyuyo). Este ambiente es particular por la presencia del bosque ya que genera protección, aumenta la diversidad faunística y brinda un hábitat propicio para *Lithodes santolla* (Tapella & Lovrich, 2006).

El clima de Tierra del Fuego carece de influencia continental. En la región del Canal Beagle el clima es templado húmedo oceánico. La temperatura media del aire en Ushuaia es de 5,9°C, sin verano térmico y con posibilidad de ocurrencias de nevadas durante todo el año (Isla *et al.*, 1999). La temperatura del agua de mar del Canal Beagle presenta una estacionalidad bien definida. Las temperaturas mínimas se alcanzan durante los meses de junio a septiembre, mientras que las más elevadas se encuentran entre diciembre y marzo (Balestrini *et al.*, 1998; Curelovich *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2011; Giarratano *et al.*, 2011) (Fig. 2.1). Las temperaturas en el Canal Beagle a 25 m de profundidad varían en promedio entre 5,4°C en agosto y 9,8°C en marzo (Lovrich, 1999).

La precipitación anual presenta un marcado gradiente decreciente de oeste a este, con valores anuales de 534,7 mm en Ushuaia (Iturraspe *et al.*, 1989). Las máximas precipitaciones se registran entre los meses de marzo y junio (Isla *et al.*, 1999).

El agua de mar del Canal Beagle se diferencia del agua oceánica principalmente por presentar valores de salinidad más bajos, que no superan las 34 ups (unidades prácticas de salinidad). Esto se debe al gran aporte de aguas continentales producto del alto índice de precipitaciones que se acumula como nieve y deshielo que caracterizan a la región (Balestrini *et al.*, 1998). La salinidad a 25 m de profundidad varía entre 27,0 y 31,2 ups en

diciembre y noviembre respectivamente, mientras que la salinidad promedio anual es de 29,4 ups (Lovrich, 1999).

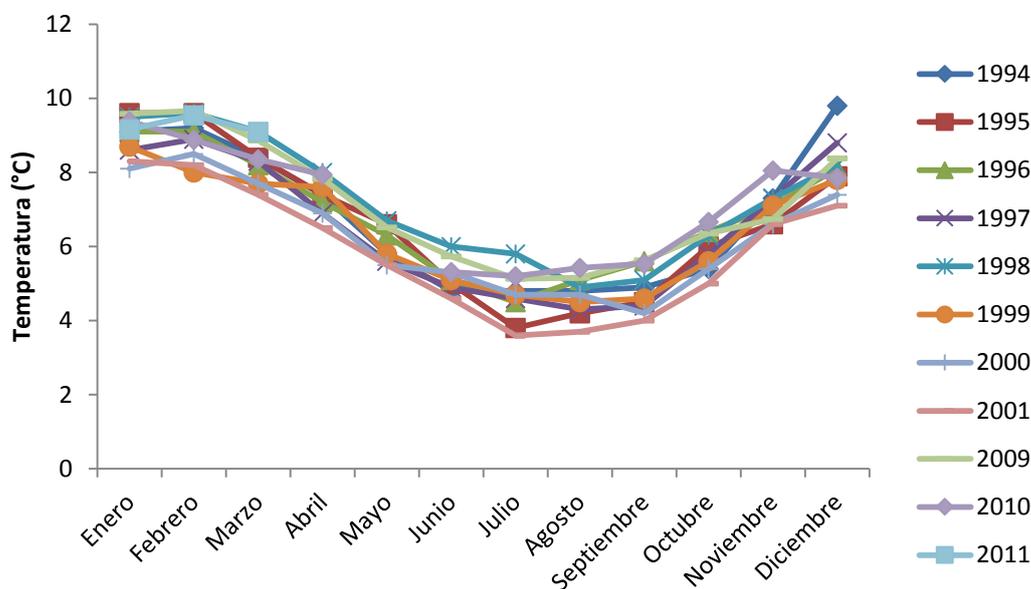


Figura 2.1. Temperatura del agua del Canal Beagle desde 1994 a 2001, y 2009 al 2011. Fuente de datos: Servicio Centralizado de Documentación –CADIC (1994-2001) y Curelovich (2013) (2009-2011).

En el Canal Beagle los vientos predominantes son del sudoeste, con una frecuencia anual de 23,6% y velocidad media de 31 km h^{-1} (Iturraspe *et al.*, 1989). La velocidad máxima del viento coincide con la época de deshielo, entre septiembre y diciembre, favoreciendo la mezcla de agua en el Canal. Sin embargo, por la estratificación de sus aguas el Canal Beagle presenta características estuarinas (Isla *et al.*, 1999).

El canal presenta un régimen de mareas micromareal y semidiurno con desigualdades diurnas. La amplitud media de la marea en Bahía Ushuaia es de 1,1 m (Isla *et al.*, 1999). Las corrientes de mareas medidas confirman valores máximos de 32 cm s^{-1} (Balestrini *et al.*, 1998). La corriente predominante es del sudoeste y su intensidad varía entre $2,6$ y $15,6 \text{ cm s}^{-1}$ (Balestrini *et al.*, 1998).

OBTENCIÓN DE LOS ANIMALES

La obtención de machos adultos de *L. santolla* fue realizada en el Canal Beagle sobre el área cercana a Península Ushuaia, en las inmediaciones de la ciudad de Ushuaia. La captura de animales se realizó con trampas de tipo cono truncado a una profundidad entre 25 y 40 m (Fig. 2.2), y se usó grasa de carne vacuna como cebo. Una vez los animales en cubierta, se seleccionaron los machos adultos legales ($LC > 110$ mm), mientras que las hembras y machos de tamaño no-comercial se devolvieron al agua. Luego los animales se transportaron hasta las instalaciones del CADIC (Centro Austral de Investigaciones Científicas) y se los ubicó en acuarios para la aclimatación al sistema de trabajo por lo menos por dos semanas.

Además, de no obtener la cantidad de animales necesarios para las experiencias, se procedió a la compra de los mismos a pescadores artesanales locales. Estos animales se capturaron con un sistema de trampas similar al descrito anteriormente. Los animales una vez en el CADIC se aclimataron en el sistema de acuarios.



Figura 2.2. Pesca de centolla realizada a bordo de la embarcación de CADIC, Don Pedro, en el Canal Beagle. En la misma se observa una de las trampas típicas en las cuales se realiza la pesca artesanal. Foto cedida por Gowland.

SISTEMA DE ACUARIOS

El sistema de acuarios del laboratorio consiste en un sistema de recirculación cerrado de 2.700 L de agua de mar (Fig. 2.3). El tanque de circulación está conectado a una bomba eléctrica, haciendo pasar el agua por un dispositivo enfriador/calentador que mantiene la temperatura del agua a $8 \pm 1^\circ\text{C}$. El sistema cuenta con un sistema de filtros biológicos en el que se desarrollan las bacterias aeróbicas que procesan compuestos nitrogenados de manera de mantener las concentraciones de amonio (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) dentro de niveles que no resulten tóxicos para los animales. Además, el sistema también presenta un filtro físico de $50 \mu\text{m}$ y un filtro UV. Este último esteriliza el agua al eliminar bacterias y algas en el agua.

Los acuarios individuales consistían en acuarios de plástico de 25 L, de 30 x 40 x 30 cm de ancho x largo x alto. Los animales fueron alimentados con calamar descongelado cada dos días, y 48 horas previo a las experiencias se suspendió la provisión de alimentos. Diariamente se realizó la extracción de heces y restos de comida, mediante sifón. Las exposiciones aéreas, descritas en los Cap. 5 y 6, se realizaron en cámara fría bajo temperatura controlada (Fig. 2.3-B).

Cada 3-4 días se realizaron determinaciones de pH, salinidad, amonio, nitrito y nitrato del agua. Si alguno de los parámetros resultaba fuera del rango, se procedía a un cambio parcial del agua en circulación con agua de reserva, de manera de mantener los parámetros similares a los del agua de mar del Canal Beagle. De esta manera, el agua del sistema de acuarios se mantuvo siempre en condiciones óptimas de pH, salinidad, amonio total, nitritos y nitratos:

pH ≈ 8

Salinidad ≈ 34

Amonio total ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) $< 0,25 \text{ mg/L}$

Nitrito (NO_2^-) $< 0,8 \text{ mg/L}$

Nitrato (NO_3^-) $< 12,5 \text{ mg/L}$



Figura 2.3. Sistema de acuarios de trabajo donde se realizaba la aclimatación y reperusión (A). Cámara fría donde se realizaba la exposición aérea a una temperatura controlada (B). Acuarios individuales donde se ubicaban las centollas (C).

OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Luego de finalizar cada tratamiento o muestreo correspondiente, se tomaron muestras de hemolinfa (HL) de la vía del seno ventral por la membrana articular en la base del 4^{to} pereiópodo. Para esto se utilizaron jeringas de plástico descartables de 10 mL y agujas 0,8 x 40 mm. Se midió el pH de la hemolinfa (1 mL), y por otro lado se tomaron dos sub-muestras de 1 mL cada una. Las sub-muestras se transfirieron a tubos de 2 mL que contenían 1 mL de buffer de TRIS-HCl (pH 6,8; 125 mM TRIS, 1 mM 2 mercaptoetanol, y 0,1 mM PMSF) en hielo. El buffer TRIS-HCl se usó para evitar la coagulación de la HL, de acuerdo a Vijayavel et al. (2004). Luego se tomaron las muestras correspondientes a los tejidos de branquias (Br), músculo (Mc) y hepatopáncreas (HP). Se extrajo la 7^{ma} branquia entera, luego se tomaron muestras de hepatopáncreas y por último se tomó muestra del músculo del merepodito del 4^{to} pereiópodo. Los tejidos se llevaron inmediatamente a -

20°C y luego tratados para su conservación para la determinación de los parámetros bioquímicos. En una primera instancia, los tejidos se conservaron en un congelador de -80°C hasta ser analizados. Este fue el caso de las muestras correspondientes al estudio de ciclo circadiano (Cap. 3). Debido al mal funcionamiento del congelador de -80°C, se prosiguió a liofilizar todos los tejidos correspondientes a los estudios de variaciones estacionales (Cap. 4) y de reperfusión (Cap. 5 y 6) para su conservación, excepto de hemolinfa. Las muestras de hemolinfa se mantuvieron a -20°C y se analizaron dentro de la semana posterior a la toma de muestras, tiempo en el que no se produce descomposición de proteínas y lípidos. La liofilización de las muestras se realizó en un Liofilizador LT-8 (RIFICOR) a -57°C y entre 0,3 y 0,5 mm de Hg. Se registró el peso de las muestras de tejido previo (peso tejido húmedo) y al finalizar el proceso de liofilización (peso tejido seco). Para los análisis químicos en los tejidos que se analizaron en este trabajo, no se encontraron diferencias entre los tejidos liofilizados y aquellos mantenidos a -80°C a partir de pruebas comparativas que se realizaron previamente.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible GBC Cintra 10e Spectrophotometer. Las enzimas usadas en las determinaciones enzimáticas eran Sigma-Aldrich, los solventes y ácidos usados eran Cicarelli, y los compuestos usados para los buffers eran Anedra. Todos los químicos eran de calidad pro-analítica.

HOMOGENIZACIÓN

La homogenización se realizó con buffer TRIS-HCl (pH 6,8; 125 mM TRIS, 1 mM 2 mercaptoetanol, y 0,1 mM PMSF). Las muestras de tejidos congeladas a -80°C, se pesaron en frío (0,3 g de músculo o branquias, y 0,15 g de hepatopáncreas) y se adicionó 1,5 mL de buffer TRIS-HCl frío. Mientras que para las muestras de tejidos liofilizados, el preparado de los homogenatos se realizó a partir de una relación de tejido húmedo: buffer de 1:6 para branquias y músculo, y de 1:11 para hepatopáncreas. De esta manera se mantuvo la relación tejido:buffer usados para los tejidos no-liofilizados, teniendo en cuenta la deshidratación del tejido que pierde aproximadamente el 80% del peso en agua.

Todas las muestras se homogenizaron a mano y en frío con homogenizadores tipo teflón-vidrio. Luego se centrifugaron a 11.000 $\times g$ a 4°C por 15 minutos, y se utilizó el sobrenadante para realizar las mediciones de los parámetros bioquímicos.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración total de proteínas se realizó con el método de Lowry et al. (1951). La técnica consta del agregado a una alícuota de 10 μL de muestra, 790 μL de agua destilada y 2 ml de una mezcla de carbonato de sodio (Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 M), sulfato de cobre (Cu_2SO_4 1%) y tartrato de sodio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$, 2%) en una relación 100:1:1. La mezcla se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se agregaron 200 μL de reactivo Folin-Cicolteau diluido (1:3). Luego de 30 minutos, se leyó la absorbancia a 625 nm. Se realizó una curva de calibración en cada determinación usando albúmina bovina como estándar.

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

La concentración de glucosa en las muestras se realizó con un kit comercial de Wiener Lab. Este se basa en un método enzimático en el cual actúan la glucosa oxidasa, la peroxidasa y la 4-aminofenazona en un buffer fosfato 100 mM, pH 7,0. Se agregó 1 mL de la mezcla de reactivos a 10 μL de muestra, se incubó la mezcla por 5 minutos a 37°C, y se leyó la absorbancia a 505 nm. Se realizó siempre un blanco de muestra, y se utilizó glucosa como estándar.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las actividades enzimáticas determinadas fueron de las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-S-transferasa (GST).

SUPERÓXIDO DISMUTASA

La actividad de superóxido dismutasa se define en términos de su habilidad para inhibir un sistema de detección que reacciona con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). En el método de ensayo utilizado (McCord & Fridovich, 1969), se genera $O_2^{\cdot-}$ a partir de la reacción de xantina y xantina oxidasa, y se lo hace reaccionar con una molécula detectora (citocromo c), produciéndose la reducción del citocromo c. Se mide en espectrofotómetro a 550 nm. La enzima SOD inhibe esta reacción por remoción del $O_2^{\cdot-}$. En una cubeta que contiene xantina 50 μ M, xantina oxidasa 6 nM, y citocromo c 20 μ M en un buffer fosfato (50 mM, pH 7,8- EDTA 0,1 mM), se observa la inhibición de la reacción por 90 segundos a 30°C. Se analizó la inhibición con tres alícuotas de muestra (10, 20 y 30 μ L), para expresar las unidades SOD (USOD) como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reducción del citocromo c por el anión superóxido a 30°C.

CATALASA

La actividad de catalasa fue determinada por medio de la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno (Aebi, 1984). La mezcla de reacción contiene 30 mM de H_2O_2 y 50 mM de buffer de fosfato (pH 7,0). Se agrega a esta mezcla de reacción 20 μ L de homogenato, y se determina la cinética de consumo de H_2O_2 por 2 min a 240 nm ($\epsilon_{240} = 4,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad enzimática se calcula en unidades enzimáticas (U), donde 1 U equivale al consumo de 1 μ mol de sustrato consumido por minuto. La misma se expresa como mUCAT \cdot mg proteína⁻¹ a lo largo de la tesis.

GLUTATIÓN PEROXIDASA

La cinética de glutatión peroxidasa se determinó midiendo la velocidad por el que 0,2 mM de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) disminuye, en un sistema conteniendo 1 mM de glutatión reducido (GSH) en presencia de glutatión reductasa. Las determinaciones se realizaron con 20 μ L de muestra de músculo, hepatopáncreas o branquias, ó 30 μ L de hemolinfa, en un buffer con EDTA 2mM, azida 1 mM y buffer TRIS-HCl 50 mM, pH 7,6. Las lecturas de absorbancia se realizan a 340 nm por 2 minutos ($\epsilon_{340} = 6,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Flohé and Gunzler, 1984). La actividad enzimática se

expresa como $\text{mUGPx} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, donde 1 mU equivale a 1 nmol de sustrato consumido por minuto.

GPx se determinó principalmente en branquias y músculo de *L. santolla*, puesto que por problemas técnicos, pérdida de muestras o falta de reactivos, la actividad en hepatopáncreas y hemolinfa no pudo ser determinada en todas las experiencias.

GLUTATIÓN TRANSFERASA

La determinación de glutatión transferasa se llevó a cabo utilizando el reactivo 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), que en presencia de glutatión forma GS-dinitro benceno (GS-DNB), que absorbe a 340 nm ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - Habig et al., 1974). La reacción se produce en buffer fosfato 100 mM, pH 6,5 a 25°C, con 50 μL de homogenato, 1 mM de glutatión reducido y 1mM de CDNB. Se registró la absorbancia por 2 min, y luego se procedió al cálculo cinético. La actividad de esta enzima se expresa como $\text{UGST} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, donde 1 U es equivalente a 1 μmol de producto formado por minuto.

ANTIOXIDANTES NO-ENZIMÁTICOS

GLUTATIÓN ($\text{GSH-EQ} = 2 \text{ GSH} + \text{GSSG}$)

La técnica descrita por Beutler et al. (1963) consta de la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) con glutatión reducido, generando glutatión oxidado (GSSG) y 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A partir de esta técnica, se realiza la determinación de tioles de bajo peso molecular, y la mayor cantidad de tioles de bajo peso molecular en eucariotas es el glutatión (Manduzio *et al.*, 2005). Además, esta técnica determina el glutatión total ya que reduce todo el glutatión oxidado (GSSG) y solamente detecta el glutatión reducido (GSH), y no discrimina entre ambos compuestos. Por estas razones, a lo largo de la presente tesis se utiliza esta determinación como un estimativo de la concentración de glutatión (GSH-eq) en sus dos formas –reducida y oxidada- (Lushchak *et al.*, 2005).

Las muestras se pre-trataron para descartar el contenido proteico que podría interferir en las mediciones. Para esto, se agregó a una alícuota de 100 μL de muestra homogenizada, 30 μL de HClO_4 2 M, pasando por vortex y centrifugando luego a 10.000

yg durante 10 minutos a 4°C. Luego, al sobrenadante se le adicionó 30 µL de KOH 2 M, y nuevamente se centrifugó a 10.000 yg por 2 minutos a 4°C. Se utilizó el sobrenadante para la determinación de la concentración de GSH-eq.

La cuantificación de GSH-eq se realizó en un buffer fosfato 100 mM, pH 7, con 1 mM de EDTA. Además, se agregaron 20 µL DTNB 0,5 %p/V, 50 µL NADPH 4 mg/mL, 20 µL GR 6 U/mL y 30 µL de muestra. Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 412 nm por 2 minutos. Siempre se trabajó con un blanco de muestra y un estándar en el cual la alícuota de muestra era reemplazada por 50 µL de GSSG 10 µM. La concentración de GSH-eq se expresa en µmol GSH • mg proteína⁻¹.

La concentración de GSH-eq se determinó en músculo y branquias, ya que las pruebas preliminares con muestras de hepatopáncreas y de hemolinfa no fueron exitosas, resultando en pendientes cinéticas menores al blanco.

ÁCIDO ASCÓRBICO

La concentración de ácido ascórbico (AA) se realizó según el método de Mitsui y Ohta (1961), descrito por Paital y Chainy (2010). Previo a la determinación del AA, se procedió a la extracción de proteínas de una alícuota de muestra de 300 µL con 300 µL de TCA 5% p/V, y se centrifugó a 10.000 yg durante 10 minutos a 4°C, descartando el pellet.

Para la determinación de AA se tomó una alícuota del sobrenadante y se mezcló con molibdato de sodio 0,66% p/V, ácido sulfúrico 0,025 M y fosfato de sodio 25 µM. Esta mezcla de reacción se calentó a baño maría por 40 min a 60°C. Luego se enfrió y centrifugó a 8.000 yg durante 5 minutos. Se determinó la concentración leyendo la absorbancia del sobrenadante a 660 nm. Se utilizó ácido ascórbico como estándar para la curva de calibración. Los datos se presentan en ng AA • g tejido húmedo⁻¹.

DAÑO OXIDATIVO

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS (LPO)

Las reacciones en cadena que ocurren durante la oxidación de lípidos generan hidroperóxidos, que se descomponen en varios productos secundarios como malonaldehído

y cetonas, entre otras. Estos compuestos reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH ácido y temperaturas elevadas, generando un complejo rosa fluorescente (Hermes-Lima, 2004).

El método de determinación utilizado se basa en la formación de una base de Schiff que absorbe a 535 nm, de acuerdo a la técnica propuesta por Ohkawa et al. (1979). A 250 μL de muestra se adicionó 1 mL de una mezcla de reactivos formado por ácido tricloroacético (TCA) al 15 % p/V, TBA al 0,375 % p/V, butilhidroxitolueno (BHT) 0,7 mM. La mezcla se calentó a 95- 100°C durante 60 minutos, y luego se enfrió en hielo durante 5 minutos. Luego, la mezcla se centrifugó a 4.300 xg por 10 minutos, y se midió la absorbancia a 535 nm. Los cálculos de concentración se realizaron teniendo en cuenta $\epsilon_{535} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y son expresados en $\mu\text{mol} \cdot \text{g tejido húmedo}^{-1}$.

OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS (OP)

Los derivados carbonilo de las proteínas son un producto de importancia en el ataque de radicales de oxígeno a proteínas. Los carbonilos de proteínas también se pueden formar a partir de la reacción de proteínas con aldehídos generados en la peroxidación de lípidos y en la oxidación de azúcares. La determinación de carbonilos en proteínas es un biomarcador de estrés oxidativo ampliamente aceptado (Hermes-Lima, 2004; Lushchak, 2011).

El método espectrofotométrico usado para medir el daño oxidativo en proteínas se basa en la reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) con los carbonilos proteicos para formar derivados de la hidrazona proteicos (Reznick & Packer, 1994). A 500 μL de muestra se adicionaron 500 μL de DNPH en HCl (2,5 M), y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, con agitación en vortex cada 15 minutos. Luego, se agregaron 500 μL de TCA (30 %p/V) y se colocaron en hielo durante 10 minutos para realizar el precipitado de la reacción. El mismo se centrifugó a 11.000 xg durante 15 minutos. Se conservó el pellet, descartando el sobrenadante. Se realizó un lavado del pellet con etanol: acetato de etilo (1:1), y se procedió a centrifugar por 15 minutos a 11.000 xg . Esta operación se realizó tres veces. Nuevamente, se descartó el sobrenadante, y se disolvió el pellet en urea (6 M, pH 2,5) a 37°C por 60 minutos. La mezcla se centrifugó a 11.000 xg por 5 minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 375 nm. Además, se realizó un

blanco de reactivos (DNPH) con 500 μL de muestra y 500 μL de HCl 2,5 M, al cual se le realizó el mismo tratamiento descrito. La concentración de carbonilos se expresa en $\text{nmol carbonilo} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

CAPÍTULO 3

VARIACIONES DIARIAS DEL SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE *LITHODES* *SANTOLLA*

INTRODUCCIÓN

Los ritmos biológicos son un componente fundamental en todos los organismos, y están presentes en todo el espectro taxonómico (excepto algunos procariotas), lo cual sugiere su importancia en la optimización y adaptación del organismo al ambiente (Sani *et al.*, 2006). La presencia de ritmos no es simplemente una respuesta a los cambios físicos impuestos por el ambiente, sino que existe un sistema interno de los seres vivos capaz de controlar estos tiempos (Takahashi *et al.*, 2001). Los relojes biológicos son mecanismos internos y autónomos que permiten al organismo adaptarse a ritmos externos de luz, temperatura y otros factores ambientales (Wijnen & Young, 2006). De esta manera, los organismos pueden predecir y prepararse con anticipación ante estos cambios de los factores ambientales (Takahashi *et al.*, 2001). Así, el animal adapta, tanto su comportamiento como su fisiología, de manera que exista una sincronización entre el organismo y el ambiente externo.

Los ritmos circadianos están usualmente sincronizados con los cambios cíclicos de luz/oscuridad y/o temperaturas (Koukkari & Sothorn, 2006). Los estudios realizados en animales resaltan la importancia de los relojes circadianos para la reproducción y supervivencia de los mismos en la naturaleza (Wijnen & Young, 2006). Particularmente en crustáceos, la ritmicidad involucra casi todas sus facetas biológicas, que comprende desde aspectos del desarrollo, la fisiología, hasta aspectos sensoriales y comportamentales (Strauss & Dirksen, 2010). En especial se incluyen aquellos aspectos sincronizados rítmicamente con el fotoperíodo como la actividad locomotora, la muda y la reproducción. Las actividades rítmicas pueden ahorrar energía durante la actividad locomotora o reproductiva, pero también puede exponer al animal a una situación de vulnerabilidad y estrés extremo, como ser durante la muda (Strauss & Dirksen, 2010). Por otro lado, los patrones de actividad circadianos podrían ser útiles para separar mecanismos con especies simpátricas, por ejemplo, aquellos que usan recursos alimenticios idénticos que demandan o constituyen nichos temporales, por lo que se reduce la competencia para recursos limitados (Collins, 2005). Las variaciones temporales dadas por las oscilaciones circadianas son evidentes en varias funciones celulares, p. ej.: expresión genética, tasas de flujos metabólicas, y concentración de señales moleculares (Coto-Montes *et al.*, 2001; Hardeland *et al.*, 2003; Krishnan *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2010).

El tiempo que se requiere para repetir un ritmo cíclico se define como un período, característica empleada para categorizar a los ritmos en tres grupos: circadiano (20-28 h), ultradiano (< 20 h), e infradiano (> 28 h) (Takahashi *et al.*, 2001; Koukkari & Sothorn, 2006). Además, factores cíclicos como las mareas también influyen en la fisiología de algunas especies, y se deben tener en cuenta también los ciclos fisiológicos que pueden existir en aquellos que habitan, por ejemplo, en el intermareal (Maciel *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista matemático, los ritmos biológicos presentan un comportamiento sinusoidal, donde generalmente se ajustan a un modelo de coseno o seno. De esta manera se introducen otros conceptos que describen un ritmo biológico, como los de amplitud y fase. La magnitud de una variable desde su línea de base, en general representada por su media, al pico de esa magnitud se denomina amplitud (Fig. 3.1.). Para indicar la presencia de un ritmo, se debe detectar una amplitud (Koukkari & Sothorn, 2006; Fernández *et al.*, 2009). Otra característica que describe un ritmo es la fase, la cual puede ser visualizada como un estado instantáneo repetitivo en un ciclo. Cuando se cuantifica un ritmo a partir de una función coseno, se suele emplear el término acrofase, usado para designar la distancia en tiempo del pico (=acro) de la curva matemática a un punto de referencia arbitrario (p. ej. medianoche, tiempo del encendido de luz, etc. Fig. 3.1.). Asimismo, el menor punto del coseno ajustado se denomina batifase (Koukkari & Sothorn, 2006; Fernández *et al.*, 2009).

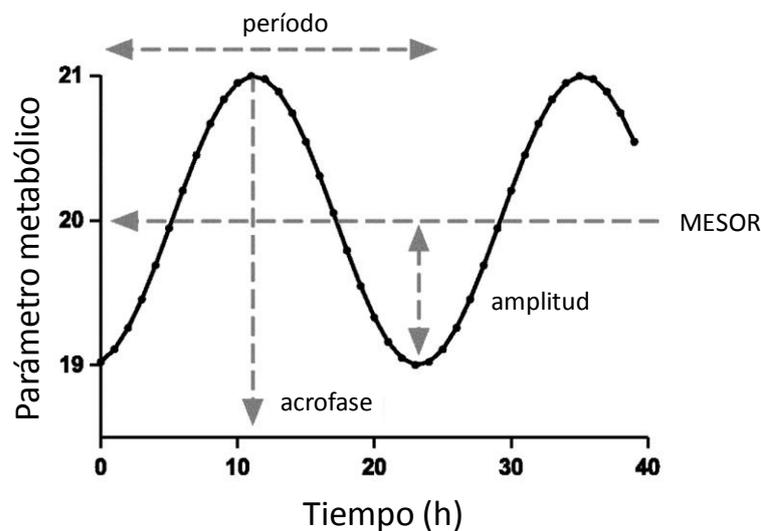


Figura 3.1. Ilustración gráfica de los parámetros circadianos analizados por cosinor. Adaptado de Hsueh *et al.* (2013).

La organización circadiana inevitablemente trae aparejada la formación de radicales libres, y otros oxidantes potencialmente dañinos (Hardeland *et al.*, 2010). Como se ha mencionado previamente, existen varias reacciones metabólicas que generan radicales en la célula, como ser en la cadena de transporte de electrones, ya sea mitocondrial, microsomal o plastidial. Entonces, la ritmicidad en la formación de radicales, podría estar relacionada al consumo de oxígeno, que a su vez depende de los ritmos circadianos de la actividad locomotora (Hardeland *et al.*, 2010). Ante los cambios periódicos de las ROS los organismos vivos mantienen el balance de la concentración de ROS de manera rítmica utilizando el sistema de defensas antioxidantes (Hardeland *et al.*, 2003). Estudios en la actividad de CAT en ratones *Mus musculus* han demostrado la existencia de cambios en la actividad enzimática relacionados con el tiempo a lo largo de un período de 24 horas (Sani *et al.*, 2006). Además, en ratas albinas, las variaciones diarias en actividades enzimáticas de GPx, CAT y glutatión son influenciadas por concentraciones fisiológicas de melatonina (Baydas *et al.*, 2002), compuesto clave en la regulación de ritmos biológicos en varios animales (Maciel *et al.*, 2010). Es así que, la influencia del ritmo circadiano en la formación de ROS, la eliminación y probablemente también en evitar la sobreproducción del mismo, sugiere una adaptación particular de anticipación programada temporal (Hardeland *et al.*, 2003). La organización circadiana de las enzimas antioxidantes, aun presentando una baja amplitud rítmica, es importante a tal punto que un disturbio en esta organización genera un estado de estrés oxidativo, como ocurre en la mosca *Drosophila melanogaster* (Krishnan *et al.*, 2008). Particularmente en crustáceos, se han realizado estudios de ritmos en los camarones *Procambarus clarkii* y *P. digueti* (Castañon-Cervantes, Battelle, & Fanjul-Moles, 1999; Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011; Fanjul-Moles & Prieto-Sagredo, 2003; Fanjul-Moles *et al.*, 2009), y en el cangrejo estuarino *Neohelice granulata* (Vargas *et al.*, 2010). En todas estas especies se evidenció la influencia de variaciones diarias en sus sistemas de defensas antioxidantes.

Por lo expuesto anteriormente, en este capítulo se plantea analizar en diferentes tejidos de la centolla *Lithodes santolla* las variaciones diarias producidas en: (1) las actividades enzimáticas de SOD, CAT, GPx y GST; (2) las concentraciones de AA y GSH-eq; (3) la OP y LPO, (4) la concentración de glucosa y (5) el pH hemolinfático.

MATERIALES Y MÉTODOS

EXPERIMENTACIÓN

En agosto de 2010 se capturaron 48 machos de centolla *Lithodes santolla* de 119 ± 15 mm de LC y 1.260 ± 460 g de peso total, todos en estado de intermuda. Los animales fueron aclimatados durante tres semanas en las condiciones descritas en el Cap. 2, y alimentados con calamar cada dos días. El fotoperíodo fue de 12:12 horas de luz:oscuridad, con el encendido de luz a las 8 h. Las condiciones de fotoperíodo en las que se trabajó se asemejaban al período de luz natural en el Canal Beagle para esa estación del año.

Los animales se separaron aleatoriamente en 6 grupos, de 8 cada uno. Durante un período de 24 horas, se disecó un grupo de centollas cada 4 horas (a las 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h y 4 h). Se tomaron muestras de hemolinfa, hepatopáncreas, branquias y músculo. Particularmente, de las muestras de hemolinfa se tomaron sub-muestras para realizar las mediciones de pH en el momento, y luego el resto de la muestra se mezcló con buffer TRIS-HCl (pH 6,8; 125 mM TRIS, 1 mM 2 mercaptoetanol, y 0,1 mM PMSF) en frío para evitar la coagulación. Todas las muestras de órganos y tejidos se resguardaron en un congelador a -80°C para la subsiguiente determinación de los parámetros de defensas antioxidantes y daño oxidativo.

Se determinaron las actividades enzimáticas de SOD, CAT y GST en todos los tejidos. La actividad de GPx fue determinada únicamente en los tejidos de branquias y músculo. Las determinaciones enzimáticas y el resto de los parámetros bioquímicos analizados se realizaron como se describen en el Cap. 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para probar la existencia de diferencias en los parámetros bioquímicos analizados entre los distintos tiempos se procedió a un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Previamente, se comprobaron las condiciones de normalidad y homogeneidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilks y de Levene, respectivamente (Sokal & Rohlf, 1995). Si los criterios de normalidad u homogeneidad no se cumplían, los datos se transformaron logarítmicamente o elevándolos al cuadrado. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) se compararon usando pruebas *post-hoc* de Tukey. Si luego de las

transformaciones, los datos aún no cumplían con las condiciones de ANOVA, los mismos se analizaron por la prueba no paramétrica de una vía de Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf, 1995). Los valores son presentados como promedio \pm desvío estándar.

ANÁLISIS DE COSINOR

La existencia de ciclos circadianos se verificó analizando los datos con el modelo Cosinor, usado comúnmente en estudios de cronobiología (Fanjul-Moles *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2009). Sobre la base de un período de tiempo (τ), el análisis de datos cosinor ajusta a una función sinusoidal y proporciona una prueba objetiva de si la amplitud del ritmo difiere de cero, es decir, si el ritmo es validado estadísticamente para un supuesto τ .

$$f(t) = M + A \cos(\omega \tau + \varphi)$$

Ecuación Cosinor, donde M = mesor, A = amplitud, ω = frecuencia angular, τ = período de tiempo y φ = acrofase.

Este método provee estimadores descriptivos para un número de diferentes parámetros de ritmicidad, acrofase, mesor y amplitud. La acrofase es el tiempo en el que se encuentra la cresta de la onda, de acuerdo a la función matemática mejor ajustada. El mesor es el valor en el que la oscilación ocurre, y cuando los intervalos de tiempo entre el muestreo de datos es constante el mismo equivale a la media aritmética de la oscilación rítmica (Castañon-Cervantes *et al.*, 1999). En esta tesis, el mesor corresponde a la media aritmética de la oscilación rítmica de los parámetros analizados dentro de las 24 horas. El período es la duración de un ciclo completo de la oscilación y se expresa en unidades de tiempo. En el método de Cosinor, la amplitud es igual a la mitad de la diferencia entre el mayor y menor valor de la oscilación. La prueba de Cosinor permite corroborar objetivamente la hipótesis de que la amplitud del ritmo difiere de cero usando diferentes grados de períodos (Fernández *et al.*, 2009).

Para el análisis Cosinor de los datos se utilizó Cosinor Periodogram (Refinetti, 2007), en el que se probaron períodos entre 10 y 27 horas. Si la amplitud no difería de cero en cualquiera de los períodos probados, no se calculó ningún parámetro rítmico (mesor, acrofase y amplitud). De obtener más de un período significativo, aquel que correspondía a

una mayor amplitud y menor error (p) era considerado como el dominante (Sani *et al.*, 2006).

RESULTADOS

Tanto el sistema de defensas antioxidantes como los parámetros de estrés oxidativo analizados de *L. santolla* presentan variaciones significativas a lo largo del período de 24 h estudiado. A continuación se describen los resultados encontrados por tejido.

BRANQUIAS

Este órgano fue el que mayor actividad enzimática presentó. A lo largo del ciclo de 24 h estudiado se observaron cambios significativos de las actividades de SOD ($F= 2,86$; $p < 0,05$), CAT ($F= 7,54$; $p < 0,001$) y GST ($F= 3,34$; $p < 0,001$). En general, se observó una mayor actividad enzimática durante la noche (Fig. 3.2-A). Así, la máxima actividad de SOD fue en la fase nocturna, a las 20 h y 4 h (14 ± 8 y 12 ± 3 USOD \cdot mg proteína⁻¹, respectivamente. Fig. 3.2-A); mientras que la mínima se encontró al inicio de la fase lumínica, a las 8 h (7 ± 4 USOD \cdot mg proteína⁻¹. Fig. 3.2-A). Los picos de actividad de CAT también se observaron a las 20 h y a las 4 h (11 ± 3 y 9 ± 4 mUCAT \cdot mg proteína⁻¹, respectivamente. Fig. 3.2-B); y la actividad más baja se encontró a las 0 h (4 ± 2 mUCAT \cdot mg proteína⁻¹. Fig. 3.2-B). Además, la actividad de GPx en branquias presentó un mesor de $3,2 \pm 0,1$ mUGPx \cdot mg proteína⁻¹, con un ritmo unimodal de período de 15,8 h; y la acrofase durante la noche (Tabla 3.1). Por medio de análisis estadísticos, la actividad de GPx no presentó diferencias significativas ($H= 5,7$; $p > 0,05$. Fig. 3.2-C). Sin embargo, estos resultados estarían indicando la existencia de una variación a lo largo de las 24 h, la que se ajusta a una función de cosinor.

La enzima GST presentó un pico significativo de actividad a las 4 h (13 ± 9 UGST \cdot mg proteína⁻¹. Fig. 3.2-D) y un mínimo de actividad a las 8 h (4 ± 2 UGST \cdot mg proteína⁻¹. Fig. 3.2-C). Además, GST presentó periodicidad, con la acrofase durante la noche, mostrando dos períodos rítmicos de 12 y 24 h, y la mayor amplitud entre todos los tejidos (Tabla 3.1). A las 12 h se observa también un pico de actividad, aunque no sea estadísticamente significativo, este punto se debe a la presencia de los dos períodos rítmicos encontrados a partir del modelo de cosinor.

En las branquias la concentración de glutatión no presentó diferencias significativas debido a la alta variabilidad de los resultados encontrados en el laboratorio ($H= 4,92$; $p > 0,05$). La concentración de ácido ascórbico presentó un período de 24 h, según los análisis de cosinor, con la acrofase durante la noche (Tabla 3.1), pero sin diferencias significativas por ANOVA ($F= 2,08$; $p > 0,05$, Tabla 3.2).

La peroxidación de lípidos también presentó variaciones a lo largo del ciclo de 24 h en branquias ($F= 8,3$; $p << 0,001$), con un pico de concentración de TBARS a las 0 h (Tabla 3.3), presentando un ritmo periódico de 12 y 24 h (Tabla 3.1). Por otro lado, la oxidación de proteínas fue constante a lo largo del ciclo estudiado ($0,3 \pm 0,2$ nmol carbonilo \cdot mg proteína⁻¹; $F= 1,51$; $p= 0,21$), sin presentar ritmo. La concentración de glucosa en las branquias también fue constante durante las 24 h, con un promedio de $0,06 \pm 0,04$ mg \cdot g tejido⁻¹ ($H= 0,62$; $p= 0,3$).

MÚSCULO

En músculo de *L. santolla* se observaron variaciones significativas en las actividades enzimáticas de SOD ($F= 11,9$; $p << 0,01$) y CAT ($F= 4,29$; $p < 0,01$) durante las 24 h analizadas (Figuras 3.3-A y B). Particularmente, la actividad de SOD presentó un ritmo bimodal, con períodos de 12 y 24 h (Tabla 3.1). Los picos de actividad de esta enzima se observaron en el inicio de la fase lumínica y durante la fase nocturna, y con una menor actividad al mediodía (12 h; $1,3 \pm 0,5$ USOD \cdot mg proteína⁻¹). El período de 12 h predomina sobre el de 24 h, puesto que presentó una mayor amplitud y un menor p (Tabla 3.1).

La enzima CAT mostró un pico de actividad a las 12 h (3 ± 1 mUCAT \cdot mg proteína⁻¹), y una disminución a las 0 h y al inicio de la fotofase a las 8 h ($1,9 \pm 0,9$ y $1,9 \pm 0,8$ mUCAT \cdot mg proteína⁻¹, respectivamente. Fig. 3.3-B). A partir de los análisis de cosinor, la actividad de CAT presentó un ritmo ultradiano de 12 h, con una fase máxima en la fase nocturna (Tabla 3.1).

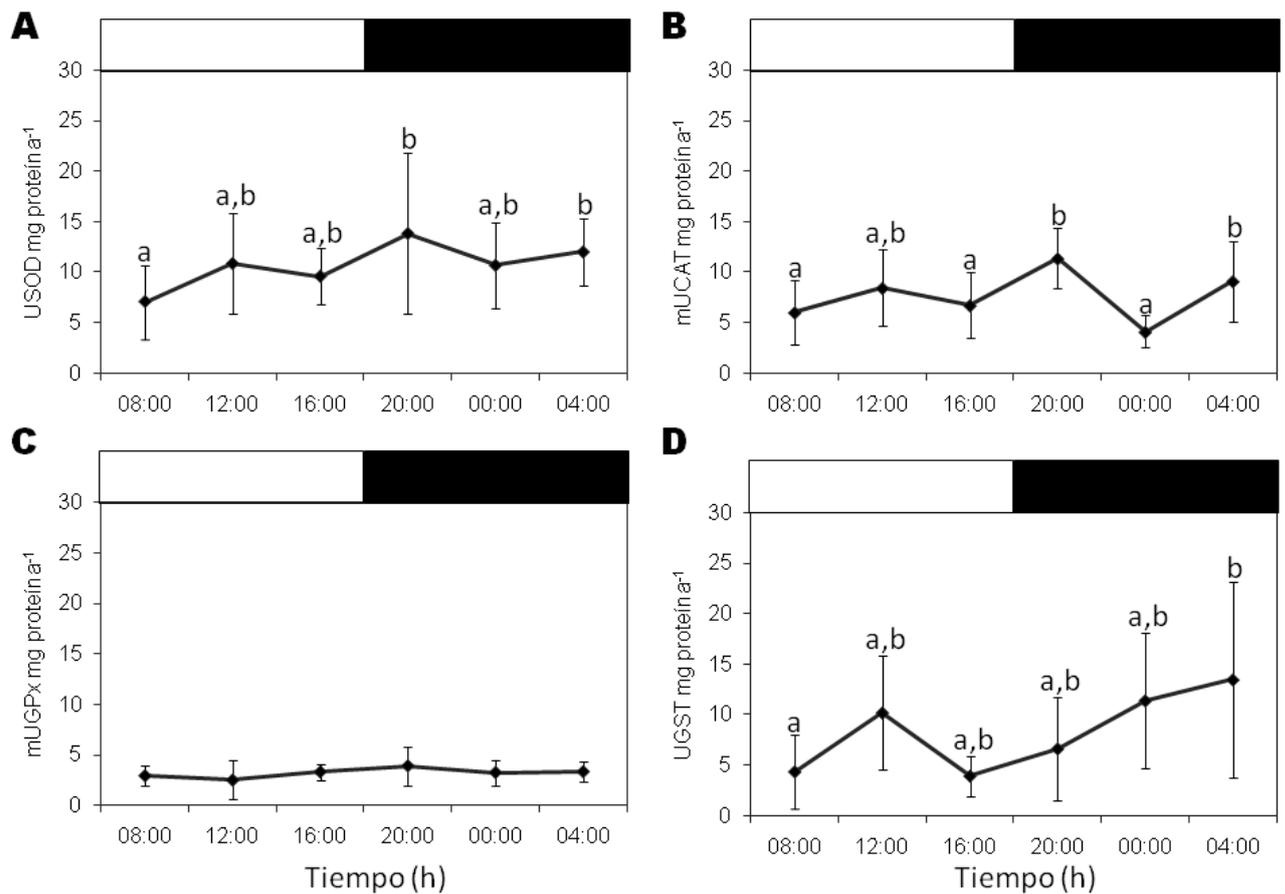


Figura 3.2. Actividad enzimática en branquias de machos *L. santolla* en un período de 24 h. (A) SOD en USOD mg proteína⁻¹. (B) CAT en mUCAT mg proteína⁻¹. (C) GPx en mUGPx mg proteína⁻¹. (D) GST en UGST mg proteína⁻¹. Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras horizontales blancas y negras indican período de oscuridad y luz, respectivamente.

Las actividades de GPx y GST fueron constantes durante las 24 h ($H = 4,85$; $p > 0,05$ y $F = 1,17$; $p > 0,05$), y presentaron valores promedios de $2,8 \pm 0,9$ mUGPx \cdot mg proteína⁻¹ y 3 ± 1 UGST \cdot mg proteína⁻¹, respectivamente. Fig. 3.3-C y D). Sin embargo, por medio del modelado de cosinor, ambas actividades enzimáticas mostraron tener un ritmo periódico de 19 h, con la acrofase durante la noche en el caso de GPx, y durante la tarde en GST (Tabla 3.1).

Los valores encontrados para AA y GSH-eq fueron constantes durante el período estudiado ($F = 1,01$; $p = 0,43$ y $F = 0,36$; $p = 0,87$, respectivamente), observándose

concentraciones promedio de 110 ± 25 ng AA \cdot g tejido⁻¹ y 15 ± 4 nmol GSH \cdot mg tejido⁻¹, respectivamente.

La peroxidación de lípidos en este tejido varió significativamente a lo largo de las 24 h ($F= 10,76$; $p < 0,001$. Tabla 3.3), con una periodicidad de 23,5 h (Tabla 3.1). El máximo daño por peroxidación de lípidos se observó al inicio del día, a las 8 h. La oxidación de proteínas fue constante durante el ciclo estudiado, con un promedio de $0,18 \pm 0,01$ nmol carbonilo \cdot mg proteína⁻¹ ($F= 1,11$; $p= 0,37$. Tabla 3.3). La concentración de glucosa también fue constante a lo largo del período de 24 h estudiado ($H= 3,73$; $p= 0,59$. Tabla 3.4), con un promedio de $0,8 \pm 0,4$ mg glucosa \cdot g tejido⁻¹.

HEMOLINFA

La enzima SOD en hemolinfa presentó una actividad promedio de 5 ± 2 USOD \cdot mg proteína⁻¹, sin variaciones significativas en el período estudiado ($F= 2,26$; $p= 0,07$; Fig. 3.3-A). En cambio, la enzima CAT presentó variaciones significativas ($F= 7,97$; $p < 0,001$), con picos de actividad durante la fotofase y en la fase oscura a las 0 h (Fig. 3.4-B). Además, CAT presentó ritmos circadiano ($\tau = 24$ h; $p < 0,001$) y ultradiano ($\tau = 12$ h; $p < 0,005$). El período de 24 h tuvo una mayor prominencia con una mayor amplitud y un p menor que el observado en el período ultradiano. La enzima GST también presentó variaciones significativas ($H= 22,19$; $p < 0,001$; Fig. 3.4-C), con picos de actividad a las 12 y a las 20 h, mientras que la actividad más baja se registró a las 8 h. Además, esta enzima presentó una ritmicidad con un período de 11 h ($p < 0,05$. Tabla 3.1). La concentración de AA fue de 3 ± 1 ng AA \cdot mL⁻¹, valor que se mantuvo constante a lo largo del ciclo de 24 h ($F= 0,41$; $p= 0,84$; Tabla 3.2).

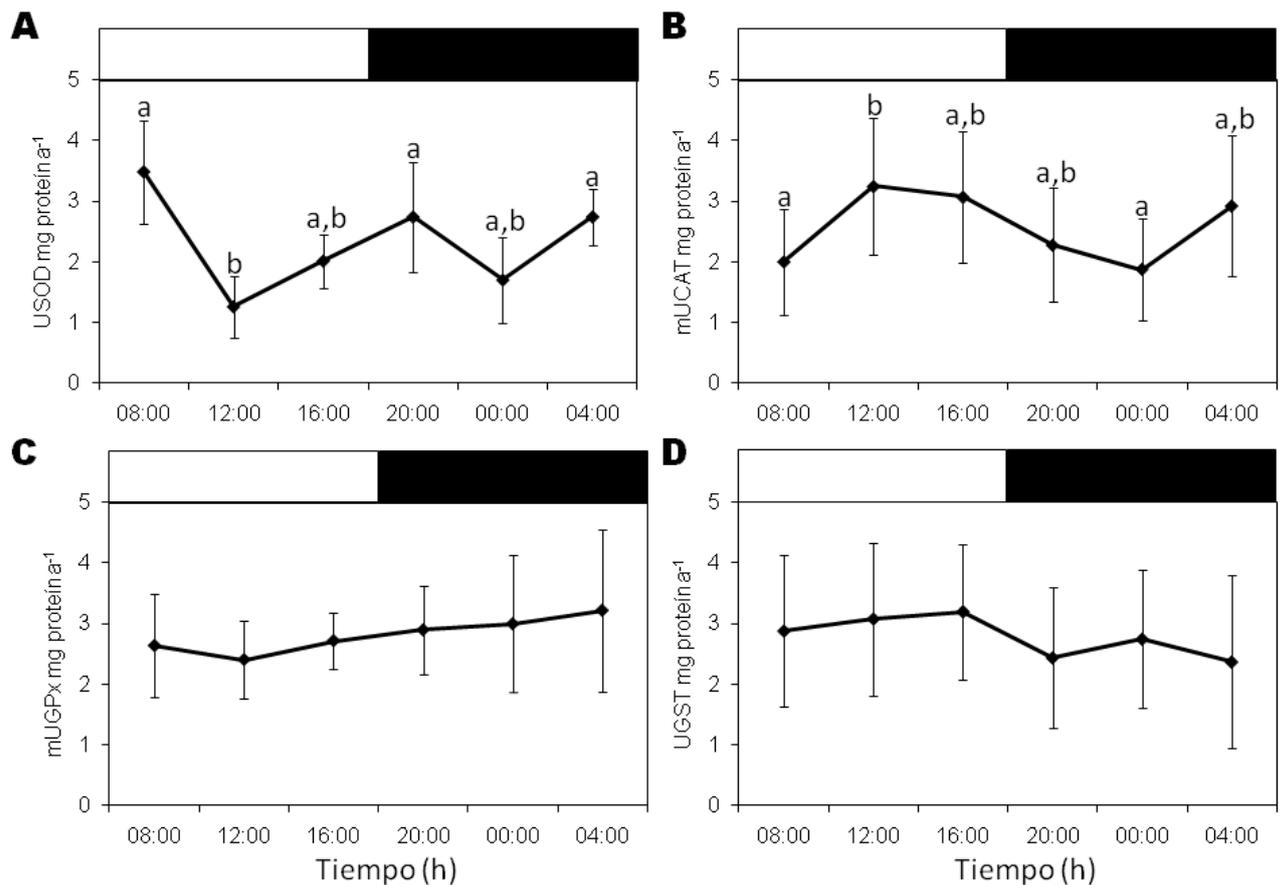


Figura 3.3. Actividad enzimática en músculo de machos *L. santolla* en un período de 24 h. (A) SOD en USOD mg proteína⁻¹. (B) CAT en mUCAT mg proteína⁻¹. (C) GPx en mUGPx mg proteína⁻¹. (D) GST en UGST mg proteína⁻¹. Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras horizontales blancas y negras indican período de oscuridad y luz, respectivamente.

La oxidación de proteínas varió significativamente ($F = 7,17$; $p < 0,0001$), encontrándose los valores máximos a las 16 y a las 20 h (Tabla 3.3).

El pH en hemolinfa varió significativamente durante el periodo estudiado ($F = 5,60$; $p < 0,001$), observándose un pH más bajo en las primeras horas de la fotofase, que luego incrementó a lo largo del día (Tabla 3.5). Además, el pH presentó ritmo circadiano, con un período de 24 h, y una acrofase durante la noche (Tabla 3.1). La concentración de glucosa fue constante en el período estudiado ($H = 9,42$; $p = 0,093$. Tabla 3.4), con un valor promedio de $0,014 \pm 0,005$ mg glucosa \cdot g tejido⁻¹.

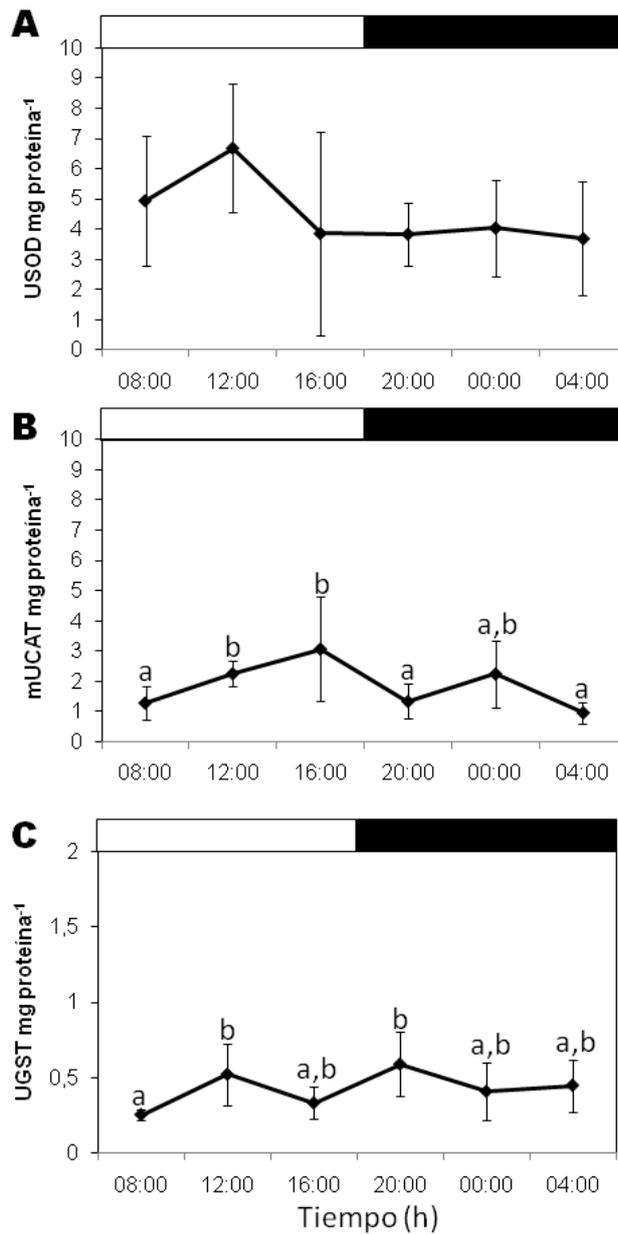


Figura 3.4. Actividad enzimática en hemolinfa de *L. santolla* en un período de 24 h. (A) SOD en USOD mg proteína⁻¹. (B) CAT en mUCAT mg proteína⁻¹. (C) GST en UGST mg proteína⁻¹. Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras horizontales blancas y negras indican período de oscuridad y luz, respectivamente.

HEPATOPÁNCREAS

El hepatopáncreas de machos de centolla mostró actividad enzimática de SOD, CAT y GST, pero sin variaciones significativas durante las 24 h ($F = 1,53$; $p = 0,20$; $F = 1,1$; $p = 0,37$ y $F = 1,62$; $p > 0,05$, para cada enzima respectivamente. Fig. 3.5).

La actividad enzimática promedio de SOD fue de 8 ± 2 USOD \cdot mg proteína⁻¹, sin presentar ritmos. Con el análisis cronobiológico de cosinor, las actividades de CAT y GST presentaron ritmos con períodos de 17,8 h y 24 h, respectivamente (Tabla 3.1). La enzima CAT presentó la fase mayor dos horas luego del comienzo de la fase lumínica, mientras que el máximo de actividad para GST se observó a las 20 h (Fig. 3.5).

La concentración de AA superó ampliamente los valores encontrados en los otros tejidos analizados en el macho de centolla (Tabla 3.2). Además, con el modelo de cosinor se observó un ritmo periódico de 17,5 h con un aumento de concentración principalmente durante la madrugada (Tabla 3.1).

El daño oxidativo se observó a partir de la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas, los cuales fueron constantes a lo largo de las 24 horas ($F= 0,35$; $p= 0,8$ y $H= 7,69$; $p= 0,17$, respectivamente), con concentraciones promedio de 74 ± 20 TBARS \cdot g tejido⁻¹ y $0,4 \pm 0,2$ nmol carbonilo \cdot mg proteína⁻¹ de LPO y OP, respectivamente. Los valores de LPO observados en hepatopáncreas fueron mayores a aquellos determinados en los otros tejidos de centolla (Tabla 3.3).

La concentración de glucosa en este órgano mostró una periodicidad de 12 h, con un aumento de concentración previo al comienzo de la fase lumínica. Además, se encontraron diferencias significativas entre los distintos tiempos analizados ($H= 20,69$; $p < 0,001$). Específicamente, a las 16 h se observó un máximo de concentración de glucosa (Tabla 3.4).

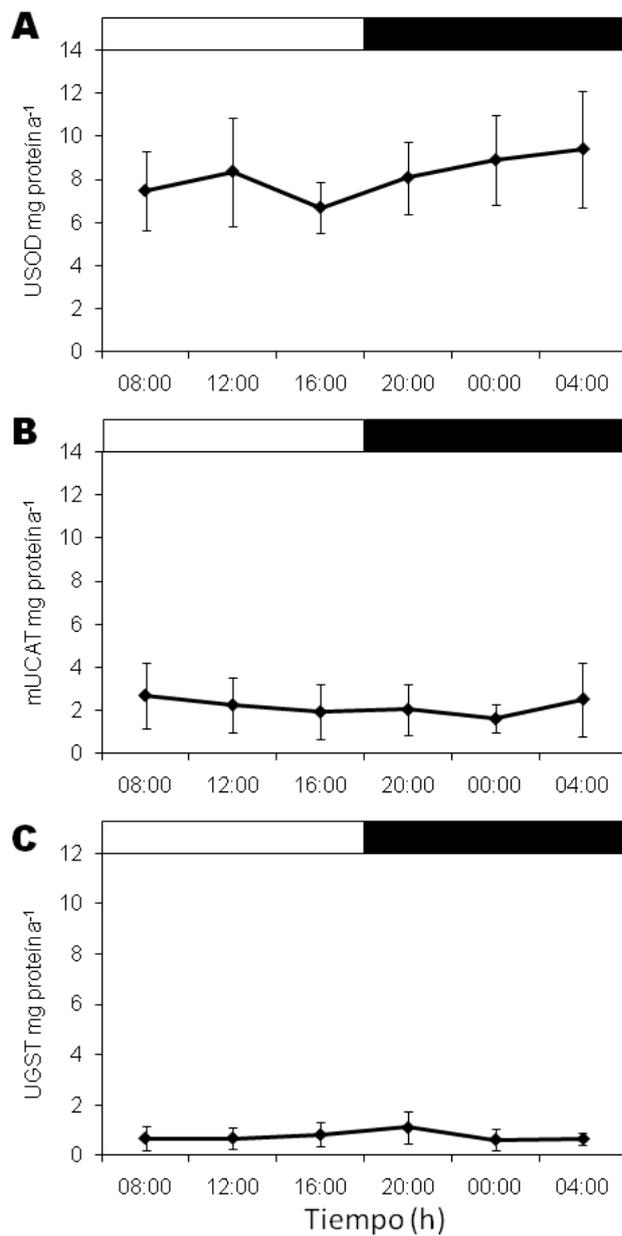


Figura 3.5. Actividad enzimática en hepatopáncreas de machos *L. santolla* en un período de 24 h. (A) SOD en USOD mg proteína⁻¹. (B) CAT en mUCAT mg proteína⁻¹. (C) GST en UGST mg proteína⁻¹. Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras horizontales blancas y negras indican período de oscuridad y luz, respectivamente.

Tabla 3.1. Análisis Cosinor de los parámetros bioquímicos analizados en machos de centolla *Lithodes santolla*. Referencias: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST), peroxidación de lípidos (LPO), oxidación de proteínas (OP).

Parámetro	Periodo (h)	p	Mesor*	Amplitud**	Acrofase (h)
<i>SOD</i>					
Branquias		NS			
Hemolinfa		NS			
Músculo	12	0,00001	2,31 ± 0,99	0,96	13,80
	23,5	0,047	2,30 ± 0,93	0,49	5,29
Hepatopáncreas		NS			
<i>CAT</i>					
Branquias		NS			
Hemolinfa	12	0,004	1,90 ± 1,19	9,91	3,67
	24	0,0005	1,86 ± 1,12	11,88	16,04
Músculo	12	0,0103	2,56 ± 1,12	8,29	5,93
Hepatopáncreas	17,8	0,0483	2,27 ± 1,33	8,16	10,60
<i>GPx</i>					
Branquias	15,8	0,016	3,25 ± 1,40	0,01	5,07
Músculo	19	0,045	2,81 ± 0,93	0,33	3,60
<i>GST</i>					
Branquias	12	0,005	8,41 ± 6,30	3,00	3,07
	24	0,006	8,58 ± 6,92	3,00	2,87
Hemolinfa	11	0,019	0,42 ± 0,19	0,09	2,13
Músculo	19	0,029	2,77 ± 1,24	0,48	16,27
Hepatopáncreas	24,5	0,044	0,77 ± 0,50	0,21	18,96

*Expresado como promedio ± desvío estándar. SOD en USOD mg proteína⁻¹, CAT en mUCAT mg proteína⁻¹, GST como UGST mg proteína⁻¹, GPx en mUGPx mg proteína⁻¹, PO en nmol carbonilo mg proteína⁻¹, LPO en μmol TBARS mg proteína⁻¹ y glucosa en mg glucosa g tejido⁻¹.

**SOD en USOD mg proteína⁻¹, CAT en mUCAT mg proteína⁻¹, GST como UGST mg proteína⁻¹, GPx en mUGPx mg proteína⁻¹, PO en nmol carbonilo mg proteína⁻¹, LPO en μmol TBARS mg proteína⁻¹ y glucosa en mg glucosa g tejido⁻¹.

Continuación de la Tabla 3.1.

Parámetro	Periodo (h)	p	Mesor*	Amplitud**	Acrofase (h)
<i>LPO</i>					
Branquias	12	0,0002	15,77 ± 8,51	6,00	23,87
	24	0,001	15,64 ± 9,43	5,00	1,83
Músculo	23,5	0,002	5,79 ± 2,04	1,52	6,51
Hepatopáncreas		NS			
<i>OP</i>					
Branquias		NS			
Hemolinfa	24	0,0013	0,52 ± 0,19	0,16	18,11
Músculo		NS			
Hepatopáncreas		NS			
<i>pH</i>					
Hemolinfa	24	0,0129	7,75 ± 0,28	0,21	21,70
<i>Glucosa</i>					
Branquias		NS			
Músculo		NS			
Hemolinfa		NS			
Hepatopáncreas	12	0,0037	2,48 ± 0,49	0,92	7,27

*Expresado como promedio ± desvío estándar. SOD en USOD mg proteína⁻¹, CAT en mUCAT mg proteína⁻¹, GST como UGST mg proteína⁻¹, GPx en mUGPx mg proteína⁻¹, PO en nmol carbonilo mg proteína⁻¹, LPO en μmol TBARS mg proteína⁻¹ y glucosa en mg glucosa g tejido⁻¹.

**SOD en USOD mg proteína⁻¹, CAT en mUCAT mg proteína⁻¹, GST como UGST mg proteína⁻¹, GPx en mUGPx mg proteína⁻¹, PO en nmol carbonilo mg proteína⁻¹, LPO en μmol TBARS mg proteína⁻¹ y glucosa en mg glucosa g tejido⁻¹.

Tabla 3.2. Variaciones diarias de ácido ascórbico (AA) y glutatión reducido (GSH-eq) en tejidos de machos de *Lithodes santolla*. Los datos son expresados en promedio \pm desvío estándar; los valores de AA se presentan en ng AA g tejido⁻¹ para branquias, músculo y hepatopáncreas, y como ng AA mL HL⁻¹ para hemolinfa. GSH-eq es presentado como nmol GSH mg tejido⁻¹.

	Tiempo (h)	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
AA					
	8:00	85 \pm 34	114 \pm 19	3 \pm 3	238 \pm 2
	12:00	50 \pm 18	102 \pm 24	2 \pm 1	209 \pm 3
	16:00	60 \pm 24	116 \pm 5	3 \pm 2	232 \pm 1
	20:00	68 \pm 25	98 \pm 19	2 \pm 1	280 \pm 2
	0:00	88 \pm 40	115 \pm 18	3 \pm 2	251 \pm 2
	4:00	81 \pm 30	121 \pm 41	3 \pm 2	329 \pm 3
GSH-eq					
	8:00	0,8 \pm 0,7	13 \pm 6	--	--
	12:00	1,6 \pm 1,4	14 \pm 4	--	--
	16:00	0,4 \pm 0,3	16 \pm 5	--	--
	20:00	0,5 \pm 0,5	14 \pm 2	--	--
	0:00	0,4 \pm 0,7	16 \pm 4	--	--
	4:00	1,3 \pm 1,1	14 \pm 5	--	--

Tabla 3.3. Variaciones diarias en la peroxidación de lípidos (LPO- $\mu\text{mol TBARS g tejido}^{-1}$) y la oxidación de proteínas (OP- $\text{nmol carbonilo mg proteína}^{-1}$) analizado en tejidos de machos de *Lithodes santolla*. Los datos se expresan en promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
LPO				
8:00	16 \pm 9 ^a	7 \pm 2 ^a	--	70 \pm 28
12:00	14 \pm 4 ^a	5 \pm 1 ^{b,c}	--	77 \pm 28
16:00	12 \pm 5 ^a	5 \pm 1 ^{a,c}	--	74 \pm 20
20:00	10 \pm 4 ^a	4 \pm 1 ^b	--	70 \pm 19
0:00	28 \pm 12 ^b	6 \pm 2 ^a	--	75 \pm 13
4:00	14 \pm 6 ^a	7 \pm 2 ^a	--	76 \pm 14
OP				
8:00	0,4 \pm 0,2	0,17 \pm 0,02	0,3 \pm 0,1 ^a	0,5 \pm 0,2
12:00	0,4 \pm 0,2	0,23 \pm 0,10	0,5 \pm 0,1 ^{a,b}	0,4 \pm 0,1
16:00	0,3 \pm 0,2	0,16 \pm 0,04	0,6 \pm 0,2 ^{a,b}	0,3 \pm 0,1
20:00	0,3 \pm 0,2	0,16 \pm 0,05	0,7 \pm 0,2 ^b	0,4 \pm 0,2
0:00	0,2 \pm 0,1	0,19 \pm 0,09	0,4 \pm 0,1 ^a	0,4 \pm 0,1
4:00	0,2 \pm 0,1	0,19 \pm 0,05	0,5 \pm 0,1 ^a	0,4 \pm 0,1

Tabla 3.4 Concentración de glucosa en tejidos de machos *Lithodes santolla* en un período de 24h. Los valores se expresan en promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
Glucosa				
8:00	0,07 \pm 0,04	0,9 \pm 0,4	0,015 \pm 0,004	1,7 \pm 2,1 ^a
12:00	0,05 \pm 0,02	0,8 \pm 0,3	0,012 \pm 0,004	1,8 \pm 1,1 ^a
16:00	0,07 \pm 0,04	0,8 \pm 0,1	0,014 \pm 0,006	4,2 \pm 2,2 ^b
20:00	0,06 \pm 0,02	0,6 \pm 0,4	0,009 \pm 0,003	2,1 \pm 1,8 ^{a,b}
0:00	0,07 \pm 0,04	0,8 \pm 0,4	0,016 \pm 0,008	2,5 \pm 2,0 ^{a,b}
4:00	0,08 \pm 0,03	0,8 \pm 0,4	0,016 \pm 0,005	2,6 \pm 1,2 ^{a,b}

Tabla 3.5. Variaciones diarias de pH en hemolinfa de *Lithodes santolla*. Los datos se expresan en promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para la hipótesis nula de igualdad de promedios de pH ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	pH
8:00	7,5 \pm 0,1 ^a
12:00	7,7 \pm 0,1 ^{a,b}
16:00	7,7 \pm 0,2 ^{a,b}
20:00	7,9 \pm 0,2 ^b
0:00	8,0 \pm 0,3 ^b
4:00	7,8 \pm 0,3 ^{a,b}

DISCUSIÓN

El sistema de defensas antioxidantes de los machos de centolla *Lithodes santolla* presentó variaciones en un ciclo de 24 horas, con diferencias entre los tejidos estudiados. Particularmente, las branquias de centolla presentaron la mayor actividad enzimática antioxidante de SOD, CAT y GST. Las branquias de los crustáceos son responsables del intercambio gaseoso, el equilibrio ácido-base y la regulación osmótica e iónica (Paital & Chainy, 2010). Además, la generación de ROS es alta puesto que sus células están constantemente intercambiando moléculas de oxígeno a partir de la difusión con el agua del ambiente (Maciel *et al.*, 2010). Por tanto, las branquias presentan una mayor sensibilidad, exhibiendo una respuesta rápida ante cambios estresantes.

Además, en las branquias se presenta un trabajo coordinado del sistema de defensas antioxidantes, al observar la similitud de los perfiles de las actividades enzimáticas de SOD y CAT en este tejido. La enzima SOD es una de las primeras enzimas que responde ante la presencia de las ROS, pero su actividad no es eficiente si no se encuentra concertada con la actividad de las enzimas CAT y/o GPx, capaces de remover el peróxido de hidrógeno producido en la dismutación del anión superóxido (Hardeland *et al.*, 2010). En esta tesis se observó que en las branquias todas las enzimas antioxidantes aumentan su actividad a las

20 h, coincidiendo con el mínimo de daño oxidativo encontrado. A lo largo de la fase nocturna, la peroxidación de lípidos se incrementa, y luego los niveles disminuyen seguido del aumento de las actividades enzimáticas de CAT y GST. Además, el ritmo encontrado a partir del análisis de cosinor en la actividad de GPx y GST de las branquias, estarían indicando que las enzimas antioxidantes trabajan de manera coordinada.

El sistema de defensas antioxidantes en las branquias de *L. santolla* fue más activo durante la noche, mostrando picos de actividad enzimática y de antioxidantes no enzimáticos, probablemente debido a un aumento en el consumo de oxígeno. En las branquias del cangrejo *Neohelice granulata* se ha encontrado una mayor actividad de GST y concentración de sulfhídricos no proteicos durante la noche, que se relacionó con un aumento en el consumo de oxígeno (Maciel *et al.*, 2004).

Las actividades enzimáticas antioxidantes en el hepatopáncreas de *L. santolla* fueron más bajas que en las branquias. En cambio, los niveles de LPO fueron los más altos encontrados, comparado con las branquias, el músculo y la hemolinfa de *L. santolla*. La actividad de enzimas antioxidantes del centollón *Paralomis granulosa* del Canal Beagle presenta un perfil similar al de la centolla. Las actividades de CAT y SOD en el hepatopáncreas de *P. granulosa* también fueron más bajas que en las branquias y el músculo, y el hepatopáncreas presentó altos valores de LPO (Romero *et al.*, 2007). Se sabe que el hepatopáncreas de los crustáceos es un órgano importante asociado a varias actividades metabólicas, desde la digestión hasta la absorción de nutrientes (Paital & Chainy, 2010), y puede ser considerado un órgano metabólicamente más activo que las branquias y el músculo. Por tanto, se propuso la presencia de otros antioxidantes no-enzimáticos presentes en el hepatopáncreas del centollón (Romero *et al.*, 2007). Particularmente, en *L. santolla* la mayor concentración de ácido ascórbico en el hepatopáncreas sugiere que en este órgano el sistema de defensas no-enzimático juega un papel importante en el balance de la concentración de las ROS. Además, aunque GSH-eq no pudo ser detectado en el hepatopáncreas con la técnica utilizada, no se descarta su presencia en este órgano, como tampoco la presencia de otros antioxidantes que no fueron analizados.

Las actividades enzimáticas de CAT y GST en el hepatopáncreas de *L. santolla* presentan una variación significativa durante un período circadiano según el modelo de cosinor. Esto estaría dando indicios de la presencia de un ritmo, aunque no pudo ser

validado por los análisis estadísticos no paramétricos empleados. La acrofase de las enzimas CAT y GST encontrada en el hepatopáncreas estaría indicando un aumento de la actividad metabólica en este órgano durante la fotofase. Este aumento se observa a partir de las variaciones significativas de la concentración de glucosa libre en el hepatopáncreas, observada tanto por análisis estadísticos convencionales y por cosinor. La presencia de glucosa podría indicar el requerimiento de energía en esos momentos. En *L. santolla* el máximo de concentración de glucosa se observa durante la fotofase, mientras que durante la noche, se observa su disminución, coincidiendo con el posible aumento de la actividad locomotora del animal. Los altos niveles de glucosa durante las fases inactivas del animal resultarían por la necesidad de alcanzar requerimientos energéticos para procesos de síntesis en general, como de mucopolisacáridos, quitina, ribosa, NADPH, piruvato, y glucógeno; mientras que los niveles disminuidos de glucosa durante la fase activa reflejan su uso para funciones motoras que demandan consumo de energía (Kumar *et al.*, 1981). La cigala *Nephrops norvegicus* es otro ejemplo de crustáceos que presentan mayor consumo de oxígeno durante la noche, relacionado con el aumento de la actividad locomotora y cardíaca (Aguzzi *et al.*, 2003).

En el músculo de centolla *L. santolla*, el sistema de defensas antioxidante también presentó variaciones a lo largo de las 24 horas. El daño oxidativo encontrado pudo haber sido originado por la acción de altas concentraciones de H₂O₂, puesto que durante la fase oscura hay un incremento de la actividad de SOD y una reducción de la actividad de CAT, coincidiendo con una alta peroxidación de lípidos. Consistentemente, el aumento en la actividad de CAT corresponde a un mínimo en la peroxidación de lípidos. Conjuntamente, la periodicidad rítmica encontrada en las actividades de todas las enzimas analizadas en el músculo, muestra un mecanismo de defensa coordinado, observándose picos de actividad durante la fotofase y la fase oscura. Principalmente, las acrofases de las enzimas antioxidantes y la producción de LPO durante la noche sugieren que el animal aumenta su actividad locomotora. El ejercicio muscular ocasiona un aumento del consumo de oxígeno y eventualmente un aumento en la producción de ROS (Lawler & Powers, 1998; Maciel *et al.*, 2010).

A partir de estudios a nivel celular y análisis realizados a nivel de organismo, se observó que el pH cumple un rol en los cambios de procesos metabólicos (Forgue *et al.*, 2001), puesto que el pH puede influir tanto en las reacciones metabólicas como en las

estructuras enzimáticas (Lehninger *et al.*, 1993). Así, la disminución de pH observada en la hemolinfa de *L. santolla* al final de la fase oscura podría estar ocasionada por un aumento de la concentración de lactato, como consecuencia del aumento de actividad locomotora del animal. Esta actividad locomotora en crustáceos causa una acidificación de la hemolinfa, debida a un componente respiratorio y metabólico, tal como se observa en los cangrejos *Cancer magister* (McDonald *et al.*, 1979) y *Cardisoma carnifex* (Wood & Randall, 1981). El componente respiratorio se debe a un incremento de la presión de dióxido de carbono en la hemolinfa, que se desarrolla en los primeros minutos de actividad; mientras que el componente metabólico se debe, principalmente, a un incremento de la concentración de lactato (Truchot, 1983). Particularmente, durante la fase oscura, en la hemolinfa de *L. santolla* se observa daño oxidativo, específicamente a las 0 h, debido a un desbalance en la producción de ROS que podría ser causado por la actividad locomotora (Geihs *et al.*, 2010), y no pudo ser contrarrestado por las defensas antioxidantes durante la noche.

Por otro lado, el ritmo encontrado en el pH de la hemolinfa de *L. santolla* podría estar relacionado a otros cambios metabólicos del organismo, donde la acidificación del sistema se corresponde con una disminución de su actividad metabólica, y viceversa (Forgue *et al.*, 2001); y por tanto no estaría relacionado directamente a la actividad locomotora. Durante la fotofase del período de 24 horas estudiado, el sistema de defensas antioxidantes en la hemolinfa de *L. santolla* se encuentra activo. En la langosta *Astacus leptodactylus*, se ha observado que cuando el animal se encuentra en un estado de descanso con poco movimiento, disminuye su P_{O_2} llegando a un leve estado de hipoxia inducida (Forgue *et al.*, 2001). Esta reacción sería una estrategia en el caso de que el animal se encontrara en un estado de estrés inevitable. De esta manera, la langosta se provee un margen de seguridad para incrementar la oxigenación de la hemolinfa, y en consecuencia, poder generar la actividad oxidativa locomotora en el músculo, evitando el metabolismo anaeróbico (Forgue *et al.*, 2001).

En general, el mecanismo de defensas antioxidantes en la centolla *Lithodes santolla* está activo en todos los tejidos, donde las enzimas SOD y CAT trabajan como la primera línea de defensa. La actividad de GPx, aunque no varía significativamente durante las 24 h, es de suma importancia para el sistema, puesto que mantiene la homeostasis de la célula cuando existe una sobreproducción de H_2O_2 (Hermes-Lima, 2004). Por otro lado, la

actividad de GST fue diferente a lo largo del período estudiado de manera rítmica, indicando que juega un papel importante en el mecanismo de defensa, al aminorar el daño oxidativo (Maciel *et al.*, 2010).

Por todo lo expuesto anteriormente, el sistema de defensas antioxidantes enzimático presente en *L. santolla* parece ser eficiente, y no habría una necesidad de incrementar los valores de los antioxidantes no-enzimáticos, como el glutatión total y el ácido ascórbico, también determinados en este trabajo. Sin embargo, no se debe descartar la acción de otros antioxidantes no analizados que podrían estar actuando en conjunto con las enzimas, como por ejemplo la melatonina, que inhibe la peroxidación de lípidos y neutraliza varios ROS, además de estar involucrada en la regulación del ciclo circadiano (Hardeland *et al.*, 2003; Hermes-Lima, 2004).

La centolla *Lithodes santolla* tiene un sistema de defensas antioxidantes activo en las branquias, músculo, hepatopáncreas y hemolinfa, con variaciones a lo largo del período de 24 horas. El mecanismo de defensa trabaja de manera activa debido a los cambios en los procesos metabólicos y la actividad locomotora, ambos causantes de variaciones en la concentración de O₂ en el organismo, que a su vez causan cambios en la producción de ROS. De esta manera, el sistema de defensas trabaja de manera coordinada y rítmica en el organismo, evitando daños oxidativos que podrían causar en el animal problemas a largo plazo.

CAPÍTULO 4

ESTACIONALIDAD DE LAS
DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN
LITHODES SANTOLLA

INTRODUCCIÓN

La temperatura y el fotoperíodo son factores cíclicos predominantes en el ambiente natural, los cuales pueden inducir cambios en la productividad primaria y en algunas características físico-químicas del agua, como la presión de oxígeno, el pH y la salinidad. Aquellos crustáceos sujetos a estos cambios estacionales marcados, han desarrollado determinados ciclos de vida, en el que el crecimiento y la reproducción se producen en estaciones más favorables, ya sea por la temperatura, el fotoperíodo o la disponibilidad de alimento (Whiteley *et al.*, 1997). Especialmente en ambientes antárticos o sub-antárticos, además de la variación de la temperatura del agua, factores como el fotoperíodo y la disponibilidad de alimento son más marcados que en ambientes templados y afectan en mayor grado a las variaciones metabólicas de los animales (Whiteley *et al.*, 1997; Malanga *et al.*, 2007). Además, existe en los organismos una relación funcional entre el sistema digestivo con el desarrollo gonadal, ya que los períodos de abundancia de recursos nutricionales y de desarrollo gonadal en general son coincidentes (Sheehan & Power, 1999; Romero *et al.*, 2004). Por otro lado, en los crustáceos los eventos fisiológicos como la muda, también influyen en los ciclos de crecimiento y alimentación, que a su vez inducen cambios en las tasas metabólicas (Geracitano *et al.*, 2004).

Aquellos compuestos bioquímicos que juegan roles importantes en la homeostasis normal del organismo se ven influenciados por los ciclos biológicos y/o ambientales (Nahrgang *et al.*, 2010). Entonces, como cualquier otro proceso metabólico, el proceso de formación de ROS se altera debido a las variaciones estacionales en las tasas metabólicas (Abele & Puntarulo, 2004), y el sistema de defensas antioxidantes debe ajustarse a estos cambios para mantener el equilibrio de producción-eliminación de ROS, evitando daños oxidativos en las células (Lesser, 2006). En varios invertebrados marinos como poliquetos (Keller *et al.*, 2004), mejillones (Sheehan & Power, 1999), lapas (Malanga *et al.*, 2005) y cangrejos (da Silva-Castiglioni *et al.*, 2007; Paital & Chainy, 2013) existen variaciones estacionales en su metabolismo, coincidiendo en todas las especies en general con un aumento de las tasas metabólicas durante el verano, época de reproducción y abundancia de alimento. Particularmente, en cangrejos comerciales, las variaciones ambientales y fisiológicas causan variaciones en la producción de radicales libres (Paschke *et al.*, 2010), que podrían causar daño oxidativo y eventualmente cambios en la calidad de la carne o incluso la muerte (Romero *et al.*, 2011).

La centolla *L. santolla* tiene un ciclo de vida estacional: la reproducción ocurre en noviembre - diciembre, las hembras llevan los huevos adheridos a sus pleópodos durante aproximadamente 10 meses, las larvas eclosionan durante septiembre, y los machos mudan durante abril - mayo (Lovrich & Tapella, 2014) (Fig. 1.3). Aunque la información sobre esta especie es sustancial, los estudios fisiológicos han sido orientados a juveniles, en su mayoría (Kattner *et al.*, 2003; Paschke *et al.*, 2010, 2013), y estudios de la fisiología en machos comerciales son aun parciales (Comoglio *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2013; Schvezov *et al.*, 2013)

El Canal Beagle (55°S 67°O) es un ambiente costero sub-antártico con una marcada estacionalidad. La temperatura superficial oscila entre 4,3°C y 9,8°C en agosto y enero, respectivamente (Balestrini *et al.*, 1998) (Fig. 2.1). La salinidad superficial es muy variable, con rangos entre 15-20 ups en noviembre - marzo a 31,5 ups en junio, dependiendo de los regímenes de precipitaciones y las distancias a descargas de aguas continentales (Balestrini *et al.*, 1998; Curelovich *et al.*, 2009; Aguirre *et al.*, 2012).

Debido al ciclo de vida estacional de la centolla, un estudio de base de las variaciones fisiológicas a lo largo de las estaciones es necesario, para estudios aplicados ya sea a la ecotoxicología o en la toma de decisiones para el manejo pesquero respecto a la manipulación de los animales. Por estas razones, el objetivo general del presente capítulo es evaluar estacionalmente la fisiología en machos adultos de *L. santolla*, específicamente su estado oxidativo y antioxidante. Particularmente se enfocará en el análisis de las variaciones estacionales de: (1) las actividades enzimáticas de SOD, CAT, GPx y GST, (2) las concentraciones de AA y GSH-eq, (3) la OP y LPO, y (4) la concentración de glucosa, proteínas y el pH hemolinfático en diferentes tejidos de *L. santolla*.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los machos de *L. santolla* fueron capturados en septiembre y diciembre de 2010, y en marzo y julio de 2011, por medio de trampas comerciales. Se trabajaron con 15 animales en todos los muestreos, excepto en marzo que solamente se muestrearon 10. Los animales muestreados tenían todos sus apéndices, estaban en intermuda y sin ningún daño externo. Los animales se transportaron al laboratorio y aclimataron por al menos 24 horas,

para evitar el efecto del manipuleo durante la pesca. Todas las centollas utilizadas fueron de tamaño comercial (119 ± 5 mm de largo de caparazón). Como los individuos fueron extraídos en algunos meses por pescadores, no se registró la temperatura *in situ* y se consideró una serie temporal usada como estándar para el Canal Beagle (Fig. 2.1).

Luego de la aclimatación, los animales se disecaron y se extrajeron las muestras de hemolinfa (HL), branquias (Br), músculo (Mc) y hepatopáncreas (HP). Una alícuota de hemolinfa fue usada para determinar el pH, como ya fue descrito en el Cap. 2, y dos alícuotas fueron congeladas a -80°C y analizada dentro de los tres meses. Las muestras de branquias, músculo y hepatopáncreas se congelaron a -80°C . A los 3 meses, por desperfectos del congelador de -80°C , las muestras se liofilizaron y analizaron en menos de 6 meses. Se analizaron en todos los tejidos las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GST.

Se determinaron los antioxidantes no-enzimáticos GSH-eq y AA. Nuevamente, la concentración de GSH-eq se determinó únicamente en las branquias y el músculo. Por otro lado, se determinaron las concentraciones de proteínas totales y glucosa en todos los tejidos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar los efectos de la estacionalidad en cada parámetro estudiado. Previamente, se realizaron pruebas de Shapiro- Wilk para comprobar normalidad y pruebas de Levene para verificar homogeneidad de los datos. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se determinaron por pruebas de Tukey post-hoc. De no cumplirse los criterios de normalidad y/o homogeneidad, los datos se transformaron usando la función de logaritmo en base 10 o raíz cuadrada (Sokal & Rohlf, 1995). Si los datos no cumplían con los criterios necesarios para realizar el ANOVA, aún después de ser transformados, se analizaron con la prueba no-paramétrica de análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf, 1995). Todos los datos se analizaron con el software libre R 2.15.2 (2012). Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar.

RESULTADOS

La centolla *L. santolla* presentó variaciones estacionales en su sistema de defensas antioxidantes, como también en sus parámetros de estrés oxidativo. Los resultados se muestran a continuación, presentando las variaciones en enzimas antioxidantes, en los antioxidantes no-enzimáticos, en los niveles de glucosa, proteínas y pH, y en los parámetros de estrés oxidativo.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Las enzimas antioxidantes estuvieron presentes en todos los tejidos analizados, y además mostraron variaciones entre las estaciones del año. Particularmente, la actividad de SOD mostró variaciones significativas entre estaciones en las branquias ($H= 14,85$, $p < 0,01$), la hemolinfa ($H= 23,57$, $p < 0,001$) y el músculo ($H= 43,03$, $p < 0,01$). Fig. 4.1). En las branquias se observó un patrón de actividades similares al encontrado en la hemolinfa, en donde hubo una baja actividad de SOD en diciembre (Fig. 4.1). La actividad de SOD en el músculo presentó sus valores más altos en diciembre y julio (Fig. 4.1). Por otro lado, en el hepatopáncreas SOD presentó una actividad sin variaciones durante el año, en promedio de $9,3 \pm 3,4$ USOD mg proteína⁻¹ ($H= 6,13$, $p= 0,10$). Fig. 4.1).

Todos los tejidos analizados presentaron actividad de CAT con diferencias estacionales (Fig. 4.2). Particularmente, en septiembre una mayor actividad de CAT fue observada en las branquias ($H= 15,89$, $p < 0,01$) y el músculo ($H= 21,22$; $p < 0,001$), opuesto a los resultados encontrados en el hepatopáncreas ($H= 18,32$; $p < 0,001$) el cual presentó la menor actividad de CAT en esta época del año (Fig. 4.2). En diciembre, solamente en las branquias se observó una disminución de la actividad de CAT, coincidente con el incremento de la actividad en el hepatopáncreas. Este último órgano mantuvo altos valores de actividad de CAT hasta marzo, a diferencia de lo encontrado en la hemolinfa ($H= 11,54$; $p < 0,01$) y el músculo, los cuales mostraron una disminución de la actividad de CAT en marzo. En julio, el músculo aún presentaba bajas actividades de CAT, y solamente en la hemolinfa la actividad de CAT aumentó significativamente (Fig. 4.2).

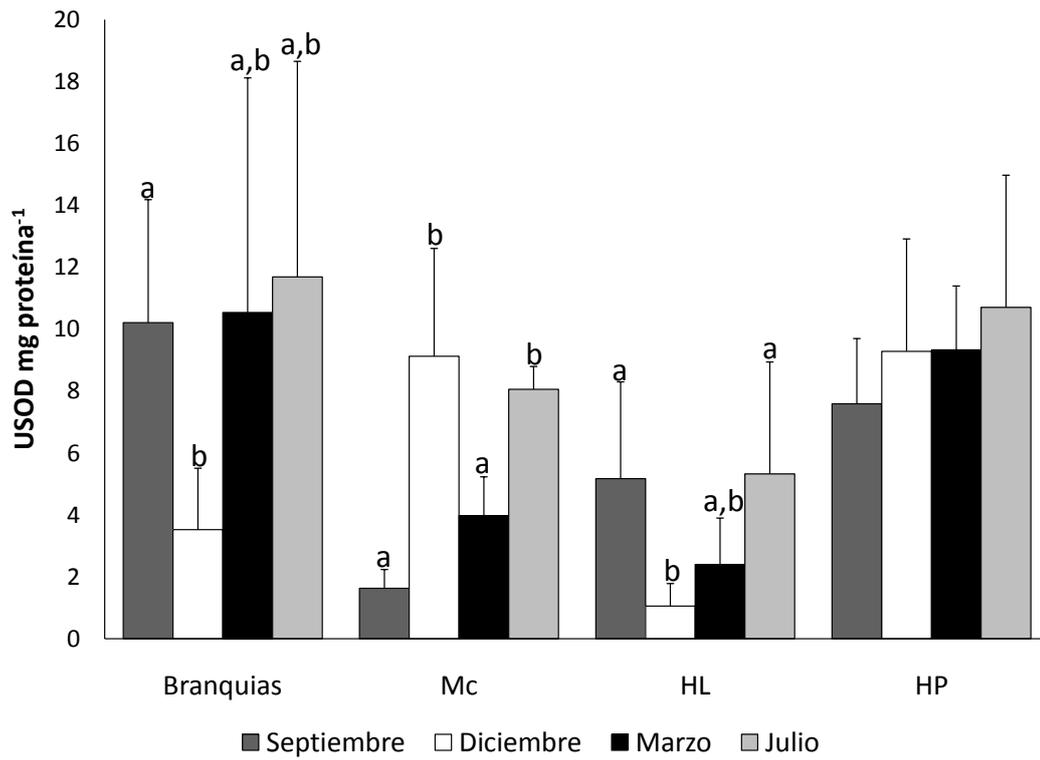


Figura 4.1. Variación estacional de la actividad enzimática de Superóxido Dismutasa en las branquias, el músculo (Mc), la hemolinfa (HL) y el hepatopáncreas (HP) de machos *L. santolla*. Los valores se presentan en USOD mg proteína⁻¹. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras de error indican desvíos estándar.

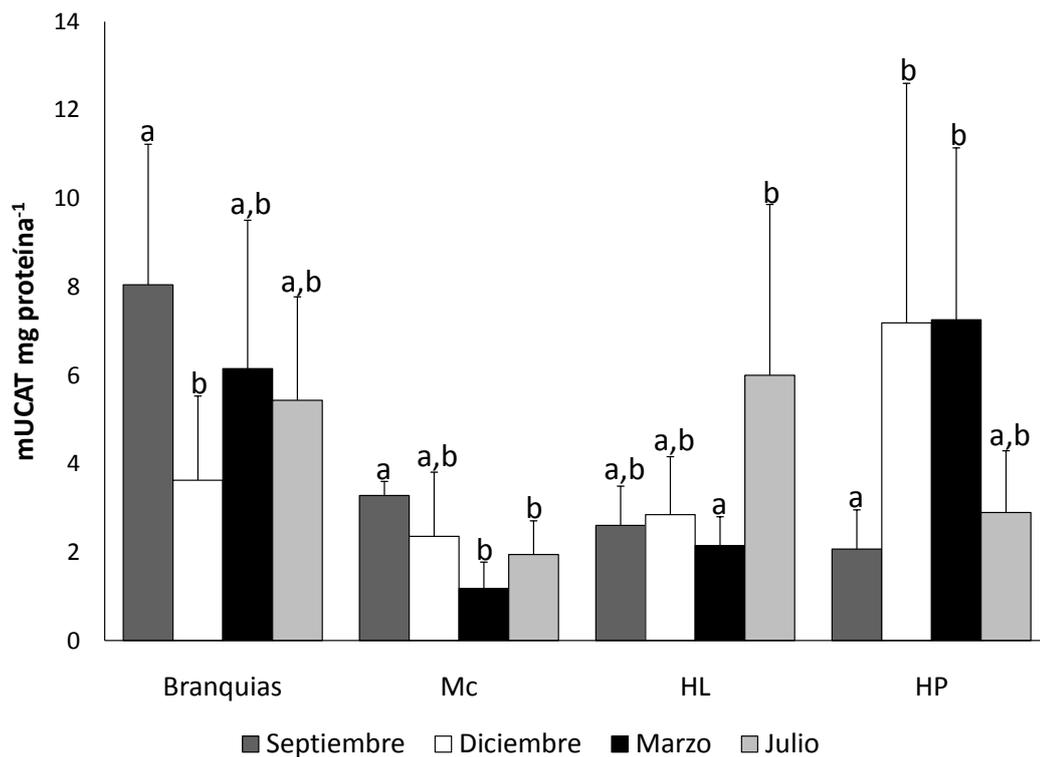


Figura 4.2. Variación estacional de la actividad enzimática de Catalasa en las branquias, el músculo (Mc), la hemolinfa (HL) y el hepatopáncreas (HP) de machos *L. santolla*. Los valores se presentan en mUCAT mg proteína⁻¹. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras de error indican desvíos estándar.

La actividad de GPx sólo mostró diferencias significativas en el músculo ($H = 9,06$, $p < 0,05$, Fig. 4.3). En este tejido, el mínimo de actividad se encontró en Septiembre ($2,6 \pm 0,4$ mUGPx mg proteína⁻¹), y el máximo en julio (4 ± 1 mUGPx mg proteína⁻¹), aunque ninguno de estos valores mostraron diferencias significativas con los valores observados en diciembre y marzo (Fig. 4.3). A lo largo del año, en los otros tejidos analizados, la enzima GPx presentó actividades promedio de $0,06 \pm 0,02$ ($H = 7,46$, $p > 0,05$); $6,6 \pm 2,3$ ($F = 0,76$, $p > 0,05$) y $7,3 \pm 2,8$ ($F = 2,74$, $p > 0,05$) mUGPx mg proteína⁻¹ en las branquias, la hemolinfa y el hepatopáncreas, respectivamente (Fig. 4.3).

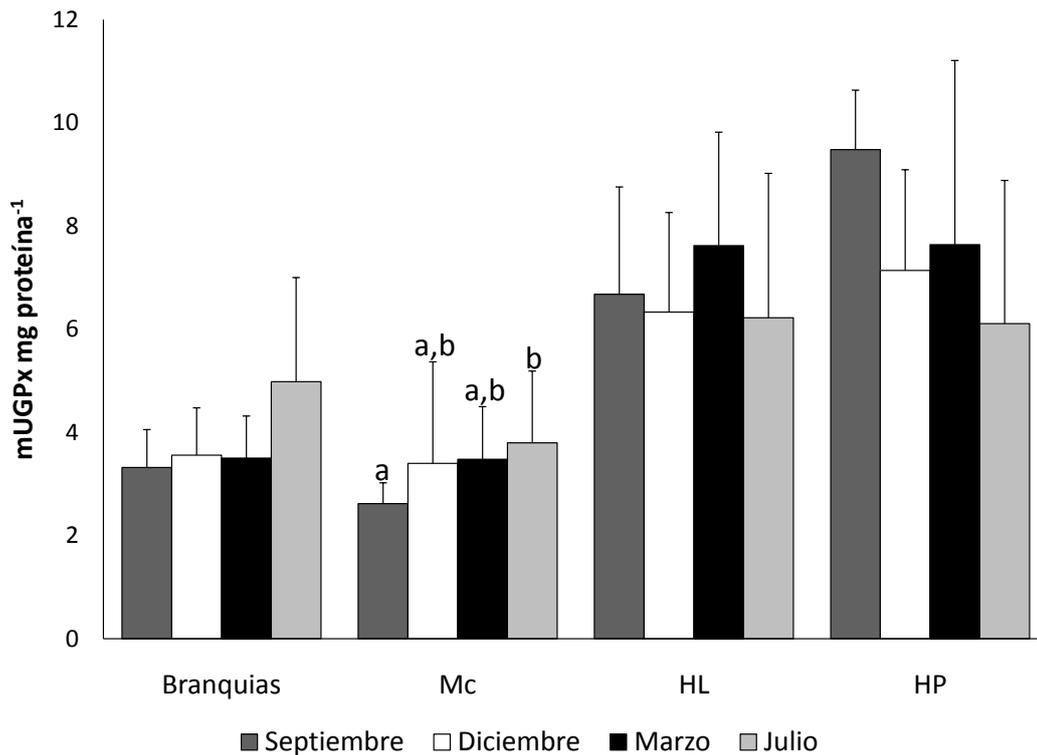


Figura 4.3. Variación estacional de la actividad enzimática de Glutación Peroxidasa en las branquias, el músculo (Mc), la hemolinfa (HL) y el hepatopáncreas (HP) de machos *L. santolla*. Los valores se presentan en mUGPx mg proteína⁻¹. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras de error indican desvíos estándar.

La actividad de GST en *L. santolla* estuvo presente en todos los tejidos analizados, con diferencias estacionales en las branquias ($H= 9,74$; $p < 0,05$), la hemolinfa ($H= 21,72$; $p < 0,001$) y el músculo ($H= 9,33$; $p < 0,01$. Fig. 4.4). El patrón de la actividad de GST difirió entre los tejidos, pero en general la actividad fue baja en septiembre, y perduró la baja actividad en diciembre. En marzo se observó un aumento de la actividad de GST en las branquias únicamente, y luego en julio el aumento se observó tanto en la hemolinfa como en el músculo (Fig. 4.4). El hepatopáncreas presentó una actividad constante de GST de $0,90 \pm 0,56$ UGST mg proteína⁻¹ a lo largo del año ($H= 3,99$, $p > 0,05$. Fig. 4.4).

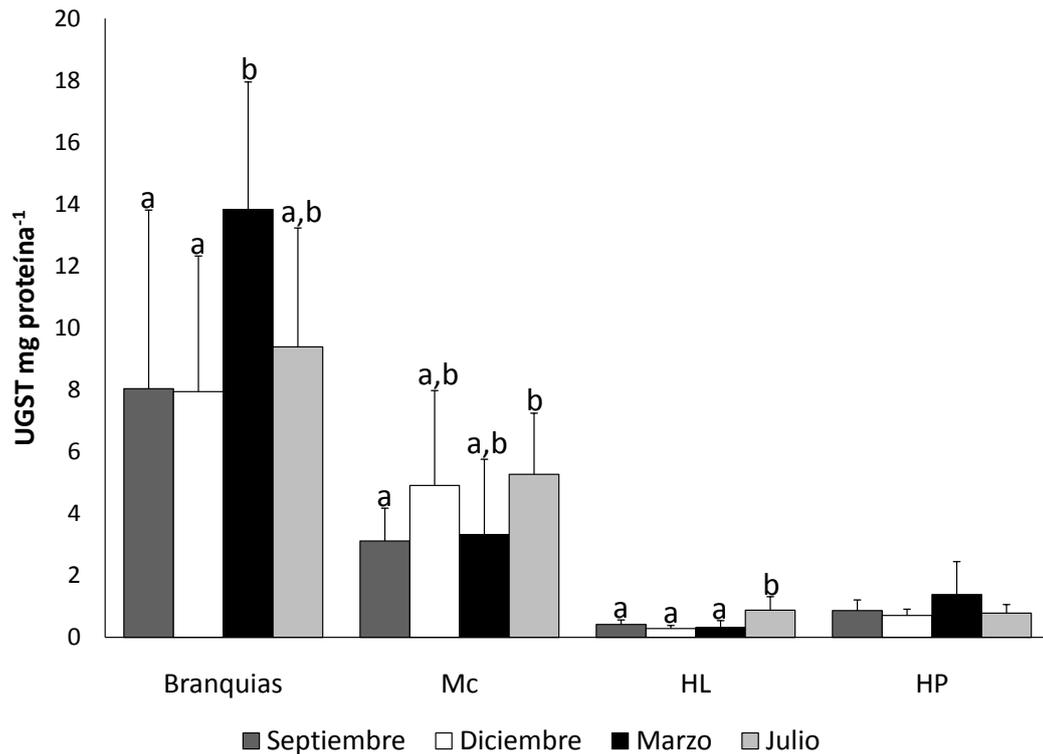


Figura 4.4. Variación estacional de la actividad enzimática de Glutación Transferasa en las branquias, el músculo (Mc), la hemolinfa (HL) y el hepatopáncreas (HP) de machos de *L. santolla*. Los valores se presentan en UGST mg proteína⁻¹. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras de error indican desvíos estándar.

ANTIOXIDANTES NO-ENZIMÁTICOS

Durante septiembre y diciembre, las branquias tuvieron una concentración de GSH-eq dos órdenes de magnitud menores comparadas al resto del año ($H = 42,1$, $p < 0,001$. Tabla 4.1). En el músculo, la concentración de GSH-eq fue menor en septiembre ($H = 42,09$; $p < 0,001$. Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Concentración estacional de glutatión (GSH-eq = GSH + 2GSSG) en machos de *L. santolla*. Los datos son expresados en promedio \pm desvío estándar, los valores se presentan como nmol GSH mg tejido⁻¹. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

GSH	Branquias	Músculo
Septiembre	$(9 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ a}$	$0,015 \pm 0,004^{\text{a}}$
Diciembre	$(8 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ a}$	$0,47 \pm 0,06^{\text{b}}$
Marzo	$0,25 \pm 0,14^{\text{b}}$	$0,67 \pm 0,12^{\text{c}}$
Julio	$0,14 \pm 0,09^{\text{b}}$	$0,58 \pm 0,07^{\text{b,c}}$

El ácido ascórbico fue el único antioxidante no-enzimático que pudo ser determinado en hemolinfa y hepatopáncreas, ya que GSH no pudo ser detectado con la técnica empleada. Entre los tejidos analizados, el músculo fue el tejido con la mayor concentración de AA a lo largo del año estudiado (Tabla 4.2). Las variaciones estacionales de AA entre cada tejido difirió, pero en septiembre una baja concentración de AA fue registrada en todos los tejidos (Tabla 4.2).

Tabla 4. 2. Concentración estacional de ácido ascórbico (AA) en machos de *L. santolla*. Los datos son expresados en promedio \pm desvío estándar. Los valores de AA se presentan como ng AA g tejido⁻¹ para las branquias, músculo y hepatopáncreas, y como ng AA mL HL⁻¹ para hemolinfa. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

AA	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
Septiembre	$55 \pm 21^{\text{a}}$	$108 \pm 28^{\text{a}}$	$3 \pm 1^{\text{a}}$	$227 \pm 37^{\text{a}}$
Diciembre	$37 \pm 17^{\text{a,c}}$	$1509 \pm 1130^{\text{b}}$	$7 \pm 1^{\text{b}}$	$483 \pm 81^{\text{b}}$
Marzo	$117 \pm 84^{\text{b}}$	$1165 \pm 312^{\text{b}}$	$8 \pm 1^{\text{b}}$	$405 \pm 35^{\text{a,b}}$
Julio	$32 \pm 10^{\text{c}}$	$867 \pm 209^{\text{b}}$	$4 \pm 1^{\text{a}}$	$537 \pm 99^{\text{b}}$

PROTEÍNAS, GLUCOSA Y PH

A lo largo del año estudiado las concentraciones de proteínas y glucosa en los tejidos de la centolla variaron significativamente (Tabla 4.3). Particularmente, en las branquias se encontró una concentración disminuida de glucosa y proteínas en septiembre, y ambas concentraciones incrementaron significativamente en diciembre y marzo ($F= 29,3$; $p < 0,0001$). En julio, en las branquias la concentración de glucosa continuó alta, mientras que la de proteínas disminuyó (Tabla 4.3). En la hemolinfa, se encontraron bajas concentraciones de glucosa y proteínas en julio y septiembre ($F_{gluc}= 18,92$, $F_{prot}= 33,59$; $p < 0,001$ en ambos casos. Tabla 4.3). Entre los tejidos analizados, el hepatopáncreas mostró la mayor concentración de glucosa (Tabla 4.3). Además, el contenido de glucosa se incrementó en este órgano durante diciembre y marzo ($H= 40,27$; $p < 0,001$. Tabla 4.3). En cambio la concentración de proteínas fue mayor durante septiembre, sin diferir significativamente del valor encontrado en diciembre ($H= 17,94$; $p < 0,001$. Tabla 4.3). La concentración de proteínas en el músculo, coincidiendo con los otros tejidos, fue mínima en julio ($F= 8,2$; $p < 0,001$. Tabla 4.3), aunque en el músculo la concentración de proteínas se mantuvo baja en diciembre y marzo. El pH en la hemolinfa presentó variaciones significativas a lo largo del año ($H= 41,89$; $p < 0,01$), con los mayores valores en septiembre y diciembre (Tabla 4.4).

Tabla 4.3. Variaciones estacionales en la concentración de proteínas y glucosa en tejidos de machos de *L. santolla*. La concentración de proteínas se expresa como mg mL⁻¹, y la concentración de glucosa como mg glucosa g tejido⁻¹ en las branquias, el músculo y el hepatopáncreas, y como mg glucosa mL HL⁻¹ en la hemolinfa. Los datos se expresan como promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Proteína	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
Septiembre	25 \pm 5 ^a	8,6 \pm 0,8 ^a	6 \pm 2 ^a	5 \pm 2 ^a
Diciembre	35 \pm 5 ^b	7,4 \pm 0,5 ^b	13 \pm 2 ^b	4,1 \pm 0,8 ^{a,b}
Marzo	33 \pm 6 ^b	7,8 \pm 0,9 ^{a,b}	12 \pm 4 ^b	3,3 \pm 0,6 ^b
Julio	20 \pm 4 ^a	7 \pm 1 ^b	4 \pm 3 ^a	3,5 \pm 0,4 ^b
Glucosa				
Septiembre	0,05 \pm 0,03 ^a	0,8 \pm 0,2 ^a	0,013 \pm 0,005 ^a	2 \pm 1 ^b
Diciembre	0,19 \pm 0,07 ^b	1,0 \pm 0,5 ^a	0,022 \pm 0,008 ^b	5 \pm 1 ^a
Marzo	0,16 \pm 0,04 ^b	1,1 \pm 0,4 ^a	0,014 \pm 0,004 ^{a,b}	9 \pm 3 ^a
Julio	0,11 \pm 0,04 ^b	0,3 \pm 0,2 ^b	0,011 \pm 0,004 ^a	1 \pm 1 ^b

Tabla 4.4. Variaciones estacionales del pH en hemolinfa de machos de *L. santolla*. Los datos se expresan en promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para la hipótesis nula de igualdad de promedios de pH ($p < 0,05$).

	pH
Septiembre	7,74 \pm 0,04 ^a
Diciembre	7,57 \pm 0,02 ^a
Marzo	7,20 \pm 0,03 ^b
Julio	7,11 \pm 0,03 ^b

PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO

El daño oxidativo, determinado como LPO y OP, mostró diferencias a lo largo del año en todos los tejidos analizados (Tabla 4.5). Además, los valores más altos de LPO se encontraron en el hepatopáncreas, como ya fue observado en el estudio de ciclos circadianos (Cap. 3). En relación a la estacionalidad, LPO presentó mínimos valores durante septiembre en el hepatopáncreas ($H= 35,7$; $p< 0,001$) y el músculo ($H= 28,8$; $p< 0,001$), mientras que en las branquias el mínimo fue registrado en julio ($H= 24,09$; $p< 0,001$). En todos los tejidos analizados, el daño en las proteínas fue consistentemente menor en septiembre, y únicamente en la hemolinfa se observa que se mantiene una baja concentración de carbonilos durante septiembre y diciembre, mientras que en los otros tejidos analizados aumenta la OP durante el resto del año analizado (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Variaciones estacionales de la peroxidación de lípidos (LPO- $\mu\text{mol TBARS g tejido}^{-1}$) y oxidación de proteínas (OP- $\text{nmol carbonilo mg proteína}^{-1}$) en tejidos de machos de *L. santolla*. Los datos se expresan como promedio \pm desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p< 0,05$).

LPO	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
Septiembre	13 \pm 5 ^a	5 \pm 1 ^a	--	76 \pm 24 ^a
Diciembre	15 \pm 4 ^a	15 \pm 6 ^b	--	246 \pm 84 ^b
Marzo	12 \pm 2 ^a	18 \pm 5 ^b	--	186 \pm 17 ^b
Julio	8 \pm 2 ^b	13 \pm 5 ^b	--	188 \pm 44 ^b
OP				
Septiembre	0,6 \pm 0,2 ^a	0,2 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,2 ^{a,b}	0,4 \pm 0,1 ^a
Diciembre	1,0 \pm 0,1 ^b	1,4 \pm 0,5 ^b	0,5 \pm 0,2 ^a	1,6 \pm 0,3 ^b
Marzo	1,0 \pm 0,1 ^b	1,2 \pm 0,1 ^b	0,9 \pm 0,3 ^{b,c}	1,6 \pm 0,3 ^b
Julio	1,2 \pm 0,2 ^b	1,2 \pm 0,3 ^b	1,8 \pm 0,9 ^c	1,5 \pm 0,3 ^b

DISCUSIÓN

SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

La actividad enzimática en los diferentes tejidos estudiado en machos de *L. santolla* fue estacional. En este capítulo se observa que las enzimas de las defensas antioxidantes están actuando de manera concertada contrarrestando la sobreproducción de ROS durante los momentos más relevantes de los ciclos de vida del crustáceo, como la reproducción y la muda. El sistema antioxidante, además, muestra altas actividades causadas probablemente por factores ambientales del Canal Beagle, como las bajas temperaturas durante el invierno y la primavera.

En las branquias de los crustáceos se produce el primer contacto con cualquier cambio que ocurra en el agua, además, como se mencionó anteriormente, este tejido es un sitio de alta producción de ROS (Borković *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2010). El patrón coincidente de las actividades enzimáticas de SOD y CAT en las branquias de *L. santolla* está indicando un trabajo concertado de esta primera línea de defensas ante algún factor estresante. La marcada diferencia de actividades entre los meses de septiembre y diciembre podrían estar indicando la influencia de la temperatura en las actividades de SOD y CAT en las branquias, aunque la misma diferencia no se observó en marzo y julio. En el Canal Beagle, las temperaturas se aproximan a 5°C desde junio a septiembre, y luego incrementa a valores promedio de 9°C en diciembre-marzo (Curelovich *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2011; Giarratano *et al.*, 2011) (Fig. 2.1). Asimismo, el estrés oxidativo inducido por bajas temperaturas también ha sido observado en otras especies, como en los camarones *Machrobrachium nipponense* (Wang *et al.*, 2006), *Litopenaeus vannamei* (Qiu *et al.*, 2011), en el pez *Danio rerio* (Malek *et al.*, 2004) y en el cirripedio *Balanus balanoides* (Niyogi *et al.*, 2001). Existen dos razones especulativas que explicarían el patrón observado en las enzimas SOD y CAT en las branquias: *i*) una disminución de la temperatura debilita el sistema de eliminación de las ROS, ya que la temperatura puede afectar directamente la actividad de las enzimas al cambiar su estructura proteica y por lo tanto cambiar su eficiencia catalítica o capacidad de anclaje con el sustrato (Cailleaud *et al.*, 2007); y/o *ii*) un aumento excesivo de la producción de las ROS que sobrepasa las capacidades del sistema de defensas antioxidantes (Lushchak, 2011). Si bien el mecanismo involucrado aun no es claro, en las branquias de *L. santolla* la primera línea de defensa enzimática (SOD y CAT) está activa en las estaciones de temperaturas bajas. Alternativamente a la presencia de las ROS, esta activación de las defensas enzimáticas puede ser parte de un ciclo anual a

una “preparación” ante el incremento de temperatura que ocurre en la primavera, a principios de octubre, que podría causar estrés oxidativo. Existen parámetros ambientales que pueden generar una depresión metabólica determinando un estado hipometabólico (Almeida & Di Mascio, 2011), momento en que el organismo puede responder como si estuviese en un estado hipóxico hacia cambios de salinidad (Freire *et al.*, 2011) o temperatura (Frederich & Pörtner, 2000). Durante este estado hipometabólico, el consumo de oxígeno disminuye y en consecuencia también la producción de las ROS. En varias especies de vertebrados e invertebrados, durante este estado se ha observado que hay una producción de ROS en los primeros momentos del estado hipometabólico (Welker *et al.*, 2013), que genera una activación del sistema de defensas antioxidantes (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002; Lushchak, 2011). De esta manera, el sistema de defensas antioxidantes del animal permanece activado y preparado para la posible sobre-producción de ROS que se produce una vez que el consumo de oxígeno es normalizado (Hermes-Lima *et al.*, 1998).

En la hemolinfa de *L. santolla*, también se observó esta acción enzimática combinada de SOD y CAT en contra de la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas. Particularmente, en septiembre las altas actividades enzimáticas de SOD y CAT previnieron la producción de un alto daño oxidativo. Por otro lado, el incremento combinado de tres actividades enzimáticas –SOD, CAT y GST- determinado en la hemolinfa en julio no fue suficiente para prevenir el daño, induciendo la oxidación de proteínas en este tejido. No obstante, no se descarta la presencia de otras defensas enzimáticas o no-enzimáticas que no fueron analizadas en el presente trabajo, que podrían estar actuando en contra del desbalance de la concentración de ROS en la hemolinfa, especialmente en diciembre y marzo, cuando la oxidación de proteínas es baja, como así también las actividades enzimáticas.

El hepatopáncreas de *L. santolla* presentó una actividad enzimática constante de SOD, GPx y GST. Esta estabilidad enzimática puede deberse a la alta actividad metabólica de este órgano, puesto que, como fue observado en el estudio de ritmos circadianos (Cap. 3), las defensas están constantemente activas para mantener el equilibrio de generación-eliminación de ROS. CAT fue la única enzima analizada que presentó variabilidad a lo largo del año estudiado. En diciembre y marzo, la actividad enzimática de CAT en el hepatopáncreas alcanzó valores dos veces mayores a los encontrados en septiembre. Este

incremento de actividad enzimática coincide con: *i*) las estaciones más cálidas en el Canal Beagle con el consecuente aumento en la actividad metabólica en los ectotermos y *ii*) la época de reproducción de esta especie durante noviembre y diciembre, momento en que los machos no se alimentan durante los largos períodos (4 semanas) de abrazo pre-copulatorio (Gowland & Lovrich, datos no publicados). Ambos factores implican cambios fisiológicos en el metabolismo que podrían causar un aumento en la producción de H₂O₂, provocando el aumento de la actividad de CAT. No obstante, no se descarta la participación de otros antioxidantes trabajando en la prevención de daño oxidativo en el hepatopáncreas durante el año. La actividad reproductiva y los patrones de ingesta de alimento para la reserva y uso, probablemente estén causando cambios en el estado hormonal y nutricional que podrían afectar los niveles de enzimas antioxidantes (Borković *et al.*, 2005).

Durante julio las altas actividades enzimáticas en el sistema de defensas del músculo, particularmente de SOD, GPx y GST, indican un mecanismo de defensas antioxidantes colaborativo que previene el daño oxidativo en esta etapa del año. Específicamente, el sistema enzimático de glutatión estudiado en el músculo de *L. santolla*, compuesto por GPX y GST, disminuye su actividad en septiembre, permaneciendo sin cambios a lo largo del año, y luego aumenta significativamente en julio. Probablemente, el alto metabolismo en el músculo se relacione con procesos de post-muda. Durante este período la división celular es elevada, producto del crecimiento muscular y del reemplazo de la absorción de agua previo a la muda por tejidos celulares (Hartnoll, 1982), proceso que se extiende aproximadamente 3-4 meses en el centollón *Paralomis granulosa*, especie simpátrica (Lovrich *et al.*, 2003).

Por otro lado, en el tejido muscular en diciembre, el sistema de defensas antioxidantes se encuentra activo, que puede ser atribuido a la movilización energética debido a la reproducción. Este evento en *L. santolla* está asociado a una fuerte competencia entre machos por acceso y defensa de parejas (Gowland, resultados no publicados). Esto genera una alta actividad muscular, al sostener a la hembra para el abrazo pre-copulatorio y defenderla mediante interacciones agonísticas con otros machos. En los crustáceos de profundidad *Nephrops norvegicus* y *Aristeus antennatus*, las actividades de CAT, del sistema de glutatión y de la colinesterasa en el hepatopáncreas y el músculo actúan de manera coordinada con la muda y la reproducción, donde los factores ambientales como la

temperatura y la salinidad son constantes y no afectan el metabolismo oxidativo (Antó *et al.*, 2009).

Además, la actividad de CAT en el músculo difiere de las actividades de las otras enzimas analizadas, puesto que aumenta en septiembre cuando las actividades de las otras enzimas disminuyen. Esta acción parece suficiente para prevenir el daño oxidativo, reflejado en la baja peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas presentes en músculo en esa etapa del año. Esta acción podría ser una “preparación para el estrés oxidativo” durante un posible estado hipometabólico en septiembre, como se observó en las branquias de *L. santolla*. En cambio, la alta actividad de CAT en el músculo durante diciembre coincide con la etapa de reproducción.

Muchos animales durante períodos de estivación, o bajo condiciones ambientales variables, tienen la capacidad de estar en un período de hipometabolismo para sobrevivir (Storey & Storey, 2010). Las defensas antioxidantes presentan un aumento de actividad en este estado de disminución metabólica en algunos animales tolerantes a la anoxia/hipoxia (Hermes-Lima *et al.*, 1998). Una vez que el animal sale del estado hipometabólico, el consumo de O₂ aumenta, y por ende la concentración de las ROS también, causando un posible estrés oxidativo. Tal como se ha mencionado previamente, se ha postulado que el aumento de defensas antioxidantes previo al re-ingreso de O₂ al sistema es un estado de preparación al estrés oxidativo (Hermes-Lima *et al.*, 1998; Gorr *et al.*, 2010; Welker *et al.*, 2013).

ANTIOXIDANTES NO-ENZIMÁTICOS

En las branquias y el músculo de *L. santolla* la concentración de GSH-eq fue estacional. Particularmente, las branquias mostraron una fuerte disminución de concentración de GSH-eq en septiembre y diciembre. Esta gran diferencia de GSH-eq en las branquias de *L. santolla* indican que este antioxidante de bajo peso molecular juega un rol importante en la prevención del daño celular. La concentración determinada en septiembre probablemente sea debido a los cambios estacionales de temperatura y salinidad en el Canal Beagle. En contraste, durante diciembre, la baja concentración podría ser causada por los incrementos de temperatura combinados con la época de reproducción

de las centollas en el Canal Beagle, que por lo antes expuesto pueden causar variaciones en las defensas antioxidantes.

La baja concentración de GSH-eq en el músculo de la centolla en septiembre indicaría que GSH es usado para la prevención del daño oxidativo causado principalmente por los cambios ambientales. A modo de ejemplo se encontró que en el anfípodo *Gammarus locusta*, la disminución de GSH se atribuye a cambios ambientales que ocasionan un aumento del consumo de oxígeno (Gismondi *et al.*, 2012), y en el mejillón *Perna perna* la disminución de GSH coincide con la época de reproducción de esta especie (Filho *et al.*, 2001).

El AA presentó una marcada estacionalidad en todos los tejidos analizados, y en el músculo y el hepatopáncreas fue mayor que en las branquias y la hemolinfa. Por ejemplo, el contenido de AA en tejidos del cangrejo *Scylla serrata* fue estacional y mayor en el verano (Paital & Chainy, 2013). Las variaciones estacionales de AA en este cangrejo podrían ser atribuidas a su estado metabólico que induce estrés oxidativo relacionado a factores estacionales como salinidad, presión de oxígeno y la temperatura (Lushchak, 2011). En el Canal Beagle y en la glándula digestiva de un molusco intermareal *Nacella magellanica* se registró una relación alta de radical ascorbilo:ascorbato, que es un índice de estrés oxidativo hidrofílico *Nacella magellanica* (Malanga *et al.*, 2007). Es decir que el AA podría ser un antioxidante no-enzimático importante en invertebrados sub-antárticos.

Los resultados encontrados en la presente tesis muestran que en todos los tejidos, excepto en las branquias, la concentración de AA es alta durante todo el año y disminuye en septiembre. Estas variaciones estacionales en el AA encontradas en *L. santolla* podrían estar relacionadas con la dieta. Las variaciones estacionales en la capacidad antioxidante de la almeja *Adammaussion colbecki* y en peces de aguas dulces y estuarinos se atribuyen a un mayor consumo de algas, que podría alterar la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular, como ser los carotenoides y el α -tocoferol (Regoli *et al.*, 2002; Da Rocha *et al.*, 2009). También en los erizos de mar *Loxechinus albus*, las variaciones anuales de ácido ascórbico ocurren debido al suplemento dietario. En *L. albus*, la ingesta de alimento podría variar durante el año incrementando el contenido de ascorbato para prevenir el daño oxidativo en el medio hidrofílico del tejido (Malanga *et al.*, 2009). Particularmente en la centolla del Canal Beagle, el consumo de macroalgas es mayor durante el verano y el otoño (60-80% de frecuencia de ocurrencia; Comoglio, 1994). Por lo tanto, la

concentración de antioxidantes no-enzimáticos en machos de centolla son mínimos en septiembre luego de un bajo consumo de algas, principal fuente de antioxidantes tales como el AA. Además, este aumento del AA coincide temporalmente con un bajo daño oxidativo, medido por LPO y OP.

ESTADO METABÓLICO DE *LITHODES SANTOLLA*

Las concentraciones de glucosa y proteínas presentaron estacionalidad en todos los tejidos de *L. santolla*. Particularmente, en el hepatopáncreas y el músculo aumentó la concentración de glucosa en diciembre y marzo, etapas del año de temperaturas más altas en el Canal Beagle, coincidiendo además con el período de reproducción de la especie en noviembre-diciembre. Este aumento de la concentración de glucosa puede estar relacionado a la necesidad de una gran cantidad de sustrato para la glicólisis (da Silva-Castiglioni *et al.*, 2010), como fuente de energía. De modo similar, en las branquias y la hemolinfa de la centolla, la gran cantidad de glucosa en diciembre y marzo podría estar actuando como un buffer. De esta manera, un animal puede responder rápidamente ante las variaciones ambientales, como lo propusieron da Silva-Castiglioni *et al.* (2010).

La hiperglucemia ha sido observada en respuesta a factores de estrés como: la hipoxia en los cangrejos *Parastacus defossus* y *P. brasiliensis* (da Silva-Castiglioni *et al.*, 2010), la anaerobiosis ambiental en el cangrejo *Neohelice granulata* (Oliveira *et al.*, 2001), y la muda en el cangrejo *Procambarus clarkii* (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). Además, las dietas ricas en carbohidratos causan altas concentraciones de glucosa en los diferentes tejidos, especialmente en la hemolinfa de los cangrejos *Aegla ligulata* y *Ocyropode quadrata* (Oliveira *et al.*, 2004; Vinagre *et al.*, 2007).

El contenido proteico en todos los tejidos de *L. santolla* fue estacional, donde las branquias y la hemolinfa presentaron aumentos de concentraciones en diciembre y marzo. En contraste, en el hepatopáncreas y el músculo la mayor concentración de proteínas se observó en septiembre. En el Canal Beagle, cuando las temperaturas son bajas y el fotoperíodo corto (junio a septiembre), la disponibilidad de alimento disminuye (Romero *et al.*, 2004; Diez *et al.*, 2009). Por tanto, la centolla podría estar empleando sus proteínas como fuente de energía durante el invierno, evidenciado por la disminución de las mismas tanto en el músculo como en el hepatopáncreas en julio. En los crustáceos, el contenido de

proteínas y su variación estacional ha sido atribuido a su rol como fuente de energía, como también a la disponibilidad y tipo de alimento (de Oliveira *et al.*, 2005; Vinagre *et al.*, 2007). El uso de proteínas en el músculo del cangrejo *Parastacus varicosus* durante el período de escasez de alimento contribuye a su mantenimiento y supervivencia (da Silva-Castiglioni *et al.*, 2007). Asimismo, durante períodos de inanición del langostino *Penaeus esculentus* (Barclay *et al.*, 1983), de la langosta *Nephrops norvegicus* (Dall, 1981) y del anfípodo *Hyalalella curvispina* (Dutra *et al.*, 2008), la masa muscular del abdomen es la mayor contribución de proteínas al metabolismo energético, donde un pequeño cambio de concentración de proteínas en este tejido es suficiente para realizar una contribución sustancial a la supervivencia. Durante experimentos de inanición la centolla *L. santolla* usa las reservas de proteínas del hepatopáncreas como fuente de energía (Comoglio *et al.*, 2008), por ende la menor concentración de proteínas que se registró en el hepatopáncreas en marzo y julio. Además, como las proteínas son constituyentes estructurales, funcionales y energéticos de los tejidos (Dutra *et al.*, 2008), podrían usarse también durante la reproducción, cuando una alta demanda de energía es requerida, y los machos están en inanición durante el abrazo pre-copulatorio, como se mencionó previamente. En cambio, la disminución de proteínas en marzo, y solamente evidenciado en el hepatopáncreas, podría estar relacionado a la energía requerida para la muda durante abril-junio.

Como se ha mencionado en el estudio de ciclos circadianos (Cap. 3), existen argumentos a favor del rol del pH en la hemolinfa como indicador de las actividades de procesos metabólicos. Se acepta en general, que la acidificación de la hemolinfa parece estar relacionada a una disminución de la tasa metabólica de los organismos (Forgue *et al.*, 2001). En el presente trabajo el pH de la hemolinfa aumentó en septiembre y diciembre entre 0,5 y 0,3 unidades, en comparación con el pH en marzo y julio. Por tanto, este pequeño aumento de pH podría estar relacionado al estado de “preparación de estrés” en septiembre observado a partir del sistema de defensas enzimáticos en las branquias y la hemolinfa de la centolla. Por otro lado, el aumento en diciembre puede deberse a los cambios metabólicos que traen aparejados la reproducción de los machos de *L. santolla*. A pesar de lo expresado anteriormente, no es posible determinar una clara relación del pH de la hemolinfa con los cambios ambientales y/o el estado fisiológico dado por eventos biológicos del ciclo de vida.

DAÑO OXIDATIVO

Los parámetros de estrés oxidativo también presentaron estacionalidad en los tejidos de la centolla *L. santolla*. Como se observó en el Cap. 3, la peroxidación de lípidos nuevamente fue mayor en el hepatopáncreas de *L. santolla*. Este patrón también se observó en las centollas *L. confundens* de la costa Atlántica de Tierra del Fuego y *L. santolla* del Golfo San Jorge, en donde los valores de LPO en el hepatopáncreas fueron un orden de magnitud mayor que el encontrado en otros tejidos (Romero *et al.*, 2013).

En general, en la mayoría de los tejidos de la centolla *L. santolla* la peroxidación de lípidos fue menor en septiembre. En muchos trabajos, se observa que esta peroxidación es mayor en el verano, relacionado al incremento de temperatura del agua o al estado fisiológico del momento dado por la reproducción en esa etapa del año (Power & Sheehan, 1996; Sheehan & Power, 1999; Malanga *et al.*, 2007). Sin embargo, en la centolla *L. santolla* la alta concentración de los parámetros de estrés oxidativo observada durante todo el año indica una alta tasa metabólica. Particularmente, esta tasa metabólica podría ser causada por los procesos fisiológicos involucrados en la muda, como por ejemplo la producción de feromonas o la inanición (Duffy & Thiel, 2007). Se ha postulado que los pulsos de estrés oxidativo influyen en la fisiología celular al intervenir en los mecanismos celulares señalizados por las ROS (Finkel & Holbrook, 2000; Gutteridge & Halliwell, 2000; Paital & Chainy, 2013). En el erizo de mar *Loxechinus albus* del Canal Beagle, la peroxidación de lípidos es necesaria para el desove, para el cual aumenta la disponibilidad de los lípidos permitiendo la separación de las células reproductivas del tejido gonadal (Malanga *et al.*, 2009). Por consiguiente, se plantea que en la centolla la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas podrían ser procesos claves en eventos fisiológicos, como la reproducción y la muda.

La centolla *Lithodes santolla* del Canal Beagle presenta estacionalidad en su sistema de defensas antioxidantes, que trabaja de manera concertada en contra de la sobreproducción de las ROS. La estacionalidad en los diferentes tejidos varió, observándose que las branquias y la hemolinfa son mayormente influenciadas por los cambios ambientales dados en el Canal Beagle a lo largo del año. En cambio, las defensas antioxidantes del hepatopáncreas y del músculo responden al estado fisiológico del animal, dado por los eventos de reproducción y muda. De esta manera, se evita el estrés oxidativo a

largo plazo que finalmente podría causar daños en la reproducción, inmunidad y/o supervivencia.

CAPÍTULO 5

EL SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE *LITHODES* *SANTOLLA* FRENTE A LA EXPOSICIÓN AÉREA Y REINMERSIÓN

INTRODUCCIÓN

El sistema respiratorio en las centollas consta de once branquias pareadas, localizadas en dos cámaras branquiales, una a cada lado del caparazón. Las branquias están formadas por varias laminillas dispuestas a lo largo de un eje central, y son las encargadas del intercambio gaseoso y balance osmótico del animal. Así, el dióxido de carbono obtenido de los tejidos del animal es intercambiado por oxígeno vía un mecanismo de contracorriente. El seno branquial conduce la sangre venosa a través de las laminillas branquiales, donde se oxigena y retorna a través de la arteria branquial. Luego, la sangre arterial pasa hacia el seno pericardial y fluye desde el corazón a los tejidos (Donaldson & Byersdorfer, 2014). El intercambio gaseoso se facilita por la producción de una corriente del agua en las cámaras branquiales impulsada por el batido de los escafognatitos y el movimiento de los apéndices bucales (Withers, 1992; Baba *et al.*, 2011).

En la mayoría de los crustáceos decápodos la emersión impide el intercambio gaseoso en las branquias con consecuencias en la respiración. La reducción del flujo de agua causa el colapso de las branquias y la reducción de la superficie de intercambio, lo cual se cree que es la principal causa de los problemas fisiológicos durante la emersión (Morris & Oliver, 1999). Esto es más pronunciado en especies infralitorales, que raramente experimentan exposición aérea, que en especies intermareales y supralitorales (Durand *et al.*, 2000). Aún así, existen especies sub-mareales que tienen una gran capacidad de supervivencia fuera del agua, lo cual es aprovechado para la exportación de especies comerciales a mercados distantes (Speed *et al.*, 2001).

La reducción del intercambio gaseoso, proceso en que el consumo de oxígeno y la eliminación de CO₂ disminuyen, induce a una hipoxia interna. Si la emersión es prolongada, el animal se ve forzado a cambiar a un metabolismo anaeróbico (Durand *et al.*, 2000). Los animales acuáticos responden a la hipoxia primero intentando mantener el ingreso de oxígeno de manera continua, luego conservando la energía reduciendo su uso, y finalmente usando la energía proveniente de procesos anaeróbicos destinándola a procesos metabólicos fundamentales (Wu, 2002). Esto se logra mediante la reducción general del metabolismo, una baja en la regulación de síntesis de proteínas, y/o la reducción o modificación de ciertas enzimas reguladoras en procesos aeróbicos y anaeróbicos. De esta manera los animales maximizan su supervivencia en un ambiente hipóxico/anóxico reduciendo la actividad metabólica entre un 10 y 30% de su actividad normal en descanso

(Hochachka & Lutz, 2001; Oliveira *et al.*, 2005), es decir, entrando en un estado hipometabólico (Wu, 2002).

En crustáceos con interés comercial, la resistencia a la exposición aérea se ha estudiado para profundizar el conocimiento en la supervivencia de los animales (Barrento *et al.*, 2010), la acumulación de desechos amoniacales (Durand *et al.*, 2000) y/o el intercambio gaseoso (Whiteley *et al.*, 1997). La centolla *L. santolla* presenta una alta tolerancia a la exposición aérea, probablemente debido a una adaptación del organismo a la hipoxia que puede encontrar en su ambiente natural en aguas profundas (Urbina *et al.*, 2013). También, la adaptación de los litódidos al ambiente aéreo podría ser una característica heredada de sus ancestros intermareales (Zaklan, 2002; Romero *et al.*, 2007). Sin embargo, los cambios fisiológicos producidos por la exposición aérea durante el transporte en vivo podrían llevar a la muerte del animal. La mortalidad puede ocurrir durante el manipuleo del animal y el transporte, como así también una vez devuelto al agua puesto que no puede regresar a un estado fisiológico basal. La muerte del animal puede producirse a largo plazo al generarse fallas en el proceso de muda y/o tener descompensaciones que afecten su sistema inmune o su comportamiento natural (Stoner, 2012). Además, altas mortalidades durante la reinmersión en los centros de acopio comercial implican pérdidas económicas considerables (Barrento *et al.*, 2008). Y, sin llegar a la muerte del animal, también se podrían producir cambios importantes en la calidad de la carne debido a la oxidación del tejido muscular (Romero *et al.*, 2007, 2011).

En este capítulo se analizará la recuperación de machos comerciales de *L. santolla* del Canal Beagle una vez reinmersos luego de 24 h de exposición aérea a 8°C. Específicamente, se considerará el sistema de defensas antioxidantes ya descrito en capítulos previos (SOD, CAT, GPx, GST, AA y GSH-eq), y los parámetros de estrés oxidativo LPO y OP. Además se estudiará la concentración de glucosa en los distintos tejidos, y el pH hemolinfático. A partir de estos análisis se espera observar la generación de un estado de estrés oxidativo en el animal durante la reperusión, pero que el sistema de defensas antioxidantes sería capaz de disminuirlo y recuperar su estado fisiológico basal durante el período de reinmersión estudiado.

MATERIALES Y MÉTODOS

ACLIMATACIÓN Y CONDICIONES DEL ENSAYO

Los machos (N= 48) de *L. santolla* fueron capturados en Septiembre 2012 y transportados al laboratorio para su aclimatación durante 3 semanas. Los animales se mantuvieron en acuarios individuales de plástico de 25 L (30 x 40 x 30 cm de ancho x largo x alto, respectivamente. Fig. 2.3-C) con agua marina recirculando y bajo las mismas condiciones generales descritas previamente (Cap. 2). El fotoperíodo seleccionado fue de 12:12 h, con el encendido de la luz a las 8 h. Estas condiciones de fotoperíodo se asemejan al período natural de luz en el Canal Beagle durante esta estación del año. Todos los cangrejos se encontraban en estado de intermuda y eran de tamaño comercial (132 ± 12 mm de LC), con 1319 ± 413 g de peso. Los animales fueron alimentados con calamar descongelado cada dos días, y 48 horas previo a la experiencia, se suspendió la provisión de alimento.

Los animales se separaron aleatoriamente en seis grupos de ocho animales cada uno, un grupo control que se mantuvo siempre en el acuario, y cinco grupos que fueron expuestos al aire por 24 h a 8°C en una cámara fría (Fig.2.3-B). Luego de las 24 h de exposición aérea, un grupo se disecó, y se lo consideró como el grupo de tiempo cero de recuperación (t_0). Los animales de los cuatro grupos restantes fueron resurgidos en agua marina a 8°C en el sistema donde fueron aclimatados. Para evitar el manipuleo de los animales, siempre se los mantenían en los acuarios individuales. Cada uno de estos grupos fue disecado aleatoriamente luego de 0,5 h, 2 h, 8 h y 24 h de reinmersión. El grupo control fue disecado al final de la experiencia, luego del grupo de 24 horas. Se tomaron las muestras de tejido, y se procedió con el análisis de los parámetros bioquímicos, como se describe en el Cap. 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar los efectos de la reinmersión de *L. santolla* luego de 24 horas de exposición aérea a 8°C en cada parámetro estudiado. Previamente, se realizaron pruebas de Shapiro- Wilk y Levene para verificar normalidad y homogeneidad de los datos, respectivamente (Sokal & Rohlf, 1995). Si los datos no cumplían con los criterios de normalidad y/o homogeneidad, se

transformaron utilizando la función de logaritmo en base 10 o raíz cuadrada. Si se detectaban diferencias significativas ($p < 0,05$) en los análisis de varianza, los datos se compararon con pruebas *post hoc* de Tukey. Si los datos no cumplían con los criterios necesarios para realizar el ANOVA, aún después de ser transformados, se analizaron con la prueba no-paramétrica de análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf, 1995). Los datos se analizaron con el software libre R 2.15.2 (2012). Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar.

RESULTADOS

La supervivencia observada al final del experimento fue de 98,5%. Luego de 24 h de exposición aérea todos los animales presentaron movimientos lentos de los pedúnculos oculares y antenas, y los pereiópodos flácidos. Además, se observaron burbujas, formando una espuma en la zona de mandíbulas y maxilares, que podría ser una estrategia para mantener las branquias húmedas y así permitir el intercambio gaseoso (Jacklin & Combes, 2007). Además, en el fondo del acuario donde se realizaron las exposiciones al aire se observó un líquido de color marrón, que se atribuye a las regurgitaciones de secreciones digestivas por la boca. Estas secreciones en contacto con el agua retenida en las branquias puede producir una gran cantidad de espuma (Freitas *et al.*, 1995). Luego de 8 h de reinmersión, los animales estaban más activos, y el movimiento de pereiópodos y antenas era más evidente. Los animales del grupo control, cuando se removieron del agua para realizar el muestreo, reaccionaron con movimientos de apéndices fuertes y rápidos, con un comportamiento típico de escape.

BRANQUIAS

En las branquias de *L. santolla* la actividad de enzimas antioxidantes mostró variaciones entre los distintos tratamientos. Específicamente, las actividades de CAT, GPx y GST presentaron cambios significativos ($H = 21,59$; $26,3$ y $14,73$ respectivamente; $p < 0,05$ en todos los casos; Fig. 5.1-B y Tabla 5.1). En cambio, la actividad de SOD presentó un valor constante de 10 ± 2 USOD mg proteína⁻¹ ($H = 4,39$, $p > 0,05$. Fig. 5.1-A) luego de la exposición aérea y durante la reinmersión. CAT tuvo una mayor actividad previo a la reinmersión y durante las primeras 2 h, y luego un mínimo de actividad a las 24 h (Fig.

5.1-B), aunque el grupo control no tuvo diferencias significativas con los grupos experimentales. La actividad de GPx presentó una disminución significativa luego de 24 h de exposición aérea, y durante la reinmersión, aumentó hasta alcanzar valores similares a los observados en el grupo control (Tabla 5.1). La enzima GST mantuvo una actividad reducida hasta 0,5 h de reinmersión, y luego gradualmente aumentó a valores estadísticamente similares a los del grupo control (Tabla 5.1).

Los valores de concentración de GSH-eq no mostraron diferencias significativas, probablemente debido a la amplia variación entre los animales ($p > 0,05$. Tabla 5.1). La concentración de AA durante la reinmersión fue menor que la concentración que se observó en el grupo t_0 ; aunque el grupo control no presentó diferencias significativas con los valores encontrados en los grupos experimentales ($H = 14,53$; $p < 0,05$. Fig. 5.2).

En las branquias, los valores de OP fueron mayores en el grupo control ($1,6 \pm 0,5$ nmol carbonilo \cdot mg proteína⁻¹), difiriendo significativamente de los valores obtenidos a las 2 h y 8 h de reinmersión ($H = 15,85$; $p < 0,01$. Tabla 5.2). La concentración de TBARS, por otro lado, no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales ($F = 1,5$; $p > 0,05$. Tabla 5.2), con un valor promedio de 19 ± 8 μ mol \cdot g tejido⁻¹.

La concentración de glucosa en las branquias fue estable a lo largo del período estudiado ($F = 2,06$; $p > 0,05$), con una concentración promedio de $0,12 \pm 0,06$ mg \cdot g tejido⁻¹ (Tabla 5.3).

MÚSCULO

Un aumento en la actividad de SOD en músculo se observó durante la reinmersión, donde luego de 24 h alcanza valores similares a los encontrados en el grupo control ($F = 8,92$; $p < 0,001$. Fig. 5.1-C). La actividad de CAT fue en promedio $3,4 \pm 2,9$ mUCAT \cdot mg proteína⁻¹, sin variaciones significativas entre los distintos grupos ($H = 2,61$; $p > 0,05$. Fig. 5.1-D).

El sistema de glutatión estudiado, conformado por GPx, GST y GSH-eq, presentó diferencias significativas en este tejido ($H = 13,64$; 24,25 y 19,46 respectivamente, $p < 0,05$), coincidiendo con una disminución del sistema a las 8 h de reinmersión. Particularmente, la actividad de GPx aumentó a las 0,5 h de reinmersión, aunque no difirió significativamente

del grupo control. La actividad luego disminuyó, con un valor mínimo a las 8 h de reinmersión. La enzima GST en cambio, tuvo un aumento de actividad luego de la exposición aérea (t_0), la cual se mantuvo hasta las 2 h de reinmersión. A partir de las 8 h de reinmersión se observaron valores de GST similares a los del grupo control. La concentración de GSH-eq también presentó un aumento luego de la exposición aérea, y durante la reinmersión disminuyó a valores basales observados en el grupo control (Tabla 5.1). En cambio, el antioxidante no-enzimático AA presentó una concentración promedio de 51 ± 8 ng AA \cdot g tejido⁻¹, sin variaciones significativas entre los grupos estudiados ($H=7,42$; $p>0,05$. Fig. 5.2).

La concentración de TBARS fue mínima a t_0 y 0,5 h de reinmersión, y luego se observó una tendencia al aumento, con concentraciones similares a las encontradas en el grupo control ($F=2,14$; $p<0,05$. Tabla 5.2). Los valores de OP fueron constantes, con una concentración promedio de $1,2 \pm 0,3$ nmol carbonilo \cdot mg proteína⁻¹ ($F=2,1$; $p>0,05$).

La concentración de glucosa en el músculo aumentó luego de la exposición aérea, y recuperó los valores basales a las 8 h de reinmersión, cuando se asemejó a la concentración del grupo control ($H=31,14$; $p<0,001$. Tabla 5.3).

HEMOLINFA

Superóxido dismutasa fue la única enzima en la hemolinfa que presentó diferencias significativas en su actividad entre los diferentes grupos experimentales ($F=4,99$; $p<0,01$), con un aumento a las 0,5 h de reinmersión, y luego disminuyó a valores similares a los encontrados en el grupo control (Fig. 5.1-E). Las otras enzimas antioxidantes CAT, GPx y GST mostraron actividades relativamente constante y en promedio de $4,9 \pm 4,8$ mUCAT \cdot mg proteína⁻¹ (Fig. 5.1-F), 14 ± 6 mUGPx \cdot mg proteína⁻¹ y 62 ± 37 UGST \cdot mg proteína⁻¹, respectivamente (Tabla 5.1).

Un aumento significativo en la concentración de AA se observó luego de la exposición aérea (t_0 - Fig. 5.2). Una vez que las centollas fueron resurgidos, estos valores disminuyeron rápidamente (luego de 0,5 h), alcanzando concentraciones similares a las observadas en el grupo control ($F=10,96$; $p<<0,001$. Fig. 5.2).

El estrés oxidativo no fue inducido en la hemolinfa, indicado por los valores de la oxidación de proteínas luego de la exposición aérea y durante la reinmersión que no varían y cuyo promedio resultó en $0,4 \pm 0,2$ nmol carbonilo \cdot mg proteína⁻¹ (F= 2,1, p> 0,05. Tabla 5.2).

En los diferentes grupos experimentales la concentración de glucosa varió, con un aumento significativo a las 2 h de reinmersión (F= 3,6; p< 0,01). Este máximo de concentración permaneció luego durante el período de reinmersión, aunque no difirió estadísticamente del grupo control (Tabla 5.3). Los valores de pH en la hemolinfa presentaron diferencias significativas (F= 11,87; p< 0,0001), se observó una acidificación antes (t₀) y durante la reinmersión, que aumentó a valores similares al grupo control luego de 24 h de reinmersión (Tabla 5.4).

HEPATOPÁNCREAS

La actividad enzimática de SOD en este órgano presentó una actividad promedio de 22 ± 14 USOD \cdot mg proteína⁻¹ (F= 2,4; p> 0,05. Fig. 5.1-G), sin diferencias significativas a partir de los análisis de ANOVA. Sin embargo, un análisis de regresión lineal indicó un aumento progresivo de la actividad durante el período de reinmersión (pendiente= 0,81. F= 12,62; p= 0,001). La actividad de CAT disminuyó durante la reinmersión, con un mínimo de actividad a las 0,5 h y 8 h, que difirieron significativamente de los valores obtenidos para t₀. Luego de 24 h de reinmersión, la actividad de CAT incrementó a valores similares a los de t₀ (H= 24,69; p< 0,01. Fig. 5.1-H).

La actividad de GST en el grupo t₀ fue significativamente mayor que la del grupo control (H= 18,52; p< 0,01. Tabla 5.1). Además, durante la reinmersión se observó una tendencia a disminuir la actividad, aunque ningún grupo experimental presentó diferencias significativas con el t₀ ni con el grupo control. Luego de 8 h de reinmersión, la actividad de GST aumentó nuevamente a un valor estadísticamente similar al t₀, mientras que a las 24 h de reinmersión disminuyó nuevamente a valores comparables con el control (Tabla 5.1).

Los valores de AA en el hepatopáncreas fueron similares durante el período estudiado, con una concentración promedio de 116 ± 12 ng AA \cdot g tejido⁻¹ (H= 10,93; p> 0,05. Fig. 5.2). Los valores de OP fueron diferentes entre los grupos experimentales (H=

19,5; $p < 0,01$. Tabla 5.2), con un mínimo de concentración de carbonilos a t_0 y luego aumentaron a las 8 h de reinmersión. La peroxidación de lípidos presentó un valor promedio de $144 \pm 74 \mu\text{mol TBARS} \cdot \text{g tejido}^{-1}$ sin diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F = 2,13$; $p > 0,05$. Tabla 5.2).

La concentración de glucosa fue mayor luego de 24h de exposición (t_0), mientras que durante la reinmersión se encontró una disminución significativa de la concentración ($H = 18,9$; $p < 0,01$. Tabla 5.3).

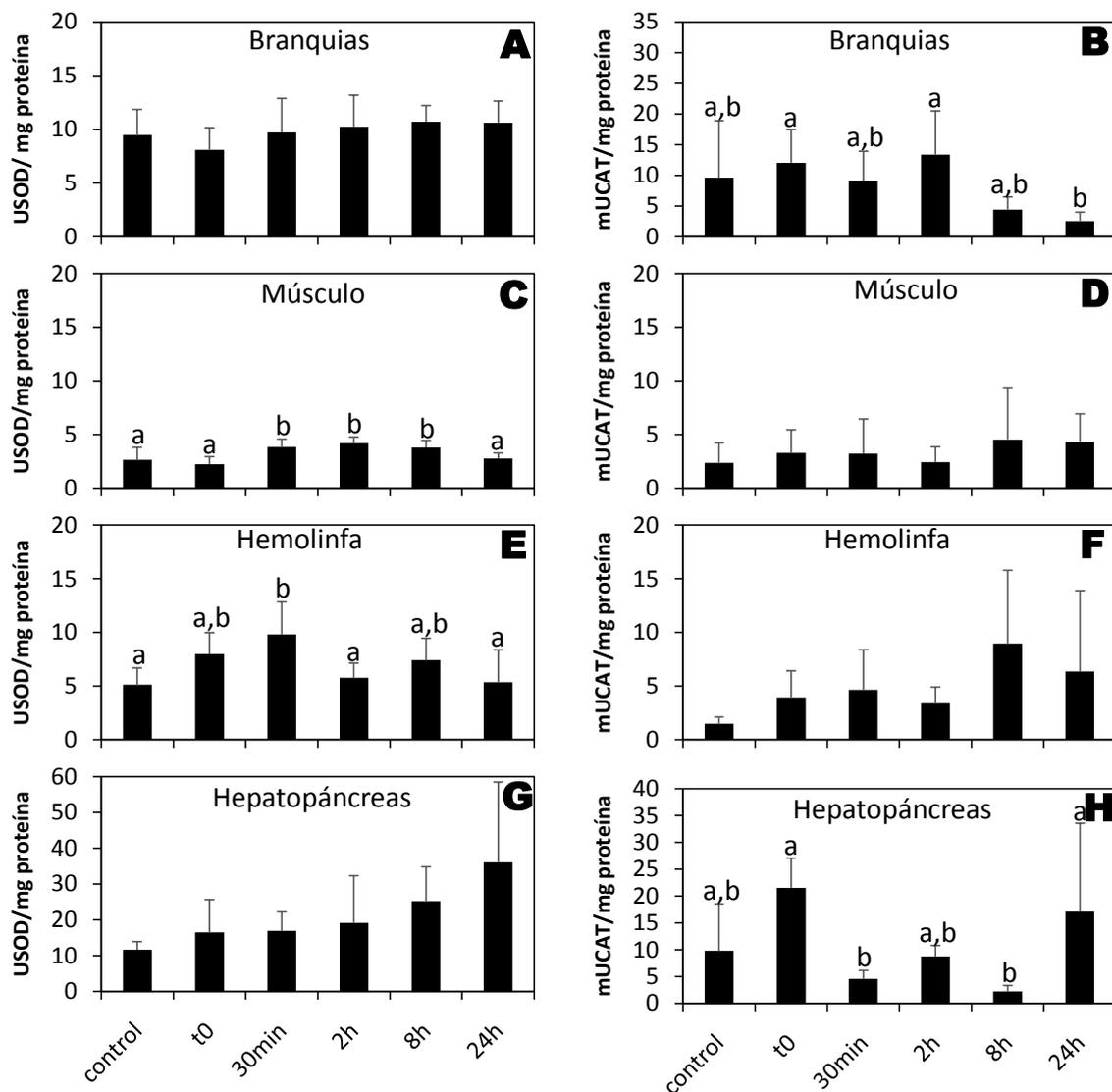


Figura 5.1. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en branquias (A y B, respectivamente), Músculo (C y D), hemolinfa (E y F) y hepatopáncreas (G y H) de *L. santolla*. Las actividades están expresadas en $\text{USOD} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ y $\text{mUCAT} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, como promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

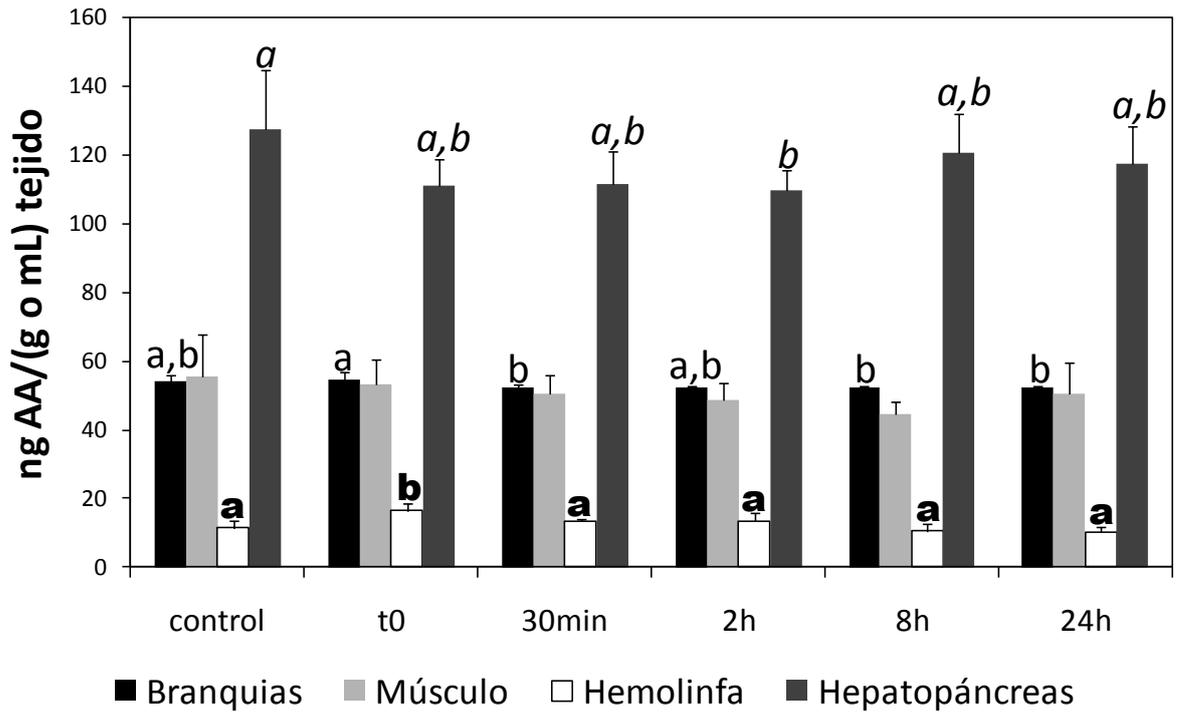


Figura 5.2. Valores de concentración de ácido ascórbico en tejidos de *L. santolla*. La concentración se expresa como ng AA · g tejido⁻¹ para branquias, músculo y hepatopáncreas, y como ng AA · mL⁻¹ para hemolinfa. Los datos se expresan como promedio ± desvío estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas entre los grupos experimentales en cada tejido (p < 0,05).

Tabla 5.1. Sistema de glutación. Actividad enzimática de glutación peroxidasa (GPx-mUGPx/mg proteína) y de glutación-S-transferasa (GST- UGST · mg proteína⁻¹) y concentración de glutación (GSH-eq= GSH + 2 GSSG -μmol GSH · mg proteína⁻¹) en branquias (Br), músculo (Mc), hemolinfa (HL) y hepatopáncreas (HP) de *Lithodes santolla*. Se presentan los datos como valores promedio ± desvío estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas entre los grupos experimentales en cada tejido (p< 0,05).

Grupo	Br	Mc	HL	HP
GPx				
Control	6 ± 2 ^a	0,2 ± 0,2 ^{a,b}	14 ± 4	--
t ₀	0,01 ± 0,02 ^b	0,3 ± 0,2 ^{a,b}	15 ± 9	--
0,5h	3 ± 1 ^{a,b}	0,4 ± 0,2 ^a	14 ± 6	--
2h	5 ± 1 ^a	0,2 ± 0,2 ^{a,b}	13 ± 4	--
8h	5 ± 1 ^a	0,001 ± 0,001 ^b	14 ± 2	--
24h	4 ± 1 ^{a,b}	0,2 ± 0,1 ^{a,b}	16 ± 8	--
GST				
Control	9 ± 7 ^a	4 ± 3 ^a	75 ± 64	0,05 ± 0,07 ^a
t ₀	2 ± 2 ^{a,b}	14 ± 6 ^b	43 ± 19	2 ± 2 ^b
0,5h	1,1 ± 0,4 ^b	12 ± 6 ^{a,b}	70 ± 49	0,7 ± 0,6 ^{a,b}
2h	3 ± 2 ^{a,b}	14 ± 6 ^b	61 ± 20	0,2 ± 0,2 ^{a,b}
8h	4 ± 3 ^{a,b}	3 ± 1 ^a	74 ± 12	2 ± 1 ^b
24h	5 ± 2 ^{a,b}	5 ± 3 ^{a,b}	50 ± 26	0,3 ± 0,3 ^{a,b}
GSH				
Control	0,3 ± 0,4	0,008 ± 0,006 ^a	--	--
t ₀	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01 ^b	--	--
0,5h	0 ± 0	0,010 ± 0,005 ^{a,b}	--	--
2h	0,02 ± 0,05	0,018 ± 0,007 ^{a,b}	--	--
8h	0,06 ± 0,09	0,009 ± 0,005 ^a	--	--
24h	0,5 ± 0,7	0,015 ± 0,004 ^{a,b}	--	--

Tabla 5.2. Niveles de peroxidación de lípidos (LPO- $\mu\text{mol TBARS g tejido}^{-1}$) y oxidación de proteínas (OP- $\text{nmol carbonilo mg proteína}^{-1}$) en tejidos analizados de *L. santolla*. Se presentan los datos \pm desvío estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas entre los grupos experimentales en cada tejido ($p < 0,05$).

Grupo	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
LPO				
Control	19 \pm 5	15 \pm 10 ^a	--	213 \pm 104
t ₀	19 \pm 10	6 \pm 4 ^b	--	154 \pm 88
0,5h	17 \pm 6	7 \pm 5 ^b	--	144 \pm 63
2h	13 \pm 3	12 \pm 6 ^{a,b}	--	107 \pm 39
8h	20 \pm 9	11 \pm 4 ^{a,b}	--	137 \pm 39
24h	24 \pm 8	10 \pm 5 ^{a,b}	--	103 \pm 44
OP				
Control	1,6 \pm 0,5 ^a	1,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,3	1,3 \pm 1,1 ^{a,b}
t ₀	0,8 \pm 0,3 ^{a,b}	1,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1 ^a
0,5h	0,7 \pm 0,6 ^{a,b}	1,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,4 ^{a,b}
2h	0,5 \pm 0,3 ^b	1,2 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3 ^{a,b}
8h	0,4 \pm 0,1 ^b	1,3 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,9 ^b
24h	0,7 \pm 0,4 ^{a,b}	1,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	2,0 \pm 1,3 ^b

Tabla 5.3. Concentración de glucosa en tejidos de *L. santolla*, expresados como mg glucosa g tejido⁻¹ en branquias, músculo y hepatopáncreas, y como mg glucosa mL HL en hemolinfa. Los datos se expresan en promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos experimentales en cada tejido ($p < 0,05$).

Glucosa	Branquias	Músculo	Hemolinfa	Hepatopáncreas
Control	0,11 \pm 0,07	0,2 \pm 0,1 ^a	0,1 \pm 0,1 ^a	2,9 \pm 2,7 ^{a,b}
t₀	0,14 \pm 0,06	1,6 \pm 0,8 ^b	0,3 \pm 0,2 ^{a,b}	5,1 \pm 4,8 ^a
0,5h	0,09 \pm 0,02	1,1 \pm 0,6 ^b	0,3 \pm 0,2 ^a	0,7 \pm 0,3 ^b
2h	0,10 \pm 0,05	1,3 \pm 0,5 ^b	0,4 \pm 0,2 ^b	0,7 \pm 0,3 ^b
8h	0,12 \pm 0,05	0,5 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,1 ^{a,b}	0,8 \pm 0,3 ^b
24h	0,16 \pm 0,07	0,7 \pm 0,4 ^a	0,4 \pm 0,2 ^{a,b}	1,4 \pm 0,4 ^b

Tabla 5.4. Valores de pH en la hemolinfa de *L. santolla*. Los datos son expresados como promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	pH
Control	7,7 \pm 0,1 ^a
t₀	7,1 \pm 0,2 ^b
0,5h	7,3 \pm 0,2 ^b
2h	7,4 \pm 0,2 ^a
8h	7,2 \pm 0,4 ^b
24h	7,7 \pm 0,2 ^a

DISCUSIÓN

El sistema de defensas antioxidantes de *Lithodes santolla* del Canal Beagle respondió ante la exposición aérea por 24 h a 8°C, y luego de otras 24 h de reinmersión a la misma temperatura el sistema de defensas antioxidantes, en general, regresó a sus valores basales, previniendo de esta manera un alto daño oxidativo en los tejidos estudiados.

Entre los parámetros analizados, el pH hemolinfático es un parámetro simple y directo que indica cambios en el metabolismo de *L. santolla* producido por la exposición aérea y la subsecuente reinmersión. Específicamente, el pH hemolinfático en la centolla se acidificó por la exposición aérea. Luego de las 24 h de reinmersión el pH vuelve a niveles basales similares a los del grupo control. La reducción del consumo de oxígeno y dióxido de carbono durante la exposición aérea induce una hipoxia interna y una acidosis respiratoria, donde el animal eventualmente cambia a un metabolismo anaeróbico (Durand *et al.*, 2000). La reducción de pH podría deberse al incremento de la P_{CO_2} , y a las concentraciones de calcio, magnesio y lactato (Zainal *et al.*, 1992; McMahan, 2001). De esta manera, los animales en estrés hipóxico logran aumentar la afinidad de la hemocianina al oxígeno, logrando un consumo de oxígeno más efectivo (McMahan, 2001).

En decápodos, la hiperglucemia es comúnmente considerada una respuesta de estrés a la hipoxia (Zou *et al.*, 1996; Ocampo *et al.*, 2003; da Silva-Castiglioni *et al.*, 2010). Particularmente, en la centolla *L. santolla* se observó en todos los tejidos hiperglucemia, excepto en las branquias; y la respuesta a la exposición aérea y reinmersión fue diferente en cada tejido. Estas observaciones coinciden con otros trabajos, en los que los tejidos de cangrejos y langostas que han sido expuestos a la hipoxia no respondieron de la misma manera (Marqueze *et al.*, 2011). El aumento de la concentración de glucosa en los tejidos de *L. santolla* en los distintos tiempos experimentales podría estar indicando que los carbohidratos están siendo movilizados para proveer un sustrato energético a los tejidos, lo cual ha sido observado en el cangrejo *Neohelice granulata* (Marqueze *et al.*, 2011; Geihs *et al.*, 2013) y en el isópodo *Stenasellus fossarum* (Hervant *et al.*, 1997) en condiciones hipóxicas. Por otro lado, la disminución de los niveles de glucosa luego de la hiperglucemia en *L. santolla* indican que la glucosa inicialmente movilizada ha sido metabolizada, como también fue registrado en cangrejos *Liocarcinus depurator* durante la reinmersión, luego de ser sujetos a condiciones de pesca y emersión (Bergmann *et al.*, 2001). En *L. santolla*, en los tres tejidos en los que se observó hiperglucemia, la

concentración de glucosa retornó a valores de control luego de 8 horas de reinmersión, indicando que hubo una recuperación del sistema hacia las condiciones estresantes de exposición aérea y reinmersión.

En vertebrados, cuando se produce isquemia por períodos largos, la reperfusión con sangre oxigenada no revierte el estrés en forma simple, sino que genera una nueva serie de procesos dañinos en las células (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Los cambios fisiológicos que ocurren en el metabolismo del animal durante la hipoxia inducida y la reperfusión puede ocasionar un desbalance en el equilibrio de la concentración de las ROS (Hermes-Lima *et al.*, 1998; Lushchak, 2011). Este fenómeno es llamado la reperfusión de oxígeno, y se sabe que los daños post-isquémicos son de naturaleza oxidativa, causados por peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas ocasionados por radicales de oxígeno (Hermes-Lima *et al.*, 1998). El equivalente a la isquemia en invertebrados acuáticos sería la emersión, en los que también se ha observado daño oxidativo durante la reperfusión (Oliveira *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2011). Los organismos anaeróbicos facultativos han desarrollado mecanismos que disminuyen el daño oxidativo generado en la transición de anoxia a aeróbico. Las potenciales estrategias involucran: a) el mantenimiento de las defensas antioxidantes altas en todo momento; b) un aumento del sistema de defensas antioxidantes en condiciones anóxicas, anticipando el posible daño producido durante el reingreso de O₂ al sistema; o c) una mayor tolerancia a los productos dañados o un mecanismo eficiente que lo remueve (Pannunzio & Storey, 1998).

En las branquias de la centolla, la enzima CAT cambia su actividad ante la exposición aérea y reinmersión. El aumento de la actividad de CAT parece ser suficiente para mantener las concentraciones de las ROS en equilibrio, especialmente luego de 24 h de exposición aérea (t_0), puesto que es la única enzima activa, y no se encontraron signos de un alto daño oxidativo en proteínas y lípidos. Sin embargo, la actividad constante de SOD podría estar colaborando también en mantener el daño oxidativo dentro de los niveles fisiológicos aceptables. La disminución de GPx observada a t_0 puede ser una estrategia de conservación de energía durante el estado hipometabólico en el que entra el organismo, donde reduce la síntesis de proteínas, baja la actividad de ciertas enzimas regulatorias, y el procesamiento de xenobióticos también se ve afectado (Wu, 2002; Lushchak *et al.*, 2005). Igualmente se han observado disminuciones en las actividades enzimáticas antioxidantes en el pez *Heterpneustus fossilis* (Paital, 2013) luego de 18 h de exposición aérea, en la

carpa *Cyprinus carpio* luego de 5 h de hipoxia (Lushchak *et al.*, 2005); y en el cangrejo *Neohelice granulata* luego de 8 h de anoxia (de Oliveira *et al.*, 2005). Sin embargo, el mecanismo concertado de defensas antioxidantes en estos organismos previno un alto daño oxidativo, como se observó en la *L. santolla* en esta tesis. Durante la reinmersión el sistema de glutatión estaba activado en la centolla, y trabajó contra la posible sobreproducción de las ROS causado por el ingreso de O₂ durante la reperusión. Además, el AA parece ser un antioxidante no-enzimático importante en las branquias durante el período de recuperación en el agua, ya que la disminución de concentración observada luego de la reinmersión está indicando el uso de este compuesto.

Por otra parte, al ser las branquias el primer tejido en contacto con cualquier cambio externo, una estrategia posible sería mantener una alta actividad enzimática constante, como se observa en *N. granulata* (Maciel *et al.*, 2004). En el caso de la *L. santolla*, en las branquias se observó una actividad constante de SOD, favoreciendo la degradación del radical superóxido, el cual genera H₂O₂. En consecuencia, hay una activación de las enzimas de CAT y GPx actuando de manera coordinada durante la reperusión, para reducir el H₂O₂ producido, tal como se observó previamente en los estudios de las variaciones diarias (Cap. 3) y estacionales (Cap. 4) en la centolla.

En la hemolinfa, la enzima SOD parece tener un rol importante en contra del posible estrés oxidativo causado por la exposición aérea y reinmersión, especialmente durante los primeros minutos de reperusión. Las otras enzimas estudiadas permanecieron constantes a lo largo del período de recuperación, y tampoco se vieron influenciadas significativamente por la exposición aérea. En relación a los otros tejidos, se observó que las actividades enzimáticas de GPx y GST en el grupo control, fueron mayores en la hemolinfa. Aún así la OP fue constante, por lo que no se descarta la presencia de otros antioxidantes, ya sean enzimáticos o no enzimáticos, que hayan mantenido el daño oxidativo en niveles estables.

El AA en la hemolinfa parece ser también un antioxidante no-enzimático importante, ya que el pico de concentración luego de la exposición aérea (t₀) está indicando una acumulación de este antioxidante en el tejido, probablemente como una preparación en contra del estrés que acarrea el incremento de la concentración de oxígeno una vez que los animales son reinmersos. Aunque el mecanismo aún no está completamente comprendido, el ácido ascórbico se considera importante para el control de la concentración de ROS bajo

condiciones de estrés por oxígeno y/o de hipometabolismo (Welker *et al.*, 2013). En vertebrados, el ascorbato juega un rol relevante en la protección del sistema nervioso central de tortugas tolerantes a la anoxia en contra del estrés oxidativo post-anóxico (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Este trabajo de tesis parece ser el primero en el que se observa que el AA probablemente tenga un rol importante durante la exposición aérea y recuperación post-anoxia en una especie de crustáceo.

En comparación con los otros tejidos estudiados, en el hepatopáncreas de la centolla *L. santolla*, tal como también se observa en capítulos previos, se encuentran los máximos de actividad de SOD. Asimismo, la concentración de AA fue también más alta en el hepatopáncreas que en los otros tejidos analizados de *L. santolla*, en concordancia con lo ya observado en capítulos previos.

Durante el periodo de la reinmersión, la actividad de CAT en el hepatopáncreas de *L. santolla* tendió a disminuir, mientras que la enzima SOD incrementó su actividad a lo largo de las 24 h de reinmersión estudiadas. Además, la enzima GST aumentó su actividad previo a la reinmersión (t_0), probablemente en un estado de preparación ante el ingreso de oxígeno al sistema durante la reinmersión, y tiende a permanecer en niveles altos durante este período. Los carbonilos de proteínas se acumularon durante la recuperación en el agua, y este mismo resultado se ha observado en el hígado de la carpa *C. carpio* al volver a la normoxia luego de 5 h de hipoxia (Lushchak *et al.*, 2005). Sin embargo, el daño oxidativo en el hepatopáncreas durante el período de recuperación no supera los niveles de oxidación de proteínas y lípidos del grupo control, indicando que existe una recuperación exitosa.

Por otro lado, también se han observado aumentos de la actividad de GST en las branquias y las glándulas digestivas de mejillones *Perna perna*, debido a la excreción de productos anaeróbicos acumulados durante períodos cortos de exposición aérea (Almeida *et al.*, 2005). Asimismo, se ha propuesto que el incremento de la actividad de GST es una respuesta al estrés oxidativo cuando disminuyen las actividades de otras enzimas antioxidantes, como CAT, momento en que isoformas de GST pueden tener actividad de peroxidasa (Power & Sheehan, 1996; Sheehan & Power, 1999; Almeida *et al.*, 2005; Almeida & Di Mascio, 2011). No obstante, no se descarta la actividad de otras enzimas antioxidantes, como GPx –activa en branquias y músculo- que no ha podido ser analizada en el hepatopáncreas.

En el músculo de la centolla, el incremento de la actividad de SOD durante la recuperación se vio acompañado de una actividad constante de CAT, y con picos de actividad de GPx y GST. Las enzimas CAT, GPx y probablemente GST, son responsables de la desproporción de H₂O₂ generado por la dismutación del anión superóxido catalizada por SOD. Por otro lado, el sistema de glutatión estudiado en el músculo, constituida por GPx, GST y GSH-eq, actúa de forma concertada, puesto que se encuentra altamente activo durante los primeros momentos de la reinmersión, y en los tres parámetros se observó el mínimo a las 8 h de reinmersión. En general, el sistema de defensas antioxidante en el músculo de *L. santolla* parece prevenir efectivamente el daño oxidativo en lípidos y proteínas, observado por los valores poco variables de TBARS y carbonilos luego de la exposición aérea y durante la reinmersión. Este es un resultado preliminar indicando que el músculo de la centolla es capaz de afrontar la exposición aérea y la subsiguiente reinmersión, disminuyendo el daño que podría afectar la calidad de la carne.

En todos los tejidos de *L. santolla*, los parámetros de estrés oxidativo –LPO y OP- luego de la exposición aérea disminuyeron o permanecieron sin cambios, comparados con el grupo control. En muchos sistemas biológicos, la tasa de producción de las ROS es proporcional a la presión de oxígeno (Hermes-Lima *et al.*, 1998). En la centolla *L. santolla*, Urbina *et al.* (2013) observó que el oxígeno disuelto en la hemolinfa decrece con el tiempo de exposición aérea, reduciendo los niveles de oxígeno disponibles para satisfacer los requerimientos de oxígeno, como una adaptación fisiológica hacia la hipoxia/anoxia. Por tanto, la reducción de la concentración de ROS podría ocurrir en la centolla *L. santolla*, reduciéndose el estrés oxidativo luego de 24 h de exposición aérea, cómo se observa en todos los tejidos a t_0 . La disminución de daño en proteínas y lípidos debido a la hipoxia se ha observado también en la carpa *C. carpio* (Lushchak *et al.*, 2005), como ya se mencionó, y debido a la anoxia en el pez *Carassius auratus* (Lushchak *et al.*, 2001).

Durante la reinmersión, se genera nuevamente un flujo de agua por las branquias, reingresando el O₂ al sistema, por lo que la concentración de ROS aumenta, lo cual causaría un aumento en los parámetros de estrés oxidativo. En los tejidos estudiados en esta experiencia, en aquellos casos en que hubo una variación en los parámetros oxidativos, se observó un aumento a largo plazo (24 h de reinmersión), pero en ningún caso los valores excedieron aquellos observados en el grupo control. Estos resultados, y los

expuesto a lo largo de este capítulo, indican la capacidad de recuperación del sistema de defensas antioxidantes de la *L. santolla* del Canal Beagle expuesto al aire durante 24 h a 8°C.

CAPÍTULO 6

EXPOSICIÓN AÉREA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y REINMERSIÓN

INTRODUCCIÓN

Los factores y las magnitudes de estrés en los crustáceos capturados y comercializados vivos en la actualidad varían de acuerdo al ambiente geográfico y la estación del año, además de la manipulación y las condiciones particulares en las que se realiza el transporte y el mantenimiento de los animales (Haukenes *et al.*, 2009). Además, los efectos de estrés en los organismos tienden a ser acumulativos. Es decir, además de los efectos naturales que causan estrés oxidativo en el animal, el efecto del mal manejo del animal durante la manipulación y transporte se refleja en un aumento de la mortalidad de los crustáceos. En general, altas tasas de mortalidad implican una pérdida económica importante (Barrento *et al.*, 2010), y es lo que se trata de evitar, explorando alternativas de transporte y/o acopio de los animales. El transporte de aquellos crustáceos históricamente comercializados vivos, como las langostas (homaridos y palinúridos), ha demostrado ser más eficiente sin agua. Este tipo de transporte es en el que la mortalidad de los animales es más bajas (Paterson & Spanoghe, 1997; Barrento *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, el transporte vivo de animales sin agua es de sumo interés, y la centolla *L. santolla* es un potencial recurso que potencialmente requiere de este transporte para expandirse como producto vivo en otros mercados (Cap. 1). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la centolla, además de ser un animal que naturalmente no se encuentra expuesto al aire, habita aguas templado-frías. Esta especie se distribuye en aguas a temperaturas entre 5 y 10°C (Hall & Thatje, 2011), donde el crecimiento y la reproducción parece ser óptimo, y las poblaciones naturales sostienen pesquerías de altos rendimientos. Comparativamente, otras especies de crustáceos pueden habitar en aguas con amplitudes térmicas más altas, entre -1 y 24°C como el caso de las langostas *Homarus americanus* (Lorenzon *et al.*, 2007). Desviaciones del rango de temperaturas óptimas pueden afectar al organismo de diferentes maneras (Menezes *et al.*, 2006), convirtiéndose en un factor de estrés que hay que considerar.

La temperatura influye en la mayoría de los procesos fisiológicos que pueden afectar el estado de salud del organismo (Van Dijk *et al.*, 1999; Pörtner, 2002). Específicamente en los crustáceos influye en el intercambio de gases en la respiración y en la regulación ácido-base (Whiteley *et al.*, 1997). Además, como resultado de varios estudios de fluctuaciones de temperatura en crustáceos comerciales, se ha aceptado en la práctica habitual de transporte vivo de crustáceos mantener las temperaturas relativamente

bajas y una atmósfera húmeda puede ayudar en maximizar la supervivencia durante el transporte y la posterior recuperación en tanques (Fotedar & Evans, 2011). Las temperaturas bajas reducen la evaporación del agua que podría secar las branquias, impidiendo el intercambio gaseoso, y además a bajas temperaturas los animales reducen su metabolismo disminuyendo el gasto de energía (Jacklin & Combes, 2007). En cambio, altas temperaturas producen el efecto contrario, aumentando el metabolismo general de los crustáceos, lo cual requiere un aumento de gasto de energía (Lorenzon *et al.*, 2007). Además, las altas temperaturas podrían exacerbar los efectos negativos de la captura y subsiguiente manipulación (Lund *et al.*, 2009; Lorenzon *et al.*, 2013). Por lo tanto para el transporte vivo, se debería tener en cuenta la temperatura óptima de exposición aérea a la que cada especie en particular está aclimatada localmente.

Las respuestas al estrés pueden ser evaluadas subjetivamente (comportamiento, vigor) o expresados cuantitativamente a través de mediciones de los cambios en los parámetros fisiológicos de los animales (Lorenzon *et al.*, 2007, 2013). En este capítulo se implementa en la centolla *L. santolla*, además del estudio de variables fisiológicas en la hemolinfa, el estudio del estado de vigor de los animales luego de la exposición aérea y de un período de recuperación. También se observa la mortalidad a lo largo de 7 días de recuperación en agua. El estado de vigor fue adoptado de un trabajo previo de Barrento *et al.* (2010), en el que se tienen en cuenta distintos estados de vigor y movimiento.

El balance de la concentración de las ROS así como la fisiología de los animales se ve afectada por la temperatura. Por consiguiente, en este capítulo se estudiará el efecto de la temperatura durante la exposición aérea y posterior reinmersión en el metabolismo de defensas antioxidantes de la centolla *L. santolla*. Principalmente, se enfocará en el análisis de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GST, en el ácido ascórbico y en el daño oxidativo en proteínas en la hemolinfa. Por otra parte, también se analizarán las variaciones en la concentración de glucosa y proteínas totales, y en el pH hemolinfático, como una aproximación a los cambios metabólicos que ocurren durante la exposición aérea.

MATERIALES Y MÉTODOS

ACLIMATACIÓN Y CONDICIONES DEL ENSAYO

Los machos de *L. santolla* fueron capturados en septiembre 2013 y transportados a los acuarios del laboratorio para su aclimatación durante 3 semanas. Los animales se mantuvieron en acuarios individuales de plástico de 25 L (30 x 40 x 30 cm de ancho x largo x alto, respectivamente. Fig. 2.3-C) en condiciones de recirculación de agua, ya descritos previamente (ver detalles en el Cap. 2). El fotoperíodo fue de 12:12 h, con el encendido de la luz a las 8 h, asemejándose al fotoperíodo en Ushuaia en la estación del año del estudio. Los animales se alimentaron con calamar descongelado cada dos días, y 48 horas previo a la experiencia, se detuvo la alimentación. Todas las centollas estaban en estado de intermuda y eran de tamaño comercial (129 ± 8 mm de LC).

Los animales se separaron aleatoriamente en cuatro grupos de ocho animales cada uno. Uno de ellos se consideró grupo control y se lo mantuvo en agua a 8°C a lo largo de todo el experimento. La toma de muestras de hemolinfa de este grupo se realizó de la misma forma que en los grupos experimentales, para tener en cuenta el efecto de manipuleo en las defensas antioxidantes en todos los grupos de animales. Los animales de los tres grupos restantes fueron expuestos al aire por 24 horas a diferentes temperaturas: T1= 4°C, T2= 8°C y T3= 12 °C. Estas temperaturas se eligieron de acuerdo a la experiencia previa de exposición aérea (ver Cap. 6), y a los estudios de exposición aérea con *L. santolla* realizados por Urbina et al. (2013). Si bien no existen estudios experimentales, los límites de tolerancia térmica de esta especie se encuentran en localidades con un rango de temperaturas entre los 5°C y 12°C, (Hall & Thatje, 2011; Urbina *et al.*, 2013). Consecuentemente, las temperaturas seleccionadas de 4°C y 12°C equivaldría a explorar las consecuencias fisiológicas sobre los límites de temperatura a los que *L. santolla* vive en su hábitat natural, específicamente en el Canal Beagle.

Luego de las 24 h de exposición aérea a las diferentes temperaturas, se extrajo hemolinfa de los animales, punto denominando a partir de aquí “*exposición*”. Luego de la extracción de hemolinfa, se resurgieron los animales en agua a 8°C. A las 12 horas de reinmersión, se extrajo una nueva muestra de hemolinfa y se los devolvió al agua nuevamente, llamando a este punto “*recuperación*”. A partir de la experiencia descrita en el Cap. 5, se sabe que la centolla *L. santolla* expuesta al aire por 24 h a 8°C recupera sus defensas antioxidantes a niveles basales luego de 8 h de reinmersión a 8°C, por lo tanto, se

consideró que luego de 12 h de reinmersión estarían completamente recuperadas. Posteriormente los animales se mantuvieron en los acuarios por 7 días más para observar mortalidad, sin ser alimentados. En las muestras de hemolinfa se determinó pH y luego se procedió con el análisis de los parámetros bioquímicos descritos en el Cap. 2. Previo a cada una de las extracciones de hemolinfa luego de 24 h de exposición y 12 h de recuperación, se observaron las condiciones de vigor de los animales. Para esto se utilizó la escala *ad hoc* descrita por Barrento et al. (2010), en el que se tienen en cuenta distintos estados de vigor –muerto, moribundo, débil, sano y muy sano- de acuerdo al movimiento de ojos pedunculares y movimiento de patas y pinzas, como se describe en la Tabla 6.1

Tabla 6.1. Escala de vitalidad de cangrejos. Reproducido de Barrento et al. (2010).

Respuesta somática	0 (muerto)	1 (moribundo)	2 (débil)	3 (sano)	4 (muy sano)
Respuesta de ojos pedunculares	No	Si	Si	Si	Si
Pinzas y patas sin peso	Si	Si	No	No	No
Movimiento lento de pinzas y patas	No	No	Si	No	No
Movimiento evidente de pinzas y patas	No	No	No	Si	Si
Movimiento rápidos y fuertes de pinzas (agresivo); pinzas y patas fuertemente contraídos hacia el abdomen (defensivo)	No	No	No	No	Si

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de 2-vías de medidas repetidas para determinar los efectos de la temperatura y la exposición aérea y reinmersión, considerando medidas repetidas los valores obtenidos en *exposición* y *recuperación*. Las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron chequeadas a partir de pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente (Sokal & Rohlf, 1995). Algunas variables fueron transformadas usando el logaritmo o la raíz cuadrada para cumplir con las suposiciones del ANOVA. En el caso de detectar interacciones estadísticas entre los factores del ANOVA se realizaron pruebas de efectos simples (Sokal & Rohlf, 1995). De ser significativo el

modelo de ANOVA empleado, se realizaron pruebas Tukey HSD *post-hoc* para detectar diferencias significativas. Los datos son presentados como promedio \pm desvío estándar. Todos los datos fueron analizados estadísticamente en el programa libre R 2.15.2.

Como los animales luego de la exposición aérea a 12°C presentaron alta mortalidad, no fueron considerados para el análisis estadístico, puesto que no se contaba con el grupo de *recuperación*. Aun así, se presentan en los resultados de manera descriptiva. Por otro lado, las actividades de GST en *exposición* presentaron valores no detectables en el laboratorio en algunos grupos experimentales, por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico. En consecuencia, solamente se analizó la actividad de GST en *recuperación* en los grupos experimentales control, 4°C y 8°C por el análisis no-paramétrico Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf, 1995).

RESULTADOS

SUPERVIVENCIA Y ESTADO DE VIGOR

Luego de la exposición aérea, y similar a lo encontrado en el Cap. 5, se observó espuma en la zona de las mandíbulas y maxilares de los animales. También se encontró un líquido marrón en la base del acuario, atribuido a la pérdida de agua y la regurgitación de secreciones digestivas por la boca.

La mortalidad de los animales expuestos al aire a 4°C fue de un 25%, el cual correspondió a 2 animales del grupo. Uno de estos animales murió luego de la exposición aérea a 4°C, y el segundo animal murió 3 días después de la reinmersión. Las condiciones de vigor de los animales en este grupo fueron entre débil y sano luego de 24 h de exposición aérea (Fig. 6.1). A las 12 h de reinmersión, el porcentaje de animales débiles disminuyó, y se observó un aumento de los porcentajes de los animales sanos y muy sanos (Fig. 6.1).

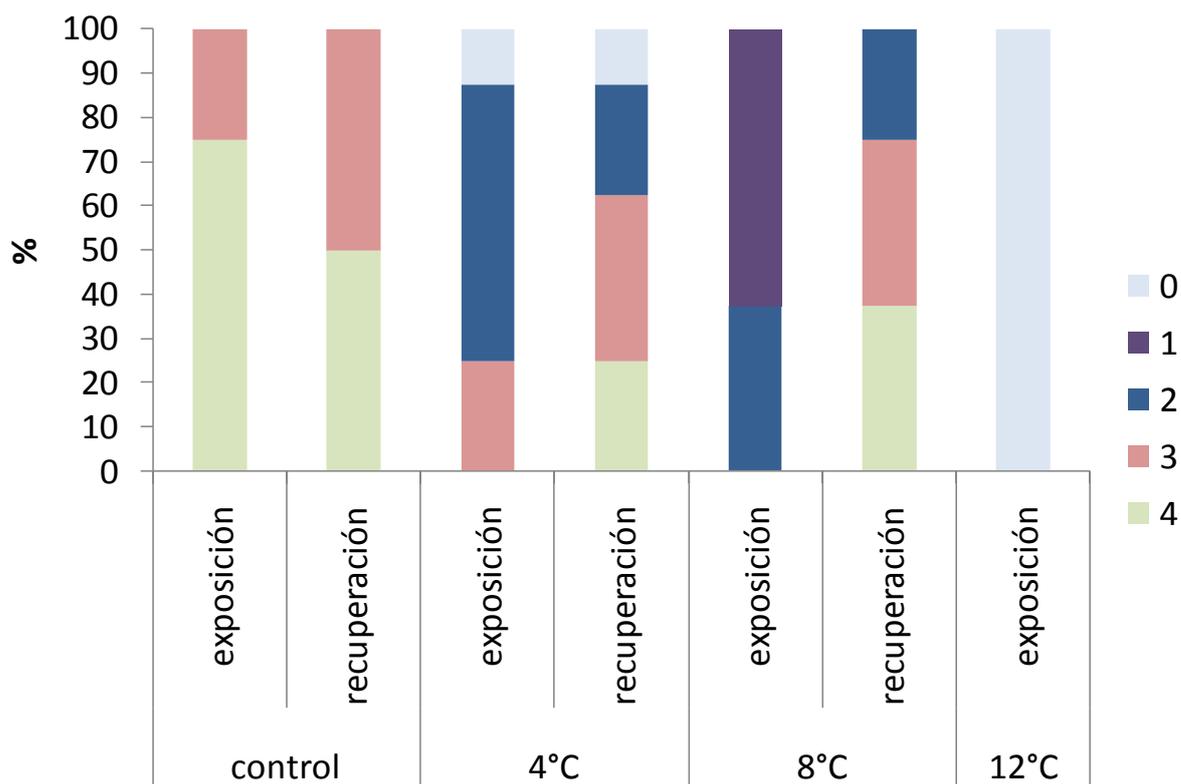


Figura 6.1. Vitalidad de los machos de *L. santolla* luego de 24 h de exposición aérea (*exposición*) (a 4°C, 8°C y 12°C) y 12 h de reinmersión en agua a 8°C (*recuperación*). La escala de vitalidad es 0= muerto, 1= moribundo, 2= débil, 3= sano y 4= muy sano.

A las 24 h de exposición aérea a 8°C, las condiciones de vigor de los animales fueron entre moribundo y débil. Sin embargo, luego de las 12 h de reinmersión todos los animales se recuperaron. Así, se encontró un 37,5% de animales sanos y un 37,5 % de animales muy sanos (Fig. 6.1). Luego de 7 días de reinmersión a 8°C se observó solamente el 25% de mortalidad entre los animales. La mortalidad de los animales se registró únicamente en el segundo día de reinmersión. En cambio, la mortalidad del grupo en exposición aérea a 12°C fue del 100%. De todas maneras, se tomaron las muestras de hemolinfa para detectar las concentraciones críticas de los componentes, y se las analizó de manera descriptiva con los resultados encontrados en los otros tratamientos.

GLUCOSA, PROTEÍNAS Y PH

El análisis estadístico de la concentración de glucosa en hemolinfa de *L. santolla* presentó una interacción significativa entre la temperatura y tratamientos *exposición* y *recuperación* (Tabla 6.2). Esto indica una respuesta diferencial de los animales ante la exposición aérea a las diferentes temperaturas y la posterior recuperación. La *exposición* a las distintas temperaturas fue diferente al control, y durante el período de *recuperación*, solamente aquellos animales expuestos a 8°C retornaron a niveles de glucosa similares al grupo control (Fig. 6.2; Tabla 6.3). Además, se observó que en el tratamiento *exposición* a 12°C la concentración de glucosa aumentó a niveles similares a los encontrados a 4°C y 8°C (Fig. 6.2).

Las proteínas totales en hemolinfa de *L. santolla* presentaron diferencias significativas entre las temperaturas y el control, y entre los tratamientos *exposición* y *recuperación* (Tabla 6.2). Aquellos animales expuestos a 4°C y 8°C aumentaron su concentración de proteínas, comparados con los animales del grupo control, sin que disminuya luego de la reinmersión (Fig. 6.3).

El pH hemolinfático también presentó una interacción significativa entre los factores analizados por ANOVA de 2-vías de medidas repetidas (Tabla 6.2). La acidificación observada en los animales expuestos al aire a 4°C, perduró luego de la *recuperación* (Tabla 6.4). En cambio el grupo de animales mantenidos a 8°C se recuperó a niveles de pH similares a los del grupo control (Tabla 6.5). Consistentemente, el pH del grupo a 12°C también disminuyó a valores semejantes a los encontrados a 4 y 8°C (Tabla 6.5).

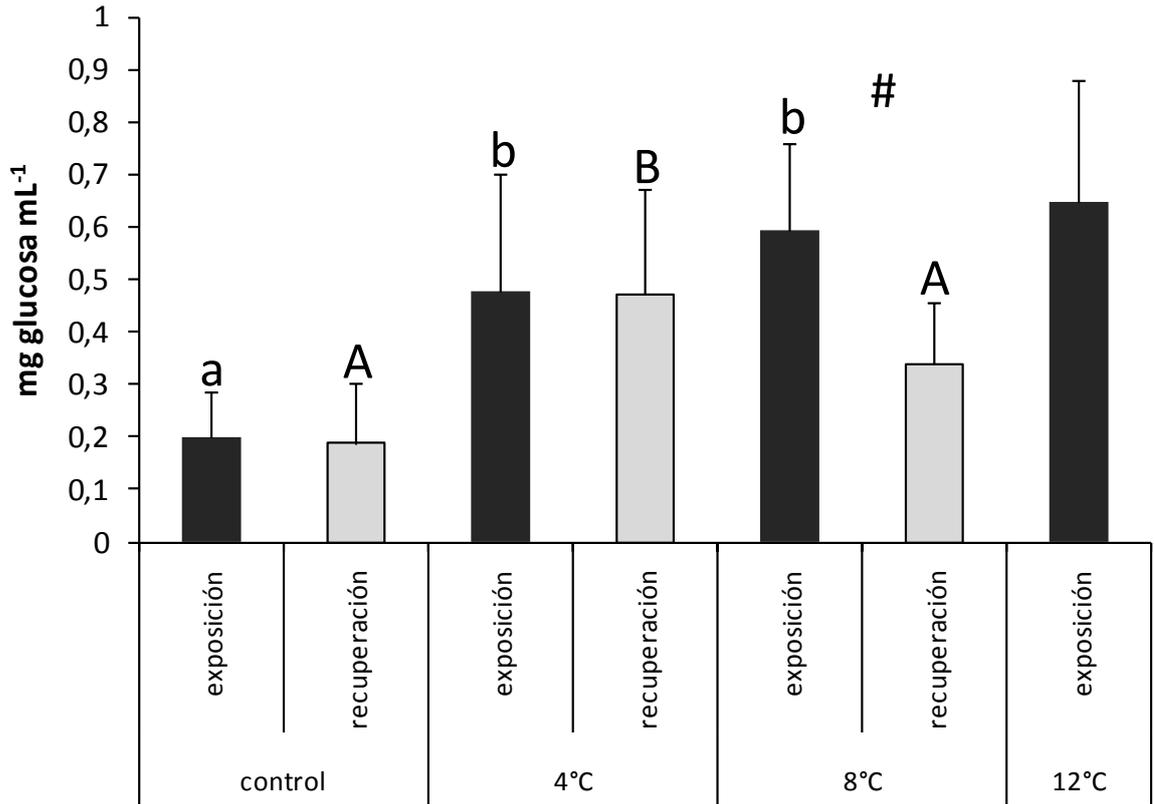


Figura 6.2. Concentración de glucosa (mg glucosa · mL⁻¹) en hemolinfa de *L. santolla*. Muestras tomadas luego de 24 h de exposición aérea (*exposición*) a diferentes temperaturas (4°C, 8°C o 12°C), y 12 h de reinmersión a 8°C (*recuperación*). El grupo control se mantuvo en agua a 8°C en todo momento. Letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas en *exposición* y *recuperación* respectivamente, y # indica diferencias significativas entre *exposición* y *recuperación* en cada temperatura. Los datos son expresados como promedio \pm desvío estándar.

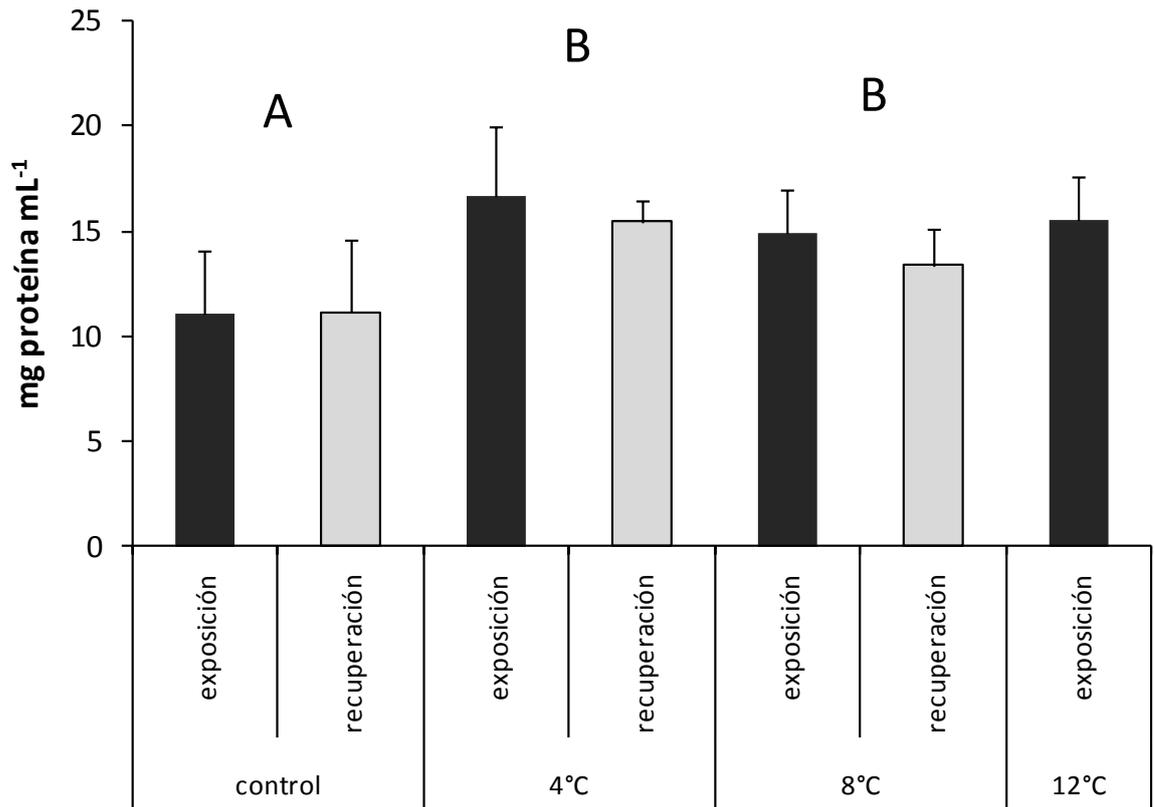


Figura 6.3. Concentración de proteínas totales (mg proteínas · mL⁻¹) en hemolinfa de *L. santolla*. Muestras tomadas luego de 24 h de exposición aérea (*exposición*) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de reinmersión a 8°C (*recuperación*). El grupo control se mantuvo en agua a 8°C en todo momento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas. Los datos son expresados como promedio \pm desvío estándar.

Tabla 6.2. Tabla de resultados de los análisis de ANOVA de 2-vías de medidas repetidas (CM: cuadrados medios, F: estadígrafo, p: probabilidad) para comparar los efectos de la temperatura y los tratamientos (*exposición y recuperación*) en *L. santolla* en los parámetros bioquímicos analizados en hemolinfa.

	CM	F	p
Glucosa			
Temperatura	0,40	10,7	< 0,001
Tratamiento	0,10	9,15	< 0,01
Temp x Trat	0,08	6,85	< 0,01
Proteínas			
Temperatura	95,12	8,34	< 0,01
Tratamiento	9,53	4,89	0,039
Temp x Trat	2,89	1,48	0,25
pH			
Temperatura	0,33	11,41	< 0,001
Tratamiento	0,23	25,36	< 0,001
Temp x Trat	0,04	4,50	0,024
SOD			
Temperatura	2,98	3,98	0,0396
Tratamiento	0,79	1,32	0,268
Temp x Trat	2,68	4,47	0,029
CAT			
Temperatura	0,67	12,78	< 0,001
Tratamiento	0,97	9,33	< 0,01
Temp x Trat	0,38	3,66	0,05

Continuación de la Tabla 6.2.

	CM	F	p
GPx			
Temperatura	37,82	5,58	0,012
Tratamiento	0,481	0,309	0,585
Temp x Trat	8,317	5,34	0,014
AA			
Temperatura	10,84	9,801	0,0011
Tratamiento	13,62	16,91	< 0,001
Temp x Trat	4,87	6,051	< 0,01
OP			
Temperatura	0,13	1,60	0,23
Tratamiento	0,06	1,07	0,31
Temp x Trat	0,05	0,93	0,41

Tabla 6.3. Tabla de resultados de los análisis de ANOVA del efecto de Tratamiento en aquellos parámetros que demostraron tener interacción significativa (ver Tabla 6.2). Se considera que cuando un $p < 0,05$, existen diferencias significativas entre los grupos Control - 4°C – 8°C.

	<i>Exposición</i>		<i>Recuperación</i>	
	F	p	F	p
Glucosa	11,9	< 0,001	7,12	< 0,01
pH	17,1	< 0,001	3,96	0,04
SOD	12,33	< 0,001	0,003	0,99
CAT	6,54	< 0,01	8,6	< 0,01
GPx	1,73	0,2	7,78	< 0,01
AA	14,5	< 0,001	1,26	0,31

Tabla 6.4. Tabla de resultados de los análisis de ANOVA del efecto de Temperatura en aquellos parámetros que demostraron tener interacción significativa (ver Tabla 6.2). Se considera que cuando un $p < 0,05$, existen diferencias significativas entre los grupos *exposición – recuperación*.

	Control		4°C		8°C	
	F	p	F	p	F	p
Glucosa	0,18	0,7	0,008	0,9	64,8	< 0,001
pH	0,91	0,4	7,72	0,03	23,84	< 0,01
SOD	27,63	< 0,01	0,57	0,5	0,2	0,7
CAT	2,35	0,2	13,84	0,01	0,12	0,8
GPx	1,99	0,2	14,3	< 0,01	2,31	0,2
AA	0,13	0,7	3,95	0,09	54,1	< 0,001

Tabla 6.5. pH hemolinfático de *L. santolla* expuestas al aire por 24 h (*exposición*) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de reinmersión a 8°C (*recuperación*). El grupo control se mantuvo en agua a 8°C en todo momento. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas en *exposición* y *recuperación*, respectivamente. Además, # indica diferencias significativas entre *exposición* y *recuperación* a cada temperatura. Los datos son expresados como promedio \pm desvío estándar.

Tratamiento		pH
control	Exposición	7,3 \pm 0,1 ^a
	Recuperación	7,3 \pm 0,2 ^A
4°C	Exposición	7,0 \pm 0,1 ^{b#}
	Recuperación	7,1 \pm 0,1 ^B
8°C	Exposición	6,9 \pm 0,2 ^{b#}
	Recuperación	7,2 \pm 0,1 ^{A,B}
12°C	Exposición	6,8 \pm 0,1

SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

En esta experiencia el sistema de defensas antioxidantes presentó diferencias significativas entre los grupos analizados. En todos los parámetros analizados de defensas antioxidantes se observó una interacción significativa entre la temperatura y el tratamiento (*exposición-recuperación*. Tabla 6.2). La excepción se encontró en el análisis de la actividad de GST, donde solamente se analizó de manera gráfica y se observó una disminución evidente de su actividad en *exposición* en todos los grupos experimentales (4, 8 y 12°C), en relación al grupo control (Fig. 6.4-D). Además, tal como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, en este caso el análisis estadístico que se realizó fue solamente en el tratamiento de *recuperación* en donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados ($H= 3,97$, $p= 0,14$).

En los grupos en *exposición* a 4°C y 8°C la actividad de SOD disminuyó significativamente. Durante la *recuperación* se observaron niveles de actividad similares en los grupos control, 4°C y 8°C (Fig. 6.4-A; Tabla 6.3). En cambio, la actividad de CAT en *exposición* únicamente para el grupo de 8°C mostró una disminución significativa (Fig.6.4-B. Tabla 6.3). Luego, en *recuperación* es el grupo de 4°C el que presenta una menor actividad en relación a los grupos control y 8°C, y también en relación al tratamiento *exposición* (Fig.6.4-B; Tabla 6.3 y 6.4).

En el caso de la actividad de GPx, se observó una actividad estable en el tratamiento de *exposición* a las diferentes temperaturas, comparables con el control (Tabla 6.4). Luego, en *recuperación*, se observó una disminución de la actividad en los grupos de 4°C y 8°C comparados con el grupo control (Fig.6.4-C). Y de manera similar a lo observado en CAT, es el grupo de 4°C el que presentó una diferencia significativa entre *exposición* y *recuperación* (Fig.6.4-C; Tabla 6.5).

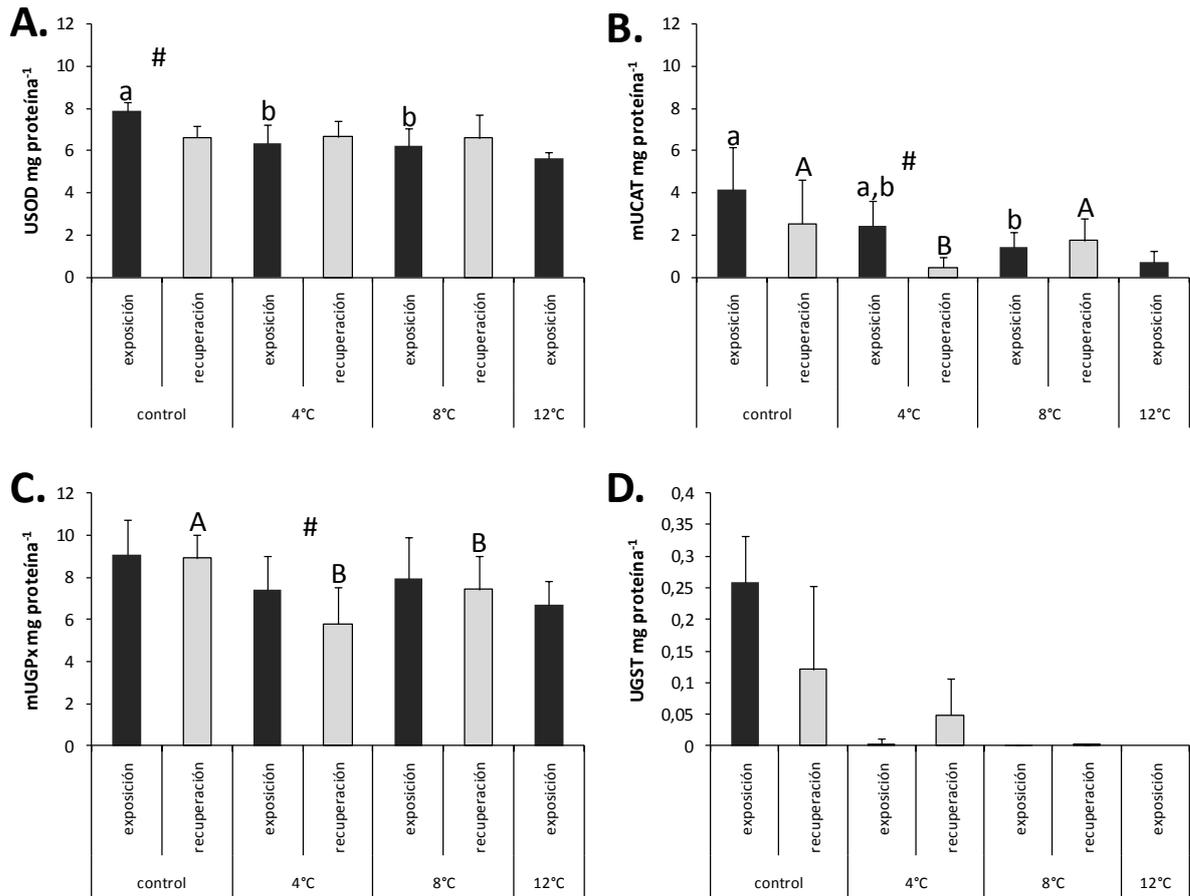


Figura 6.4. Actividad enzimática de (A) Superóxido dismutasa (USOD mg proteína⁻¹), (B) Catalasa (mUCAT mg proteína⁻¹), (C) glutatión peroxidasa (mUGPx mg proteína⁻¹) y (D) Glutatión-S-transferasa (UGST mg proteína⁻¹) en hemolinfa de *L. santolla*. Muestras tomadas luego de 24 h de exposición aérea (*exposición*) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de reinmersión a 8°C (*recuperación*). El grupo control se mantuvo en agua a 8°C en todo momento. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas en *exposición* y *recuperación*, respectivamente. Además, # indica diferencias significativas entre *exposición* y *recuperación* a cada temperatura. Los datos son expresados como promedio \pm desvío estándar.

La concentración de AA aumentó significativamente en los tratamientos de *exposición* a 4°C y 8°C, comparados con los valores observados en el grupo control (Fig.6.5; Tabla 6.3). Luego de la recuperación, las concentraciones disminuyeron a valores similares al grupo control, sin presentar diferencias significativas en el tratamiento de *recuperación* a las diferentes temperaturas (Fig.6.5). Sin embargo, al comparar entre tratamientos en cada temperatura, se observó que esta disminución fue significativa en el caso del grupo a 8°C (Tabla 6.4).

El grupo en *exposición* a 12°C presentó una disminución de las actividades enzimáticas analizadas, llegando a valores similares a los encontrados a 4°C y 8°C (Fig. 6.4). En cambio, la concentración de AA mostró un aumento que sextuplicó el control y que aparenta ser mayor que aquellas observadas en los grupos de 4 y 8°C (Fig.6.5).

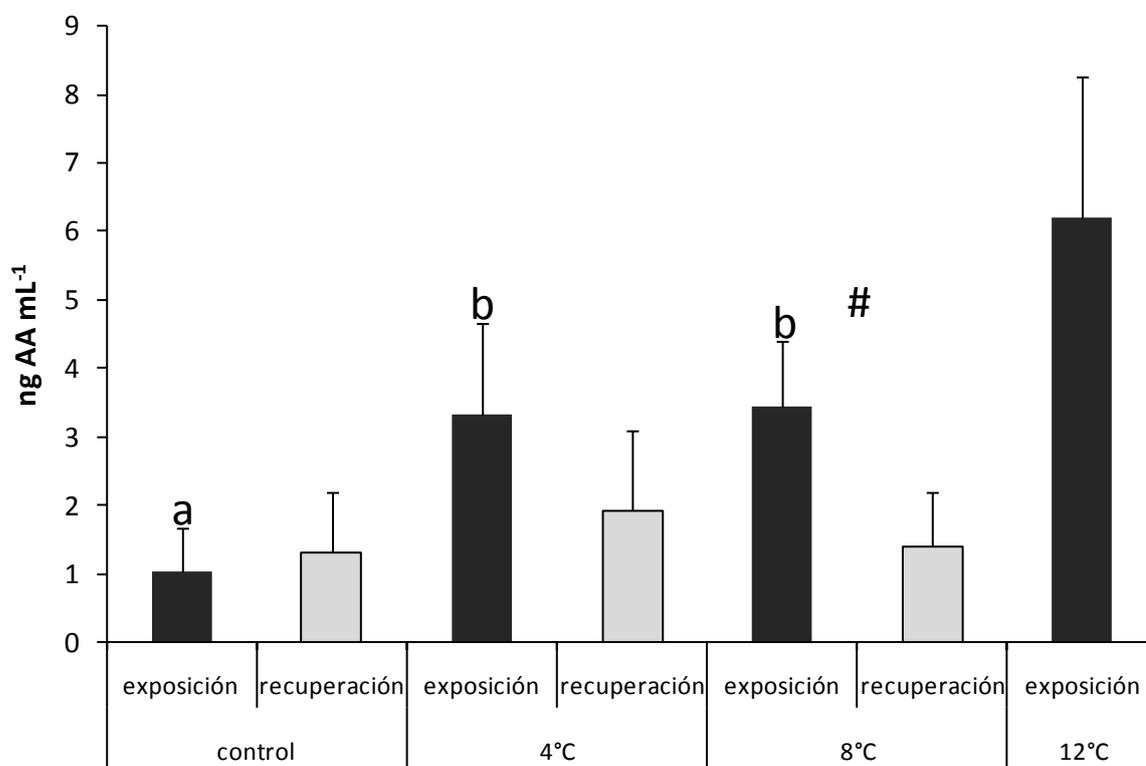


Figura 6.5. Concentración de ácido ascórbico (ng AA mL⁻¹) en hemolinfa de *L. santolla*. Muestras tomadas luego de 24 h de exposición aérea (*exposición*) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de reinmersión a 8°C (*recuperación*). El grupo control se mantuvo en agua a 8°C en todo momento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas en *exposición*, y # indica diferencias significativas entre *exposición* y *recuperación* a 8°C. Los datos son expresados como promedio \pm desvío estándar.

El estrés oxidativo determinado en este capítulo a partir de la oxidación de proteínas en la hemolinfa de *L. santolla* no presentó diferencias significativas entre los grupos analizados (Tabla 6.2), y resultó en una concentración de carbonilos promedio de $0,4 \pm 0,3$ nmol carbonilos mg proteína⁻¹ (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Oxidación de proteínas en la hemolinfa de *L. santolla* expuestas al aire por 24 h (*exposición*) a 4°C, 8°C y 12°C, y luego de 12 h de reinmersión a 8°C (*recuperación*). El grupo control se mantuvo en agua a 8°C en todo momento. Datos expresados como promedio \pm desvío estándar, nmol carbonilo mg proteína⁻¹. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tratamiento		OP
control	Exposición	0,4 \pm 0,3
	Recuperación	0,4 \pm 0,1
4°C	Exposición	0,6 \pm 0,4
	Recuperación	0,4 \pm 0,2
8°C	Exposición	0,4 \pm 0,2
	Recuperación	0,3 \pm 0,1
12°C	Exposición	0,3 \pm 0,2

DISCUSIÓN

Las defensas antioxidantes en la centolla *L. santolla* del Canal Beagle responden al efecto de la exposición aérea a diferentes temperaturas, con variaciones específicas en cada temperatura analizada. La recuperación de la fisiología oxidativa luego de 12 h en agua a 8°C fue posible en el grupo expuesto al aire a la misma temperatura. A esta temperatura las actividades enzimáticas de SOD y CAT, las concentraciones de AA y glucosa y el pH registraron valores similares al grupo control. En cambio a 4°C, no todos los parámetros analizados volvieron a valores similares a los del grupo control luego de la recuperación.

SUPERVIVENCIA Y ESTADO DE VIGOR

La escala de vigor en esta experiencia facilitó una primera aproximación del estado general de los animales expuestos al aire a diferentes temperaturas. Según esta escala, luego de la exposición aérea, se podría considerar al grupo expuesto a 4°C como el grupo que presentó mejores condiciones, puesto que el porcentaje de animales moribundos fue bajo y hubo un solo animal muerto. Durante la reinmersión, las centollas del grupo de 8°C se recuperaron, aunque dos de ellos clasificados como moribundos (nivel de vigor 1)

murieron luego de 48 h en agua. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Barrento et al. (2010), quienes observaron que los cangrejos *Cancer pagurus* moribundos se debilitaron hasta un punto donde la homeostasis se vio imposibilitada, llevando a la muerte de los animales. Sin embargo, en el presente trabajo muchos de los animales en el nivel 1 (moribundo) y 2 (débil) fueron capaces de confrontar el estrés sometidos a 4°C y 8°C, y luego se recuperaron.

La mortalidad de *L. santolla* expuesta al aire por 24 h a 12°C fue del 100%, y esta temperatura es una temperatura del aire posible en el verano en Tierra del Fuego (Borromei et al., 2010). Estos resultados están en desacuerdo con Carls y O'Clair (1990), quienes luego de exponer al aire por 24 h a la centolla *Paralithodes camtschatica* a diferentes temperaturas, concluyen que para reducir la supervivencia, la exposición aérea debería realizarse a temperaturas cálidas que no son usuales en el ambiente del animal. Un ejemplo similar a lo observado con la centolla *L. santolla* es el de los cangrejos *Liocarcinus depurator* del mar Adriático (Giomi et al., 2008). La mortalidad de los animales capturados y fuera del agua fue casi nula a temperaturas frías de invierno, pero esta situación se revierte hasta alcanzar una mortalidad próxima al 100% luego de tan sólo 20 minutos expuestos a temperaturas de aire cálidas del verano (Giomi et al., 2008). Estos resultados indican que para reducir la mortalidad de los animales transportados se deben evitar temperaturas similares a las más altas registradas en el verano del sitio de donde provienen los animales.

Además, la alta mortalidad de la centolla *L. santolla* a 12°C difiere de las experiencias de Urbina et al. (2013). Estos últimos autores observaron que los machos adultos de *L. santolla* de Puerto Montt, Chile (41° 41' S, 72° 27' O) toleraron hasta 30 h de exposición aérea a 12°C. Las centollas en esta área de Chile habitan aguas que alcanzan temperaturas de 12°C (Urbina et al., 2013), mientras que las aguas del Canal Beagle presentan temperaturas estacionales entre 5 y 9°C (Curelovich et al., 2009; Duarte et al., 2011; Giarratano et al., 2011). Como los animales ectotérmicos están adaptados y dependen del mantenimiento de la ventana de temperaturas característica de cada uno en su ambiente natural (Pörtner, 2002), esta diferencia de temperaturas podría haber influido en la adaptación fisiológica de *L. santolla* de Puerto Montt y del Canal Beagle, siendo las centollas de Puerto Montt tolerantes a la temperatura de 12°C. En cambio, para las centollas del Canal Beagle esto implicó un aumento de 3°C por encima de la temperatura

máxima en las aguas del Canal Beagle, llevando al animal a una situación de estrés, muy probablemente extrema al sumarse el factor de estrés de la exposición aérea.

Particularmente, sobre la pérdida del líquido marrón atribuida a agua y secreciones digestivas, no se determinó cuantitativamente en esta experiencia. Sin embargo, considerando que *L. santolla* tiene un volumen relativamente alto de hemolinfa (30,9% de su peso. Urbina *et al.*, 2013), y que una pérdida gradual de líquido fue mínima en centollas expuestas hasta 45 hs (Urbina *et al.*, 2013), sería una causa poco probable de mortalidad de los animales en esta experiencia de la tesis.

GLUCOSA, PROTEÍNAS Y PH

El pH hemolinfático de *L. santolla*, tal como se observó en el capítulo anterior, proveyó una medida directa de un cambio en el metabolismo del organismo, causado por la exposición aérea. La acidificación de la hemolinfa se vio disminuida en el período de recuperación, retornando a niveles basales solamente en el grupo expuesto a 8°C de aire. Esto estaría indicando que: (1) el efecto del cambio a un metabolismo anaeróbico fue mucho más costoso en el grupo de 4°C; o (2) que el cambio de temperatura –pasar de 4°C al aire a 8°C en agua- fue un factor extra que también afectó el metabolismo del organismo.

En este capítulo, nuevamente se observa el aumento de la concentración de glucosa ante la exposición aérea. Este es un mecanismo considerado como respuesta al estrés en casos de hipoxia (da Silva-Castiglioni *et al.*, 2010), anaerobiosis (Oliveira *et al.*, 2001) y emersión (Ridgway *et al.*, 2006b). En la centolla *L. santolla* la temperatura de exposición aérea parece no afectar la concentración de glucosa, puesto que entre los grupos de 4°C, 8°C y 12°C en *exposición* no se observaron diferencias en este parámetro. Este resultado no concuerda con lo observado en la langosta *Panulirus interruptus*, donde en hipoxia progresiva, la concentración de glucosa varió de acuerdo a la temperatura de las condiciones hipóxicas, y no como una estrategia de preparación a la anoxia (Ocampo *et al.*, 2003).

Durante la reinmersión, solamente el grupo de 8°C recuperó los niveles basales de concentraciones de glucosa. Esto estaría indicando el uso de la glucosa para restaurar las

reservas energéticas, como fue también observado en el cangrejo *Neohelice granulata* (Marqueze *et al.*, 2011; Geihs *et al.*, 2013). La concentración alta de glucosa en el grupo de 4°C luego del período de recuperación indicaría que el animal aún se encuentra en un estado de estrés, es decir, su recuperación parecería ser más lenta, y por tanto, necesitaría más tiempo para poder restaurar sus reservas.

El rol de las proteínas totales en las especies de crustáceos en condiciones de estrés varía entre las especies, pero en general, las proteínas totales tienden a disminuir con el estrés (Stoner, 2012). Contrariamente a lo esperado, en esta experiencia, se produce un aumento de la concentración de proteínas por efecto combinado de la temperatura y de la exposición aérea. Un comportamiento similar fue observado también en la langosta americana *Homarus americanus*, en la cual las proteínas aumentaron luego de la exposición aérea a diferentes temperaturas (Lorenzon *et al.*, 2007). Se ha propuesto que las proteínas podrían ser utilizadas para reparar membranas o como fuente de energía, y que la glucosa podría ser empleada como una fuente de energía para controlar la concentración de iones internas a través del bombeo (Lorenzon *et al.*, 2007). Este podría ser el caso de la centolla *L. santolla*.

SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

La exposición aérea provocó una disminución de las actividades de las enzimas SOD y CAT en el grupo de 8°C. A su vez, en el grupo de 4°C la actividad de SOD también se vio significativamente reducida, mientras que la actividad de CAT tiende a disminuir pero no de manera significativa. La actividad de GST luego de la exposición aérea también fue menor que el grupo control a las tres temperaturas. Estos resultados están en concordancia con lo observado en el Cap. 5, donde se observó la disminución de las actividades enzimáticas en la centolla expuesta al aire a 8°C por 24 h.

La actividad constante de GPx luego de la exposición aérea, especialmente en el grupo de 8°C, podría estar compensado por la baja actividad de CAT, puesto que ambas enzimas participan en la detoxificación del H₂O₂ (ver Cap. 1). La inducción de GPx generalmente actúa de manera concomitante con CAT y a veces también con SOD (Manduzio *et al.*, 2005), aunque en el presente trabajo, la enzima GPx parece ser la única enzima próxima a los niveles encontrados en el grupo control a las 24 h de exposición, manteniendo el daño oxidativo en un mínimo. Esto no descarta que previamente no hayan actuado las enzimas antioxidantes SOD y CAT, puesto que existen varios estudios que

demuestran una clara diferencia en la modulación de las defensas antioxidantes durante el tiempo de hipoxia (Almeida & Di Mascio, 2011). Por ejemplo, se ha observado en distintos tejidos del centollón *Paralomis granulosa* del Canal Beagle, expuesto al aire por 24 h, un aumento de las actividades de las enzimas de SOD, CAT y GST dentro de las primeras 6 h de exposición, pero luego de ese periodo las actividades enzimáticas disminuyen (Romero *et al.*, 2007). De manera similar, en el mejillón *Perna perna* a las 4 h de exposición aérea hay un aumento de la actividad de SOD, pero por períodos más largos se observó que la misma disminuía a valores similares a los del control (Almeida *et al.*, 2005; Almeida & Di Mascio, 2011)

En la centolla *L. santolla* hay una acumulación de ácido ascórbico AA luego de la exposición aérea en las tres temperaturas. Este aumento de concentración podría deberse, como se observó en el Cap. 5, a una estrategia de preparación al estrés causado por el aumento de la concentración de oxígeno una vez que los animales son resurgidos. Aunque el mecanismo aún no es claro, el ácido ascórbico juega un rol importante en el control de las concentraciones de ROS bajo condiciones de hipoxia y/o hipometabolismo (Welker *et al.*, 2013).

En general, estos resultados están indicando que el sistema de defensas antioxidantes responde al estrés generado, ya sea por la exposición aérea y/o la temperatura de exposición. Sin embargo, existe una temperatura crítica de exposición aérea de *L. santolla*, dada por el 100% de mortalidad a 12°C. No se descartan cambios en otros parámetros fisiológicos no considerados en este estudio, como concentraciones de amonio y lactato, que podrían llegar a un límite causando la mortalidad del animal (Woll *et al.*, 2010).

Luego de 12 h en agua a 8°C, todas las actividades enzimáticas a esta temperatura se recuperaron, regresando a niveles basales de actividades similares a las observadas en el grupo control. Por otro lado, los animales expuestos a 4 °C no recuperaron plenamente el sistema de defensas antioxidantes. Esto podría deberse a que la temperatura de reperfusión no fue la misma que la temperatura de exposición aérea (4°C), como se mencionó previamente. Se conoce que los cambios de temperatura tienen una gran influencia en las respuestas de estrés fisiológicas en organismos acuáticos. Así, aumentos de la temperatura conllevan un aumento en el metabolismo y en el consumo de oxígeno, y consecuentemente en la producción de ROS (Almeida & Di Mascio, 2011). El shock térmico producido en *L.*

santolla también se ha observado en otras especies comercialmente importantes, que fueron expuestas al aire y a temperaturas variables. Por ejemplo, en las vieiras *Clamys farreri* un shock térmico luego de la exposición aérea a diferentes temperaturas y resurgidos a una temperatura específica e ideal para esta especie, contribuyó a un aumento significativo de producción de ROS en los hemocitos (Chen *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2006) observaron que los parámetros de estrés en la almeja *Crassostrea gigas* fueron menos notorios si los animales pasaban de condiciones agua-aire a la misma temperatura, que si se realizaba el pasaje agua-aire a diferentes temperaturas. Además, las langostas *Homarus americanus* expuestas al aire a una temperatura determinada y resurgidas a otra, tardaron 24 h en recuperar sus niveles fisiológicos basales, mientras que las expuestas al aire y resurgidos a una misma temperatura tardaron solamente 12 h en recuperarse (Lorenzon *et al.*, 2007).

Aun teniendo en cuenta el factor de estrés acumulado de exposición aérea, reperusión y shock térmico, la exposición aérea a 4°C y 8°C y la posterior reinmersión a 8°C no produjeron aumentos de oxidación de proteínas. Esto estaría indicando que el sistema de defensas antioxidantes en la hemolinfa de *L. santolla* pudo mantener la concentración de ROS balanceada, evitando un alto daño oxidativo.

En la centolla *L. santolla* del Canal Beagle se observó una disminución en el sistema de defensas antioxidantes sin cambios en la oxidación de proteínas. En el cangrejo *Callinectes danae* se observó un patrón similar, que ante la exposición aérea y el estrés por salinidad la disminución de las actividades de CAT y GPx se estimuló, mientras que la concentración de carbonilos de proteínas se mantuvo (Freire *et al.*, 2011). Esta es una respuesta típica al estrés causado por la exposición aérea en animales que muestran altos niveles constitutivos de defensas antioxidantes (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002; Gorr *et al.*, 2010). Por eso, una pérdida del potencial de algunos antioxidantes deja suficiente actividad enzimática para controlar el daño oxidativo bajo condiciones de estrés (Freire *et al.*, 2011). Sin embargo, no se descarta la presencia de otros antioxidantes que no fueron determinados en este trabajo, y que ayudaron en mantener el daño oxidativo al mínimo.

CONSIDERACIONES FINALES

La centolla *L. santolla* del Canal Beagle ha demostrado tener un sistema de defensas antioxidantes que trabaja de manera concertada, impidiendo un alto daño oxidativo, causado por eventos biológicos naturales, como el aumento de la actividad locomotora o cambios fisiológicos durante la muda o reproducción. También se observó una respuesta del sistema de defensas antioxidantes ante la exposición aérea y la reperusión, causados de manera artificial.

De manera general, los estudios de las variaciones diarias y estacionales en las defensas antioxidantes en la centolla del Canal Beagle han dado una perspectiva de que este sistema trabaja de manera concertada ante eventos de estrés. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el concepto de “estrés” se ha modificado en los últimos años, y en la actualidad sigue siendo un término de debate (Koolhaas *et al.*, 2011). Particularmente, el estrés oxidativo se define como el desbalance del equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes (Jones, 2006), lo cual es una definición simple, que ha colaborado a comprender algunas situaciones observadas en esta tesis. Chrousos (2009) definió a un estresor como un estímulo que pone en peligro la homeostasis del sujeto, y que la respuesta estresante es la reacción del organismo para retornar a este estado de homeostasis. El problema con esta definición es que todas las actividades de un organismo directa o indirectamente conciernen la defensa de la homeostasis (Koolhaas *et al.*, 2011). Específicamente, y tal como se definió en el capítulo de Introducción General, el estrés oxidativo se produce cuando el equilibrio de la concentración de ROS es momentáneamente o crónicamente aumentado, produciendo disturbios en el metabolismo celular, exclusivamente en la señalización redox, causando daños en los constituyentes celulares (Jones, 2006; Lushchak, 2011). No obstante, Koolhaas *et al.* (2011), definen al estrés como cualquier estímulo incontrolable y/o impredecible, enfatizando que cualquier reacción fisiológica que sea un pre-requisito ante un comportamiento, como por ejemplo el aumento de la actividad enzimática ante un aumento de la actividad locomotora, no debería llamarse “estrés”, ni cualquier excitación o despertar debería ser sinónimo de “estrés”. Por tanto, se debe tener en claro que el aumento de la actividad enzimática antioxidante, o el aumento de la oxidación de proteínas y/o de la lipoperoxidación, como ser en los casos de variaciones diarias o estacionales, no siempre indicarían condiciones de estrés.

En este trabajo se demostró que el sistema de defensas antioxidantes de *L. santolla* varía, tanto de manera diaria como estacional, de manera que el organismo pueda

enfrentarse a los cambios fisiológicos, debidos por ejemplo a una actividad locomotora o por los cambios producidos durante la muda y reproducción. Además, en *L. santolla* la respuesta a estos cambios difiere entre los tejidos, siendo unos más sensibles que otros. Por otro lado, los parámetros de estrés oxidativo aquí determinados, LPO y OP, no siempre dan una respuesta específica como una consecuencia negativa, sino que en algunos casos podrían ser factores importantes en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Esto se observó en el estudio de estacionalidad de las defensas antioxidantes (Cap. 4), donde erróneamente se podría interpretar que el animal se encuentra en un estado de “estrés” durante casi todo el año.

Los resultados encontrados en la tesis se deben tener en cuenta a la hora de formular conclusiones con respecto a cuan estresante es un factor determinado. Además, se debe considerar realizar un amplio estudio del sistema de defensas para tener un panorama lo más abarcativo posible de la situación. De otra manera, es muy difícil afirmar que un animal está estresado o no; sumado a que el término “estrés” no llega a ser preciso en muchos casos. Y asimismo, como lo mencionan Koolhaas et al. (2011), también es necesario conocer y diferenciar los ajustes fisiológicos funcionales adaptativos en respuesta a desafíos ecológicos relevantes en la vida normal del individuo, de agentes estresantes que puedan causar desequilibrios incontrolables en el metabolismo celular.

En la centolla del Canal Beagle, se ha observado que las enzimas antioxidantes, y en algunos casos los antioxidantes no-enzimáticos, se preparan ante un eventual incremento del consumo de O₂, principalmente en las branquias. Este tejido es el primero en entrar en contacto ante cualquier cambio físico-químico que ocurra en el agua. Por tanto, es el encargado de actuar como buffer ante los cambios repentinos de concentraciones de O₂ que conllevan la sobreproducción de las ROS. Cabe resaltar que es interesante el resultado que se observa en las branquias, enfocado principalmente en las enzimas SOD y CAT. En los muestreos estacionales se observó que las actividades de estas enzimas aumentan al disminuir la temperatura. La misma tendencia se observa también en las branquias ante la exposición aérea. Así, bajo un estado hipometabólico, estas enzimas parecen estar preparadas ante el eventual aumento de concentración de oxígeno, ya sea por un aumento de temperatura o debido a una reperfusión en el agua. Este es un mecanismo de adaptación presente en animales tolerantes a la hipoxia, capaces de activar los antioxidantes endógenos durante períodos de mínima formación de ROS, para

luego contrarrestar el efecto de estrés oxidativo durante la re-oxigenación (Hermes-Lima *et al.*, 1998; Welker *et al.*, 2013)

Debido a las diferentes funciones que cumple cada tejido estudiado, se encontraron diferentes respuestas ante los eventos que podrían originar el estrés, que se deberían considerar para futuros estudios. Así, el análisis de hemolinfa es uno de los más frecuentes entre crustáceos, puesto que su muestreo es sencillo y no requiere sacrificar al animal. Particularmente en *L. santolla* la hemolinfa respondió ante la exposición aérea a diferentes temperaturas y reperusión, y no es tan sensible ante los cambios estacionales, aunque se deben tener en cuenta las variaciones diarias. Sin embargo, se debe ser consciente que el estudio de un solo tejido no brinda un panorama completo de lo que realmente ocurre en el animal. Además, de no encontrarse una respuesta antioxidante a un evento estresante, no significa que el animal no se vea afectado, y que el estresante no pueda repercutir en la fisiología general del animal y su supervivencia. En los otros tejidos estudiados, se observó una respuesta ante los cambios diarios y estacionales. Las branquias son un tejido que responde directamente a las variaciones en el consumo de O₂. En el músculo y en el hepatopáncreas ocurren la mayoría de los eventos fisiológicos importantes que involucran gastos de energía y procesos metabólicos que a su vez producen variaciones en el sistema de defensas antioxidantes. Además, si nuestro objetivo final es el animal para el consumo humano, se debe enfocar principalmente en la calidad de la carne, es decir, en el músculo. Por tanto, de requerir un análisis más detallado de lo que ocurre fisiológicamente en el animal, se debería considerar analizar más de un tejido.

Desde el punto de vista biológico, la centolla *L. santolla* del Canal Beagle es capaz de soportar hasta 24 horas fuera del agua. Puntualmente, la capacidad de la centolla para permanecer tantas horas expuesta al aire podría relacionarse a que todavía mantienen caracteres ancestrales (ver Romero *et al.* 2007) de sus antecesores que habitan aguas someras y en el intermareal (Hall & Thatje, 2009). Otra posible explicación se basa en que esta especie enfrenta en su hábitat natural situaciones comparables con la exposición aérea, como ser zonas de mínimo oxígeno (Urbina *et al.*, 2013) o por cambios estacionales de temperatura (Cap. 4). Bajo cualquiera de estas condiciones el organismo entra en un estado hipometabólico, en que la mayoría de sus defensas antioxidantes se encuentran en un estado inactivo, excepto algunas enzimas claves. Tampoco se descarta la presencia de otros

compuestos antioxidantes que podrían estar actuando y no fueron determinados en esta tesis.

Sin embargo, la centolla del Canal Beagle difiere en cuanto a su fisiología de las centollas que se encuentran en la zona de Puerto Montt, Chile, puesto que las respuestas de las centollas variaron ante la temperatura de exposición aérea. Las centollas de latitudes más bajas sobrevivieron a temperaturas más altas que las del Canal Beagle. Estas diferencias pueden deberse, como se mencionó anteriormente en el Cap. 6, a que las temperaturas del agua a las que están aclimatadas las centollas de las distintas latitudes difieren, por lo que el rango de temperaturas natural que pueden soportar cada una podría diferir también. En experiencias preliminares con las centollas del Estrecho de Magallanes, Chile ($53^{\circ}10' S$ $70^{\circ}54' O$), donde el rango de temperatura es de 5 a $10^{\circ}C$ (Ríos *et al.*, 2007), se observó que la temperatura crítica de supervivencia es de aproximadamente $9^{\circ}C$ (Storch *et al.*, 2011). Por lo tanto, sería aconsejable tener en cuenta la temperatura a la cual se realizará el transporte en seco, dependiendo de la zona de la cual las centollas sean pescadas.

Desde un punto de vista comercial, los resultados de esta tesis también son interesantes, puesto que las centollas sobrevivieron a la exposición aérea, y además fueron capaces de recuperarse, con un alto porcentaje de supervivencia. Si bien el sistema de defensas ante la reinmersión presentó variaciones con diferencias entre los tejidos, en la mayoría de los casos las enzimas antioxidantes estudiadas tuvieron un rol importante, actuando en forma conjunta frente al aumento repentino de la concentración de O_2 que ocurre durante la reperusión. Así, se evitaron daños post-isquémicos de naturaleza oxidativa. Todos los resultados encontrados en esta tesis indican que el transporte en vivo de estos animales a grandes centros urbanos, donde se podrían comercializar vivos, es posible. Como se ha mencionado previamente, se deben considerar las condiciones apropiadas para el transporte y para la reinmersión. En esta tesis solamente se tomaron en cuenta la exposición aérea y la temperatura, pero habría que considerar otros factores también importantes, que podrían afectar la supervivencia o podrían influir en la calidad de la carne, por ejemplo las condiciones de humedad y la tecnología de contenedores apropiados para el transporte. Pero, nuevamente, se debe resaltar la importancia de estos resultados, que proveen la base de futuros estudios para mejorar el transporte de esta

especie, ya sea a mercados lejanos o dentro de la ciudad de Ushuaia, y servirán también para considerarlos durante la pesca artesanal de la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Abele, D., Philipp, E., Gonzalez, P. & Puntarulo, S. (2007) Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Frontiers in Bioscience*, **2**, 933–946.
- Abele, D. & Puntarulo, S. (2004) Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **138**, 405–425.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121–126.
- Aguirre, G., Capitanio, F., Lovrich, G. & Esnaj, E. (2012) Metazooplankton community in coastal sub-Antarctic waters (Beagle Channel), with emphasis on the smaller size fractions: spatial and temporal variability. *Marine Biological Research*, **8**, 341–353.
- Aguzzi, J., Company, J., Sardà, F. & Abelló, P. (2003) Circadian oxygen consumption patterns in continental slope *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae) in the western Mediterranean. *Journal of Crustacean Biology*, **23**, 749–757.
- Almeida, E.A., Dias Bainy, A.C., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G. & Di Mascio, P. (2005) Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **318**, 21–30.
- Almeida, E.A. & Di Mascio, P. (2011) *Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates. Hypometabolism: Strategies of Survival in Vertebrates and Invertebrates* (ed. by A. Nowakowska and M. Caputa), pp. 39–55. Research Signpost.
- Anger, K., Lovrich, G. a, Thatje, S. & Calcagno, J. a (2004) Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **306**, 217–230.
- Antó, M., Arnau, S., Buti, E., Cortijo, V., Gutiérrez, E. & Solé, M. (2009) Characterisation of integrated stress biomarkers in two deep-sea crustaceans, *Aristeus antennatus* and *Nephrops norvegicus*, from the NW fishing grounds of the Mediterranean sea. *Ecotoxicology and environmental safety*, **72**, 1455–1462.
- Baba, K., Ahyong, S.T. & Macpherson, E. (2011) *Morphology of marine squat lobsters. The Biology of Squat Lobster* (ed. by G.C.B. Poore, S.T. Ahyong, and J. Taylor), pp. 1–38. CSIRO Publishing, Victoria.

- Balestrini, C., Manzella, G. & Lovrich, G. (1998) Simulación de corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. *Servicio de Hidrografía Naval. Departamento de Oceanografía. Informe Técnico*, **98**, 58 pp.
- Barclay, M.C., Dall, W. & Smith, D.M. (1983) Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **68**, 229–244.
- Barrento, S. (2010) *Nutritional quality and physiological responses to transport and storage of live crustaceans traded in Portugal. Tesis Doctoral.*, Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar. Universidad de Porto., Portugal.
- Barrento, S., Marques, A., Pedro, S., Vaz-Pires, P. & Nunes, M.L. (2008) The trade of live crustaceans in Portugal: space for technological improvements. *Journal of Marine Science*, **65**, 551–559.
- Barrento, S., Marques, A., Vaz-Pires, P. & Nunes, M.L. (2010) Live shipment of immersed crabs *Cancer pagurus* from England to Portugal and recovery in stocking tanks: stress parameter characterization. *Journal of Marine Science*, **67**, 443–453.
- Bartosz, G. (2005) Superoxide Dismutases and Catalase. *The Handbook of Environmental Chemistry*, **2**, 109–149.
- Baydas, G., Gursu, M.F., Yilmaz, S., Canpolat, S., Yasar, A., Cikim, G. & Canatan, H. (2002) Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience Letters*, **323**, 195–198.
- Bergmann, M., Taylor, A.C. & Moore, P.G. (2001) Physiological stress in decapod crustaceans *Munida rugosa* and *Liocarcinus depurator* discarded in the Clyde *Nephrops* fishery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **259**, 215–229.
- Beutler, E., Durán, O. & Kelly, B.M. (1963) Improved method for determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **61**, 882–890.
- Borković, S.S., Pavlović, S.Z., Kovacević, T.B., Stajin, A.S., Petrović, V.M. & Saicić, Z.S. (2008) Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology* ., **147**, 122–128.
- Borković, S.S., Saponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milosević, S.M., Kovacević, T.B., Radojčić, R.M., Spasić, M.B., Zikić, R. V & Saicić, Z.S. (2005)

- The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology.*, **141**, 366–374.
- Borromei, A.M., Coronato, A., Franzén, L.G., Ponce, J.F., Sáez, J.A.L., Maidana, N., Rabassa, J. & Candel, M.S. (2010) Multiproxy record of Holocene paleoenvironmental change, Tierra del Fuego, Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **286**, 1–16.
- Boschi, E.E., Bertuche, D.A., Wyngaard, J.G. & Vinuesa, J.H. (1984) *Estudio biológico pesquero de la centolla (Lithodes antarcticus) del Canal Beagle, Tierra del Fuego, Argentina*, Instituto Nacional de Investigacion y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata.
- Brambati, A., Fontolan, G. & Simeoni, U. (1991) Recent sediments and sedimentological processes in the Strait of Magellan. *Bolletino di Oceanología Teorica ed Applicata*, **9**, 217–259.
- Brigelius-Flohé, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**, 951–965.
- Buttemer, W. a., Abele, D. & Costantini, D. (2010) From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, **24**, 971–983.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S. & Forget-Leray, J. (2007) Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in Eurytemora affinis (Calanoida, Copepoda). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **147**, 841–849.
- Carls, M.G. & O'Clair, C.E. (1990) *Influence of cold air exposures on ovigerous red king crabs (Paralithodes camtschatica) and tanner crabs (Chionoecetes bairdii) and their offspring. Proceedings of the International Symposium on King and Tanner Crabs.*, pp. 329–343. Alaska Sea Grant Program, Alaska.
- Castañon-Cervantes, O., Battelle, B., Fanjul-Moles, M., Comparada, N., Ciencias, F. De, Nacional, U., Postal, A. & Augustine, S. (1999) Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *The Journal of experimental biology*, **202**, 2823–30.
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S. & Xing, K. (2007) Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **345**, 52–60.

- Chrousos, G.P. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews. Endocrinology*, **5**, 374–81.
- Colizza, E. (1991) Preliminary report on coastal morphology and sea-bottom sediments of the Canales Beagle, Ballenero, Brecknock, Cockburn, and Magdalena. *Bollettino di Oceanologia Teorica ed Applicata*, **9**, 273–279.
- Collins, P. (2005) A coexistence mechanism for two freshwater prawns in the Parana River floodplain, Argentina. *Journal of Crustacean Biology*, **25**, 219–225.
- Comoglio, L., Goldsmit, J. & Amin, O. (2008) Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **43**, 345–353.
- Comoglio, L.I. (1994) *La nutrición de los Crustáceos Decápodos en el Canal Beagle, con especial énfasis en la centolla (Lithodes santolla) y el centollón (Paralomis granulosa), y la función trófica de los mismos en el ecosistema. Tesis Doctoral.*, Universidad Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Coto-Montes, A., Boga, J.A., Tomás-Zapico, C., Rodríguez-Colunga, M.J., Martínez-Fraga, J., Tolivia-Cadreja, D., Menendez, G., Hardeland, R. & Tolivia, D. (2001) Physiological oxidative stress model: syrian hamster harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, **30**, 785–792.
- Curelovich, J., Calcagno, J. & Lovrich, G.A. (2009) New locality for *Notochthamalus scabrosus* (Crustacea, Cirripedia): Bahía Lapataia, Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Anales del Instituto de la Patagonia*, **37**, 47–50.
- Curelovich, J.N. (2013) *Mecanismos reguladores de la estructura y dinámica de la comunidad intermareal rocosa de Ensenada Zaratiegui, Tierra del Fuego. Tesis Doctoral*, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Dall, W. (1981) Lipid absorption and utilization in the Norwegian lobster *Nephrops norvegicus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **50**, 33–45.
- Das, N., Levine, R., Orr, W. & Sohal, R. (2001) Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal*, **216**, 209–216.
- Diez, M.J., Romero, M.C., Obenat, S., Albano, M.J. & Tapella, F. (2009) Distribution of benthic invertebrates in the Beagle Channel, Argentina. *Anales del Instituto de la Patagonia*, **37**, 29–40.

- Van Dijk, P., Tesch, C., Hardewig, I. & Portner, H. (1999) Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *The Journal of experimental biology*, **202**, 3611–21.
- Donaldson, W.E. & Byersdorfer, S. (2014) *Anatomy of King Crabs. King Crabs of the World: Biology and Fisheries Management* (ed. by B.G. Stevens), pp. 73–80. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Duarte, C.A., Giarratano, E., Amin, O.A. & Comoglio, L.I. (2011) Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine pollution bulletin*, **62**, 1895–1904.
- Duffy, J.E. & Thiel, M. (2007) *Evolutionary ecology of social and sexual systems*, Oxford University Press, Oxford.
- Durand, F., Devillers, N., Lallier, F.H. & Regnault, M. (2000) Nitrogen excretion and changes in blood components during emersion of the subtidal spider crab *Maia squinado* (L.). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **127**, 259–271.
- Dutra, B.K., Santos, R.B., Bueno, A.A. & Oliveira, G.T. (2008) Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalloa curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **151**, 322–328.
- Fanjul-Moles, M.L., Durán-Lizarraga, M.E., Gonsebatt, M.E. & Prieto-Sagredo, J. (2003) The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*. *Photochemistry and Photobiology*, **77**, 210–218.
- Fanjul-Moles, M.L. & Gonsebatt, M.E. (2011) *Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycle. Oxidative stress in aquatic ecosystems* (ed. by D. Abele, J.P. Vázquez-Medina, and T. Zenteno-Savín), pp. 208–223. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Fernández, J.R., Hermida, R.C. & Mojón, A. (2009) Chronobiological analysis techniques. Application to blood pressure. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, **367**, 431–445.

- Filho, D.W., Tribess, T., Gáspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A. & Magalhaes, A.R.M. (2001) Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, **203**, 149–158.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature-London.*, **408**, 239–247.
- Flohé, L. & Gunzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* (ed. by L. Packer), pp. 114–121. Academic Press, NJ.
- Forgue, J., Legeay, A. & Massabuau, J.C. (2001) Is the resting rate of oxygen consumption of locomotor muscles in crustaceans limited by the low blood oxygenation strategy? *The Journal of experimental biology*, **204**, 933–940.
- Fotedar, S. & Evans, L. (2011) Health management during handling and live transport of crustaceans: a review. *Journal of invertebrate pathology*, **106**, 143–152.
- Frederich, M. & Pörtner, H. (2000) Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **279**, 1531–1538.
- Freire, C.A., Togni, V.G. & Hermes-Lima, M. (2011) Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **160**, 291–300.
- Freitas, J., Sato, S., Ogata, T. & Kodama, M. (1995) Guanidine neurotoxins are released with the digestive fluid of crabs (Crustacea, Brachyura). *Toxicon*, **33**, 201–208.
- Geihs, M.A., Maciel, F.E., Vargas, M.A., Cruz, B.P. & Nery, L.E.M. (2013) Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **445**, 69–78.
- Geihs, M.A., Vargas, M.A., Maciel, F.E., Caldas, S.S., Cruz, B.P., Primel, E.G., Monserrat, J.M. & Nery, L.E.M. (2010) Effect of melatonin in the antioxidant defense system in the locomotor muscles of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura). *General and comparative endocrinology*, **166**, 72–82.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M. & Bianchini, A. (2004) Oxidative stress in *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Marine Environmental Research*, **58**, 625–630.

- Giarratano, E., Gil, M.N. & Malanga, G. (2011) Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Marine pollution bulletin*, **62**, 1337–1344.
- Giomi, F., Raicevich, S., Giovanardi, O., Pranovi, F., Muro, P. Di & Beltramini, M. (2008) Catch me in winter! Seasonal variation in air temperature severely enhances physiological stress and mortality of species subjected to sorting operations and discarded during annual fishing activities. *Hydrobiologia*, **606**, 195–202.
- Gismondi, E., Beisel, J.-N. & Cossu-Leguille, C. (2012) Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental research*, **118**, 47–52.
- Gorr, T.A., Wichmann, D., Hu, J., Hermes-Lima, M., Welker, A.F., Terwilliger, N., Wren, J.F., Viney, M., Morris, S., Nilsson, G.E., Deten, A., Soliz, J., Gassmann, M. & 1 (2010) Hypoxia Tolerance in Animals: Biology and Application. *Physiological and Biochemical Zoology*, **83**, 733–753.
- Gutteridge, J.M.C. (1995) Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, **41**, 1819–1828.
- Gutteridge, J.M.C. & Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**, 136–147.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974) Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130–7139.
- Haddad, J.J. (2002) Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular signalling*, **14**, 879–97.
- Hall, S. & Thatje, S. (2009) Global bottlenecks in the distribution of marine Crustacea: temperature constraints in the family Lithodidae. *Journal of Biogeography*, **36**, 2125–2135.
- Hall, S. & Thatje, S. (2011) Temperature-driven biogeography of the deep-sea family Lithodidae (Crustacea: Decapoda: Anomura) in the Southern Ocean. *Polar Biology*, **34**, 363–370.
- Halliwell, B. (2005) *Free Radicals and other reactive species in Disease. Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–7. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester.

- Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet*, **344**, 721–724.
- Halliwell, B. & Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 715S–725S.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, **219**, 1–14.
- Hardeland, R., Coto-Montes, A., Burkhardt, S. & Zsizsik, B.K. (2010) *Circadian rhythm and oxidative stress in non-vertebrate organisms*. *The Redox State and Circadian Rhythms* (ed. by T. Vanden Driessche, J.-L. Guisset, and G.M. Petiau-de Vries), pp. 121–140. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Hardeland, R., Coto-Montes, A. & Poeggeler, B. (2003) Circadian Rhythms, Oxidative Stress, and Antioxidant Defense Mechanisms. *Chronobiology International*, **20**, 921–962.
- Hartnoll, R.G. (1982) *Growth. The biology of Crustacea: Embryology, morphology and genetics* (ed. by L.G. Abele), pp. 111–196. Academic Press, New York.
- Haukenes, A.H., Buck, C.L., El Mejjati, S.Y. & Mejjati, S.Y. El (2009) Effects of emersion temperature on the oxygen consumption rates of male tanner crabs, *Chionoecetes bairdi*. *Journal of Crustacean Biology*, **29**, 91–95.
- Hermes-Lima, M. (2004) *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals*. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* (ed. by K.B. Storey), pp. 319–368. John Wiley and Sons, Inc.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M. & Storey, K.B. (1998) Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, **120**, 437–448.
- Hermes-Lima, M. & Zenteno-Savín, T. (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology and Pharmacology*, **133**, 537–556.
- Hervant, F., Mathieu, J. & Messana, G. (1997) Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences Paris, Sciences de la vie*, **320**, 139–148.

- Hochachka, P.W. & Lutz, P.L. (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **130**, 435–459.
- Hsuchou, H., Wang, Y., Cornelissen-Guillaume, G.G., Kastin, A.J., Jang, E., Halberg, F. & Pan, W. (2013) Diminished leptin signaling can alter circadian rhythm of metabolic activity and feeding. *Journal of applied physiology*, **115**, 995–1003.
- Isla, F., Bujalesky, G. & Coronato, A. (1999) Procesos estuarinos en el canal Beagle, Tierra del Fuego. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, **54**, 307–318.
- Iturraspe, R.J., Sottini, R., Schroeder, C. & Escobar, J. (1989) *Hidrología y variables climáticas del Territorio de Tierra del Fuego. Información básica.*, CADIC-CONICET, Ushuaia, Argentina.
- Jacklin, M. & Combes, J. (2007) The good practice guide to handling and storing live Crustacea. *Sea Fish Industry Authority Publication, UK*, 151 pp.
- Jones, D.P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxidant and Redox signaling*, **8**, 1865–1879.
- Kamata, H. & Hirata, H. (1999) Redox Regulation of Cellular Signaling. *Cell Signal*, **11**, 1–14.
- Kattner, G., Graeve, M., Calcagno, J.A., Lovrich, G.A., Thatje, S. & Anger, K. (2003) Lipid, fatty acid and protein utilization during lecithotrophic larval development of *Lithodes santolla* (Molina) and *Paralomis granulosa* (Jacquinot). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **292**, 61–74.
- Keller, M., Sommer, A.M., Pörtner, H.-O. & Abele, D. (2004) Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *The Journal of Experimental Biology*, **207**, 2529–2538.
- Keppler, D. (1999) Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**, 985–991.
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, a, Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, a, Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M. & Fuchs, E. (2011) Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **35**, 1291–301.

- Koukkari, W.L. & Sothorn, R.B. (2006) *Introducing Biological Rhythms*, Springer Science & Business Media, New York.
- Krishnan, N., Davis, A.J. & Giebultowicz, J.M. (2008) Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and biophysical research communications*, **374**, 299–303.
- Kumar, T.P., Ramamurthi, R. & Babu, K.S. (1981) Circadian fluctuations in total protein and carbohydrate content in the slug *Laevicaulis alte* (Ferussac, 1821). *Biological Bulletin*, **160**, 114–122.
- Lawler, J. & Powers, S. (1998) Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Canadian Journal of Applied Physiology*, **23**, 23–55.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (1993) *Principios de bioquímica*, Segunda. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Lesser, M.P. (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual review of physiology*, **68**, 253–78.
- Livingstone, D.R. (2003) Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue Medicine et Veterinaire*, **154**, 427–430.
- Lorenzon, S., Giulianini, P.G., Martinis, M. & Ferrero, E.A. (2007) Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **147**, 94–102.
- Lorenzon, S., Martinis, M., Borme, D. & Ferrero, E.A. (2013) Hemolymph parameters as physiological biomarkers for monitoring the effects of fishing and commercial maintenance methods in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda). *Fisheries Research*, **137**, 9–17.
- Lovrich, G. & Vinuesa, J. (1999) Reproductive potential of the lithodids *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa* (Anomura, Decapoda) in the Beagle Channel, Argentina. *Scientia Marina*, **63**, 355–360.
- Lovrich, G.A. (1997) La pesquería mixta de las centollas *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Anomura: Lithodidae) en Tierra del Fuego, Argentina. *Investigaciones Marinas*, **25**, 41–57.
- Lovrich, G.A. (1999) Seasonality of larvae of Brachyura and Anomura (Crustacea Decapoda) in the Beagle Channel, Argentina. *Scientia Marina*, **63**, 347–354.

- Lovrich, G.A. & Tapella, F. (2014) *Southern King Crabs. King Crabs of the World: Biology and Fisheries Management* (ed. by B. Stevens), pp. 441–476. CRC Press.
- Lovrich, G.A., Thatje, S., Calcagno, J.A., Anger, K. & Kaffenberger, A. (2003) Changes in biomass and chemical composition during lecithotrophic larval development of the southern king crab, *Lithodes santolla* (Molina). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 65–79.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265–275.
- Lund, H.S., Wang, T., Chang, E.S., Pedersen, L.F., Taylor, E.W., Pedersen, P.B. & McKenzie, D.J. (2009) Recovery by the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.) from the physiological stresses of trawling: Influence of season and live-storage position. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **373**, 124–132.
- Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, **101**, 13–30.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T. V, Lushchak, O. V, Storey, J.M. & Storey, K.B. (2005) Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **37**, 1319–30.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A. & Hermes-Lima, M. (2001) Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **280**, 100–107.
- Maciel, F., Geihs, M., Monserrat, J.M. & Nery, L.E.M. (2010) Antioxidant defense system rhythms in crustaceans and possible roles for melatonin. *Frontiers in bioscience*, **E2**, 1448–1459.
- Maciel, F.E., Rosa, C.E., Santos, E.A., Monserrat, J.M. & Nery, L.E.M. (2004) Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian Journal Zoology*, **82**, 1871–1877.
- Macpherson, E. (1988) Revision of the family Lithodidae Samouelle, 1819 (Crustacea, Decapoda, Anomura) in the Atlantic Ocean. *Monografias de Zoología Marina*, **2**, 9–153.

- Malanga, G., Estevez, M.M.S., Calvo, J. & Puntarulo, S. (2005) Oxidative stress in gills of limpets from the Beagle Channel: comparison with limpets from the Antarctic. *Scientia Marina*, **69**, 297–304.
- Malanga, G., Estevez, M.S., Calvo, J., Abele, D. & Puntarulo, S. (2007) The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **146**, 551–558.
- Malanga, G., Perez, A., Calvo, J. & Puntarulo, S. (2009) The effect of seasonality on oxidative metabolism in the sea urchin *Loxechinus albus*. *Marine Biology*, **156**, 763–770.
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A. & Gerhard, G.S. (2004) The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology*, **138**, 363–373.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C. & Leboulenger, F. (2005) The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, **2**, 91–104.
- Marqueze, A., Ribarcki, F., Kirst, I., Kucharski, L.C. & Da Silva, R.S.M. (2011) Glucose metabolism in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets: Anoxia and recovery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **404**, 40–46.
- Martin, J.W. & Davis, G.E. (2001) An updated classification of the recent crustacea. *Science Series 39. Natural History Museum of Los Angeles County, Los Angeles*.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049–6055.
- McDonald, D.G., McMahan, B.R. & Wood, C.M. (1979) An analysis of acid-base disturbances in the haemolymph following strenuous activity in the Dungeness crab, *Cancer magister*. *Journal of Experimental Biology*, **79**, 47–58.
- McMahan, B.R. (2001) Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. *Respiration physiology*, **128**, 349–64.
- Menezes, S., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. & R. Peck, M. (2006) Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **335**, 114–122.

- Mitsui, A. & Ohta, T. (1961) Photooxidative consumption and photoreductive formation of ascorbic acid in green leaves. *Plant Cell Physiology*, **2**, 31–44.
- Moncheva, S., Trakhtenberg, S., Katrich, E., Zemser, M., Goshev, I., Toledo, F., Arancibia-Avila, P., Doncheva, V. & Gorinstein, S. (2004) Total antioxidant capacity in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Black Sea coasts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **59**, 475–484.
- Morris, S. & Oliver, S. (1999) Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: simulation studies of commercial shipping methods. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, **122**, 299–308.
- Nahrgang, J., Camus, L. & Broms, F. (2010) Seasonal baseline levels of physiological and biochemical parameters in polar cod (*Boreogadus saida*): Implications for environmental monitoring. *Marine pollution bulletin*, **60**, 1336–1345.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S. & Datta, A.G. (2001) Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine environmental research*, **52**, 13–26.
- Ocampo, L., Patiño, D. & Ramírez, C. (2003) Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **296**, 71–77.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**, 351–358.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C. & Da Silva, S.M. (2004) Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, **137**, 383–390.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C. & Da Silva, R.S.M. (2001) Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Marine Biology*, **139**, 335–342.
- De Oliveira, U.O., da Rosa Araújo, A.S., Belló-Klein, A., da Silva, R.S.M. & Kucharski, L.C. (2005) Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **140**, 51–57.

- Oliveira, U.O., da Rosa Araújo, A.S., Belló-Klein, A., da Silva, R.S.M. & Kucharski, L.C. (2005) Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **140**, 51–57.
- Paital, B. (2013) Antioxidant and oxidative stress parameters in brain of *Heteropneustes fossilis* under air exposure condition; role of mitochondrial electron transport chain. *Ecotoxicology and environmental safety*, **95**, 69–77.
- Paital, B. & Chainy, G. (2013) Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and environmental safety*, **87**, 33–41.
- Paital, B. & Chainy, G.B.N. (2010) Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology*, **151**, 142–151.
- Pannunzio, T.M. & Storey, K.B. (1998) Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **221**, 277–292.
- Paschke, K., Cumillaf, J.P., Chimal, M.E., Díaz, F., Gebauer, P. & Rosas, C. (2013) Relationship between age and thermoregulatory behaviour of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **448**, 141–145.
- Paschke, K., Cumillaf, J.P., Loyola, S., Gebauer, P., Urbina, M., Chinal, M.E. & Pascual, C. (2010) Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae). *Marine Biology*, **157**, 7–18.
- Paterson, B.D. & Spanoghe, P.T. (1997) Stress indicators in marine decapod crustaceans, with particular reference to the grading of western rock lobsters *Panulirus cygnus* during commercial handling. *Marine Freshwater Research*, **48**, 829–834.
- Pörtner, H.O. (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **132**, 739–761.

- Power, A. & Sheehan, D. (1996) Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology & Pharmacology*, **114**, 99–103.
- Qiu, J., Wang, W.-N., Wang, L.-J., Liu, Y.-F. & Wang, A.-L. (2011) Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology*, **154**, 36–41.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Refinetti, R. (2007) Cosinor Periodogram. www.circadian.org.
- Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M. & Winston, G.W. (2002) Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *The Science of the Total Environment*, **289**, 205–211.
- Reznick, A.Z. & Packer, L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, **233**, 357–363.
- Ridgway, I.D., Taylor, A.C., Atkinson, A., Chang, E.S. & Neil, D.M. (2006a) Impact of capture method and trawl duration on the health status of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **339**, 135–147.
- Ridgway, I.D., Taylor, A.C., Atkinson, R.J.A., Stentiford, G.D., Chang, E.S., Chang, S.A. & Neil, D.M. (2006b) Morbidity and mortality in Norway lobsters, *Nephrops norvegicus*: physiological, immunological and pathological effects of aerial exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **328**, 251–264.
- Ríos, C., Arntz, W.E., Gerdes, D., Mutschke, E. & Montiel, A. (2007) Spatial and temporal variability of the benthic assemblages associated to the holdfasts of the kelp *Macrocystis pyrifera* in the Straits of Magellan, Chile. *Polar Biology*, **31**, 89–100.
- Da Rocha, A.M., Salomão de Freitas, D.P., Burns, M., Vieira, J.P., de la Torre, F.R. & Monserrat, J.M. (2009) Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology*, **150**, 512–520.

- Romero, M., Lovrich, G., Tapella, F. & Thatje, S. (2004) Feeding ecology of the crab *Munida subrugosa* (Decapoda: Anomura: Galatheididae) in the Beagle Channel, Argentina. *Journal of the Marine Biology Assessment*, **84**, 359–365.
- Romero, M.C., Ansaldo, M. & Lovrich, G.A. (2007) Effect of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulosa* (Decapoda: Anomura). *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology*, **146**, 54–9.
- Romero, M.C., Schvezov, N., Sotelano, M.P., Diez, M.J., Florentin, O., Tapella, F. & Lovrich, G.A. (2013) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in two *Lithodes* species from South Atlantic during summer. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **48**, 227–234.
- Romero, M.C., Tapella, F., Sotelano, M.P., Ansaldo, M. & Lovrich, G.A. (2011) Oxidative stress in the subantarctic false king crab *Paralomis granulosa* during air exposure and subsequent re-submersion. *Aquaculture*, **319**, 205–210.
- Sani, M., Sebaï, H., Gadacha, W., Boughattas, N., Reinberg, A. & Mossadok, B.A. (2006) Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **145**, 331–337.
- Schvezov, N., Lovrich, G.A., Tapella, F. & Romero, M.C. (2013) Daily variations of the antioxidant defense system of the lithodid crab *Lithodes santolla*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **164**, 605–611.
- Sheehan, D. & Power, A. (1999) Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology*, **123**, 193–199.
- Sherratt, P.J. & Hayes, J.D. (2001) *Glutathione S-transferases. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotic*. (ed. by C. Ioannides), pp. 319–352. John Wiley and Sons, Ltd.
- Da Silva-Castiglioni, D., Dutra, B.K., Oliveira, G.T. & Bond Backup, G. (2007) Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **148**, 204–213.
- Da Silva-Castiglioni, D., Oliveira, G.T. & Backup, L. (2010) Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae)

- to hypoxia. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **156**, 436–444.
- Sohal, R.S. (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 37–44.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1995) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, Third. W.H. Freeman and Co., New York.
- Speed, S.R., Baldwin, J., Wong, R.J. & Wells, R.M.G. (2001) Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*, and responses to emersion during simulated live transport. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **128**, 435–444.
- Stoner, A.W. (2012) Assessing Stress and Predicting Mortality in Economically Significant Crustaceans. *Reviews in Fisheries Science*, **20**, 111–135.
- Storch, D., Kathöver, R., Arntz, W.E., Lovrich, G.A., Romero, M.C. & Schvezov, N. (2011) *Thermal tolerance of life history stages and their relevance for the biodiversity and biogeography of decapod crustaceans. Reports on Polar and Marine Research. (ANT-XXVII/3)* (ed. by R. Knust, D. Gerdes, and K. Mintenback), pp. 76–79. Helmholtz. Gemeinschaft. AWI.
- Storey, K.B. & Storey, J.M. (2010) *Metabolic regulation and gene expression during aestivation. Aestivation: Molecular and Physiological aspects* Progress in Molecular and Subcellular Biology. (ed. by C. Arturo Navas and J.E. Carvalho), pp. 25–45. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Strauss, J. & Dirksen, H. (2010) Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems. *Frontiers in Bioscience*, **1**, 1040–1047.
- Takahashi, J.S., Turek, F.W. & Moore, R.Y. (2001) *Circadian clocks. Handbook of Behavioral Neurobiology*, pp. 1–770. Plenum Publishers, New York.
- Tapella, F. & Lovrich, G. (2006) Asentamientos de estadios tempranos de las centollas *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Decapoda: Lithodidae) en colectores artificiales pasivos en el Canal Beagle, Argentina. *Investigaciones marinas Valparaíso*, **34**, 47–55.
- Truchot, J.P. (1983) *Regulation of acid-base balance. The Biology of Crustacea* (ed. by L.H. Mantel), pp. 431–457. Academic Press, New York.
- Urbina, M.A., Paschke, K., Gebauer, P., Cumillaf, J.P. & Rosas, C. (2013) Physiological responses of the Southern King Crab, *Lithodes santolla* (Decapoda: Lithodidae), to

- aerial exposure. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **166**, 538–545.
- Vijavayel, K., Gomathi, R.D., Durgabhavani, K. & Balasubramanian, M.P. (2004) Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible crab *Scylla serrata*. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 429–433.
- Vinagre, A.S., Amaral, A.P.N., Ribarcki, F.P., Silveira, E.F. & Périco, E. (2007) Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **146**, 514–519.
- Wang, W.-N., Wang, A.-L., Liu, Y., Xiu, J., Liu, Z.-B. & Sun, R.-Y. (2006) Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, **256**, 624–630.
- Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, É.G. & Hermes-Lima, M. (2013) Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **165**, 384–404.
- Whiteley, N.M. & Taylor, E.W. (1990) The acid-base consequences of aerial exposure in the lobster, *Homarus gammarus* (L.) at 10 and 20°C. *Journal of Thermal Biology*, **15**, 47–56.
- Whiteley, N.M., Taylor, E.W., El Haj, A.J. & Haj, A. El (1997) Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. *Journal of thermal biology*, **22**, 419–427.
- Wijnen, H. & Young, M.W. (2006) Interplay of Circadian Clocks and Metabolic Rhythms. *Annual Review of Genetics*, **40**, 409–448.
- Withers, P.C. (1992) *Comparative Animal Physiology*, Saunders College Publishing, Western Australia.
- Woll, A., Larssen, W. & Fossen, I. (2010) Physiological responses of brown crab (*Cancer pagurus* Linnaeus 1758) to dry storage under conditions simulating vitality stressors. *Journal of Shellfish Research*, **29**, 479–487.
- Wood, C.M. & Randall, R.J. (1981) Haemolymph gas transport, acid-base regulation, and anaerobic metabolism during exercise in the land crab (*Cardisoma carnifex*). *Journal of Experimental Zoology*, **218**, 23–35.
- Wu, R.S.S. (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine pollution bulletin*, **45**, 35–45.

- Za, M., Koller, F. & Zámocký, M. (1999) Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*, **72**, 19–66.
- Zainal, K., Taylor, A. & Atkinson, R. (1992) The effect of temperature and hypoxia on the respiratory physiology of the squat lobsters, *Munida rugosa* and *Munida sarsi* (Anomura, galatheidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, **1**, 551–561.
- Zaklan, S.D. (2002) *Review of the family Lithodidae (Crustacea: Anomura: Paguroidea): Distribution, Biology, and Fisheries. Crabs in cold water regions: Biology, management, and economics* (ed. by A.J. Paul, E.G. Dawe, R. Elner, G.S. Jamieson, G.H. Kruse, R.S. Otto, B. Sainte-MARie, T.C. Shirley, and D. Woodby), pp. 751–845. University of Alaska Sea Grant, AK-SG-02-01, Fairbanks, Alaska.
- Zhang, Z., Li, X., Vandeppeer, M. & Zhao, W. (2006) Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, **256**, 502–509.
- Zou, E., Du, N.N. & Lai, W. (1996) The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **114**, 105–109.