

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

**FISIOLOGÍA BIOQUÍMICA DIGESTIVA Y METABÓLICA DE CRUSTÁCEOS DECÁPODOS Y PECES
TELEÓSTEOS DE INTERÉS REGIONAL, ECOLÓGICO Y/O ECONÓMICO: CARACTERIZACIÓN Y
MODULACIÓN DE ENZIMAS CLAVE EN TRACTO DIGESTIVO**

Autora: Eugenia Méndez

Directora: Dra. Alejandra A. López Mañanes

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS –
ÁREA BIOLOGÍA**

Año 2020



Parte de los resultados de la presente Tesis han sido publicados. Como reconocimiento y agradecimiento a los co-autores de estos trabajos se detallan a continuación las citas correspondientes.

Artículo completo publicado en revista científica internacional con referato indexada (ISI):

- **Méndez E**, Caruso Neves C, López Mañanes A.A. “Two sodium pumps in the hepatopancreas of the intertidal euryhaline crab *Neohelice granulata*: biochemical characteristics and differential modulation after feeding” Canadian Journal of Zoology 96: 576-584 (2018) <https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0128>.

Resúmenes publicados en revistas con referato indexadas (En inglés)

- **Méndez E.**, López Mañanes AA. “*Neohelice granulata* from different habitats: Alkaline phosphatases and lipase upon distinct lipidic diet” Abstracts First Biology Meeting of the River Plate, Buenos Aires, Argentina Biocell 37 (1), 17, 2013, ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).
- **Méndez E.**, López Mañanes AA. “Effect of diets with different lipid content in the crab *Neohelice granulata* from different habitats” Abstracts XV Annual Meeting Argentine Biology Society, Chascomús, Argentina Biocell 38(2), 32, A51, 2014, ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).

- **Méndez E.**, López Mañanes AA. “K⁺-independent ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in hepatopancreas of *Neohelice granulata*” XVI Annual Meeting Argentine Biology Society, Chascomús, Argentina Biocell 39 (3), 15, A38, 2015 ISSN: 0327-9545 (print), 1667-5746 (electronic).

Resúmenes publicados en acta de resúmen:

- **Méndez, E.;** López Mañanes A.A. “Fosfatasa alcalina y lipasa en hepatopáncreas del cangrejo *Neohelice granulata* de hábitats contrastantes: efecto de dietas de diferente proporción lipídica” XIV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología/Primer Encuentro Rioplatense de Biología, 5 al 7 de setiembre de 2012, Buenos Aires, Argentina.
- **Méndez, E.,** López Mañanes AA. “Efecto diferencial de dietas de distinta proporción lipídica sobre reservas de energía en el cangrejo *Neohelice granulata* de hábitats contrastantes” XV Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, 4-6 de diciembre de 2013, Chascomús, Argentina.
- **Méndez, E.,** López Mañanes AA. “K⁺-independent ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in hepatopancreas of *Neohelice granulata*” XVI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, 1-3 de diciembre de 2014, pag. 30, Chascomús, Argentina.
- **Méndez, E.,** Caruso-Neves, C.; López Mañanes AA “Respuestas postingesta de la actividad de Na⁺-ATPasa y Na⁺/K⁺-ATPasa en diferentes salinidades en

hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*” X Encuentro Biólogos En Red, 16 y 17 de noviembre de 2015, Pág. 130; Mar del Plata, Argentina.

- **Méndez, E.**, Caruso-Neves, C.; López Mañanes AA “Actividad de fosfatasa alcalina en intestino anterior del lenguado *Paralichthys orbignyanus*: caracterización parcial”. XIII Biólogos en Red. Mar del Plata, pcia. Buenos Aires. 20 y 21 de noviembre de 2018.

- *Agradecimientos*

- *En estos últimos años mi vida ha cambiado para siempre. Recorrí un fascinante camino, en el que crecí tanto personal como profesionalmente. Esta tesis es el resultado de un intenso período formativo con el que me comprometí durante un largo tiempo. Pudo haber sido un camino solitario, pero me encontré con gente a mi lado que siempre me acompañó.*

- *Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial, agradecer a la Dra. Alejandra López Mañanes por aceptarme para realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo, así como también por su importante aporte y participación en el desarrollo de la misma. Por su calidad humana y profesional.*

- *A los jurados, por aceptar ser parte del tribunal, y por sus oportunos aportes que ayudaron a enriquecer este trabajo, muchas gracias.*

- *Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeras de grupo, las de hoy y las que han estado, por haber creado un estimulante ambiente de trabajo. Por ser grandes personas, excelentes profesionales, siempre dispuestas a compartir sus conocimientos a lo largo de estos años y sobre todo por su amistad.*

- *A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, que están siempre presentes de una u otra manera. A ellos, con quienes tengo el privilegio de compartir la vida, gracias.*

- *Agradecer a mis padres y hermanos por su apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis objetivos como persona y profesional. Así como también a toda esa familia que ha ido creciendo y que siempre ayuda y acompaña.*

- *A esa persona que estuvo apoyándome en cada decisión que tomara, Alejandro, mi cable a tierra, por tu contención, por tu paciente compañía en los difíciles momentos. Por enseñarme y alentarme a descubrir cariño por este trabajo. Tu ayuda fue fundamental, te lo agradezco muchísimo.*

- *A vos, que posiblemente en este momento no comprendas del todo lo que sucede. Porque en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe, sos mi principal motivación. A Manuel, mi cielo, gracias por tu amor. Y también a quién me acompañó en todo este último tramo, inseparable, quién siente todo lo que yo siento, hace lo yo hago, Nicolás.*

- *En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta Tesis Doctoral, les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.*

Contenido

RESUMEN	12
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	18
CAPÍTULO 1:	28
Actividad de Na ⁺ K ⁺ ATPasa y de Na ⁺ ATPasa en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i> : caracterización parcial	28
INTRODUCCIÓN.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Captura y mantenimiento de animales.....	31
Preparación de las muestras	32
Determinaciones cuantitativas	32
Osmolalidad de la hemolinfa	34
Análisis Estadístico	35
RESULTADOS	36
Actividad de Na ⁺ K ⁺ ATPasa en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i>	36
Actividad de Na ⁺ - ATPasa independiente de K ⁺ , insensible a la ouabaína, sensible a furosemida (Na ⁺ ATPasa) en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	41
DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO 2:	48
Estudios de modulación de las actividades de Na ⁺ ATPasa y Na ⁺ -K ⁺ ATPasa en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i>	48
INTRODUCCIÓN.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
Captura y mantenimiento de animales.....	52
Preparación de las muestras	53
Determinaciones cuantitativas	54

Análisis Estadístico	54
RESULTADOS	55
Actividad de Na ⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> mantenidos en diferentes salinidades.....	55
Actividad de Na ⁺ -K ⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> mantenidos en diferentes salinidades.....	57
Efecto in vitro de dopamina (DA) sobre la actividad de Na ⁺ ATPasa y Na ⁺ -K ⁺ ATPasa en hepatopáncreas de <i>Neohelice granulata</i>	59
DISCUSIÓN.....	60
CAPÍTULO 3:	65
Estudios sobre la influencia del hábitat en parámetros digestivos y metabólicos a nivel bioquímico en individuos de <i>Neohelice granulata</i> de la Laguna Costera Mar Chiquita	65
INTRODUCCIÓN.....	66
MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
Captura y mantenimiento de los animales	69
Preparación de extractos enzimáticos de hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>	70
Determinaciones cuantitativas	71
Índice hepatosomático.....	72
Análisis estadístico	73
RESULTADOS	73
Concentración de triglicéridos y proteínas en hepatopáncreas de individuos adultos de <i>N. granulata</i>	73
Actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos adultos de <i>N. granulata</i>	76
Actividad de fosfatasa alcalina (AP) en hepatopáncreas de individuos adultos de <i>N. granulata</i>	76
Índice hepatosomático de individuos adultos de <i>N. granulata</i> de planicie de mareas y espartillar	80
DISCUSIÓN.....	81
CAPÍTULO 4:	88

Perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico de adultos del lenguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> : actividad de carbohidrasas en intestino y concentración de glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva.....	88
INTRODUCCIÓN	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	92
Captura y mantenimiento de animales.....	92
Preparación de homogenatos	93
Determinaciones cuantitativas	93
Análisis estadístico	95
RESULTADOS	96
Actividad de carbohidrasas en intestino anterior de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	96
Concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado y músculo de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	97
Actividad de carbohidrasas en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	99
Concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	103
Concentración de glucógeno y glucosa libre en músculo a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	106
DISCUSIÓN.....	109
CAPÍTULO 5:	117
Perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico de adultos del lenguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> : actividad de proteasas y lipasa en intestino y concentración de proteínas y triglicéridos en órganos de reserva.....	117
INTRODUCCIÓN.....	118
MATERIALES Y MÉTODOS.....	120
Captura y mantenimiento de animales.....	120
Preparación de homogenatos	121
Determinaciones cuantitativas	121
Análisis estadístico	122

RESULTADOS	123
Actividad de proteasas en intestino anterior de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	123
Actividad de lipasa en intestino anterior de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	124
Concentración de proteínas en hígado y músculo de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	125
Concentración de triglicéridos en hígado y músculo de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	126
Actividad de proteasas en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	127
Concentración de proteínas en hígado y músculo a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	130
Actividad de lipasa en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	133
Concentración de triglicéridos en hígado y músculo a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i>	134
DISCUSIÓN.....	137
CAPÍTULO 6:	146
Actividad de Fosfatasa Alcalina en intestino del lenguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> : caracterización parcial y dinámica postprandial INTRODUCCIÓN.....	146
MATERIALES Y MÉTODOS.....	150
Mantenimiento de animales	150
Preparación de homogenatos	150
Determinaciones cuantitativas	151
Análisis estadístico	151
RESULTADOS	152
Actividad de AP en intestino anterior de individuos adultos de <i>P. orbignyanus</i> : caracterización parcial.....	152
Actividad de AP en intestino a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de adultos de <i>P. orbignyanus</i>	158
Actividad de AP en intestino de individuos juveniles de <i>P. orbignyanus</i>	159
DISCUSIÓN.....	160
CONSIDERACIONES FINALES	165

BIBLIOGRAFÍA..... 170

RESUMEN

El objetivo general de la presente tesis fue realizar estudios de caracterización y modulación de enzimas claves (en procesos digestivos y metabólicos y de modulación del contenido de reservas de energía) en el cangrejo eurihalino *Neohelice granulata* de la laguna costera Mar Chiquita y en el lenguado *Paralichthys orbignyanus*. La finalidad de estos estudios fue establecer el posible rol de enzimas clave en mecanismos de ajustes digestivos y/o metabólicos en relación a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales cubriendo un área de vacancia en el estudio de la fisiología bioquímica, digestiva, integrativa y ambiental de estos organismos. Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares: a) determinar la existencia y características bioquímicas de actividades de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 1); b) determinar la modulación de la actividad de Na^+ ATPasa y de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* en diferentes condiciones de salinidad ambiental y el efecto *in vitro* de dopamina sobre ambas actividades (Capítulo 2); c) determinar la concentración de triglicéridos y proteínas y las actividades de lipasa, de fosfatasa alcalina (AP) sensible e insensible a levamisol en hepatopáncreas de machos adultos procedentes de planicie de marea y espartillar de la Laguna Costera Mar Chiquita a diferentes tiempos

luego de la exposición en laboratorio a las mismas condiciones de alimentación (Capítulo 3); d) determinar la actividad de carbohidrasas en intestino y glucógeno y glucosa libre en órganos de reserva en adultos del lenguado *P. orbignyanus* (Capítulo 4); e) determinar la actividad de proteasas y lipasa en intestino y concentración de proteínas y triglicéridos en órganos de reserva en adultos del lenguado *P. orbignyanus* (Capítulo 5) y f) caracterizar parcialmente la actividad de AP en intestino anterior de adultos del lenguado *P. orbignyanus* y la respuesta postingesta de la actividad de AP en intestino anterior de adultos y juveniles de *P. orbignyanus* (Capítulo 6). Los resultados de la presente tesis muestran la co-existencia de actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (bomba clásica de sodio) y de Na^+ ATPasa insensible a ouabaína e inhibible por furosemida (segunda bomba de sodio) en hepatopáncreas de *N. granulata*. Las mismas fueron parcialmente caracterizadas. La estimulación por Na^+ bajo total inhibición de la actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa reveló la existencia de actividad de Na^+ ATPasa la cual fue totalmente inhibida por furosemida 2 mM, exhibe cinética de Michaelis-Menten para ATP y actividad más alta alrededor de pH 7,4 (Capítulo 1). Se determinó la existencia de una modulación específica y diferencial de la actividad Na^+ ATPasa luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo su rol en ajustes digestivos y metabólicos postprandiales y como componente de respuestas post-ingesta a nivel bioquímico a la salinidad ambiental (Capítulo 2). Se observó que en individuos de *N. granulata* de planicie de mareas y espartillar, la concentración de triglicéridos y las actividades de lipasa y de AP sensible a levamisol e insensible a levamisol en hepatopáncreas son afectadas diferencialmente por la exposición a una misma dieta (Capítulo 3). Se demostró la existencia de actividad de amilasa y de maltasa en

intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* y de glucógeno en hígado y músculo (Capítulo 4), y la existencia de actividad de tripsina, N-aminopeptidasa (APN) y de lipasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* (Capítulo 5). Los resultados muestran una respuesta diferencial de la actividad de amilasa, maltasa (Capítulo 4), tripsina, APN y lipasa (Capítulo 5) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* y de reservas en hígado y músculo. Por último se observó la existencia de actividad de AP en intestino de adultos y juveniles de *P. orbignyanus*, la cual se caracterizó parcialmente en adultos. Dicha actividad presenta una respuesta diferente a distintos tiempos postingesta sugiriendo la existencia de ajustes postprandiales diferenciales en relación a la edad (Capítulo 6).

Los resultados de la presente tesis constituyen un aporte de importancia al conocimiento sobre diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva y metabólica de crustáceos decápodos y peces teleósteos en general y de cangrejos eurihalinos estuariales y peces planos estuario-dependientes de importancia regional, ecológica y/o comercial, en particular. Además, son de impacto y potencial aplicación en acuicultura debido a la importancia para la misma del conocimiento del perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico (existencia y modulación de enzimas digestivas específicas y reservas de energía) para el mejoramiento del cultivo y explotación de especies de interés comercial.

Palabras clave: Enzimas digestivas, fosfatasa alcalina; $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa; Na^+ ATPasa, hepatopáncreas, intestino, reservas de energía, cangrejos eurihalinos, peces eurihalinos

ABSTRACT

The general objective of this thesis was to carry out studies of characterization and modulation of key enzymes (in digestive and metabolic processes and in modulation of the energy reserve content) in the eurihalin crab *Neohelice granulata* from Mar Chiquita Coastal Lagoon and in the flounder *Paralichthys orbignyanus*. The purpose of these studies was to establish the possible role of key enzymes in mechanisms of digestive and/or metabolic adjustments in relation to different physiological and/or environmental conditions covering a vacancy area in the study of the biochemical, digestive, integrative and environmental physiology of these organisms. To accomplish the general objective, the following particular objectives were proposed: a) determine the existence and biochemical characteristics of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and Na^+ ATPase activities in hepatopancreas of *N. granulata* (Chapter 1); b) determine the modulation of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase and of Na^+ ATPase activities at different times after feeding in hepatopancreas of *N. granulata* under different conditions of environmental salinity and the in vitro effect of dopamine on both activities (Chapter 2); c) determine triglyceride and protein concentration and lipase and alkaline phosphatase activities sensitive and insensitive to levamisole in hepatopancreas of individuals of *N. granulata* of from the maduflat and the saltmarsh of Mar Chiquita coastal lagoon under exposure to same feeding controlled conditions (Chapter 3); d) determine the activity of carbohydrases in the intestine and glycogen and free glucose in storage organs of adults of *P. orbignyanus* (Chapter 4); e) determine protease and lipase activity in the

intestine and concentration of proteins and triglycerides in storage organs of adults of *P. orbignyana* (Chapter 5) and partial characterization of alkaline phosphatase activity in the digestive tract of adults of *P. orbignyana* and on the postprandial dynamics of alkaline phosphatase activity in intestine of juveniles and adults of *P. orbignyana* (Chapter 6). The results of this thesis show the co-existence of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity (classical sodium pump) and the ouabain insensitive and furosemide inhibible Na^+ ATPase (second sodium pump) in hepatopancreas of *N. granulata*. They were partially characterized. Stimulation by Na^+ under total inhibition of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity revealed the existence of Na^+ ATPase activity which was totally inhibited by 2 mM of furosemide, exhibits Michaelis-Menten kinetics for ATP and higher activity around pH 7.4 (Chapter 1). The existence of a specific and differential modulation of Na^+ ATPase activity after feeding in hepatopancreas of *N. granulata* was determined, suggesting its role in postprandial digestive and metabolic adjustments and as a component of post-feeding responses at the biochemical level to salinity environmental (Chapter 2). It was observed that in individuals of *N. granulata* of mudflat and saltmarsh, the concentration of triglycerides and lipase, AP levamisole-sensitive and AP levamisole-insensitive activities in hepatopancreas are differentially affected by exposure to the same diet (Chapter 3). The existence of amylase and maltase activity in the anterior intestine of adults of *P. orbignyana* and glycogen in liver and muscle was demonstrated (Chapter 4), and also the existence of trypsin, N-aminopeptidase (APN) and lipase activity in intestine of adult of *P. orbignyana* (Chapter 5). The results show a differential response of the amylase, maltase (Chapter 4), trypsin, APN and lipase activities (Chapter 5) at different times after feeding in the anterior

intestine of adults of *P. orbignyana* and reserves in liver and muscle. Finally, the existence of AP activity in the intestine of adults and juveniles of *P. orbignyana* was observed, and it was partially characterized in adults. This activity presents a different response to different post-feeding times suggesting the existence of differential postprandial adjustments in relation to age (Chapter 6).

The results of this thesis constitute an important contribution to the knowledge about different aspects of the digestive and metabolic biochemical physiology of decapod crustaceans and teleosts fish in general and of estuarial euryhaline crabs and estuarine-dependent flatfish of regional, ecological and/or commercial importance, in particular. In addition, they are of impact and potential application in aquaculture due to the importance of the knowledge of the digestive and metabolic profile at the biochemical level (occurrence and modulation of specific digestive enzymes and energy reserves) for the improvement of the cultivation and exploitation of species of commercial interest.

Key words: Digestive enzymes, alkaline phosphatase; $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase; Na^+ ATPase, hepatopancreas, intestine, energy reserves, euryhaline crabs, euryhaline fishes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La capacidad de balancear la adquisición, almacenamiento y el uso de energía es crítica en la supervivencia, crecimiento y mantenimiento de los animales (Karasov y Douglas, 2013). En este contexto, el tracto digestivo cumple un rol esencial debido a su participación central en múltiples funciones que incluyen la digestión y absorción de nutrientes, balance hídrico y osmótico y defensa (Karasov y Douglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Akiba et al., 2018; Chassaing y Gerwartz, 2018; Liu et al., 2018). Así, los estudios sobre diferentes aspectos de la fisiología bioquímica del tracto digestivo constituyen una herramienta fundamental para el conocimiento integrado de las características digestivas (ej. presencia y modulación de enzimas digestivas específicas) y metabólicas (ej. presencia, tipo, localización y modulación de reservas de energía) y de los ajustes en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales.

Las enzimas digestivas desempeñan un rol fisiológico esencial como vínculo entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (del Valle y López Mañanes, 2011; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Imran et al., 2016). El nivel de actividad de enzimas digestivas constituye un factor clave que afecta la capacidad digestiva (Karasov y Douglas, 2013; Ramirez-Otarola et al., 2018). El nivel y modulación de actividad de carbohidrasas (ej. amilasa, maltasa), proteasas (ej. tripsina, N-aminopeptidasa) y lipasas determinará la capacidad para la digestión y utilización de hidratos de carbono, proteínas y lípidos respectivamente. Las α -amilasas (α -1,4-glucano-4-

gluconohidrolasa, EC 3.2.1.1) tienen una importancia fisiológica central en el metabolismo de hidratos de carbono debido a su rol en los pasos iniciales de la digestión de sustratos glucogénicos dietarios (Date et al., 2015, Gominho-Rosa et al., 2015; Tiwari et al., 2015; Dhital et al., 2017). La maltasa tiene también un papel principal ya que interviene en las etapas iniciales asistiendo a la α -amilasa y en los pasos finales para producir glucosa (Dhital et al., 2013; Lin et al., 2016). La tripsina es una de las proteasas más importantes en tracto digestivo de animales (Wang et al., 2014; Perera et al., 2015). La N-aminopeptidasa (APN) es una ectopeptidasa de membrana que tiene un rol principal en pasos finales de la digestión proteica y se utiliza como índice de capacidad para digerir proteínas (Ramirez-Otarola et al., 2011; Fairweather et al., 2012). Las lipasas son de importancia central debido a su rol en la digestión de lípidos dietarios y de reserva (Casas-Godoy et al., 2012; Karasov y Douglas, 2013).

Diferentes enzimas en tracto digestivo son consideradas capaces de sostener funciones digestivas y absortivas mediante la provisión de iones o interviniendo en la modulación de la actividad de sistemas de transporte de nutrientes (Chang y Leung, 2014; Con et al., 2017). En células absortivas del tracto gastrointestinal, el mantenimiento y/o ajustes de gradientes de iones (ej sodio) son esenciales en procesos digestivos y de absorción de nutrientes (ej. absorción de glucosa y aminoácidos) ya que son necesarios para sostener la actividad de enzimas y sistemas de transporte de membrana que intervienen en los mismos (Holmgren y Olsson, 2009; Chang y Leung, 2014; Zhang et al., 2016; Con et al., 2017). El mantenimiento de gradientes de sodio en tejidos animales se ha atribuido principalmente a la Na^+K^+ ATPasa (bomba de sodio clásica) (Zhang et al., 2016). Sin

embargo, en varios tejidos, existe otra enzima, la Na^+ ATPasa, que también desempeña un importante rol en el mantenimiento y/o ajustes de gradientes de sodio. La Na^+ ATPasa independiente de K^+ , insensible a ouabaína e inhibible por furosemida (Na^+ ATPasa) (denominada comúnmente segunda bomba de sodio), bajo ciertas condiciones fisiológicas y/o ambientales, inclusive reemplaza a la Na^+ - K^+ ATPasa por lo que tiene un rol clave en varios procesos fisiológicos (Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016). Otra enzima presente en el tracto digestivo, la fosfatasa alcalina (AP) es una enzima de membrana ubicua que cataliza la hidrólisis de monoésteres de fosfato de un amplio rango de sustratos a pH superiores a 7,0 y regula diferentes procesos fisiológicos esenciales en varios animales (Linder et al., 2013; Lallès, 2014, 2019a). La AP intestinal en mamíferos participa en la digestión y absorción de nutrientes, en la regulación de la secreción de bicarbonato y mantenimiento del pH de la mucosa duodenal y en varias especies se ha demostrado que protege al organismo de la invasión de microorganismos patógenos cumpliendo un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal siendo considerada una proteína de defensa (Estaki et al., 2014; Lallès 2014, 2019a; Ducatelle et al., 2018).

El hepatopáncreas de crustáceos decápodos es un órgano multifuncional que desempeña un papel central en la digestión y absorción de nutrientes, almacenamiento de sustratos energéticos, en la síntesis de macromoléculas, como órgano endocrino y en la excreción de desechos nitrogenados (Fingerman et al., 1994; Huang et al., 2005; Zeng et al., 2010; Wang et al., 2014; Saborowski, 2015; Ribeiro et al., 2016; Vogt, 2019). En varios crustáceos decápodos, se ha relacionado la presencia y el nivel de actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas con la naturaleza de los componentes dietarios que pueden

ser potencialmente utilizados para los procesos metabólicos (Pavasovic et al., 2007, Figueiredo y Anderson, 2009; Ramirez-Otarola et al., 2011; Fairwather et al., 2012). En membranas apicales de las células del hepatopáncreas de varias especies se registró la presencia de diferentes transportadores de aminoácidos y péptidos dependientes de iones, sugiriendo el rol de este órgano en pasos finales de la digestión proteica y en la absorción de metabolitos resultantes (Ahearn et al., 1999; Duka y Ahearn, 2013). La dependencia de cationes en el transporte de nutrientes sugiere la importancia del mantenimiento de gradientes de sodio en procesos digestivos y absorptivos en hepatopáncreas (Simmons et al., 2012; Duka y Ahearn, 2013, 2014; Lignot y Charmantier, 2015; Saborowski, 2015). En hepatopáncreas de crustáceos, la AP estaría involucrada en varios estadios del ciclo digestivo incluyendo síntesis y secreción de enzimas y en la absorción de productos digestivos (Barker y Gibson, 1977, Gibson y Barker, 1979, Wang et al., 2014). En este contexto, el hepatopáncreas constituye un indicador sensible de las variaciones digestivas y metabólicas en relación a condiciones fisiológicas y/o ambientales (Zeng et al., 2010; Pinoni et al., 2011, 2013; Wang et al., 2014; Belgrad y Griffen, 2016; Ribeiro et al., 2016; Pinoni et al., 2018).

En peces teleósteos, el intestino constituye el sitio principal de digestión y absorción de nutrientes (Con et al., 2017; Gisbert et al., 2018; Steimberg, 2018). En general, la batería de enzimas digestivas en intestino parece ser cualitativamente similar a la de otros vertebrados. Sin embargo, falta aún información sobre la existencia y características más específicas de diferentes enzimas digestivas y sobre su modulación en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas para la mayoría de las especies (Steinberg, 2018). En

distintas especies de peces, se ha observado la modulación de enzimas digestivas en respuesta a diferentes factores externos e internos, aunque los ajustes presentan diferencias intra e interespecíficos (Yúfera et al., 2012; Pujante et al., 2015; Pujante, 2019). En intestino de peces, la AP cumpliría funciones similares a la de mamíferos (Wang et al., 2018; Lallès, 2019b). En diferentes vertebrados, la expresión de la AP intestinal es influida por la dieta y la privación de alimento (Geddes y Philpott, 2008; Guerville y Boudry, 2016; Bilski et al., 2017).

El contenido (tipo y concentración de reserva en diferentes sitios) y la modulación de sustratos de energía son una expresión del perfil metabólico y de ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas (del Valle y López Mañanes, 2012; Cadiz et al., 2018; Calí et al., 2019; Guo et al., 2019). En este contexto, los estudios sobre existencia, caracterización y modulación de enzimas claves en funciones digestivas, absorptivas y de defensa del tracto digestivo y del contenido de reservas de energía permiten determinar el perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico, los posibles cambios y/o ajustes en respuesta a diferentes factores intrínsecos y extrínsecos y la naturaleza de los componentes dietarios y/o de reserva que pueden ser potencialmente utilizados. Resulta evidente la importancia de este tipo de estudios para especies animales de interés ecológico y/o económico tales como cangrejos eurihalinos intermareales y peces marinos estuarino-dependientes ya que determinar el perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico y los ajustes en los mismos constituye una herramienta de gran valor para la comprensión de diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva y metabólica, aspectos ecofisiológicos y para la selección de condiciones adecuadas de alimentación y

mantenimiento, particularmente para especies con potencial para acuicultura (Murashita et al., 2013; Sanz et al., 2015; Pujante et al., 2017).

En este contexto, en la presente tesis se realizaron estudios de caracterización y modulación de diferentes enzimas clave en el cangrejo eurihalino intermareal *Neohelice granulata* y el lenguado *Paralichthys orbignyanus*.

N. granulata es un cangrejo eurihalino intermareal que constituye un modelo animal para la investigación bioquímica, fisiológica y ecológica (Spivak, 2010). *N. granulata* es un cangrejo cavador que construye cuevas en la zona intermareal, es la especie más importante en cuanto a su rol ecológico en las zonas costeras y estuarios del Atlántico sudoccidental y por su densidad poblacional (Luppi et al., 2013). Sus cuevas semipermanentes y los montículos que se forman a partir de la excavación de éstas, afectan la dinámica sedimentaria de estos ambientes incrementando el contenido de humedad, materia orgánica y penetrabilidad del sustrato. Debido a ello, esta especie tiene un rol ecológico clave en los estuarios como ingeniero ecosistémico (Angeletti et al., 2018). Se ha demostrado la existencia y modulación de la actividad de diferentes enzimas digestivas en el hepatopáncreas sugiriendo el rol en ajustes digestivos y metabólicos en relación a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales y la existencia de flexibilidad fenotípica digestiva y metabólica (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2013, 2015; Michiels, 2015; Michiels et al., 2015a; Asaro et al., 2011, 2017a,b). Una sola población de este cangrejo puede habitar hábitats contrastantes (Spivak, 1997). En la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia de Bs. As.) es uno de los cangrejos dominantes encontrándose en toda la zona intermareal (Luppi et al., 2013). Los individuos machos adultos de *N. granulata* de las zonas de planicie de mareas y

de espartillar de la laguna costera Mar Chiquita constituyen un buen modelo para investigar la variabilidad intraespecífica en la flexibilidad digestiva y metabólica a nivel bioquímico ya que presentan especialización de hábitat (Pinoni et al., 2011; Luppi et al., 2013; Bas et al., 2014). En el ambiente natural, machos adultos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas y de espartillar exhiben diferencias en relación al hábitat en componentes clave del metabolismo lipídico y proteico. Dichas diferencias representarían ajustes digestivos y metabólicos en relación a las condiciones particulares de cada hábitat (disponibilidad de alimento/hábito alimenticio/salinidad) (Pinoni et al., 2011). En condiciones controladas de laboratorio, machos adultos de la zona de planicie de mareas y de espartillar muestran diferentes respuestas en el contenido de reservas de energía y de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas frente a diferentes condiciones de salinidad sugiriendo la influencia del hábitat de origen sobre ajustes digestivos y metabólicos (Pinoni et al., 2013).

Los peces planos de la familia *Paralichthyidae* tienen un importante rol ecológico y son importantes en pesquerías comerciales en toda la longitud del Atlántico, desde el Ártico profundo hasta las costas del sur de África y América del Sur (Díaz de Astarloa, 2002; Magnone et al., 2015; Munroe, 2015; Ruiz-Jarabo et al., 2015; Walsh et al., 2015). Los lenguados conforman uno de los principales recursos pesqueros, y la pesca ha inducido en la disminución en la abundancia de los predadores tope, produciendo un potencial daño sobre la estructura poblacional del área (Díaz de Astarloa, 1994; Rivera-Prisco et al., 2001). En Argentina, los peces pleuronectiformes del género *Paralichthys* son de gran valor comercial debido a la calidad de su carne (Díaz de Astarloa, 1994; Rivera-Prisco et al., 2001). El lenguado *P. orbignyanus* es una especie marina estuarino-dependiente, que se

distribuye desde Rio de Janeiro (Brasil) hasta el Golfo de San Matías (Argentina) con gran potencial para acuicultura (Sampaio et al., 2001, 2007, 2008; Radonic et al., 2007, 2016; López et al., 2009; Radonic y Macchi, 2009; Bolasina, 2011). *P. orbignyana* es un predador tope de la cadena alimenticia (Díaz de Astarloa, 1994; Rivera-Prisco et al., 2001). El rol que tienen los predadores superiores en el control de las poblaciones de niveles tróficos más bajos, es un factor importante en la dinámica y estructura de las comunidades (Norbis y Galli, 2004). Sin embargo, no se conoce aún el perfil digestivo y metabólico de adultos de *P. orbignyana*. En juveniles de esta especie, se ha demostrado la existencia de actividad de diferentes enzimas digestivas en tracto digestivo y de sustratos de energía en hígado y músculo de juveniles. Esto sugiere la existencia de una adecuada batería digestiva para la hidrólisis completa de varios sustratos dietarios y la capacidad para almacenamiento y/o utilización de reservas de energía en hígado y músculo (del Valle et al., 2016; Albanesi et al., 2017, 2018; Albanesi, 2018).

El objetivo general de la presente tesis fue realizar estudios de caracterización y modulación de enzimas claves en procesos digestivos y metabólicos y de modulación del contenido de reservas de energía en el cangrejo eurihalino *N. granulata* de la laguna costera Mar Chiquita y en el lenguado *P. orbignyana*. Así, poder establecer el posible rol de enzimas clave en mecanismos de ajustes digestivos y/o metabólicos en relación a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales, cubriendo un área de vacancia en el estudio de la fisiología bioquímica, digestiva, integrativa y ambiental de estos organismos.

En este contexto, los objetivos particulares fueron:

- Determinar la existencia, características bioquímicas, las respuestas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en diferentes condiciones de salinidad ambiental y a dopamina de actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulos 1 y 2)

- Determinar la concentración de triglicéridos y proteínas y las actividades de lipasa, de fosfatasa alcalina (AP) sensible e insensible a levamisol en hepatopáncreas de machos adultos procedentes de planicie de marea y espartillar de la laguna costera Mar Chiquita a diferentes tiempos luego de la exposición en laboratorio a las mismas condiciones de alimentación (Capítulo 3).

- Determinar a) la existencia de actividad de carbohidrasas (amilasa y maltasa), proteasas (tripsina, APN) y lipasa en intestino anterior de individuos adultos de *P. orbignyanus* como índices de la capacidad potencial para la digestión de diferentes sustratos dietarios y para digestión total de sustratos glucogénicos y proteínas, b) la concentración de glucógeno y de glucosa libre, proteínas y triglicéridos en hígado y músculo de individuos adultos de *P. orbignyanus* para identificar sitios de almacenamiento de sustratos de energía, c) la actividad de amilasa, maltasa, tripsina, APN y lipasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de *P. orbignyanus* para evaluar la dinámica temporal postprandial, d) la concentración de glucógeno, glucosa libre, proteínas y triglicéridos a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hígado y músculo en individuos adultos de *P. orbignyanus* para la dinámica temporal de posibles ajustes metabólicos postprandiales, e) establecer aspectos comparativos con individuos juveniles (Capítulos 4 y 5).

- Determinar a) la existencia de actividad de AP y realizar una caracterización parcial de la misma en intestino de individuos adultos de *P. orbignyana* y b) la actividad de AP a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos juveniles y adultos de *P. orbignyana* para evaluar la dinámica temporal postprandial (Capítulo 6).

CAPÍTULO 1:

Actividad de Na⁺ K⁺ ATPasa y de Na⁺ATPasa en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*: caracterización parcial

INTRODUCCIÓN

En células animales, el mantenimiento de gradientes de Na^+ es esencial para sostener diferentes procesos fisiológicos clave, incluyendo la homeostasis celular (Clausen et al., 2017). La $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (bomba de sodio clásica) es una ATPasa de tipo P que transporta Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática estableciendo y manteniendo la alta concentración interna de K^+ y la baja concentración interna de Na^+ , necesaria para la actividad de procesos de transporte involucrados en funciones celulares esenciales (ej. control del potencial de membrana, del volumen y pH celular, entrada y salida de solutos, excitabilidad y contractilidad) (Skou, 1997; Jørgensen et al., 2003; Jaitovich y Bertorello, 2006; Apell, 2019; Pirahanchi y Aeddula, 2019). La ouabaína es un inhibidor altamente específico de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (Skou, 1997; Kaplan, 2002; Miles et al., 2013; Clausen et al., 2017; Leone et al., 2017). Así, se utiliza usualmente para la detección *in vitro* de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, debido a que otras ATPasas del tipo P no son sensibles a la misma. En las células polarizadas animales, la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa basolateral se considera la principal responsable del transporte activo primario de Na^+ para mantener los gradientes de este ión (Chang y Leung, 2014; Zhang et al., 2016; Nepal et al., 2019). Sin embargo, en varios tejidos, se ha demostrado que la Na^+ ATPasa independiente de K^+ , insensible a ouabaína e inhibible por furosemida (Na^+ ATPasa) (usualmente denominada segunda bomba de sodio) desempeña un importante rol en el mantenimiento y/o ajustes de gradientes de Na^+ (del

Castillo y Robinson, 1985a, b; Rocafull et al., 2012; Thomas et al., 2013; Vieyra et al., 2016).

La Na⁺ ATPasa es un miembro de la familia de ATPasas de tipo P que participa en la extrusión de Na⁺ en varias células polarizadas y no polarizadas y, por lo tanto, en el mantenimiento y/o ajustes de gradientes de este ión (Caruso-Neves et al., 1997, 2001, 2002; Rocafull et al., 2011, 2012; Thomas et al., 2013; Vieira-Filho et al., 2014; Vieyra et al., 2016). Esta enzima se ha purificado y clonado a partir de enterocitos de cobayo (Rocafull et al., 2011). En comparación con vertebrados, la información acerca de la presencia y características de la Na⁺ ATPasa en invertebrados es escasa y fragmentaria. La Na⁺ ATPasa ha sido identificada en diferentes tejidos de varios invertebrados, como heterópteros, almejas, mejillones, cangrejos y parásitos (Caruso-Neves y Lopes, 2000; Pagliarani et al., 2006, 2008; Pinoni y López Mañanes, 2009; Vieyra et al., 2016). Además de la Na⁺-K⁺ ATPasa, se ha demostrado la coexistencia de actividad de Na⁺ ATPasa en túbulos de Malpighi de insectos hematófagos *Rhodnius sp.* (Caruso-Neves y Lopes, 2000), y en branquias y manto del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y de la almeja *Tapes philippinarum* (Pagliarani et al., 1996; Vieyra et al., 2016). En moluscos bivalvos, la Na⁺ ATPasa participaría junto con la Na⁺-K⁺ ATPasa en la regulación de la concentración intracelular de Na⁺ por medio del bombeo de este ión hacia el exterior celular (Pagliarani et al., 1996, 2006, 2008). Se ha demostrado la existencia de actividad de Na⁺ ATPasa en músculo de la quela de *N. granulata* coexistente con la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa (Pinoni y López Mañanes, 2009).

El hepatopáncreas de crustáceos decápodos desempeña un papel central en la digestión y la absorción de nutrientes (Zeng et al., 2010; Wang et al., 2014; Saborowski, 2015; Ribeiro et al., 2016; Vogt, 2019). Se ha sugerido la importancia del mantenimiento de gradientes adecuados de Na^+ y de ATPasas del tipo P para sostener procesos digestivos y absorptivos (Simmons et al., 2012; Duka y Ahearn, 2013, 2014; Lignot y Charmantier, 2015; Saborowski, 2015). El trabajo de Zilli et al., (2003) en el camarón, *Marsupenaeus japonicus* es el único que describe la existencia de actividad de Na^+ ATPasa en tracto digestivo de un crustáceo decápodo.

En este capítulo se describen estudios para determinar la existencia y características bioquímicas de actividades de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de animales

Machos adultos de *N. granulata* en intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967) con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, se recolectaron en la zona de planicie de marea de la laguna costera Mar Chiquita ($37^\circ 32'\text{-}37^\circ 45'\text{S}$, $57^\circ 19'\text{-}57^\circ 26'\text{O}$) y fueron llevados al laboratorio en agua del sitio de recolección el mismo día. La salinidad se determinó en unidades prácticas (ups). Los cangrejos se mantuvieron durante al menos 10 días a 35 ups ($906 \pm 26 \text{ mOsm kg}^{-1}$; osmoconformación) (Pinoni y López Mañanes 2009; Michiels et al.,

2015a; Pinoni et al., 2013, 2015). Los valores de osmolalidad de la hemolinfa fueron de 831 ± 78 (media \pm SE, 10-15 cangrejos). Los cangrejos se colocaron en acuarios (36 L) bajo condiciones controlada: 12 h luz / 12 h oscuridad, $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 7.4, agua continuamente aireada y filtrada (Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2015a). Los cangrejos fueron alimentados tres veces a la semana (Tetrapond Koi Vibrance, EE. UU.: 62% de hidratos de carbono, 31% de proteínas, 5% de lípidos) (alrededor de $0,07 \text{ g cangrejo}^{-1}$). Los individuos fueron privados de alimento 24h antes de comenzar los experimentos (Michiels et al., 2015a; Asaro et al., 2018; Méndez et al., 2018, 2019).

Preparación de las muestras

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 25 minutos en hielo (Pinoni y López Mañanes, 2009; Pinoni et al., 2011, 2013; Michiels et al., 2015a; Méndez et al., 2018, 2019). Luego se pesaron y midieron los individuos y se extrajo el hepatopáncreas. El hepatopáncreas se pesó y luego se homogeneizó en buffer sacarosa 0,25 M / EGTA-Tris 0,5 mM, pH 7,4; 4 ml g^{-1} de tejido (homogeneizador CAT \times 120, herramienta T10) en hielo (Méndez et al., 2018). El homogeneizado se usó inmediatamente para ensayos de actividades enzimáticas. El hepatopáncreas de un individuo fue utilizado para cada preparación.

Determinaciones cuantitativas

La actividad de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa se analizó cuantificando la hidrólisis del ATP como se describió previamente (Pinoni y López Mañanes, 2009). La actividad de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

ATPasa se determinó como la diferencia entre dos ensayos que contenían NaCl 100 mM, KCl 30 mM, MgCl₂ 10 mM y EGTA 0,5 mM en buffer imidazol 20 mM (pH 7,4) y el mismo medio en ausencia de KCl pero en presencia de ouabaína 1 mM. Luego de preincubar la muestra en la mezcla de ensayo durante 5 minutos a 30° C, se añadió ATP (concentración final 5 mM) y se continuó la incubación durante 15 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 2 ml de reactivo de Bonting (ácido sulfúrico 560 mM, molibdato de amonio 8,1 mM y sulfato ferroso 176 mM) y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La cantidad de Pi liberado se cuantificó midiendo la absorbancia en 700 nm del complejo de fosfomolibdato reducido (Bonting, 1970). Para determinar la relación adecuada de concentraciones de sodio/potasio para la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa, la actividad se determinó en presencia de concentraciones variables de sodio y potasio pero siempre manteniendo constante la concentración total de sodio más potasio en 130 mM. Para estudiar el efecto de la ouabaína, la actividad se midió como se describió anteriormente, pero en ausencia y/o presencia de diferentes concentraciones de ouabaína (0,1 a 1,0 mM). Para estudiar el efecto de la concentración de ATP y el pH, se determinó la actividad en presencia de concentraciones variables de ATP (0,1 a 10 mM) o a diferentes pH (6,3 a 9,0) de la mezcla de ensayo.

La actividad de Na⁺ ATPasa independiente de K⁺ e insensible a ouabaína (Na⁺ ATPasa) se acorde a Pinoni y López Mañanes, (2009). La actividad de Na⁺ ATPasa se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de ATP en un medio de reacción conteniendo NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,5 mM, ouabaína 1 mM y azida sódica 1 mM (para inhibir F-ATPasas) en buffer imidazol 20 mM (pH 7,4). La actividad de Mg²⁺ -

ATPasa (determinada en ausencia de NaCl) se restó en todos los casos. La muestra se preincubó durante 5 min a 30 ° C y luego se añadió ATP (concentración final 3 mM) y se continuó con una incubación durante 15 min. Para detener la reacción, se añadieron 2 ml de reactivo de Bonting (ácido sulfúrico 560 mM, molibdato de amonio 8,1 mM y sulfato ferroso 176 mM) y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La cantidad de Pi liberado se cuantificó midiendo la absorbancia en 700 nm del complejo de fosfomolibdato reducido (Bonting, 1970). Para determinar el efecto de la concentración de sodio en la actividad de Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína, se usaron concentraciones variables de Na⁺ (0,25 – 150 mM). Para estudiar el efecto de furosemida, se analizó la actividad en ausencia y/o presencia de diferentes concentraciones de furosemida (0,1 a 3 mM). Para estudiar el efecto de la concentración de ATP y el pH sobre la actividad de Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína, se determinó la actividad en presencia de concentraciones variables de ATP (0,1 a 12,0 mM) o a diferentes pH (6,3-9,0) de la mezcla de reacción.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Osmolalidad de la hemolinfa

La osmolalidad de la hemolinfa se determinó acorde a Pinoni et al., (2013, 2015); Michiels et al., (2015a); Méndez et al., (2018). Las muestras de hemolinfa (aproximadamente 500 ul) se extrajeron del seno infrabranquial en la base del quelípodo por medio de una jeringa y se transfirieron a tubos de centrifuga fríos y se centrifugó a 10.000 × g

(Beckman, Microfuge, B) durante 30 s. La osmolalidad se midió mediante un micro-osmómetro (Osmomat 030 D, GONOTEC).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se realizó un análisis paramétrico, One-Way ANOVA, para estimar diferencias estadísticas. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

Los resultados del efecto de concentraciones variables de Na^+ , K^+ , y ATP sobre las actividades de Na^+-K^+ ATPasa y de Na^+ ATPasa se analizaron mediante análisis de regresión no lineal (software GraphPad Prism 5.01). Las correspondientes curvas que se muestran son las que mejor se ajustan a los datos experimentales. Los valores de K_m (constante de Michaelis -Menten) se estimaron de las mismas (GraphPad Prism 5.01 software). I_{50} (la concentración de ouabaína o furosemida a la que se inhibió el 50% de la actividad de ATPasa correspondiente) se calculó a partir de la curva de inhibición (software GraphPad Prism 5.01).

RESULTADOS

Actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas de Neohelice granulata

La actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa aumentó con concentraciones crecientes de sodio hasta 100 mM exhibiendo cinética de Michaelis- Menten (Km aparente=36±5 mM para sodio) (Figura 1.1).

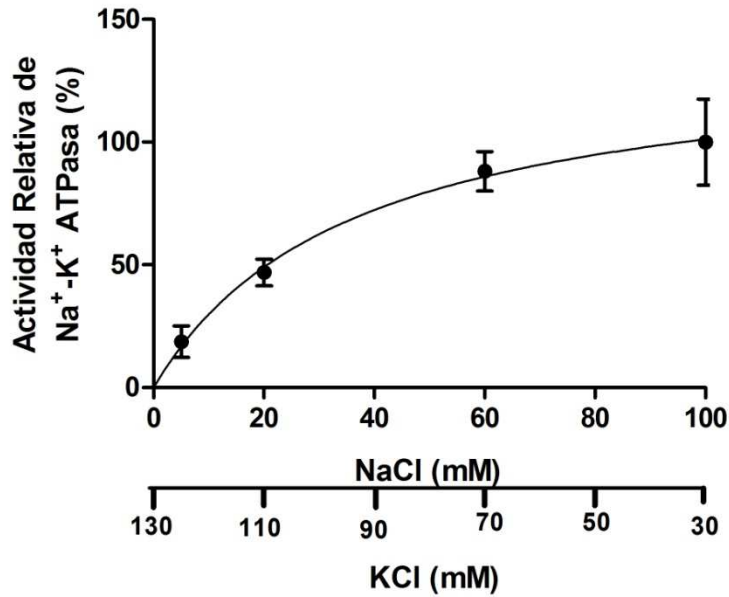


Figura 1.1. Actividad de Na⁺ - K⁺ ATPasa en presencia de concentraciones variables de sodio/potasio en presencia de una concentración constante de Na⁺ más K⁺ de 130 mM en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na⁺ - K⁺ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia de MgCl₂ 10 mM/ EGTA 0,5 mM/ Na₂ATP 5mM a pH 7,4 y 30 °C. Los valores de actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa se expresan en relación a la actividad en Na⁺100 mM / K⁺ 30 mM (100%: 293 ±51 nmol Pi x min⁻¹ x mg proteínas⁻¹). La curva es la que mejor se ajusta a los datos experimentales. Los datos son la media ± S.E para 5 individuos.

La ouabaína produjo la inhibición de la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas (Figura 1.2). La inhibición máxima se obtuvo con una concentración 1 mM de ouabaína.

La I₅₀ (la concentración de ouabaína que produjo la mitad de la inhibición máxima) fue de 0,07 mM (Figura 1.2).

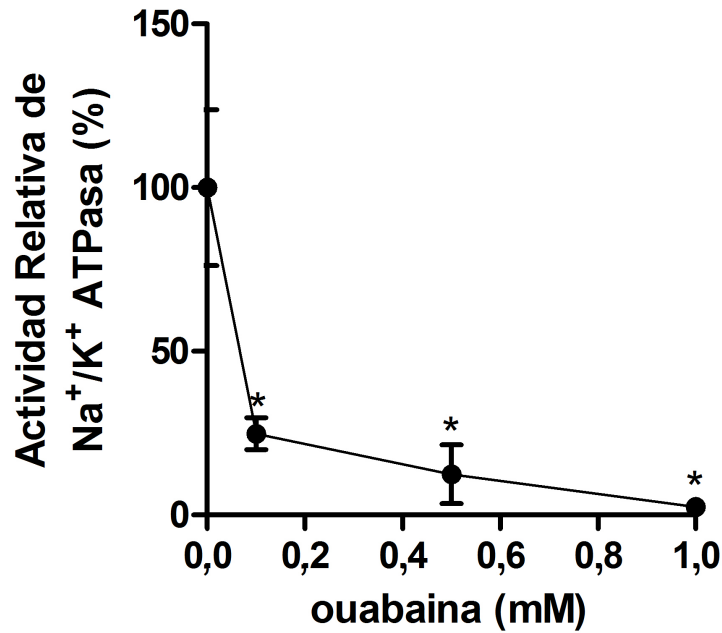


Figura 1.2. Efecto de diferentes concentraciones de ouabaína (0 – 1 mM) sobre la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na⁺ - K⁺ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia de NaCl 100 mM/ KCl, 30 mM/ MgCl₂10 mM/EGTA 0,5 mM/ Na₂ATP a pH 7,4 y 30 °C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ouabaína (0,1 to 1,0 mM). Los valores de actividad se expresan en relación con la actividad en ausencia de ouabaína (100%: 242 ± 57 nmol Pi x min⁻¹ x mg proteína⁻¹). *indica diferente a la actividad sin ouabaína (One-Way ANOVA; p < 0,05). Los datos son la media ± S.E para 4 individuos.

El efecto de la concentración de ATP (0,1-10 mM) se determinó sobre la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa. La actividad Na⁺-K⁺ ATPasa exhibió una cinética michaeliana (K_m aparente= 0,7 ± 0,3 mM) (Figura 1.3).

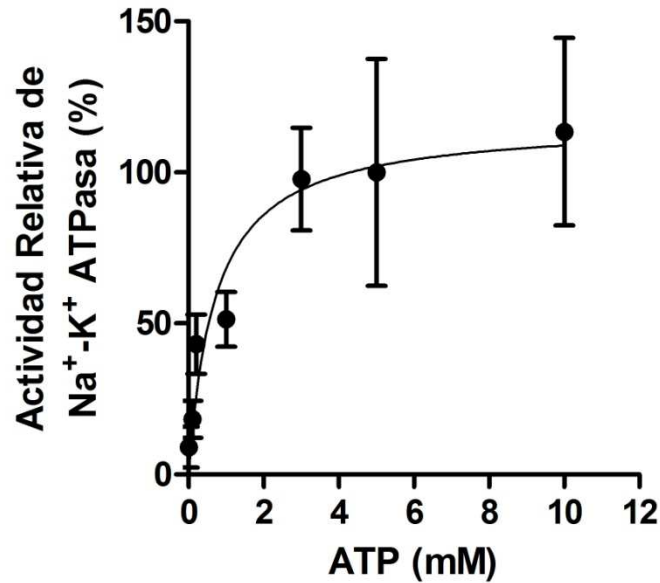


Figura 1.3. Efecto de diferentes concentraciones de ATP (0,1 – 10 mM) sobre la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia de NaCl 100 mM/ KCl, 30 mM/ MgCl₂10 mM/EGTA 0,5 mM a pH 7,4 y 30 °C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de Na₂ATP (0,1 to 10 mM). Los valores de actividad se expresan en relación con la actividad correspondiente en presencia de ATP 5 mM (100%: 246 ± 92 nmol Pi x min⁻¹ x mg proteína⁻¹). La curva es la que mejor se ajusta a los datos experimentales. Los datos son la media ± S.E. para 4-5 individuos.

La actividad de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPasa aumentó cuando el pH se incrementó de 6,3 a 8,0. A pH 9,0 la actividad de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPasa disminuyó hasta valores similares a pH 6,0 (Fig. 1.4).

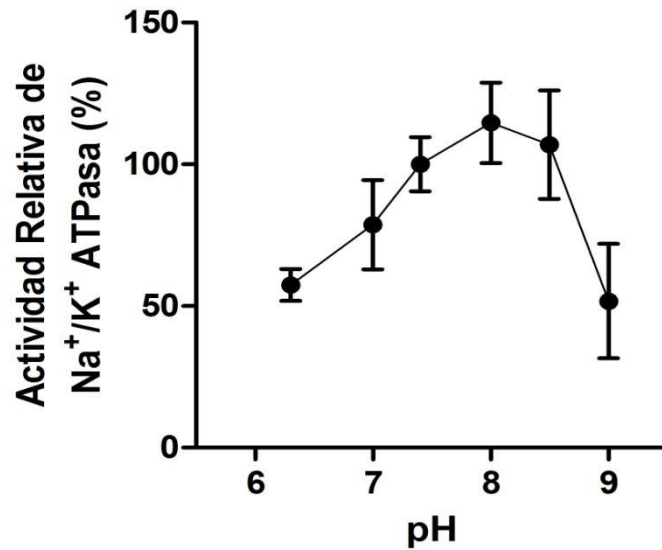


Figura 1.4. Efecto del pH (6,3-9,0) sobre la actividad de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPasa en hepatopáncreas de *N.granulata*. La actividad de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia de NaCl 100 mM/ KCl, 30 mM/ MgCl_2 10 mM/EGTA 0,5 mM/ Na_2ATP 5 mM a 30 °C y a diferentes pH (6,3-9,0). Los valores de expresan en relación con la actividad correspondiente a pH 7,4 (100%: 260 ± 25 nmol Pi \times $\text{min}^{-1} \times$ mg proteína $^{-1}$). Los datos son la media \pm S.E. para 4-5 individuos.

Actividad de Na⁺ - ATPasa independiente de K⁺, insensible a la ouabaína, sensible a furosemida (Na⁺ ATPasa) en hepatopáncreas de N. granulata

En un segundo paso, se investigó la presencia de actividad de Na⁺ ATPasa independiente de K⁺, insensible a la ouabaína, sensible a furosemida en hepatopáncreas. La dependencia del sodio (0,25-150 mM) de la actividad de ATPasa se determinó en presencia de ouabaína 1 mM y en ausencia de potasio. En estas condiciones, la actividad Na⁺-K⁺ ATPasa está completamente inhibida (Fig. 1.2). La actividad ATPasa fue en incremento hasta una concentración de Na⁺ de 40 mM y luego se mantuvo constante. La actividad Na⁺ ATPasa exhibió una cinética michaeliana (Km aparente= 12 ± 3 mM) (Figura 1.5).

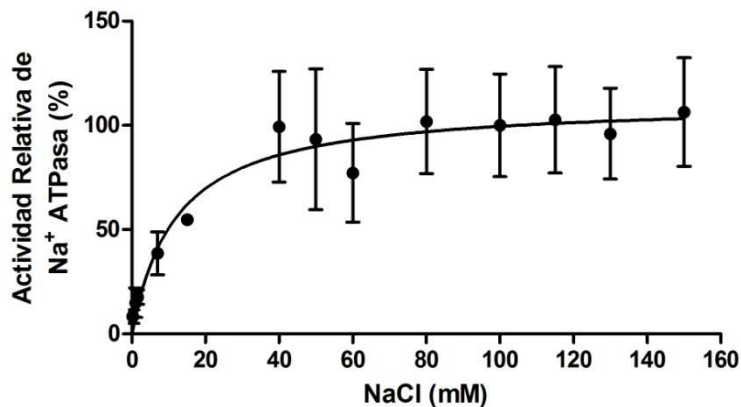


Figura 1.5. Efecto de diferentes concentraciones de Na⁺ (0,25 – 150 mM) sobre la actividad de Na⁺ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na⁺ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia de MgCl₂ 10 mM/EGTA, 0,5 mM/ouabaína 1 mM/azida sódica 1 mM/ Na₂ ATP 3 mM a pH 7.4 y 30 °C en presencia de concentraciones variables de Na⁺. Los valores de la actividad Na⁺ ATPasa se expresan en relación con la actividad en 100 mM de Na⁺ (100%: 460 ± 113 nmol Pi x min⁻¹ x mg proteína⁻¹). La curva es la que mejor se ajusta a los resultados experimentales. Los datos son la media ± S.E para 5 individuos.

La furosemida produjo la inhibición de la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas (Figura 1.6). La inhibición máxima se obtuvo con una concentración 2-3 mM de furosemida. La I_{50} (la concentración de furosemida que produjo inhibición semimáxima de la actividad de ATPasa insensible a ouabaína) fue aproximadamente 0,6 mM (Figura 1.6).

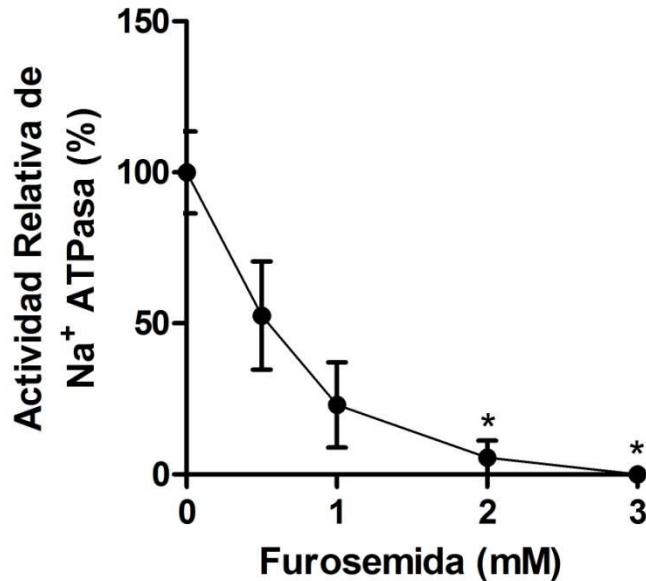


Figura 1.6. Efecto de diferentes concentraciones de furosemida (0,5 – 3 mM) sobre la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na^+ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia NaCl 100 mM/ MgCl_2 10 mM/EGTA, 0,5 mM/ouabaína 1 mM/azida sódica 1 mM/ Na_2ATP 3 mM a pH 7.4 y 30 °C y en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de furosemida. Los valores de Na^+ ATPasa insensible a ouabaína se expresan en relación con la actividad en ausencia de inhibidor (100%: $17 \pm 2 \text{ nmol Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteínas}^{-1}$). * indica diferente de la actividad sin furosemida (One-Way ANOVA: $p < 0,05$) I_{50} : concentración de furosemida que produjo 50% de inhibición se calculó mediante GraphPad Prism 5.01. Los datos son la media \pm S.E. para 4-5 individuos.

El efecto de diferentes concentraciones de ATP (0,1 – 12 mM) se determinó sobre la actividad de Na⁺ ATPasa. La actividad de Na⁺ ATPasa exhibió una cinética michaeliana para ATP (K_m aparente = $0,5 \pm 0,16$ mM $\text{nmol Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$) (Figura 1.7).

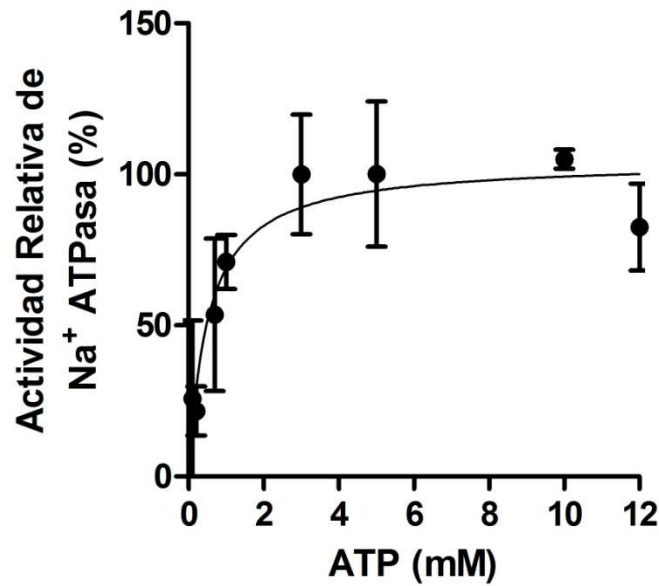


Figura 1.7. Efecto de diferentes concentraciones de ATP (0,1 – 12 mM) sobre la actividad de Na⁺ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na⁺ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia NaCl 100 mM/MgCl₂ 10 mM/EGTA, 0,5 mM/ouabaina 1 mM/azida sódica 1 mM a pH 7,4 y 30 °C y en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ATP (0,1 – 12 mM). Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de ATP 3 mM (100%: 424 ± 84 $\text{nmol Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$). La curva es la que mejor se ajusta a los resultados experimentales. Los datos son la media \pm S.E. para 4-5 individuos.

La actividad de Na^+ ATPasa aumentó de pH de 6,3 a 7,4 (Figura 1.8). A pHs más elevados la actividad disminuyó siendo a pH 9,0 aproximadamente un 20% de la actividad a pH 7,4.

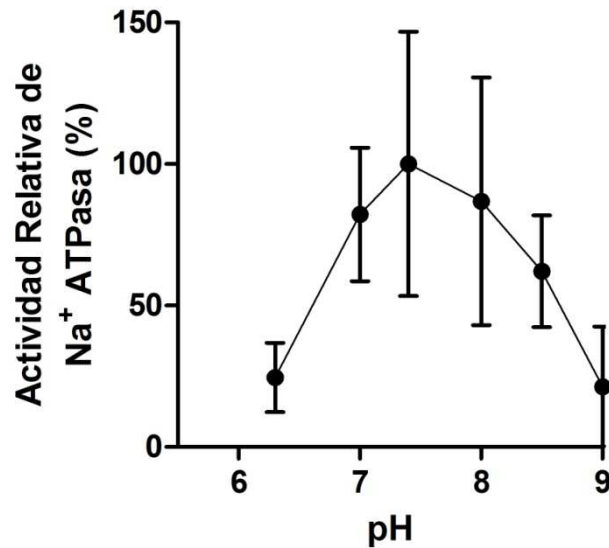


Figura 1.8. Efecto del pH (6,3 – 9,0) sobre la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad de Na^+ ATPasa se determinó como se describió en Materiales y Métodos en presencia NaCl 100 mM/ MgCl_2 10 mM/EGTA, 0,5 mM/ouabaína 1 mM/azida sódica 1 mM/ Na_2 ATP 3 mM a a 30 °C y a diferentes pH (6,3 – 9,0). Los valores de la actividad Na^+ ATPasa se expresan en relación con la actividad correspondiente a pH 7,4 (100%: 92 ± 43 nmol Pi \times min $^{-1}$ \times mg proteína $^{-1}$). Los datos son la media \pm S.E. para 4-5 individuos.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la coexistencia de actividad de Na^+ ATPasa (segunda bomba de sodio) y de actividad de Na^+-K^+ ATPasa (bomba de sodio clásica) en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino intermareal *Neohelice granulata*.

Hasta el momento no hay datos disponibles sobre características bioquímicas de la actividad de Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas de crustáceos decápodos. El patrón de respuesta a diferentes concentraciones de K^+ y ATP, y la fuerte dependencia del pH de la actividad de Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* es similar a lo encontrado para branquias de varios crustáceos decápodos (Neufeld et al., 1980; D'Orazio y Holliday, 1985; Corotto y Holliday, 1996; Lucu y Towle, 2003; Leone et al., 2014, 2017). En homogenatos de branquias anteriores y posteriores de *N. granulata*, el pH óptimo de la actividad de Na^+-K^+ ATPasa es de aproximadamente 7.4-7.6, y dicha actividad disminuye a pH más bajos y más altos (Castilho et al., 2001). En el músculo de la quela del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*, la actividad de Na^+-K^+ ATPasa también presenta una fuerte dependencia del pH (Pinoni y López Mañanes, 2008).

La insensibilidad a la ouabaína (un inhibidor específico de la Na^+-K^+ ATPasa; (Skou, 1997; Kaplan, 2002; Miles et al., 2013; Clausen et al., 2017; Leone et al., 2017) y la inhibición por furosemida (contrariamente a lo que ocurre para la Na^+-K^+ ATPasa) permitieron identificar la existencia de una actividad de Na^+ ATPasa en varios tejidos de vertebrados e invertebrados (Proverbio et al., 1986, 1991; Caruso-Neves et al., 1999; Beltowski et al., 2004; Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016). Utilizando esta herramienta,

los resultados de este capítulo muestran, por primera vez en un cangrejo eurihalino, la existencia de actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. La coexistencia de actividad de Na^+ ATPasa y actividad de Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas es similar a lo descrito para intestino delgado de mamíferos (Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016) y a lo encontrado en músculo de la quela de este cangrejo (Pinoni y López Mañanes, 2009). Similarmente a lo que ocurre en músculo de la quela (Pinoni y López Mañanes, 2009), la inhibición máxima por furosemida de la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas se alcanzó a una concentración de 2 mM, concentración que inhibe completamente esta actividad en insectos y mamíferos (del Castillo y Robinson, 1985b; Moretti et al., 1991; Caruso-Neves y Lopes, 2000; Caruso-Neves et al., 2002; Beltowski et al., 2004). La cinética de Michaelis-Menten de la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* concuerda con lo encontrado para esta actividad en músculo de la quela (Pinoni y López Mañanes, 2009) y en branquias de trucha arco iris (Ventrella et al., 2001), riñón de cerdo (Caruso -Neves et al., 2002) y en parásitos (de Almeida-Amaral et al., 2008). La actividad de Na^+ ATPasa en el hepatopáncreas mostró ser más sensible al pH siendo más baja a pH ácido (6,3) y alcalino (9,0) en comparación con la actividad en músculo de la quela (Pinoni y López Mañanes, 2009). Se requiere mayor investigación para establecer si la diferente sensibilidad al pH se debe a la existencia de diferentes formas específicas de tejido.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo, muestran por primera vez la existencia de actividad de Na^+ ATPasa, coexistente con la bomba de sodio clásica, en hepatopáncreas de un cangrejo eurihalino intermareal. La coexistencia de ambas actividades podría sugerir un rol diferencial de las mismas en diferentes condiciones fisiológicas y/o

ambientales como describimos en músculo de la quela (Pinoni y López Mañanes, 2009). En este contexto en el siguiente capítulo se describen estudios de modulación de las actividades de Na^+ ATPasa y de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa en hepatopáncreas.

CAPÍTULO 2:

Estudios de modulación de las actividades de Na^+ ATPasa y Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*

INTRODUCCIÓN

En células absortivas del tracto gastrointestinal de vertebrados, el mantenimiento y/o ajustes de gradientes de Na^+ son esenciales en procesos digestivos y de absorción de nutrientes (ej. absorción de aminoácidos y glucosa), ya que soportan la actividad de enzimas y sistemas de transporte de membrana (ej. transporte facilitado) que intervienen en los mismos (Holmgren y Olsson, 2009; Chang y Leung, 2014; Zhang et al., 2016; Con et al., 2017; Nepal et al., 2019; Palaniappan et al., 2019; Qu et al., 2019). Como señalamos anteriormente en la presente tesis (Capítulo 1), en todas las células polarizadas de los tejidos animales se considera a la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa basolateral (la bomba de sodio clásica) como la principal responsable del transporte activo primario de Na^+ para mantener gradientes de dicho ión (Skou, 1997; Jorgensen et al., 2003; Jaitovich y Bertorello, 2006; Apell, 2019; Pirahanchi y Aeddula, 2019). Sin embargo, en varios tejidos de vertebrados e invertebrados la actividad de Na^+ ATPasa independiente de K^+ , insensible a ouabaína, sensible a furosemida (Na^+ ATPasa) (usualmente denominada segunda bomba de sodio) también tendría un rol en estos procesos (del Castillo y Robinson, 1985a, b; Rocafull et al., 2012; Thomas et al., 2013; Vieyra et al., 2016). Este parece ser el caso para enterocitos de mamíferos, en donde la Na^+ ATPasa estaría involucrada en el mantenimiento de gradientes de Na^+ y, de esta manera, en procesos digestivos y absortivos (Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016).

El hepatopáncreas de crustáceos decápodos desempeña un papel central en la digestión y la absorción de nutrientes (Zeng et al., 2010; Wang et al., 2014; Saborowski, 2015; Ribeiro et al., 2016; Vogt, 2019). En varias especies se observó la activación de diferentes transportadores dependientes de Na^+ durante la absorción de nutrientes, sugiriendo la importancia del mantenimiento de gradientes adecuados de Na^+ para sostener procesos digestivos y absortivos (Simmons et al., 2012; Duka y Ahearn, 2013, 2014; Lignot y Charmantier, 2015; Saborowski, 2015). En este contexto, la coexistencia de actividades de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa y de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas y su potencial modulación diferencial luego de la ingesta de alimento podrían ser importantes para soportar y/o modificar procesos digestivos y de absorción en diferentes condiciones fisiológicas y / o ambientales.

En varias especies de cangrejos eurihalinos, incluyendo *N. granulata*, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas sugiere la existencia de distintos ajustes digestivos y metabólicos a nivel bioquímico en respuesta a diferentes condiciones de salinidad ambiental (Asaro et al., 2011, 2017a, 2018; Romano y Zeng, 2012; Michiels et al., 2013, 2015a, 2017; Wang et al., 2014; Pinoni et al., 2013, 2015; Pinoni y López Mañanes, 2016). *N. granulata* presenta una diferente modulación postprandial temporal de la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas, lo que sugiere la existencia de ajustes concomitantes en procesos absortivos (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2015; Michiels, 2015; Pinoni y López Mañanes, 2016; Méndez et al., 2019). Además, las respuestas postprandiales de enzimas digestivas específicas (ej. N-aminopeptidasa) en hepatopáncreas difieren en individuos de *N. granulata* expuestos a 35

ups (condición de osmoconformación) y a baja salinidad (10 ups, condición de hiperregulación), sugiriendo la existencia de diferentes ajustes digestivos y metabólicos postprandiales a nivel bioquímico dependiendo de la salinidad ambiental (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2015; Michiels, 2015; Méndez et al., 2019). Los resultados presentados en el Capítulo 1 de la presente tesis muestran la coexistencia de actividad de Na^+ ATPasa y de actividad de Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* lo que podría sugerir un rol diferencial de las mismas en distintos procesos fisiológicos y/o condiciones ambientales al como sugerimos para estas actividades en músculo de la quela (Pinoni et al., 2009). Las diferentes respuestas de la actividad de Na^+ ATPasa y de Na^+-K^+ ATPasa en músculo de la quela a salinidad ambiental sugieren que podrían estar sujetas a modulación diferencial por mensajeros químicos primarios (Pinoni et al., 2009; resultados no publicados de nuestro grupo). En este contexto, las aminas biogénicas circulantes juegan un rol importante en la regulación de diferentes procesos fisiológicos en crustáceos decápodos (Cebada y García, 2007; Clark et al., 2008; Christie et al., 2014; Lucena et al., 2019; Pamuru, 2019; Pan et al., 2019). Varias aminas biogénicas como, por ejemplo, la dopamina, han sido detectadas en hepatopáncreas el cual constituye también un importante órgano endocrino (Fingerman et al., 1994; Huang et al., 2005; Saborowsky, 2015). Se ha sugerido el rol de la dopamina como mensajero químico primario involucrado en la regulación de funciones digestivas. Así, la dopamina modula la actividad de diferentes enzimas digestivas en hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos (Michiels et al., 2013, 2015a,b). La actividad de N-aminopeptidasa (APN) en hepatopáncreas de *N. granulata* es estimulada in vitro por dopamina sugiriendo su efecto directo sobre el hepatopáncreas. En

varios crustáceos decápodos, la dopamina modula la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en branquias (Lucena et al., 2019; Pan et al., 2019). Por otro parte, la dopamina modula por diferentes mecanismos la Na⁺ ATPasa de células renales de mamíferos (Vieyra et al., 2016). **No se han realizado aún estudios sobre la modulación por mensajeros químicos primarios de la actividad de Na⁺ ATPasa en invertebrados en general o sobre la actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas de crustáceos decápodos.**

En este capítulo se determina la respuesta de la actividad de Na⁺ ATPasa y de Na⁺-K⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* en diferentes condiciones de salinidad ambiental y se analiza el efecto de dopamina *in vitro* sobre ambas actividades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de animales

Para la captura de los individuos se procedió como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis. Se trabajó con machos adultos de *N. granulata* mantenidos en 35 ups (906± 26 mOsm kg⁻¹, condición de osmoconformación) o 10 ups (274±34 mOsm kg⁻¹, condición de hiper-regulación) (Pinoni y López Mañanes, 2009; Michiels et al., 2015a; Pinoni et al., 2013, 2015; Méndez et al., 2018, 2019). Para determinar las actividades enzimáticas en hepatopáncreas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento, cangrejos mantenidos en 35 ups o 10 ups, y privados de alimento por

120 h, fueron alimentados individualmente. El tiempo cero se tomó cuando la cantidad total de alimento ofrecido fue ingerida (lo que tomó como máximo 5 min). Los cangrejos que no comieron o comieron parcialmente no se usaron en los experimentos. Los individuos fueron crioadestesiados a tiempo cero y 1, 24, 48 y 120 h luego de la ingesta de alimento para determinar las actividades de Na^+ ATPasa y Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas. Estos tiempos fueron seleccionados de acuerdo al trabajo experimental en nuestro laboratorio que muestra que en machos de este cangrejo ocurren cambios digestivos y metabólicos postprandiales a nivel bioquímico hasta 120 h luego de la ingesta de alimento (Asaro et al., 2009; Méndez et al., 2011, 2012, 2019; Michiels, 2015; Michiels et al., 2015a, Pinoni et al., 2015; Asaro, 2016).

Preparación de las muestras

Se realizó según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Para estudiar el efecto *in vitro* de dopamina (DA) sobre las actividades de Na^+ ATPasa y de Na^+-K^+ ATPasa en hepatopáncreas, secciones de hepatopáncreas (100 mg) se incubaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de DA en 2 ml de un medio que contuvo (mM): NaCl 400, KCl 13, 10 MgCl_2 8,8 H_3BO_3 , pH 7,6 a 30° C acorde a Michiels et al., (2015a,b) y 2% p/v de coctel inhibidor de proteasas de uso general (SIGMA). A tiempos 0 y 30 min de incubación, se separó el tejido y se homogeneizó en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (4 ml x g tejido⁻¹) para determinar la correspondiente

actividad enzimática. Para estos experimentos, se trabajó con secciones de hepatopáncreas de individuos recién alimentados (tiempo cero) o luego de 24 h de la ingesta de alimento.

Determinaciones cuantitativas

Las actividades de Na⁺ ATPasa y de Na⁺-K⁺ ATPasa se determinaron como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se realizó un análisis paramétrico One-Way ANOVA para estimar las diferencias estadísticas. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias (Méndez et al., 2018).

RESULTADOS

Actividad de Na⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de N. granulata mantenidos en diferentes salinidades

En individuos mantenidos en 35 ups, la actividad de Na⁺ ATPasa en hepatopáncreas no cambió entre 1 y 24 h luego de la ingesta de alimento. A las 48 h post-ingesta, la actividad de Na⁺ ATPasa incrementó (aproximadamente 15 veces) en comparación con la actividad a tiempo 0. A las 120 h después de la ingesta de alimento, la actividad Na⁺ ATPasa volvió a valores similares a tiempo 0 (Figura 2.1).

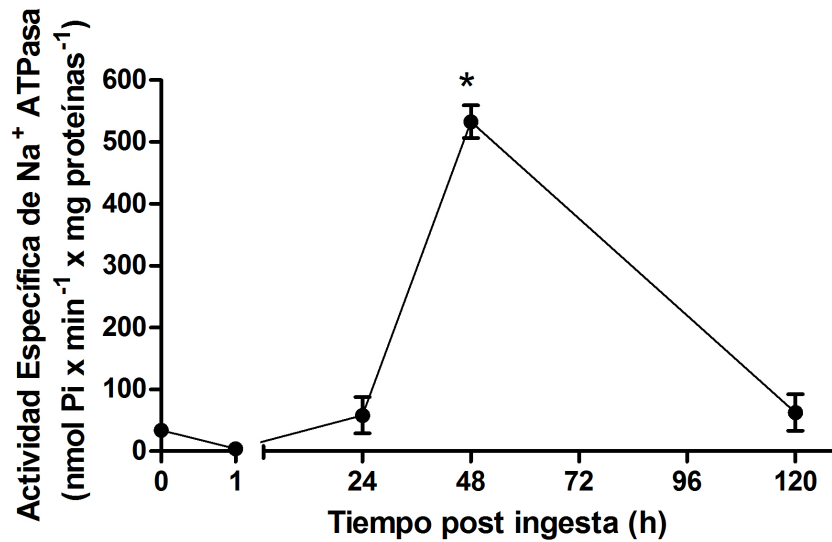


Figura 2.1. Actividad de Na⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos en 35 ups. Los datos son la media \pm S.E para 4 - 6 individuos. * Indica diferente a la correspondiente actividad a t0 (P < 0,05).

En individuos mantenidos a 10 ups, la actividad de Na⁺ ATPasa fue menor a 1 y 24 h luego de la ingesta de alimento con respecto a la actividad a t0. A las 48 h después de la ingesta de alimento, la actividad de Na⁺ ATPasa aumentó hasta valores similares a t0 y se mantuvo constante hasta las 120 h (Figura 2.2).

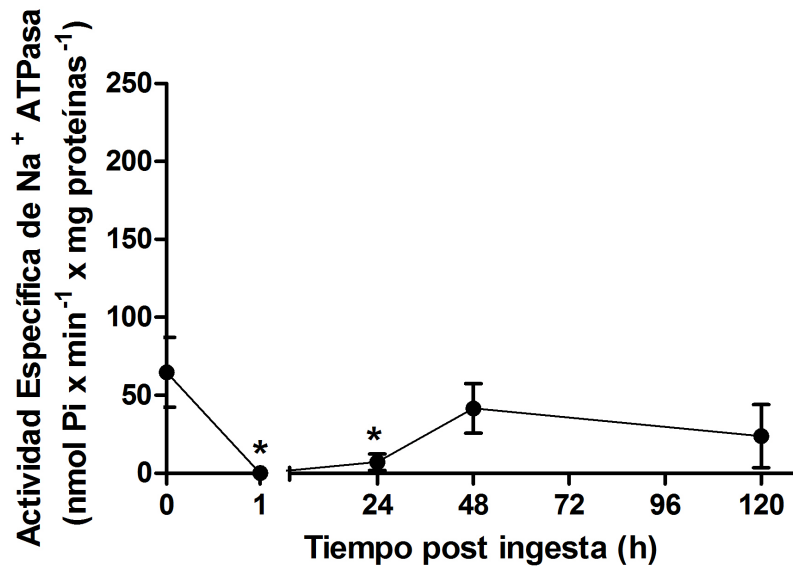


Figura 2.2. Actividad de Na⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos en 10 ups. Los datos son la media ± S.E para 4 - 6 individuos. * Indica diferente a la correspondiente actividad a t0 (P < 0,05).

Actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de N. granulata mantenidos en diferentes salinidades

La actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* no varió a los diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento para individuos mantenidos en 35 ups o en 10 ups (Figuras 2.3 y 2.4).

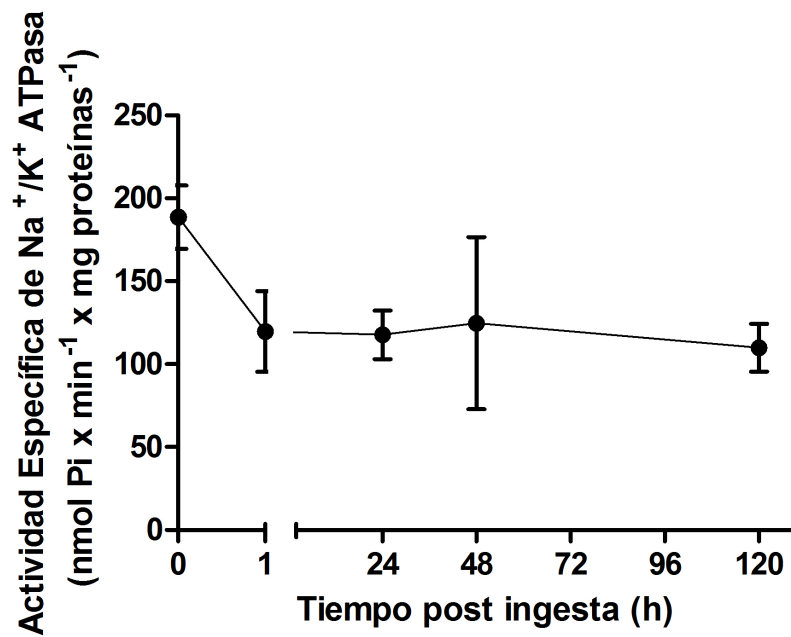


Figura 2.3. Actividad de Na⁺-K⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos en 35 ups. Los datos son la media ± S.E para 4-5 individuos.

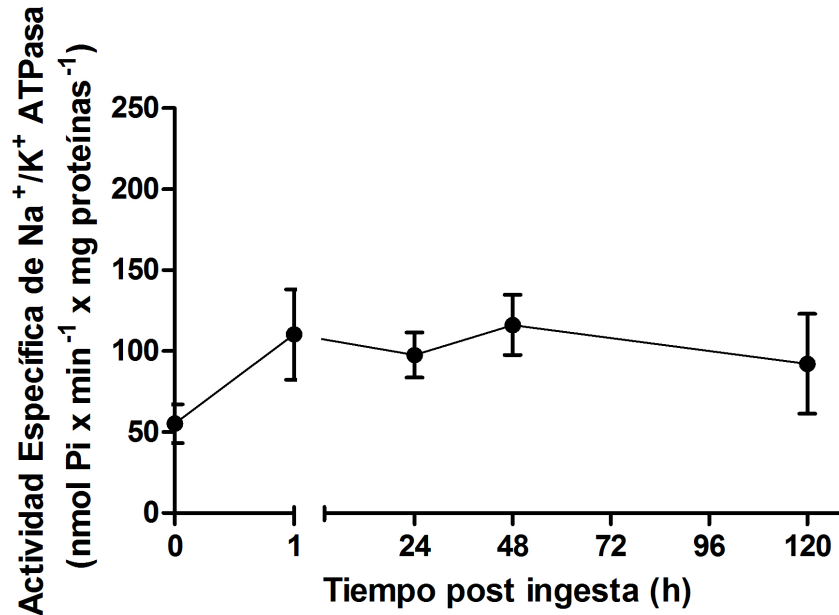


Figura 2.4. Actividad Na⁺-K⁺ ATPasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos en 10 ups. Los datos son la media ± S.E para 4-5 individuos.

Efecto in vitro de dopamina (DA) sobre la actividad de Na⁺ ATPasa y Na⁺-K⁺ ATPasa en hepatopáncreas de Neohelice granulata

Concentraciones de DA 10^{-5} M, 5×10^{-5} M o 10^{-4} M no afectaron las actividades de Na⁺ ATPasa o de Na⁺-K⁺ ATPasa en secciones de hepatopáncreas de individuos recién alimentados mantenidos en 35 ups (Figura 2.5) o de individuos 24 h luego de la ingesta de alimento (no mostrado).

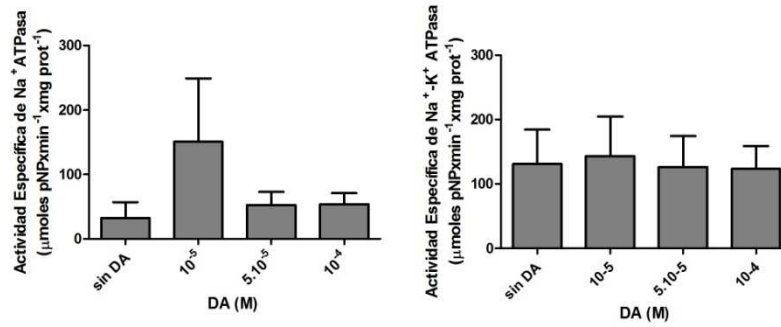


Figura 2.5. Actividad de Na⁺ ATPasa (A) y de Na⁺-K⁺ ATPasa (B) en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de DA en secciones de hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* recién alimentados (tiempo cero) en 35 ups. Los datos son la media ± S.E para 4-5 individuos.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran la existencia de modulación específica y diferencial de la actividad de Na⁺ ATPasa luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata*.

En crustáceos decápodos, el hepatopáncreas constituye el sitio principal de absorción de nutrientes, y además es donde se llevan a cabo los pasos iniciales de síntesis de macromoléculas luego de la ingesta de alimento (McGaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014; Saborowski, 2015). El aumento agudo y marcado de la actividad de Na⁺

ATPasa en 35 ups en hepatopáncreas de *N. granulata* 48 h después de la ingesta de alimento, sugiere el rol de esta actividad en ajustes digestivos y absorptivos postprandiales (por ejemplo, manteniendo gradientes de Na^+). En intestino delgado de mamíferos, los aminoácidos resultantes de la acción de la actividad de la ectopeptidasa N-aminopeptidasa (APN) unida a membrana son absorbidos por diferentes transportadores, la mayoría de los cuales dependen de Na^+ (Fairweather et al., 2012; Chang y Leung, 2014; Vuille -dit-Bille et al., 2015). Los gradientes de Na^+ necesarios para sustentar la absorción de nutrientes parecen estar mantenidos por la actividad de Na^+ ATPasa junto con la bomba de Na^+ clásica (Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016). En células intestinales y renales de mamíferos la modulación de la actividad de Na^+ ATPasa resulta en modificaciones en la absorción de Na^+ (Caruso-Neves et al., 1997, 2000, 2001; Gomes et al., 2008; Líbano-Soares et al., 2011; Wengert et al., 2005, 2007, Rocafull et al., 2012; Dias et al., 2014; Thimm et al., 2015; Vieyra et al., 2016). En enterocitos del pez *Sparus aurata* la Na^+ ATPasa sostiene el funcionamiento de procesos de transporte activo secundario (Dópido et al., 2004). La actividad de APN en hepatopáncreas de *N. granulata* aumenta a las 24 h postingesta en individuos mantenidos en 35 ups, lo que sugiere un aumento postprandial de la digestión final de proteínas (Michiels, 2015; Michiels et al., 2015a). En este contexto, el aumento de la actividad de Na^+ ATPasa luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata* en 35 ups podría ser necesario para soportar un posible aumento en la absorción dependiente de Na^+ de productos de la digestión. En el hepatopáncreas de varios crustáceos decápodos, durante la asimilación de nutrientes se ponen en funcionamiento transportadores dependientes de Na^+ (Lignot y Charmantier, 2015; Saborowski, 2015;

Scheffler y Ahearn, 2017). No se han realizado estudios aún para describir los transportadores de nutrientes dependientes de Na^+ presentes en hepatopáncreas de *N. granulata*. En mamíferos, los mecanismos de regulación de la Na^+ ATPasa parecen ser muy complejos. En células intestinales y renales, la Na^+ ATPasa está regulada por diferentes mensajeros químicos y vías de señalización tales como cAMP / proteína quinasa A (PKA) y vías purinérgicas y dopaminérgicas. La modulación por estas vías que conduce a cambios en la actividad de Na^+ ATPasa resulta en modificaciones en la absorción de Na^+ (Wengert et al., 2005, 2007; Rocafull et al., 2012; Dias et al., 2014; Thimm et al., 2015; Vieyra et al., 2016). Existe una estimulación *in vitro* por dopamina de las actividades de lipasa y de APN en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* expuestos a 35 ups (Michiels et al., 2015 a,b). En este contexto, investigamos si la actividad de Na^+ ATPasa y/o de Na^+ - K^+ ATPasa en hepatopáncreas podrían ser afectadas *in vitro* por esta amina biogénica. Se ha demostrado que la dopamina regula la actividad de estas ATPasas en diferentes tejidos de invertebrados y vertebrados (Vieyra et al., 2016; Banday et al., 2019; Lucena et al., 2019, Pan et al., 2019). Los resultados de la presente tesis muestran que la dopamina tuvo efecto *in vitro* sobre las actividades de Na^+ ATPasa o de Na^+ - K^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* contrariamente a lo demostrado para actividades de APN y lipasas (Michiels et al., 2015a; b). Esto sugiere que los cambios postprandiales de las actividades de enzimas digestivas clave y de Na^+ ATPasa podrían implicar diferentes vías de regulación (ej. distintos mensajeros químicos primarios). Sin embargo, se necesita mayor evidencia experimental para descartar una diferente sensibilidad a dopamina de la Na^+ ATPasa o de la

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (ser afectadas por otras concentraciones de dopamina) y/o establecer posibles vías de regulación involucradas en su modulación.

Por otro lado, la exposición a baja salinidad (10 ups) afecta la respuesta luego de la ingesta de alimento de la actividad de diferentes enzimas digestivas en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo la existencia de una diferente dinámica temporal postprandial de ajustes digestivos y absortivos a nivel bioquímico dependiendo de la salinidad ambiental (Michiels, 2015; Pinoni et al., 2015; Méndez et al., 2019). En este contexto, los ajustes diferenciales de la actividad de APN y de la actividad proteolítica total luego de la ingesta de alimento en 10 ups podrían estar relacionados con cambios concomitantes en mecanismos dependientes de Na^+ (por ejemplo una menor absorción de aminoácidos) y consecuentemente con una menor demanda de flujo de Na^+ (Michiels et al., 2015a). La disminución 1 h luego de la ingesta de alimento de la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* en 10 ups apoya esta idea. Además, las diferentes respuestas de la actividad de Na^+ ATPasa señalan a esta enzima como uno de los componentes implicados en las distintas respuestas postprandiales dependiendo de la salinidad en este cangrejo.

En células que transportan Na^+ a tasas muy altas, como en el intestino delgado, la Na^+ ATPasa sería necesaria para la absorción de este ión, nutrientes y agua sin un aumento significativo en la concentración de K^+ intracelular y de esta manera, previniendo el envenenamiento por el mismo (Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016). El hecho que la actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa no varió luego de la ingesta de alimento en individuos

mantenidos en 35 o 10 ups sugiere la modulación específica postprandial de la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata*. Esta modulación específica de la actividad de Na^+ ATPasa luego de la ingesta de alimento podría permitir una regulación fina del flujo de Na^+ como se ha sugerido para intestino de mamíferos (Rocafull et al., 2012; Vieyra et al., 2016). En mamíferos, insectos y moluscos bivalvos y en el músculo de la quela de *N. granulata*, las actividades de Na^+ ATPasa y de Na^+-K^+ ATPasa co-existentes responden diferencialmente a condiciones intrínsecas y/o ambientales y/o a productos químicos exógenos (Caruso-Neves y Lopes, 2000; Ventrella et al., 2001; Caruso-Neves et al., 2004; Beltowski et al., 2004; Wengert et al., 2005; Pagliarani et al., 2006, 2008; Pinoni, 2009; Pinoni y López Mañanes, 2009). Los resultados del presente capítulo sugieren que este podría ser también el caso para estas actividades en hepatopáncreas de *N. granulata*.

En conclusión, la modulación específica postprandial de la actividad de Na^+ ATPasa en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiere su participación en ajustes digestivos y absorptivos postprandiales y que esta actividad constituye uno de los componentes de las respuestas luego de la ingesta de alimento a nivel bioquímico en relación a la salinidad ambiental.

CAPÍTULO 3:

**Estudios sobre la influencia del hábitat
en parámetros digestivos y metabólicos
a nivel bioquímico en individuos de
Neohelice granulata de la Laguna
Costera Mar Chiquita**

INTRODUCCIÓN

El hepatopáncreas de crustáceos decápodos, al desempeñar un papel central en la digestión y absorción de nutrientes, almacenamiento de sustratos energéticos y en la síntesis de macromoléculas, es un indicador sensible de las variaciones digestivas y metabólicas en relación con diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales (Zeng et al., 2010; Pinoni et al., 2011, 2013; Wang et al., 2014; Belgrad y Griffen, 2016; Pinoni et al., 2018). La modulación de actividades enzimáticas clave en el tracto digestivo y/o de reservas de energía en órganos de almacenamiento es una expresión de los ajustes digestivos y metabólicos en relación con el hábitat y las condiciones ambientales (del Valle et al., 2006; Buckup et al., 2008; Sjoboen et al., 2010; del Valle y López Mañanes, 2008, 2012). En varios cangrejos eurihalinos intermareales, la modulación diferencial de enzimas digestivas y/o la concentración de reservas de energía en el hepatopáncreas constituye una de las respuestas a desafíos ambientales (Asaro et al., 2011, 2017a, b; 2018; Pinoni et al., 2013, 2018; Michiels et al., 2015a,b, 2017). Las diferentes condiciones ambientales y/o patrones de variación de las mismas en hábitats de planicie de mareas y espartillar de lagunas costeras pueden imponer diferentes condiciones a cangrejos intermareales de una misma especie que habita ambas zonas (Iribarne et al., 1997; Méndez-Casariago et al., 2011; Pinoni et al., 2011; Spivak et al., 2012; Mueller, 2017). Estos escenarios diferenciales podrían implicar la existencia de mecanismos intrínsecos de regulación que conducirán a respuestas intraespecíficas en el patrón de ajustes y/o en la flexibilidad a diferentes niveles (ej. bioquímico). (Pinoni et al., 2013).

Una población del cangrejo eurihalino *N. granulata* puede habitar los hábitats contrastantes de planicie de marea y espartillar en un mismo área (Spivak, 1997; Luppi et al., 2013; Bas et al., 2014). Este es el caso en la Laguna Costera Mar Chiquita ($37^{\circ} 32' - 37^{\circ} 45'S$, $57^{\circ} 19' - 57^{\circ} 26'O$) en donde *N. granulata* ocupa todo el intermareal desde la zona de planicie de marea sin vegetación hasta la zona del espartillar cubierta por *Spartina desinflora* (Spivak, 1997; Iribarne et al., 2003; Fanjul et al., 2008; Luppi et al., 2013). Machos adultos de *N. granulata* de la Laguna Costera Mar Chiquita constituyen un buen modelo para investigar la variabilidad intraespecífica en flexibilidad digestiva y metabólica, ya que muestran especialización de hábitat (Spivak et al., 1994; Iribarne et al., 2003; Fanjul et al., 2008; Luppi et al., 2013). En el ambiente natural existen diferencias intraespecíficas en componentes clave del metabolismo de lípidos y proteínas en relación con el hábitat (planicie de marea y espartillar) que podrían representar ajustes digestivos y metabólicos para enfrentar las condiciones particulares de cada sitio (Pinoni et al., 2011). Machos adultos de *N. granulata* de la zona de planicie de mareas y de espartillar expuestos a diferentes salinidades bajo condiciones controladas exhiben ajustes diferenciales de componentes del metabolismo de lípidos y proteínas (enzimas digestivas, concentración de reservas) en el hepatopáncreas (Pinoni et al., 2013) Estas diferentes respuestas podrían deberse a que mecanismos intrínsecos de regulación disparados por las condiciones ambientales particulares de cada sitio podrían seguir operando en condiciones controladas (Pinoni et al., 2011, 2013). Por otro lado, se piensa que la diferencia entre hábitats en recursos alimenticios influye sobre los distintos hábitos alimentarios de machos adultos de *N. granulata* en la laguna costera Mar Chiquita (Iribarne et al., 1997; Bas et al., 2014;

Lancia et al., 2014). Aún faltan estudios sobre la influencia del hábitat de procedencia sobre las respuestas de parámetros digestivos y metabólicos a nivel bioquímico (ej. enzimas clave, contenido de reservas de energía en hepatopáncreas) cuando se someten a los individuos a una misma condición de alimentación en condiciones controladas.

El hepatopáncreas constituye el sitio principal de reserva de triglicéridos en *N. granulata* de ambas zonas, y está involucrado en ajustes del metabolismo lipídico y proteico en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales (Pinoni et al., 2013, 2015; Michiels et al., 2015a Asaro et al., 2018; Mendez et al., 2019). Las lipasas son de importancia central debido a su rol en la digestión de lípidos dietarios y de reserva (Casas-Godoy et al., 2012; Karasov y Douglas, 2013). Las fosfatasa alcalinas (AP) son glicoproteínas unidas a membrana que hidrolizan el fosfato de una variedad de moléculas en un rango de pH óptimo por encima de 7,0 (Millan, 2006; Buchet et al., 2013; Linder et al., 2013; Lallès, 2019a). La actividad de AP en hepatopáncreas de crustáceos decápodos estaría involucrada en la síntesis y secreción de enzimas y en la absorción de productos digestivos (Barker y Gibson, 1977; Gibson y Barker, 1979; Verri et al., 2001; Wang et al., 2014). El levamisol es un inhibidor específico que se utiliza comúnmente para identificar diferentes formas de AP (Mota et al., 2008; Sharma et al., 2014; Lallès, 2019a). Las actividades de lipasa y de AP sensible e insensible a levamisol estarían involucradas en ajustes digestivos y metabólicos en hepatopáncreas de *N. granulata* y del cangrejo eurihalino *C. angulatus* en relación con diferentes condiciones ambientales y/o fisiológicas (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2015; Michiels, 2015; Pinoni y López Mañanes, 2016; Méndez et al., 2019).

En este contexto, en el presente capítulo se describe la influencia del hábitat sobre respuestas de componentes claves del metabolismo de lípidos y proteínas en hepatopáncreas de machos adultos de *N. granulata* de planicie de mareas y de espartillar de la Laguna Costera Mar Chiquita expuestos durante diferentes tiempos a las mismas condiciones de alimentación. Determinamos la concentración de triglicéridos y de proteínas y las actividades de lipasa, y de fosfatasa alcalina sensible e insensible a levamisol en el hepatopáncreas inmediatamente después de la captura (tiempo cero) y después de uno y tres meses en condiciones controladas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de los animales

Machos adultos de *N. granulata* en intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967) con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, se recolectaron en las zonas de planicie de marea y de espartillar de la Laguna Costera Mar Chiquita (37 ° 32'-37 ° 45'S, 57 ° 19'-57 ° 26'O). Las capturas se realizaron en otoño, cuando el movimiento de individuos entre los dos hábitats es muy reducido y los individuos permanecen en las cuevas la mayor parte del tiempo (Luppi et al., 2013). Los animales fueron transportados al laboratorio en agua del sitio de recolección. Un grupo de cangrejos de ambos sitios (planicie de marea y espartillar) se usó inmediatamente para realizar muestreos y ensayos bioquímicos para determinar los correspondientes valores en el ambiente natural. Dos grupos de cangrejos, de ambos

hábitats, se mantuvieron en acuarios separados (25 individuos por acuario) bajo condiciones controladas: 35 ups; (salinidad a la cual los machos adultos de ambos sitios de la laguna costera Mar Chiquita osmoconforman (Pinoni et al., 2013), 12 h luz / 12 h oscuridad, $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 7.4. El agua de los acuarios (36 L) estuvo bajo aireación y filtración continua. (Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2015a). Los cangrejos fueron alimentados tres veces por semana (alimento TetraPond 62% de hidratos de carbono, 31% de proteínas, 5% de lípidos) (alrededor de $0,07 \text{ g cangrejo}^{-1}$) durante todo el período experimental (hasta 3 meses). Los individuos fueron privados de alimento 24 horas antes de los correspondientes ensayos bioquímicos. A uno y / o tres meses, se determinaron la concentración de triglicéridos y proteínas y las actividades de lipasa y fosfatasa alcalina en hepatopáncreas como se describe a continuación. No hubo diferencias en el comportamiento de alimentación ni mortalidad durante todo el período experimental.

Preparación de extractos enzimáticos de hepatopáncreas de N. granulata

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 25 minutos en hielo (Pinoni y López Mañanes, 2009; Pinoni et al., 2011, 2013; Michiels et al., 2015a; Méndez et al., 2018, 2019). Luego se pesaron y midieron los individuos y se extrajo el hepatopáncreas. El hepatopáncreas se homogeneizó en Tris / HCl 50 mM, pH 7,4 (4 ml de tejido⁻¹) (homogeneizador CAT XI20, herramienta T10) y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos (Sorval, rotor SS34, refrigerado). Antes de la centrifugación, se separó una alícuota del homogenato para la determinación de la concentración de triglicéridos y proteínas. El

sobrenadante se separó y almacenó a -20°C hasta ser utilizado para los correspondientes ensayos enzimáticos.

Determinaciones cuantitativas

La concentración de triglicéridos (TG) se determinó por el método colorimétrico de la glicerol fosfato oxidasa con un kit comercial (TAG Wiener Lab AA cod. 861110001). La muestra correspondiente se incubó con este reactivo durante 5 minutos a 37°C . La cantidad de glicerol liberado se determinó leyendo la absorbancia en 505 nm del complejo de quinonimina coloreado (Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2015a).

La determinación de proteínas se realizó como se describió en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Para la determinación de la actividad de lipasa y de AP sensible e insensible a levamisol se utilizaron condiciones de ensayo óptimas para la correspondiente actividad en hepatopáncreas de *N. granulata*, determinadas en trabajos previos de nuestro laboratorio (Pinoni et al., 2013, 2016; Michiels, 2015; Michiels et al., 2015a; Pinoni y López Mañanes, 2016).

La actividad de lipasa se determinó midiendo la hidrólisis del pNP-palmitato (Markweg et al., 1995), con algunas modificaciones como se describieron previamente (Pinoni et al., 2013; Michiels et al., 2015a). La reacción se inició añadiendo pNP-palmitato (concentración final 0,7 mM) a una mezcla de reacción que contenía la muestra correspondiente en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) / 4 l de Tween 80. La incubación se

llevó a cabo a 37° C durante 3 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 0,5 ml de 0,2% p v⁻¹ de ácido tricloroacético (TCA). La cantidad de p-nitrofenol liberado (pNP) se determinó leyendo la absorbancia en 410 nm.

Las actividades de AP sensible e insensible a levamisol se determinaron como se describió previamente (Pinoni et al., 2005, 2016; Pinoni y López Mañanes, 2008). La actividad AP insensible a levamisol se realizó midiendo la hidrólisis de pNPP en un medio de reacción que contiene MgSO₄ 4 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,7) en presencia de levamisol 16 mM. La reacción se inició mediante la adición de pNPP (concentración final 9,5 mM) y la incubación se llevó a cabo a 37° C durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 ml de KOH 0,1 M. La cantidad de pNP liberado se determinó leyendo la absorbancia en 410 nm. La actividad de AP sensible a levamisol se determinó como la diferencia entre la hidrólisis de pNPP en un medio de reacción que contiene MgSO₄ 4 mM en buffer Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) en ausencia (actividad AP total) y en presencia de levamisol 16 mM.

Índice hepatosomático

Para determinar el índice hepatosomático (IH), se tomaron los pesos de los cangrejos y los hepatopáncreas. El IH fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice hepatosomático (IH, \%)} = \text{peso hepatopancreático} / (\text{peso corporal} - \text{peso hepatopancreático}) * 100$$

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se realizaron análisis paramétricos, t-test o One-Way ANOVA, para estimar diferencias estadísticas. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

RESULTADOS

Concentración de triglicéridos y proteínas en hepatopáncreas de individuos adultos de N. granulata

Concentración de triglicéridos

- Planicie de mareas

Luego de 1 mes en condiciones controladas de alimentación, la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas fue similar ($p=1,0$) a la del ambiente natural, pero disminuyó (aproximadamente 60%) a los 3 meses (Fig. 3.1 A).

- Espartillar

A diferencia de lo observado en individuos de la zona de planicie de marea, la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de individuos de la zona de espartillar fue similar a la del ambiente natural y se mantuvo constante durante todo el período experimental (Figura 3.1 B).

Concentración de proteínas

- Planicie de mareas

La concentración de proteínas en hepatopáncreas de los cangrejos de planicie de mareas fue similar ($p=0,373$) a la del ambiente natural luego de 1 mes, pero aumentó a los 3 meses (aproximadamente 140%) (Figura 3.2 A).

- Espartillar

La concentración de proteínas en hepatopáncreas de los cangrejos del espartillar fue similar a la del ambiente natural luego de 1 mes, y se mantuvo constante durante todo el periodo experimental (Figura 3.2 B).

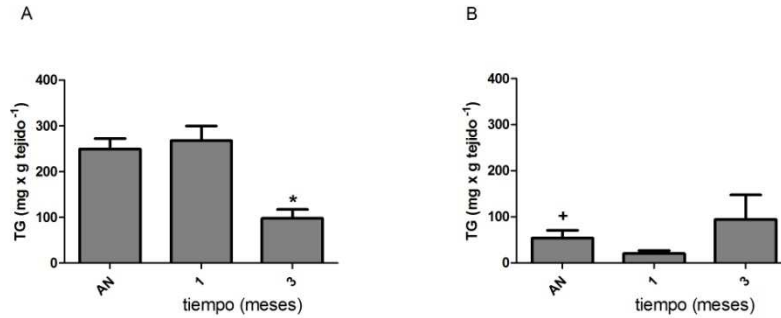


Figura 3. 1. Concentración de triglicéridos (TG) en el hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* de planicie (A) y espartillar (B) en el ambiente natural (AN) y a 1 y 3 meses bajo las mismas condiciones de alimentación. * indican diferencias entre individuos del mismo sitio (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). ⁺ Indica diferente del valor correspondiente en el ambiente natural en individuos de planicie de marea (t-test; $p < 0,05$) Los datos son la media \pm S.E 4-10 individuos.

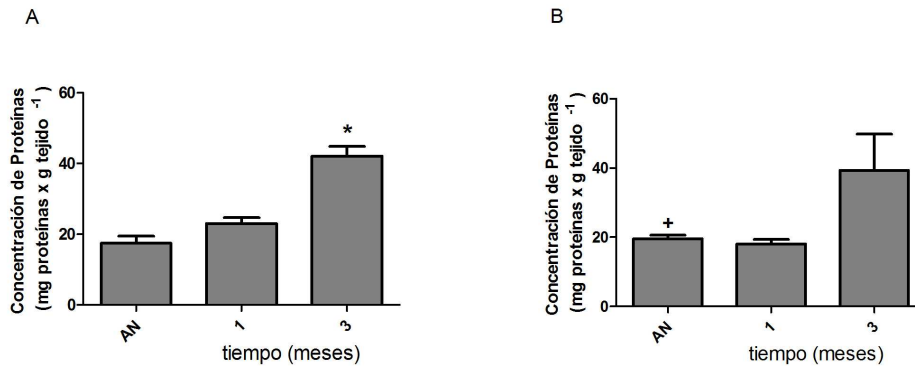


Figura 3.2. Concentración de proteínas en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* de planicie (A) y espartillar (B) en el ambiente natural (AN) y a 1 y 3 meses bajo las mismas condiciones de alimentación. * indica diferencias entre individuos del mismo sitio. (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). ⁺ Indica diferente del valor correspondiente en el ambiente natural en individuos de planicie de marea (t-test; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm S.E 4-10 individuos.

Actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos adultos de N. granulata

- *Planicie de marea*

La actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* de planicie de marea fue similar ($p=0,083$) luego de 1 mes a la del ambiente natural. A los 3 meses, la actividad de lipasa en hepatopáncreas disminuyó (alrededor del 45%) (Figura 3.3 A).

- *Espartillar*

A diferencia de lo observado para individuos de planicie de mareas, la actividad de lipasa en hepatopáncreas de individuos del espartillar no se modificó durante todo el período experimental, manteniendo valores similares a los del ambiente natural (Figura 3.3 B).

Actividad de fosfatasa alcalina (AP) en hepatopáncreas de individuos adultos de N. granulata

AP sensible a levamisol

- *Planicie de marea*

La actividad AP sensible a levamisol se incrementó (aproximadamente 4300%) en 1 mes. A los 3 meses, la actividad AP sensible a levamisol disminuyó a valores similares a los encontrados en el ambiente natural (Figura 3.4 A)

- *Espartillar*

Luego de 1 mes en condiciones controladas, la actividad de AP sensible a levamisol en hepatopáncreas no se modificó con respecto al valor en ambiente natural. Después de 3 meses disminuyó (alrededor de un 135%) (Figura 3.4 B).

AP insensible a levamisol

- *Planicie de marea*

La actividad de AP insensible a levamisol en hepatopáncreas aumentó (aproximadamente 1250%) al mes. A los 3 meses, la actividad de AP insensible al levamisol se redujo hasta valores similares al ambiente natural (Figura 3.5 A).

- *Espartillar*

La actividad de AP insensible a levamisol en hepatopáncreas no se modificó al mes. A los 3 meses fue mayor a los valores encontrados en el ambiente natural (aproximadamente 600%) (Figura 3.5 B).

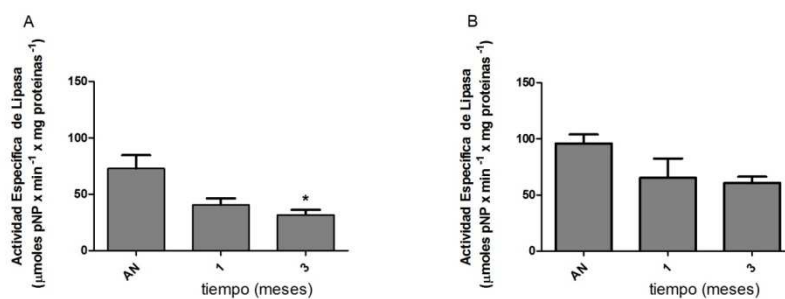


Figura 3.3. Actividad de la lipasa en hepatop\u00e1ncreas de individuos de *N. granulata* de la planicie de mareas (A) y el espartillar (B) en el ambiente natural (AN) y a 1 y 3 meses alimentados en condiciones controladas en el laboratorio. * indica diferencias entre individuos del mismo sitio. (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los datos son la media \pm S.E 4-10 individuos.

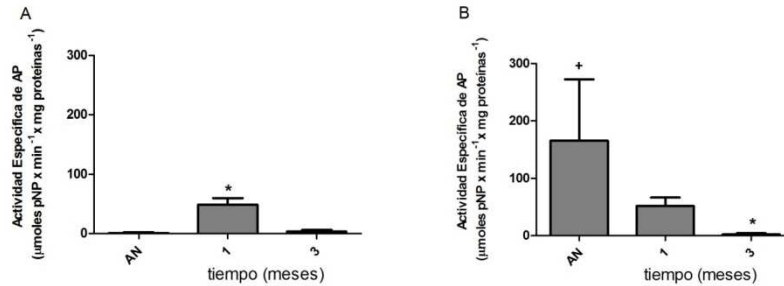


Figura 3.4. Actividad de AP sensible a levamisol en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* de planicie de mareas (A) y espartillar (B) y en el ambiente natural (AN) y a 1 y 3 meses alimentados en condiciones controladas en laboratorio. * indica diferencias entre individuos del mismo sitio. (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). ⁺ Indica diferente del valor correspondiente en el ambiente natural en individuos de planicie de marea (t-test; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm S.E 4-10 individuos.

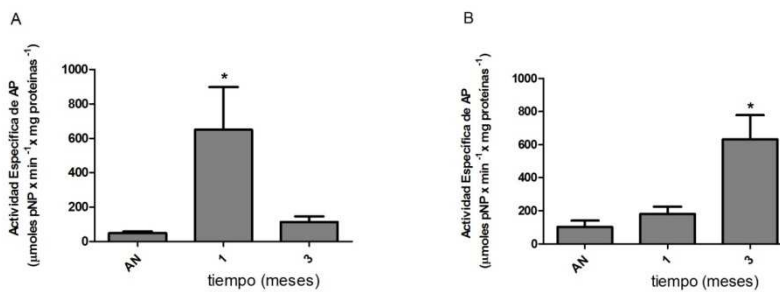


Figura 3.5. Actividad AP insensible al levamisol en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* de planicie de mareas (A) y espartillar (B) y en el ambiente natural (AN) y a 1 y 3 meses alimentados en condiciones controladas en el laboratorio. * indica diferencias entre individuos del mismo sitio. (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los datos son la media \pm S.E 4-10 individuos.

Índice hepatosomático de individuos adultos de N. granulata de planicie de mareas y espartillar

El índice hepatosomático se mantuvo durante todo el período experimental para los individuos de ambas zonas (Figura 3.6).

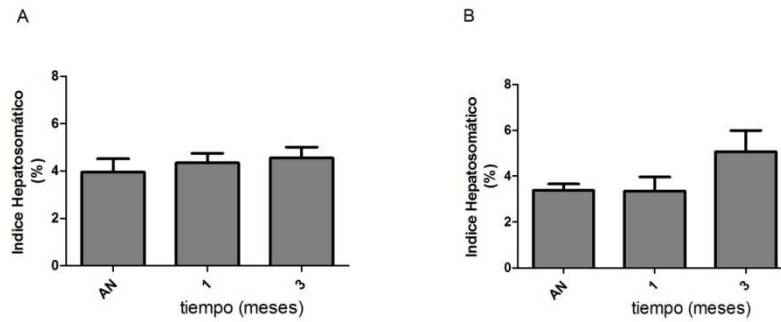


Figura 3.6. Índice hepatosomático de individuos de *N. granulata* de planicie de mareas (A) y espartillar (B) y en el ambiente natural (AN) y a 1 y 3 meses alimentados en condiciones controladas en laboratorio. Los datos son la media \pm S.E 4-10 individuos.

DISCUSIÓN

Las respuestas diferenciales en la concentración de triglicéridos y de las actividades de lipasa y de AP sensible e insensible a levamisol en hepatopáncreas de individuos machos adultos de *N. granulata* de planicie de marea y de espartillar de la Laguna Costera Mar Chiquita sugieren la influencia del hábitat de procedencia en ajustes digestivos y metabólicos en respuesta a las mismas condiciones de alimentación.

En varios animales, la calidad, composición y/o disponibilidad del alimento es uno de los principales factores que influyen en el tipo y niveles de reservas de energía almacenadas (Buckup et al., 2008; del Valle y López Mañanes, 2012; Karasov y Douglas, 2013). Los crustáceos decápodos utilizan comúnmente lípidos y proteínas como moléculas de energía, pero la importancia relativa de las diferentes fuentes metabólicas varía según la especie y/o el tipo de desafío ambiental (Pinoni et al., 2013; Jimenez y Kinsey, 2015; Wang et al., 2016). Las diferencias intraespecíficas en la utilización de reservas de energía en diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales, han sido poco estudiadas (Pinoni et al., 2013, 2018). El hepatopáncreas es el sitio principal de digestión, absorción y almacenamiento de sustratos energéticos entre otras funciones tales como excreción de productos de desecho nitrogenados (Zeng et al., 2010; Wang et al., 2014; Saborowski, 2015; Ribeiro et al., 2016; Vogt, 2019). El hepatopáncreas tiene un papel clave en los pasos iniciales de la síntesis de macromoléculas (ej., triglicéridos, proteínas) luego de la ingesta de alimento (McGaw y Curtis, 2013; Carter y Mente, 2014; Michiels, 2015). Los lípidos digeridos se almacenan principalmente como triglicéridos (más del 80-90%) y el

hepatopáncreas representa el sitio de almacenamiento primario, particularmente para las reservas de energía a largo plazo (Saborowski, 2015). Este es el caso para machos adultos de *N. granulata* de planicie y espartillar de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pinoni et al., 2011, 2013). Los cangrejos construyen depósitos de triglicéridos a través del anabolismo lipídico, principalmente por la captación directa de lípidos de dietas ricas en lípidos (Saborowski, 2015). La flexibilidad metabólica y digestiva a nivel bioquímico (modulación de la concentración de triglicéridos y proteínas y de actividad de lipasa) de cangrejos de *N. granulata* de planicie de mareas podría relacionarse con su hábito alimenticio (omnívoros-detritívoros) y la disponibilidad y/o el tipo de alimento en la planicie especialmente en otoño cuando los cangrejos permanecen en sus cuevas durante largos períodos (hasta 3 meses) (Luppi et al., 2013; Pinoni et al., 2013). La dieta de machos adultos de *N. granulata* en planicie de mareas se basa principalmente en ítems animales con una muy baja proporción de *Spartina densiflora*, la cual es la principal especie vegetal consumida por los cangrejos en el espartillar. Así, en el ambiente natural, los machos adultos de *N. granulata* de planicie de mareas sostienen una dieta con un potencial alto contenido de sustratos lipídicos (Iribarne et al., 1997; Bas et al., 2014; Lancia et al., 2014) los cuales serían la principal fuente de metabolitos para la construcción y/o mantenimiento de reservas de triglicéridos en hepatopáncreas. La disminución en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de individuos de planicie de mareas bajo alimentación en condiciones controladas durante 3 meses con una dieta con un posiblemente menor contenido de lípidos que la disponible en el ambiente natural sugiere una menor disponibilidad y/o utilización de metabolitos para la construcción de reservas.

Debido a su función como un vínculo entre la digestión y la absorción, los cambios en la actividad de enzimas digestivas en tracto digestivo pueden conducir a ajustes en características digestivas y metabólicas a nivel bioquímico (del Valle y López Mañanes, 2011, 2012; Romano y Zeng, 2012; Karasov y Douglas, 2013; Pinoni et al., 2011, 2013, 2015; Michiels et al., 2017). En varios animales, los niveles de enzimas digestivas pueden cambiar en correlación con cambios en los principales sustratos de la dieta (Karasov y Douglas, 2013). Estos cambios pueden llevar a ajustes en la capacidad digestiva para nutrientes específicos (del Valle y López Mañanes, 2011, 2012; Romano y Zeng, 2012; Karasov y Douglas, 2013). El nivel y/o modulación de la actividad de lipasa en el hepatopáncreas juega un papel central en la digestión y absorción de lípidos de la dieta (Michiels et al., 2013; 2015b; Saborowski, 2015). En este contexto, la menor actividad de lipasa en hepatopáncreas de cangrejos de planicie de mareas después de 3 meses sugiere una modulación en respuesta a una menor disponibilidad de lípidos en la dieta. La disminución en la actividad de lipasa y por ende en la capacidad digestiva lipolítica podría conducir a una menor disponibilidad de metabolitos para la construcción de reservas en hepatopáncreas. En el hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*, existe actividad de lipasa intracelular, la cual está regulada por factores externos e internos y cuya modulación se correlaciona con la de la concentración de triglicéridos (Michiels et al., 2013; 2015b). Aún se desconocen las rutas de digestión-absorción en *N. granulata*. Así, se necesita evidencia experimental para establecer el vínculo entre una digestión disminuida de lípidos de la dieta y una disminución en la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de individuos de planicie de mareas. La mayor concentración de proteínas

al final del período experimental en cangrejos de planicie de mareas sugiere la capacidad de *N. granulata* para ajustar también el metabolismo proteico en hepatopáncreas (ej. aumento del anabolismo o disminución del catabolismo). Los ajustes diferenciales en el metabolismo de lípidos y proteínas podrían permitir el mantenimiento del índice hepatosomático.

Los diferentes comportamientos alimentarios entre hábitats (omnívoros-detritívoros en la planicie de mareas y herbívoros-detritívoros en el espartillar) de machos adultos de *N. granulata* en la Laguna Costera Mar Chiquita parecen estar relacionados con diferencias en el alimento disponible en cada hábitat (Iribarne et al., 1997; Bortolus y Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Botto et al., 2005; Bas et al., 2014). Los cangrejos en el espartillar tienen un bajo consumo de ítems dietarios de origen animal (Iribarne et al., 1997; Bortolus et al., 2002; Alberti et al., 2007). *Spartina densiflora*, la principal especie vegetal consumida por los cangrejos en el espartillar, se caracteriza por un bajo contenido proteico (aproximadamente 5% en peso seco). Por lo tanto, los lípidos y las proteínas podrían ser componentes dietéticos limitados para los individuos de este hábitat en el ambiente natural (Pinoni et al., 2011, 2013). Particularmente durante el otoño, el menor consumo de productos de origen animal por cangrejos del espartillar, conduciría a una menor ingesta de lípidos y una posible disminución en la formación y/o utilización de triglicéridos en hepatopáncreas (Iribarne et al., 1997; Bortolus et al., 2002; Alberti et al., 2007; Pinoni et al., 2011, Bas et al., 2014). La menor concentración de triglicéridos en hepatopáncreas de individuos de espartillar soporta esta idea. Por otro lado, el mantenimiento en niveles similares de la concentración de triglicéridos y de la actividad de lipasa en hepatopáncreas sugieren diferencias intraespecíficas en ajustes en el metabolismo

lipídico y proteico en relación al hábitat de origen. Esta idea también es compatible con el hecho de que el índice hepatosomático no se vió afectado.

Las fosfatasas alcalinas (AP) son glicoproteínas unidas a membrana que hidrolizan el fosfato de una variedad de moléculas en un rango de pH óptimo por encima de 7,0 (Millan, 2006; Buchet et al., 2013; Linder et al., 2013; Lallès, 2019a). Se ha sugerido el papel de las actividades de AP sensibles a levamisol e insensibles a levamisol (un inhibidor utilizado para distinguir distintas formas de AP) en el proceso digestivo y metabólico posprandial en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* (Pinoni, 2009; Pinoni et al., 2015; Pinoni y López Mañanes, 2016). Las respuestas diferenciales de las actividades de AP sensible e insensibles a levamisol en hepatopáncreas de *N. granulata* de planicie de marea y espartillar indicarían que estas actividades también son componentes involucrados en las diferencias intraespecíficas en relación con el hábitat. Se requiere mayor investigación para corroborar si las variaciones en las actividades de AP a lo largo del período experimental en el hepatopáncreas de *N. granulata* de planicie de mareas y espartillar están relacionadas con los ajustes en la actividad de la lipasa y el contenido de triglicéridos y proteínas en cangrejos de planicie de mareas y/o en el mantenimiento de las reservas en el hepatopáncreas en cangrejos del espartillar. La actividad de AP en hepatopáncreas de crustáceos decápodos estaría involucrada en la síntesis y secreción de enzimas y en la absorción de productos digestivos (Barker y Gibson, 1977; Gibson y Barker, 1979; Verri et al., 2001; Wang et al., 2014).

La flexibilidad fenotípica involucra variaciones reversibles, a distintos niveles, dentro de un individuo en respuesta a cambios en condiciones ambientales (Piersma y Drent, 2003; Kelly et al., 2012). Las distintas respuestas observadas de los parámetros digestivos y metabólicos clave luego de exponer individuos de *N. granulata*, provenientes de dos zonas diferentes, a una misma dieta, señala la influencia del hábitat de origen en dichas respuestas. Así, mecanismos intrínsecos de regulación podrían estar operando en el ambiente natural. Es probable que dicha capacidad de flexibilidad que presenta el individuo esté determinada genéticamente (ej. sintetizar *de novo* una enzima digestiva frente a un cambio en el sustrato dietario), esto no quiere decir que los individuos, en este caso de la zona de planicie y espartillar, sean genéticamente diferentes. Para *N. granulata* se encontró que hay dos grupos genéticamente distintos, al sur y al norte del Río de la Plata (Ituarte et al., 2012). Sin embargo, no hay ningún estudio que indique que haya diferencias poblacionales (diferencias genéticas, morfológicas o reproductivas) entre individuos de planicie y espartillar de la Laguna Costera Mar Chiquita que contribuyan a explicar las diferentes respuestas observadas.

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran que las actividades de lipasa y AP, así como el contenido de triglicéridos se ven afectados de manera diferente con la exposición a largo plazo a una misma dieta en individuos de *N. granulata* de planicie de mareas y espartillar, señalando la influencia del hábitat de origen en las respuestas de parámetros digestivos y metabólicos clave. Como mencionamos anteriormente, distintos mecanismos intrínsecos de regulación podrían estar operando en el ambiente natural, probablemente activados por las características ambientales particulares de cada sitio

(Pinoni et al., 2011). La modulación diferencial de las actividades de enzimas digestivas clave y de reservas de energía en hepatopáncreas de cangrejos de ambos sitios bajo las mismas condiciones de alimentación sugiere que estos diferentes mecanismos intrínsecos podrían subyacer al uso diferencial de vías digestivas y metabólicas en relación con el hábitat.

CAPÍTULO 4:

**Perfil digestivo y metabólico a nivel
bioquímico de adultos del lenguado
Paralichthys orbignyanus: actividad de
carbohidrasas en intestino y
concentración de glucógeno y glucosa
libre en órganos de reserva**

INTRODUCCIÓN

Debido a su rol fisiológico central como vínculo entre la digestión y absorción de nutrientes, resulta evidente la importancia de determinar la existencia y/o modulación potencial de la actividad de enzimas digestivas específicas en tracto digestivo para establecer la capacidad de un animal en utilizar diferentes sustratos dietarios y los posibles ajustes en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales (del Valle y López Mañanes, 2011, 2012; Karasov y Douglas, 2013; Sanz et al., 2015; Wang y Karasov, 2017). Por otro lado, determinar la existencia y/o modulación de sustratos de energía en órganos de reserva permite evaluar posibles ajustes en el metabolismo de diferentes macromoléculas.

Los peces requieren diferentes fuentes de energía para mantener la condición física y procesos fundamentales, como el crecimiento, el metabolismo y la reproducción. La homeostasis de glucosa es esencial en el soporte de las funciones de varios órganos y las respuestas a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales (Polakof et al., 2011, 2012; La Fleur et al., 2014; Chen et al., 2018). La digestión de hidratos de carbono tales como almidón, glucógeno y disacáridos y la absorción de glucosa vía el intestino constituyen las principales fuentes de glucosa circulante (Bakke et al., 2011; Polakof et al., 2011, 2012; Steimberg, 2018). En ese contexto, la existencia y nivel de actividad de carbohidrasas específicas en intestino determina la capacidad en la digestión y utilización de hidratos de carbono dietarios glucogénicos (Karasov y Douglas, 2013; Steinberg, 2018). Las endo

amilasas (α -1,4 glucan-4-gluconohidrolasa, EC 3.2.1.1) son enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis aleatoria de uniones internas α -D-(1, 4) glucosídicas de α -glucanos (ej. almidón, glucógeno y polímeros relacionados). En animales, las amilasas tienen una importancia fisiológica central debido a su rol en los pasos iniciales de la digestión de sustratos glucogénicos clave tales como almidón y glucógeno dietarios y/o glucógeno de reserva (Janeček et al., 2014; Janeček y Svensson, 2016; Date et al., 2015, 2019; Peng et al., 2015; Tiwari et al., 2015; Azzopardi et al., 2016; Rodríguez-Viera et al., 2016). La maltasa tiene también un papel principal ya que interviene en las etapas iniciales asistiendo a la amilasa y en los pasos finales para producir glucosa (Dhital et al., 2013; Lin et al., 2016). Similarmente a mamíferos, en varias especies de peces se ha descrito que la amilasa, que actúa en el lumen intestinal, y disacaridasas tales como la maltasa, situadas en la membrana del borde estriado de enterocitos, constituyen las enzimas principales involucradas en la digestión de hidratos de carbono glucogénicos (Bakke et al., 2011; Steinberg, 2018). En especies de peces de importancia comercial y/o de cultivo, establecer la presencia y/o posible modulación de actividad de amilasa en intestino es de particular interés debido a la posibilidad de incorporar a la dieta hidratos de carbono de menor costo tales como el almidón (Al-Gharrawi et al., 2019; Ma et al., 2019; Pujante, 2019).

Los peces planos de la familia *Paralichthyidae* tienen un importante rol ecológico y son importantes en pesquerías comerciales en toda la longitud del Atlántico, desde el Ártico profundo hasta las costas del sur de África y América del Sur (Díaz de Astarloa, 2002; Magnone et al., 2015; Munroe, 2015; Ruiz-Jarabo et al., 2015; Walsh et al., 2015). En Argentina, los peces pleuronectiformes del género *Paralichthys* son de gran valor

comercial debido a la calidad de su carne (Díaz de Astarloa, 1994; Rivera-Prisco et al., 2001). El lenguado *P. orbignyanus* es una especie marina estuarino-dependiente, que se distribuye desde Rio de Janeiro (Brasil) hasta el Golfo de San Matías (Argentina) con gran potencial para acuicultura (Sampaio et al., 2001, 2007, 2008; Radonic et al., 2007, 2016; López et al., 2009; Radonic y Macchi, 2009; Bolasina, 2011). Sin embargo, no se conoce aún el perfil digestivo y metabólico de adultos de esta especie. Así, faltan estudios de determinación y modulación de actividad de enzimas clave en intestino y de contenido de reservas en órganos de reserva. En juveniles de *P. orbignyanus* se determinó la actividad intestinal de amilasa y maltasa, así como su modulación diferencial luego de la ingesta de alimento. Esto sugiere la existencia de una batería bioquímica adecuada para llevar a cabo la hidrólisis completa de sustratos glucogénicos como almidón y glucógeno y de ajustes postprandiales diferenciales de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018).

En varias especies de peces el hígado y el músculo constituyen sitios de síntesis, almacenamiento y utilización de biomoléculas de reserva tales como glucógeno y triglicéridos, aunque la distribución y utilización de las mismas varía con la especie (del Valle et al., 2016; Rossi et al., 2017; Albanesi, 2018; Karatas, 2018)

En este capítulo se describen estudios para: a) determinar la actividad de carbohidrasas (amilasa y maltasa) en intestino anterior de individuos adultos de *P. orbignyanus* como indicador de la capacidad potencial para digerir sustratos glucogénicos; b) determinar la concentración de glucógeno y de glucosa libre en hígado y músculo de

individuos adultos de *P. orbignyana* para identificar sitios de almacenamiento; c) determinar las actividades de carbohidrasas (amilasa y maltasa) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de *P. orbignyana* para establecer la dinámica temporal postprandial; d) determinar la concentración de glucógeno y glucosa libre a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en hígado y músculo en individuos adultos de *P. orbignyana* para establecer la dinámica temporal postprandial e) establecer aspectos comparativos con individuos juveniles

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de animales

Se trabajó con individuos adultos de *P. orbignyana* nacidos en cautiverio en el Programa de Maricultura y Biología Experimental del Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Los individuos se mantuvieron en acuarios (100 l de agua continuamente aireada y filtrada, recirculación constante de agua) durante 15 meses en condiciones controladas de alimentación (alimento comercial Núcleo Alimentos MDQ S.R.L 41,8% hidratos de carbono; 46% proteínas; 2,8 % de lípidos; alimentados *ad libitum* tres veces al día (9:00, 12:00 and 15:00 h) y 6 veces por semana), salinidad (28 ups), fotoperíodo (12h de luz/12h de oscuridad) y temperatura (22±2°C). Para la determinación de la actividad de enzimas digestivas y el contenido de reservas de energía a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento, inmediatamente (t0) y a diferentes tiempos (24, 72

y 360 h) luego de la ingesta de alimento los individuos (n=6 por tiempo) fueron crioanestesiados y se procedió como se describe posteriormente para la determinación de la actividad de enzimas digestivas en intestino anterior y el contenido de reservas en hígado y músculo. Los diferentes tratamientos se llevaron a cabo en el INIDEP. Las determinaciones cuantitativas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología Bioquímica y Adaptativa, Departamento de Biología-IIMYC-CONICET-UNMDP. Para establecer posibles diferencias en la actividad específica en relación a la edad se compararon los valores determinados en individuos adultos (presente tesis) con los valores de individuos juveniles provenientes de la misma camada (Albanesi et al., 2017, 2018; Albanesi, 2018).

Preparación de homogenatos

Los individuos fueron crioanestesiados durante 10 min, pesados y medidos. Inmediatamente se extrajo intestino anterior, hígado y músculo estriado los cuales se colocaron en buffer Tris/HCl 50 mM pH 7,4 a 0°C (intestino anterior e hígado: 4 ml g⁻¹ de tejido; músculo: 8 ml g⁻¹ de tejido), se homogeneizaron en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Determinaciones cuantitativas

La actividad de amilasa se determinó colorimétricamente cuantificando la formación de maltosa a partir de almidón (Biesiot y Capuzzo, 1990) como describimos previamente (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018; Asaro et al., 2018). La actividad se determinó en un medio de reacción que contenía 15 mg ml⁻¹ de almidón en buffer fosfato

50mM (pH 7,4) a 30°C. La reacción se inició con la adición de una alícuota de muestra (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas). Después de 15 minutos, la reacción se detuvo con la adición de 1,5ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se realizó una incubación adicional durante 10 min a 100°C. Los tubos de ensayo se enfriaron inmediatamente en hielo. La cantidad de maltosa liberada fue determinada por lectura de absorbancia en 540 nm. La actividad de amilasa se expresó como μg de maltosa $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

La actividad de maltasa se determinó colorimétricamente cuantificando la formación de glucosa liberada por la hidrólisis de maltosa como se describió previamente (del Valle y López Mañanes, 2008, 2011; Pinoni et al., 2013; del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018; Asaro et al., 2018). La reacción se inició añadiendo una alícuota de la muestra correspondiente (zona de linealidad en el gráfico de actividad vs concentración de proteína) a una mezcla de reacción que contenía 42mM de maltosa en buffer malato 0,1M pH 6,4 (Asaro et al., 2011). Se incubó durante 10 minutos a 30°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 1,5 ml de reactivo de glicemia (glucosa oxidada 10 kU L, peroxidasa 1 kU, 1, 4- aminofenazona 0,5 mmol L $^{-1}$, fosfatos pH 7,0100 mmol L $^{-1}$, hidroxibenzoato 12 mmol L $^{-1}$) (Wiener Lab AA Kit, cod. 1400101). Luego de 5 minutos a 37°C, la cantidad de glucosa liberada se determinó por lectura de absorbancia en 505nm. La actividad enzimática de los disacáridos se expresó como μg de glucosa $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteínas $^{-1}$.

La concentración de glucógeno se determinó por hidrólisis de α -amiloglucosidasa acorde a Pinoni et al., (2011, 2013); del Valle et al., (2016); Albanesi, (2018). La correspondiente muestra se hirvió durante 4 minutos y luego se incubó en buffer acetato (pH 4,8) en presencia y ausencia de $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ de α -amiloglucosidasa durante 2,5 h a 55°C . Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. La glucosa fue cuantificada en el sobrenadante utilizando el kit comercial para glicemia enzimática. La glucosa liberada del glucógeno se determinó como la diferencia entre los ensayos con y sin enzima. Los resultados se presentaron como mg de glucosa x g de tejido⁻¹. La concentración de glucosa libre se determinó mediante el ensayo en ausencia de α -amiloglucosidasa.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se realizaron análisis, t-test o One-Way ANOVA, para estimar diferencias estadísticas. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

RESULTADOS

Actividad de carbohidrasas en intestino anterior de adultos de P. orbignyana

Actividad de amilasa

El intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* exhibió actividad de amilasa (Tabla 4.1).

No se encontraron diferencias en la actividad específica de amilasa detectada en intestino anterior de adultos con respecto al valor en juveniles (Tabla 4.1).

Actividad de maltasa

El intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* exhibió actividad de maltasa (Tabla 4.1).

La actividad específica de maltasa en intestino anterior de adultos fue similar al valor en juveniles (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Actividad de amilasa y maltasa en intestino anterior de adultos y juveniles de *P. orbignyana*.

	Adultos	Juveniles*
Actividad Específica de Amilasa (μg maltosa \times min^{-1} \times mg prot^{-1})	126 \pm 14	98 \pm 10
Actividad Específica de Maltasa (μg glucosa \times min^{-1} \times mg prot^{-1})	288 \pm 36	292 \pm 32

*Albanesi, 2018

Los datos son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado y músculo de adultos de P. orbignyana

Glucógeno

Se detectó glucógeno en hígado y músculo de adultos de *P. orbignyana* aunque en músculo la concentración fue muy baja (Figura 4.1).

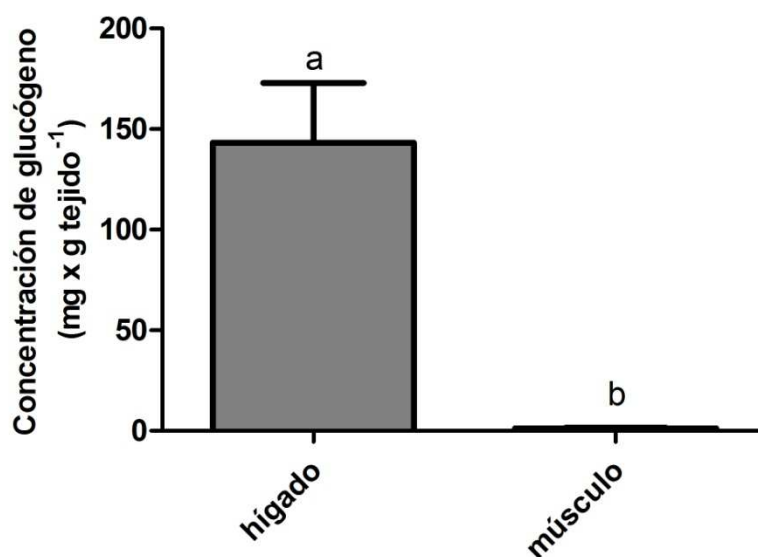


Figura 4.1. Concentración de glucógeno en hígado y músculo en adultos de *P. orbignyana*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tejidos (t-test; $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Glucosa libre

Se detectó una alta concentración de glucosa libre en hígado de adultos de *P. orbignyana*, mientras que en músculo dicha concentración fue muy baja (Figura 4.2).

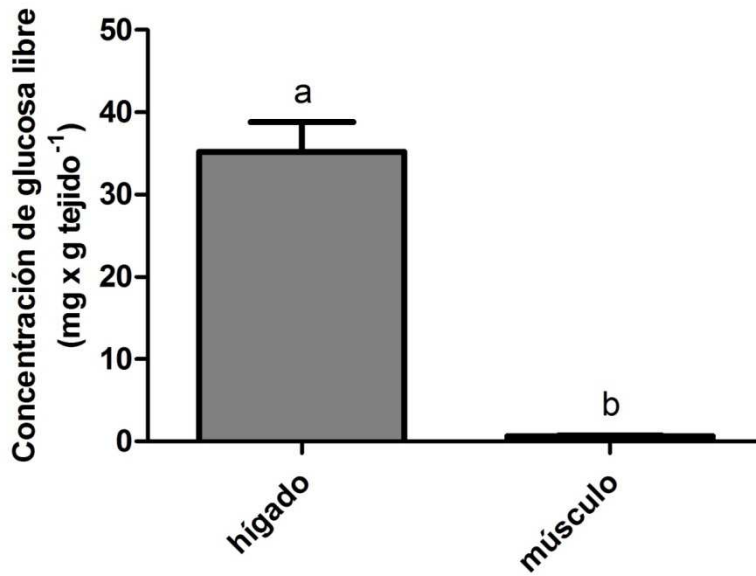


Figura 4.2. Concentración de glucosa libre en hígado y músculo en adultos de *P. orbignyana*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tejidos (t-test; $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Actividad de carbohidrasas en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyana

Actividad de amilasa

A las 24 h luego de la ingesta de alimento la actividad de amilasa en intestino anterior disminuyó (aproximadamente un 35 %) con respecto al valor a t₀. A tiempos más largos, 72 y 360 h, la actividad de amilasa, continuó decreciendo (alrededor de un 58 y 73% respectivamente) con respecto a t₀ (Figura 4.3).

La dinámica temporal de la disminución postingesta de la actividad de amilasa en intestino anterior de adultos fue diferente a la descrita en juveniles (Recuadro figura 4.3).

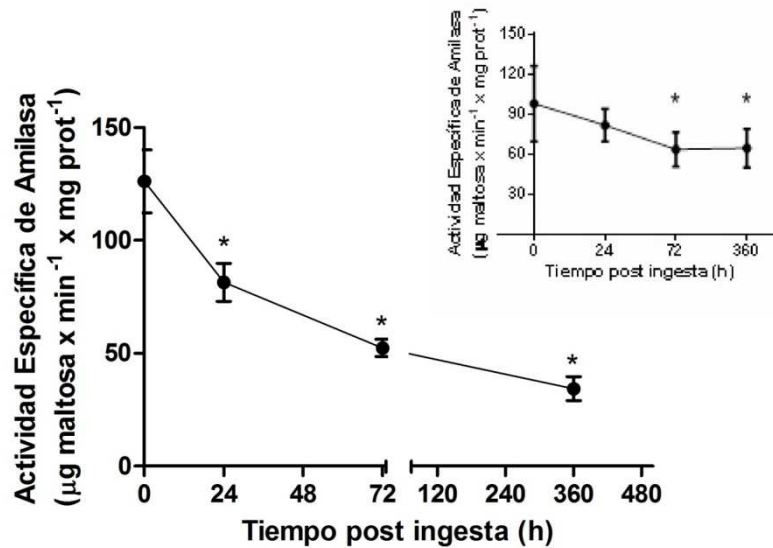


Figura 4.3. Actividad de amilasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Actividad de amilasa en intestino anterior de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Actividad de maltasa

La actividad de maltasa en intestino anterior a las 24 h luego de la ingesta de alimento fue similar a la actividad a t0. Luego de 72 h de la ingesta, la actividad disminuyó (alrededor de un 58 %) respecto a t0 y se mantuvo constante a las 360 h (Figura 4.4).

La respuesta postingesta de la actividad de maltasa en intestino anterior de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 4.4).

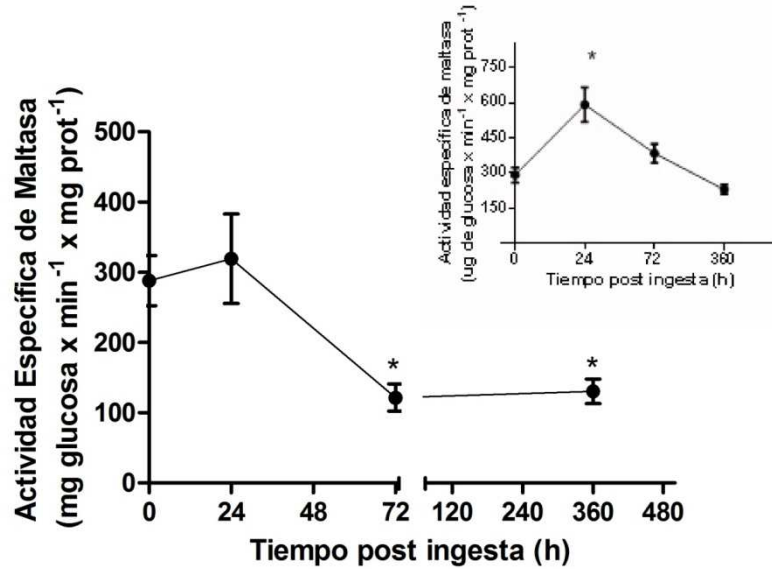


Figura 4.4. Actividad de maltasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Actividad de maltasa en intestino anterior de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyana

Glucógeno

La concentración de glucógeno en hígado fue similar en todos los tiempos estudiados (Figura 4.5).

La respuesta postingesta de la concentración de glucógeno en hígado de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 4.5).

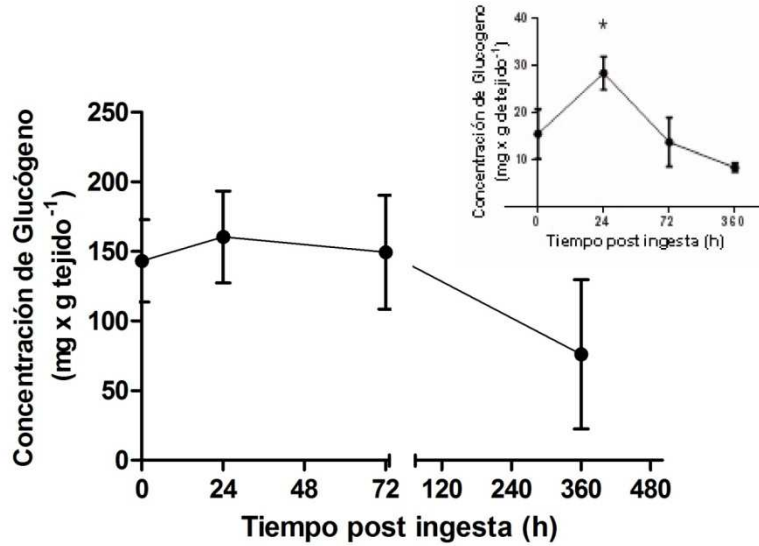


Figura 4.5. Concentración de glucógeno en hígado de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de glucógeno en hígado de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Glucosa libre

En hígado, la concentración de glucosa libre a las 24 h luego de la ingesta de alimento se mantuvo a niveles similares a los encontrados a t0. La concentración de glucosa libre fue mayor que t0 (aproximadamente un 77%) 72 h luego de la ingesta de alimento. A las 360 h disminuyó hasta valores similares a t0 (Figura 4.6).

La respuesta postingesta de la concentración de glucosa libre en hígado de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 4.6).

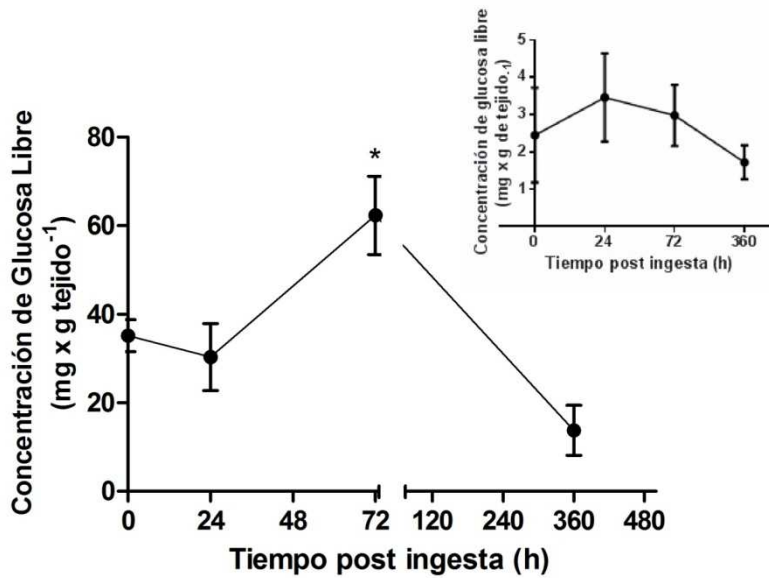


Figura 4.6. Concentración de glucosa libre en hígado de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de glucosa libre en hígado de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

*Concentración de glucógeno y glucosa libre en músculo a diferentes tiempos
luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyanus*

Glucógeno

La concentración de glucógeno en músculo fue similar a todos los tiempos postingesta (Figura 4.7).

La respuesta postingesta de la concentración de glucógeno en músculo de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 4.7).

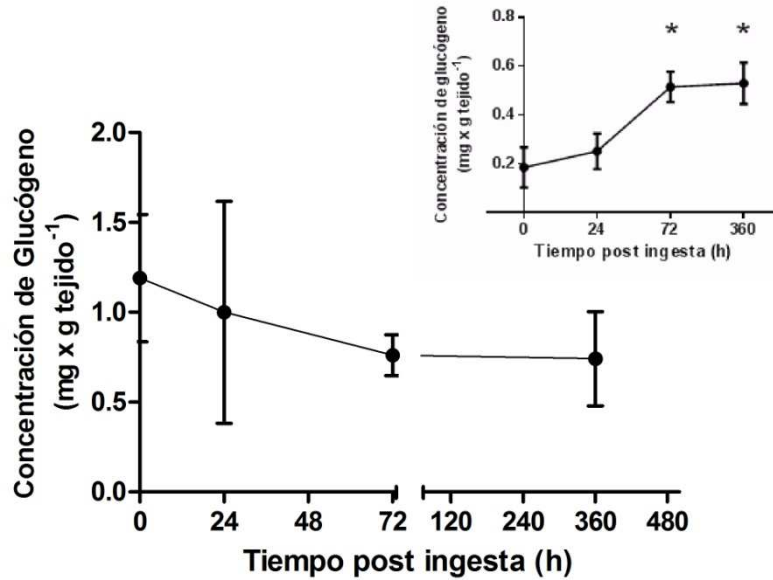


Figura 4.7. Concentración de glucógeno en músculo de adultos de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de glucógeno en músculo de juveniles de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). Los valores son la media \pm E.S. para 6 individuos.

Glucosa libre

A las 24 y 72 h postingesta la concentración de glucosa libre en músculo fue similar a t0. A las 360 h luego de la ingesta de alimento la concentración de glucosa libre en músculo disminuyó (aproximadamente un 57%) (Figura 4.8).

La respuesta postingesta de la concentración de glucosa libre en músculo de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 4.8).

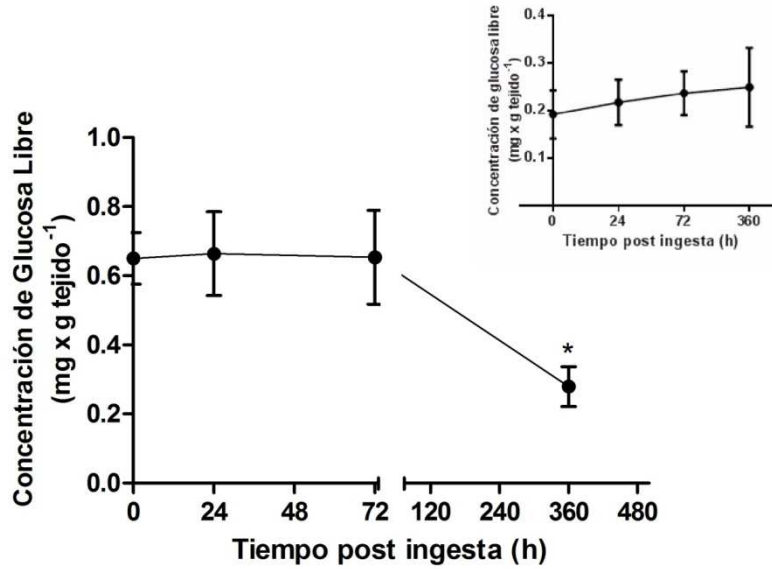


Figura 4.8. Concentración de glucosa libre en músculo de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de glucosa libre en músculo de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (One-Way ANOVA, $p < 0,05$; test a posteriori Bonferroni). Los valores son la media \pm E.S. para 6 individuos.

DISCUSIÓN

La existencia de actividad de amilasa y de maltasa en intestino anterior y el contenido de glucógeno sugiere que individuos adultos de *P. orbignyanus* exhiben una adecuada batería digestiva a nivel bioquímico para la hidrólisis completa de sustratos glucogénicos como almidón y glucógeno y capacidad para el almacenamiento y/o utilización de sustratos de reserva en hígado y músculo.

La presencia y/o niveles de actividad de amilasa en intestino de peces son muy variables. En general, altos niveles en el tracto digestivo de actividad de enzimas que degradan hidratos de carbono (ej. amilasa) son típicos de individuos omnívoros y herbívoros (Sanz y Zamora, 2009; Bakke et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Chen et al., 2018; Steinberg, 2018). Sin embargo, en varias especies carnívoras, se han detectado altos niveles de actividad de amilasa en intestino. En diferentes animales, se sabe que la amilasa, además de poseer capacidad amilolítica, tiene la capacidad de degradar glucógeno (Dutta et al., 2006; Asaro et al., 2017). En este contexto, debido a que el almidón es un sustrato dietario poco común para los peces en el ambiente natural, se piensa que el rol principal para la amilasa consistiría en la degradación del glucógeno presente en ítems animales ingeridos. Este podría ser el caso para *P. orbignyanus*. *P. orbignyanus* ha sido descrito como un predador activo, no selectivo, que se alimenta en o cerca del fondo (Carneiro, 1995; Rivera-Prisco et al., 2001; Díaz de Astarloa, 2002). En la Laguna Costera

Mar Chiquita, la dieta de juveniles de *P. orbignyanus* se basa principalmente en crustáceos y poliquetos mientras que los adultos se alimentan principalmente de especies pelágicas y bentónicas de crustáceos de mayor tamaño y también de peces (Rivera-Prisco et al., 2001). La maltasa (disacaridasa de membrana en borde estriado en enterocitos) posee un papel principal en las etapas iniciales de la digestión de hidratos de carbono glucogénicos asistiendo a la amilasa y en los pasos finales para producir glucosa (Dhital et al., 2013; Lin et al., 2016). Varias especies de peces carnívoros y omnívoros exhiben actividad de maltasa en intestino (Ballantyne, 2014; Gioda et al., 2017; Steimberg, 2018). La existencia de actividad de maltasa en intestino de adultos de *P. orbignyanus*, además de indicar la capacidad de la digestión final de hidratos de carbono, permitiría el potencial uso de disacáridos de la dieta tal como se sugiere en juveniles de esta especie (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018). En varias especies de peces planos marinos se ha reportado una diferente tolerancia a los hidratos de carbono de la dieta (Hamre et al., 2003; Salas-Leiton et al., 2018). En este contexto, y similarmente a juveniles (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018), individuos adultos de *P. orbignyanus* serían capaces de tener dietas con alto contenido de carbohidratos ($\geq 20\%$ de hidratos de carbono) (Xu et al., 2017), este hecho resulta de marcada importancia para la potencial aplicación en acuicultura (Al-Gharrawi et al., 2019; Ma et al., 2019; Pujante, 2019). La incorporación de hidratos de carbono en la dieta no solamente puede promover el crecimiento en algunas especies de peces, sino que también, podría proporcionar intermediarios metabólicos para la síntesis de otros compuestos biológicamente importantes (Ballantyne, 2014; Sanz et al., 2015; Mente et al., 2017; Xu et al., 2017). Se ha sugerido que varias especies de peces carnívoros poseen

potencial flexibilidad para la utilización de glucosa en condiciones de disponibilidad limitada de lípidos o proteínas o en condiciones de privación de alimento (Yang et al., 2019).

La similar actividad específica de amilasa y maltasa en intestino sugiere una misma capacidad para la digestión completa de hidratos de carbono glucogénicos tales como almidón y glucógeno en juveniles y adultos de *P. orbignyanus*. La realización de estudios integrativos y comparativos sobre el perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico durante la ontogenia constituye una herramienta fundamental, particularmente en especies de peces de importancia ecológica y/o económica para la comprensión de ajustes y/o cambios en relación con el ciclo de vida. Así, determinar la existencia y/o modulación de actividad de enzimas digestivas específicas en intestino de individuos juveniles y adultos permite conocer las posibles diferencias y/o cambios en el perfil digestivo a nivel bioquímico en relación a la edad y de esta manera poder establecer condiciones adecuadas de alimentación e indicadores del estado nutricional en diferentes etapas del desarrollo (Moyano López, 2006; Bakke et al., 2011; Pujante et al., 2017). Resulta evidente la importancia de este tipo de estudios por su potencial aplicación en acuicultura (Pujante et al., 2017; Sanchez Hernandez et al., 2018).

El período postprandial se refiere a las respuestas a nivel fisiológico y bioquímico luego de la ingesta de alimento (McCue, 2006; Secor, 2001). Determinar la actividad de enzimas digestivas específicas y la concentración de reservas de energía a diferentes tiempos luego de la alimentación permite establecer la dinámica temporal postprandial y/o

efectos de diferentes tiempos de privación de alimento sobre componentes claves del metabolismo de las principales macromoléculas (ej. hidratos de carbono). En peces, como en otros animales, los nutrientes y la energía obtenidos a través de la ingesta y procesamiento del alimento juegan un papel importante en diversos procesos metabólicos y en el mantenimiento de la homeostasis (Bakke et al., 2011; Hixson, 2014; Choi et al., 2018). Por lo tanto, la privación de alimento puede tener efectos negativos sobre el metabolismo y la fisiología de peces (Shan et al., 2008; Choi et al., 2012; Yang et al., 2019). La menor actividad de amilasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* a las 24 h y el mantenimiento en valores menores a t_0 hasta las 360 h luego de la ingesta de alimento sugiere la existencia de ajustes postprandiales en pasos iniciales de la digestión de hidratos de carbono (ej. una disminución en la capacidad hidrolítica para sustratos específicos tales como almidón/glucógeno). La disminución de la actividad de maltasa en intestino anterior de individuos adultos de *P. orbignyanus* a las 72 h luego de la ingesta de alimento y el mantenimiento en niveles similares a las 360 h podrían relacionarse con ajustes (ej. menor capacidad) para la digestión final de hidratos de carbono glucogénicos. El mantenimiento de la actividad de maltasa en valores similares a t_0 a las 24 h, tiempo al cual se observó una disminución de la actividad de amilasa, sugiere la existencia de modulación temporal diferencial de distintas etapas de la digestión de hidratos de carbono dietarios y por ende, en la capacidad digestiva para sustratos específicos. Por otro lado, la disminución de la actividad de maltasa coincidentemente con la menor actividad de amilasa a las 72 y 360 h sugiere la existencia de ajustes postprandiales coordinados de componentes principales de la digestión de hidratos de carbono en intestino anterior de adultos de *P.*

orbignyanus. En varias especies de peces teleósteos se ha observado la modulación de enzimas digestivas específicas en respuesta a diferentes tiempos de privación de alimento, aunque los ajustes parecen ser especie-específicos (Grosell et al., 2011; Yúfera et al., 2012; Ballantyne, 2014; Aslam et al., 2018; Vizcaino et al., 2018). En intestino de diferentes especies de peces se ha reportado la modulación de la actividad de amilasa aunque la disminución comienza a producirse a partir de la segunda semana de privación de alimento (Sanz, 2009). Las diferentes respuestas temporales de la actividad de amilasa y las diferencias cualitativas en la respuesta de la actividad de maltasa (aumento de la actividad a las 24 h luego de la ingesta de alimento y valores similares a t0 a tiempos prolongados en juveniles) sugieren diferencias intraespecíficas en la dinámica para la digestión de hidratos de carbono glucogénicos en relación a la edad. Si estas diferencias se deben a diferentes rutas metabólicas y/o distinta utilización de las mismas o a la existencia de diferentes mecanismos de regulación (ej. mensajeros químicos) en juveniles y adultos requiere mayor investigación.

El hígado desempeña un papel central en la homeostasis de glucosa de varias especies de peces (Tseng y Hwang, 2008; Polakof et al., 2012; Chen et al., 2018; Steinberg, 2018). Similarmente a juveniles (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018) el hígado de adultos de *P. orbignyanus* constituiría un sitio principal de reserva de glucógeno. El alto contenido de glucosa libre en el hígado sugiere un rol en el mantenimiento de un adecuado y sostenido suministro de glucosa. Sin embargo, a diferencia de juveniles (Albanesi, 2018) no se observaron cambios en la concentración de glucógeno luego de la ingesta de alimento a ninguno de los tiempos estudiados, sugiriendo la existencia de diferencias intraespecíficas

en el metabolismo postprandial de hidratos de carbono en hígado. El aumento de la concentración de glucosa libre en hígado de adultos a las 72 h luego de la ingesta de alimento sugeriría la modulación postprandial de vías gluconeogénicas para la construcción de glucógeno y/o la utilización de glucosa en otras vías metabólicas. En hígado de varias especies de peces se ha demostrado que ocurre una modulación postprandial a diferentes niveles (expresión, cantidad y/o actividad) de enzimas involucradas en la ruta de síntesis de glucógeno y/o vías gluconeogénicas (Chen et al., 2017; Conde-Sieira y Soegas, 2017; Yang et al., 2019). La disminución en la actividad de amilasa y maltasa en intestino y, consecuentemente, la disminución potencial en la capacidad digestiva de hidratos de carbono soportan aún más la idea de la posible utilización de glucosa de otras fuentes para sostener las reservas de glucógeno y/u otras vías metabólicas en hígado de adultos de *P. orbignyanus*. En varias especies de peces teleósteos, los requerimientos de glucosa en situaciones de baja disponibilidad de este metabolito son cubiertos principalmente mediante movilización de reservas de glucógeno y/o por la síntesis *de novo* de glucosa por vías gluconeogénicas en hígado (Polakof et al., 2012; Yang et al., 2019). Por otro lado, el hígado constituye una fuente principal de glucosa para otros órganos y/o tejidos modificando el flujo neto de glucosa mediante el ajuste en forma sincronizada de vías de producción y de utilización (Enes et al., 2009; Polakoff et al., 2012; Chen et al., 2018; Yang et al., 2019). La concentración de glucosa en el hígado se mantiene en equilibrio con la glucosa circulante vía la actividad de transportadores de membrana (Castillo et al., 2009; Liang et al., 2018). La disminución en la concentración de glucosa libre en hígado de adultos de *P. orbignyanus* a las 360 h sugiere el rol del hígado como fuente de glucosa a

tiempos prolongados postingesta. En peces teleósteos, el músculo esquelético es un sitio principal de entrada de glucosa mediante la modulación de la actividad y/o cantidad de un transportador de membrana específico (Marin-Juez et al., 2013). El mantenimiento de los niveles de glucógeno y la marcada disminución en la concentración de glucosa libre en músculo luego de 360 h de la ingesta de alimento podría sugerir la idea de la utilización de glucosa proveniente de otros tejidos para el mantenimiento de los niveles de glucógeno en músculo de adultos de *P. orbignyanus*. Similarmente a lo observado para la actividad de amilasa y maltasa en intestino anterior, individuos adultos de *P. orbignyanus* exhibieron respuestas diferenciales luego de la ingesta de alimento en la concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado y músculo a la de juveniles, apoyando la idea de la existencia de diferentes ajustes postprandiales en componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono en relación a la edad.

El ayuno representa una situación extrema de privación de alimento que muchas especies de peces deben tolerar tanto en el ambiente natural como en condiciones controladas (Navarro y Gutiérrez, 1995; Miller et al., 2009; Zaldúa y Naya, 2014; Yang et al., 2019). Para sobrevivir al mismo, varias especies de peces movilizan reservas de energía enfrentado el requerimiento energético en los procesos al menos vitales (Salem et al., 2007; Furné et al., 2012; Yang et al., 2019). Sin embargo, los estudios para evaluar la dinámica de los cambios metabólicos involucrados en la transición de la alimentación al ayuno (ayuno postprandial) son escasos y fragmentarios (Yang et al., 2019). Los resultados de este capítulo sugerirían, que tomando como parámetro la concentración de glucógeno en hígado y músculo, un tiempo de privación de alimento de 360 h no representaría una situación de

ayuno para adultos de *P. orbignyana* similarmente a lo observado en juveniles (Albanesi, 2018).

En conclusión, la existencia de actividad de amilasa y de maltasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* sugiere su potencial capacidad para la digestión de diferentes tipos de carbohidratos glucogénicos (almidón, glucógeno, dextrina y maltosa), así como el rol del intestino anterior en pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y absorción de metabolitos resultantes (ej. glucosa). Las respuestas de la actividad de amilasa y de maltasa en intestino anterior y de la concentración de glucosa libre en hígado y músculo luego de la ingesta de alimento sugieren la existencia de ajustes digestivos y metabólicos postprandiales diferenciales en componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono en adultos de *P. orbignyana*.

CAPÍTULO 5:

Perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico de adultos del lenguado *Paralichthys orbignyanus*: actividad de proteasas y lipasa en intestino y concentración de proteínas y triglicéridos en órganos de reserva

INTRODUCCIÓN

A pesar de las diferencias en las dietas en el ambiente natural, la mayoría de especies de peces estudiadas muestran, en general, capacidad para utilizar diferentes componentes dietarios para hacer frente a los requerimientos de energía y nutrientes (Raubenheimer et al., 2009; Bakke et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Steimberg, 2018). Al ocurrir un vínculo entre la digestión y absorción de nutrientes, resulta evidente la importancia de determinar la existencia y/o modulación de la actividad de enzimas digestivas específicas en tracto digestivo para establecer la capacidad de un animal en utilizar diferentes sustratos dietarios y los posibles ajustes en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales (del Valle y López Mañanes, 2011, 2012; Karasov y Douglas, 2013; Sanz et al., 2015).

Conocer la existencia y/o modulación de proteasas claves en intestino anterior de peces (sitio principal de digestión proteica y absorción de productos resultantes tales como aminoácidos y oligopéptidos) (Bakke et al., 2011; Steimberg, 2018) resulta esencial como parámetro para evaluar la potencial capacidad digestiva proteolítica. La endopeptidasa tripsina (EC 3.4.21.4) es una de las proteasas más importantes en el tracto digestivo de mamíferos y de varias especies de vertebrados no mamíferos (Sainz, 2004; Vandermarliere et al., 2013, Perera et al., 2015; Rittschoff, 2017). Este parece ser el caso también para intestino de varias especies de peces teleósteos (Bakke et al., 2011; Steinberg, 2018). La N-aminopeptidasa (APN) (E.C. 3.4.11.2) es una ectopeptidasa que juega un rol esencial en los pasos finales de la digestión proteica produciendo di/tripéptidos y aminoácidos libres

(Alpers, 1987; Mentlein, 2004; Goodman, 2010; Fairweather et al., 2012; Michiels et al., 2015a; Wanat et al., 2019). La N-aminopeptidasa se utiliza como indicador de la capacidad de digerir proteínas (Ramirez-Otarola et al., 2011, 2018). La determinación de la actividad de proteasas específicas en intestino es particularmente importante para el caso de especies de peces cultivadas, ya que las proteínas deben incorporarse a las dietas en niveles adecuados para alcanzar un crecimiento y mantenimiento normales, pero un exceso puede ser perjudicial para el organismo (Rahman et al., 2017; Baloch et al., 2019; Mo et al., 2019).

Por otro lado, la incorporación de lípidos y/o de hidratos de carbono en la dieta en un nivel adecuado pueden minimizar el uso de proteínas como fuente de energía (Rahman et al., 2017; Yang et al., 2019). En base a esto, resulta de fundamental importancia conocer la existencia de actividad de carbohidrasas (ver capítulo 4 de la presente tesis) y de lipasa en intestino de peces teleósteos en general y en particular en especies de interés económico y con potencial para acuicultura. Varias especies de peces teleósteos, utilizan lípidos como fuentes de energía para el mantenimiento de diversos procesos fisiológicos, el crecimiento, la reproducción y el movimiento (Tocher, 2003; Sandre et al., 2017; Steimberg, 2018). En este contexto, los niveles y/o modulación de la actividad de lipasa en intestino determinarán la capacidad para la digestión y utilización de lípidos dietarios. En animales, las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) tienen una importancia fisiológica central debido a su papel en la digestión de lípidos dietarios hasta moléculas pequeñas que puedan ser absorbidas (Casas-Godoy et al., 2012; Karasov y Douglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Castro, 2015, 2016; Michiels et al., 2015b; Sarmah et al., 2018; Negi, 2019).

En varias especies de peces se ha determinado la presencia de actividad de lipasa en intestino y que la absorción de productos de la digestión se realiza, principalmente, a nivel del intestino anterior (Kurtovic et al., 2009; Bakke et al., 2011; Steimberg, 2018).

En este capítulo se describen estudios para, a) determinar la existencia de actividad de tripsina, APN y lipasa, en intestino anterior de individuos adultos de *P. orbignyanus* como indicador de la capacidad potencial para la digestión de proteínas y lípidos dietarios respectivamente.; b) determinar la concentración de proteínas y triglicéridos en hígado y músculo de individuos adultos de *P. orbignyanus*, para establecer sitios de almacenamiento y c) determinar la actividad de tripsina, APN y lipasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de *P. orbignyanus*, para evaluar la dinámica temporal postprandial d) determinar la concentración de proteínas y triglicéridos a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en órganos de reserva en individuos adultos de *P. orbignyanus* para determinar posibles ajustes metabólicos postprandiales e) establecer aspectos comparativos con individuos juveniles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de animales

Se procedió según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 4 de la presente tesis.

Preparación de homogenatos

Se realizó según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 4 de la presente tesis.

Determinaciones cuantitativas

La actividad de tripsina se determinó utilizando N- α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide (BAPNA) como sustrato (Candiotta et al., 2018) con modificaciones (Michiels et al., 2017). La reacción se inició mediante la adición de sustrato (concentración final 1,23 mM) a una mezcla de reacción que contuvo Cl_2Ca 400mM y una alícuota de la muestra correspondiente (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas) en 50 mM buffer Tris/HCl pH 9. Se incubó a 45°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo por la adición de 250 μl de KOH 0,1M. La concentración se midió en 405 nm.

La actividad de APN se determinó usando como sustrato L-alanine-p-nitroanilide (L-Ala pNA) (Roncari y Zuber, 1969) con modificaciones (Michiels et al., 2015a, 2017; del Valle et al., 2016). La reacción se inició mediante la adición de sustrato (concentración final 0,33mM) a una mezcla de reacción que contenía una alícuota de la muestra correspondiente (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas) en buffer Tris-HCl 50mM a pH 7,4. Se incubó a 45°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 0,2 ml de ácido acético frío 2M. La absorbancia se midió en 384 nm.

La actividad de lipasa se determinó colorimétricamente por cuantificación del p-nitrofenol (pNP) liberado a partir de p-nitrofenilpalmitato (pNPP) (Michiels et al., 2013; del Valle et al., 2016). La reacción se inició mediante la adición de pNPP (concentración final 0,85mM) a una reacción conteniendo una alícuota de la muestra correspondiente (zona de linealidad de la curva de actividad vs concentración de proteínas) en Tris-HCl 50mM pH 8,5. Se incubó a 37°C durante 5 minutos. La reacción se interrumpió con el agregado de 0,5 ml de TCA 0,1 % v/v. La cantidad de p-nitrofenol liberado se cuantificó por lectura de absorbancia en 410 nm. La actividad de lipasa se expresó como $\mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

La concentración de triglicéridos se midió por el método colorimétrico de glicerol fosfato oxidasa (TAG Wiener-Lab AA cod. 861110001). Una alícuota de la muestra correspondiente se incubó con este reactivo durante 5 minutos a 37°C (Pinoni et al., 2011; Michiels et al., 2015b; Albanesi, 2018). La cantidad de glicerol liberado se determinó leyendo la absorbancia en 505 nm del complejo coloreado de quinona.

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

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se realizaron análisis paramétricos, t-test o One-Way ANOVA, para estimar

diferencias estadísticas. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

RESULTADOS

*Actividad de proteasas en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus**

Actividad de tripsina

El intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* exhibió actividad de tripsina (Tabla 5.1).

No se encontraron diferencias entre la actividad específica de tripsina en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* y el correspondiente valor en juveniles (Tabla 5.1).

Actividad de APN

El intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* exhibió actividad de APN (Tabla 5.1).

La actividad específica de APN en intestino de adultos fue menor a la actividad en intestino anterior de juveniles (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Actividades de tripsina y APN en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana*: comparación con actividad específica en intestino de juveniles

	Adultos	Juveniles*
Tripsina ($\mu\text{moles p-nitroanilina} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ proteína ⁻¹)	60 \pm 12	68 \pm 10
APN ($\mu\text{moles p-nitroanilina} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ proteína ⁻¹)	0,17 \pm 0,021*	1 \pm 0,1

* Albanesi, 2018

* indica diferencias significativas con el correspondiente valor en juveniles (t.test; $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Actividad de lipasa en intestino anterior de adultos de P. orbignyana

El intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* exhibió actividad de lipasa (Tabla 5.2).

La actividad específica de lipasa encontrada en el intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* fue mayor a la actividad en intestino anterior de juveniles (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Actividad de lipasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana*: comparación con actividad específica en intestino de juveniles

	Adultos	Juveniles*
Actividad Específica de Lipasa ($\mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	665 \pm 95*	5 \pm 0,4

* Albanesi, 2018

* indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en juveniles (t-test; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

*Concentración de proteínas en hígado y músculo de adultos de *P. orbignyana**

La concentración de proteínas fue mayor (aproximadamente 50%) en hígado que en músculo de adultos de *P. orbignyana*. (Figura 5.1).

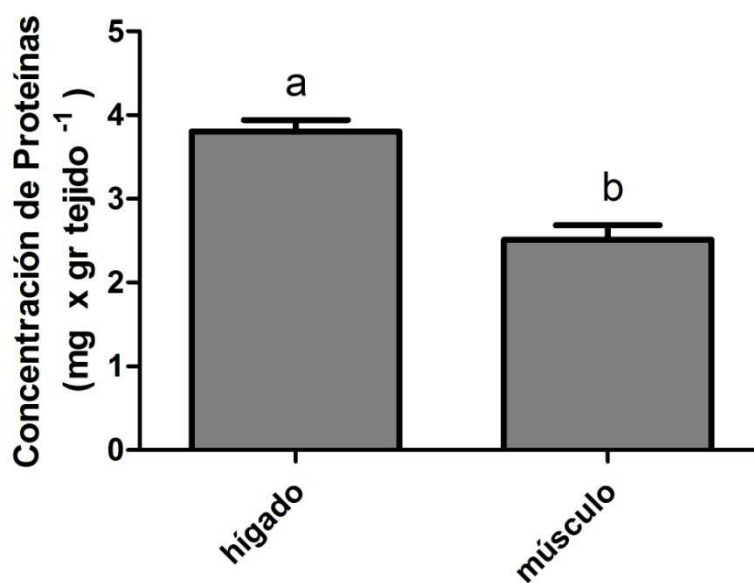


Figura 5.1. Concentración de proteínas en hígado y músculo en adultos de *P. orbignyanus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tejidos (t-test: $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Concentración de triglicéridos en hígado y músculo de adultos de P. orbignyanus

La concentración de triglicéridos fue varias veces mayor (2000%) en hígado que en músculo de adultos de *P. orbignyanus* (Figura 5.2).

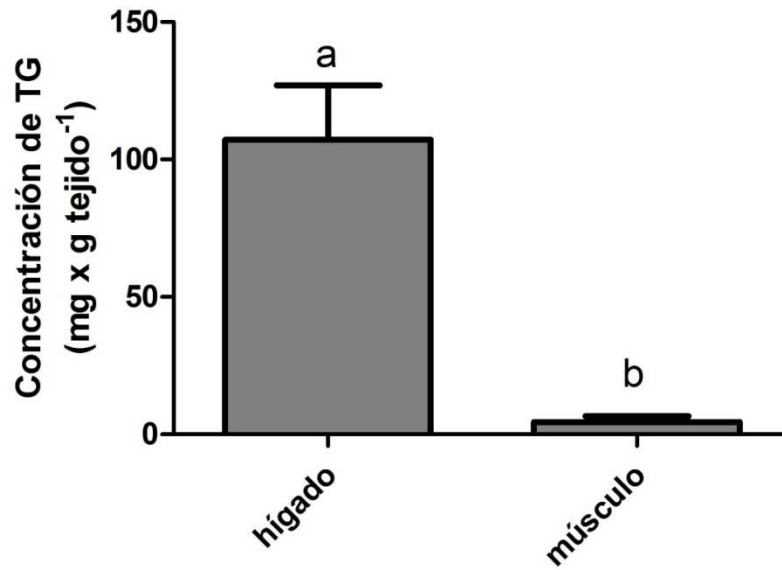


Figura 5.2. Concentración de triglicéridos en hígado y músculo en adultos de *P. orbignyana*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tejidos (t-test; $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Actividad de proteasas en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyana

Actividad de tripsina

La actividad de tripsina en intestino anterior disminuyó (aproximadamente 60%) a las 24 h luego de la ingesta de alimento y se mantuvo constante hasta las 72. A las 360 h la actividad fue similar a t0 (Figura 5.3).

La dinámica temporal de la disminución postingesta de la actividad de tripsina en intestino anterior de adultos fue diferente a la descrita en juveniles (Recuadro figura 5.3).

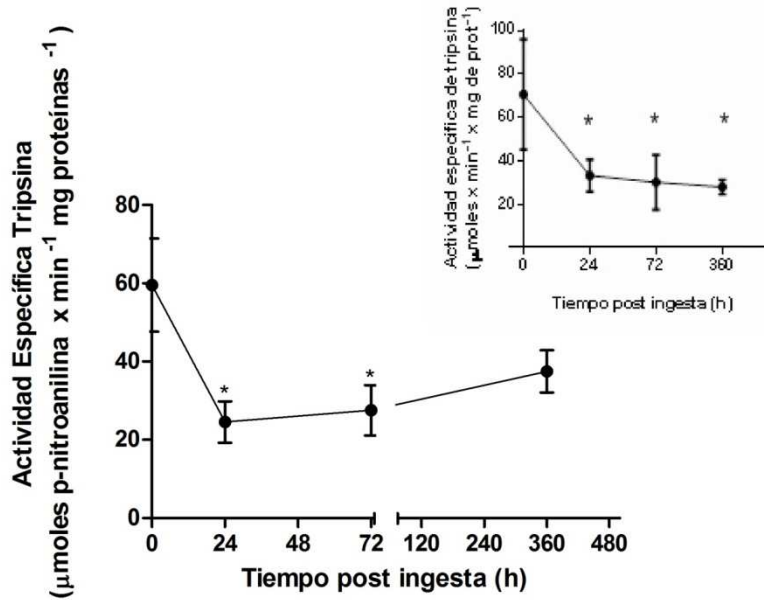


Figura 5.3. Actividad de tripsina en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Actividad de tripsina en intestino anterior de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Actividad de APN

La actividad de APN a las 24 h luego de la ingesta fue mayor (188%) a la correspondiente actividad a t0. A las 72 h la actividad disminuyó hasta valores similares a los observados para t0 y se mantuvo constante hasta las 360 h (Figura 5.4).

La respuesta postingesta de la actividad de APN de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 5.4).

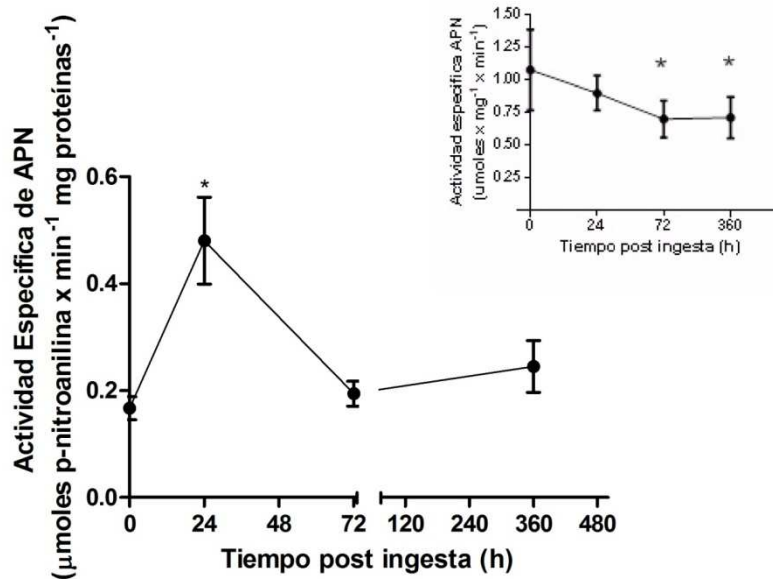


Figura 5.4. Actividad de APN en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Actividad de APN en intestino anterior de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Concentración de proteínas en hígado y músculo a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyana

Hígado

La concentración de proteínas en hígado no varió luego de la ingesta de alimento a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 5.5).

La respuesta postingesta de la concentración de proteínas en hígado de adultos difirió a la de individuos juveniles (Recuadro figura 5.5).

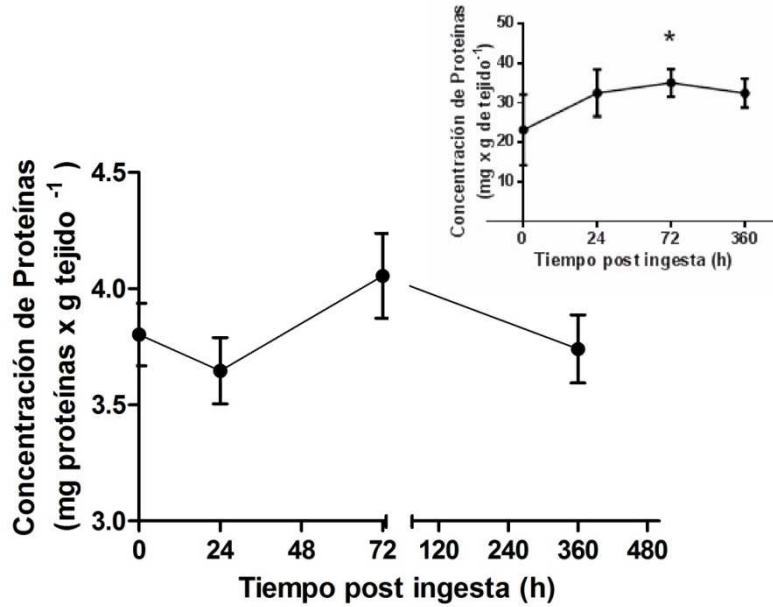


Figura 5.5. Concentración de proteínas en hígado de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de proteínas en hígado de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 5-6 individuos.

Músculo

No se observaron diferencias en la concentración de proteínas en músculo luego de la ingesta de alimento a los tiempos estudiados (Figura 5.6).

La respuesta postingesta de la concentración de proteínas en músculo de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 5.6).

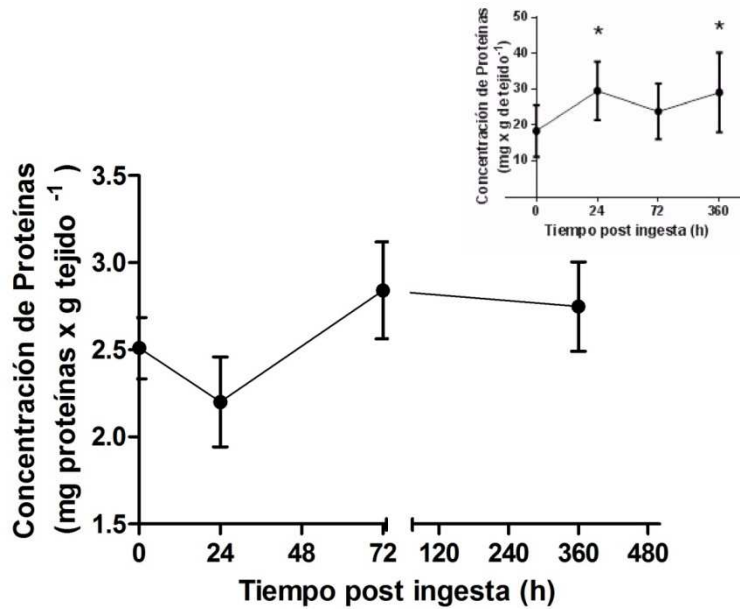


Figura 5.6. Concentración de proteínas en músculo de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de proteínas en músculo de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 6 individuos.

Actividad de lipasa en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyanus

La actividad de lipasa disminuyó (aproximadamente 55%) a las 24 h luego de la ingesta de alimento. A las 72 h la actividad aumentó hasta valores similares a t0 manteniéndose constante hasta las 360 h (Figura 5.7).

La respuesta postprandial de la actividad de lipasa en intestino anterior de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 5.7).

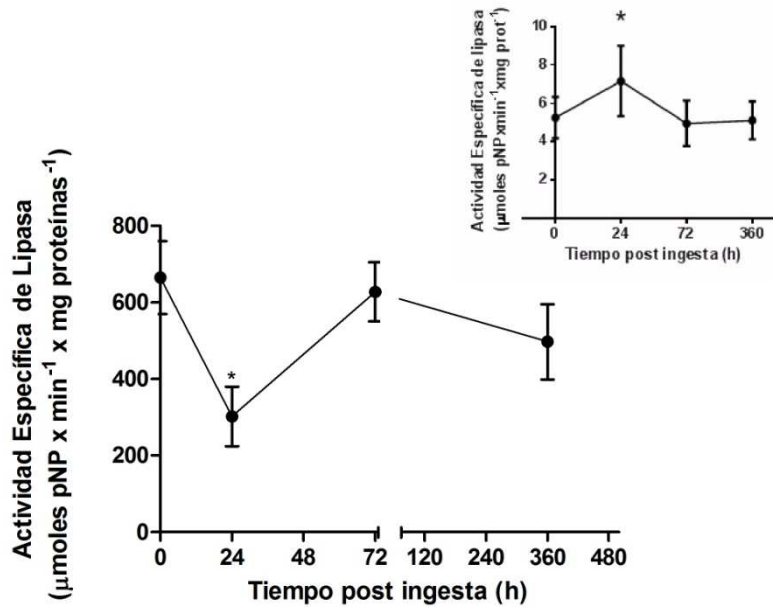


Figura 5.7. Actividad de lipasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Actividad de lipasa en intestino anterior de juveniles de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Concentración de triglicéridos en hígado y músculo a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos adultos de P. orbignyanus

Hígado

La concentración de triglicéridos en hígado no varió luego de la ingesta de alimento a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 5.8).

La respuesta postingesta de la concentración de triglicéridos en hígado de adultos fue diferente a la de individuos juveniles (Recuadro figura 5.8).

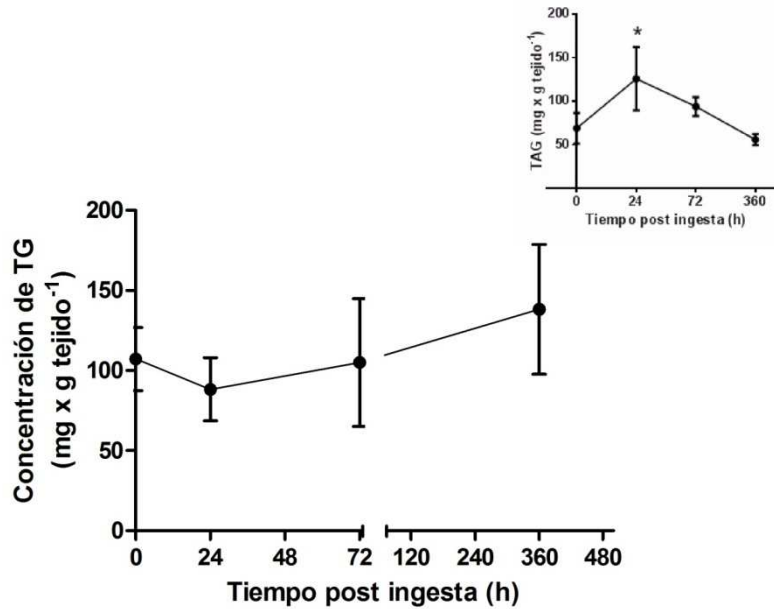


Figura 5.8. Concentración de triglicéridos en hígado de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de triglicéridos en hígado de juveniles de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 4-6 individuos.

Músculo

La concentración de triglicéridos en músculo no varió luego de la ingesta de alimento a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 5.9).

La respuesta postingesta de la concentración de triglicéridos en hígado de adultos difirió a la encontrada en juveniles (Recuadro figura 5.9).

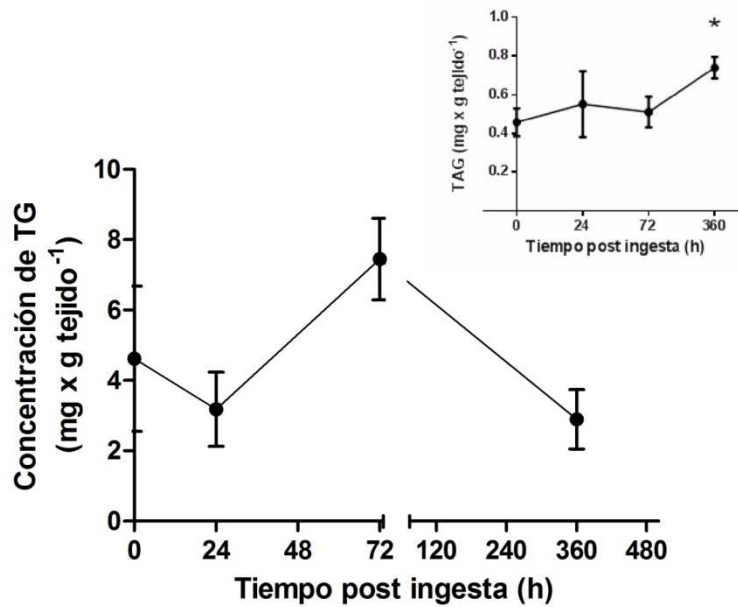


Figura 5.9. Concentración de triglicéridos en músculo de adultos de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Recuadro: Concentración de triglicéridos en músculo de juveniles de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Albanesi, 2018). * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, p < 0,05). Los valores son la media ± E.S. para 6 individuos.

DISCUSIÓN

La existencia de actividad de tripsina y APN en intestino anterior sugiere que individuos adultos de *Paralichthys orbignyanus* exhiben capacidad digestiva a nivel bioquímico para la hidrólisis completa de sustratos dietarios proteicos, lo cual estaría en relación con su hábito alimenticio en el ambiente natural (Carneiro, 1995; Rivera-Prisco et al., 2001; Diaz de Astarloa, 2002). En la Laguna Costera Mar Chiquita, individuos adultos de *P. orbignyanus* se alimentan principalmente de especies pelágicas y bentónicas de crustáceos y de peces (Rivera-Prisco et al., 2001). En general, altos niveles de actividad de proteasas en intestino son típicos de peces carnívoros (Sanz, 2009; Bakke et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Steimberg, 2018).

Las lipasas son de importancia fisiológica central en todos los animales debido a su papel en la digestión de lípidos dietarios y de reserva (Casas-Godoy et al., 2012; Karasov y Douglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Castro, 2015, 2016; Michiels et al., 2015b; Sarmah et al., 2018; Negi, 2019). Diversos estudios han demostrado la existencia de actividad de lipasa en intestino anterior de varias especies de peces aunque con diferencias cuanti y/o cualitativas inter e intraespecíficas (Bakke et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Pujante et al., 2017; Steinberg, 2018; Aratzamendi et al., 2019). La presencia de actividad de lipasa en intestino anterior de *P. orbignyanus*, también estaría de acuerdo con su hábito alimenticio en el ambiente natural (Rivera-Prisco et al., 2001), ya que una alta actividad

lipolítica en intestino es en general, típica de especies carnívoras (Sanz, 2009; Bakke et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Steimberg, 2018).

Como señalamos anteriormente (ver capítulo 4 de la presente tesis) para especies de peces de importancia ecológica y/o económica tales como el lenguado *P. orbignyanus*, determinar la existencia y/o modulación de actividad de enzimas digestivas específicas en intestino de individuos juveniles y adultos permite establecer posibles diferencias y/o cambios en el perfil digestivo a nivel bioquímico en relación a la edad (Moyano López, 2006; Bakke et al., 2011; Pujante et al., 2017; Sanchez Hernandez et al., 2018). Los resultados del presente capítulo (junto con los presentados en el Capítulo 4) sugieren que podría producirse una modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas en relación a la edad en *P. orbignyanus*. Los niveles similares de actividad específica de tripsina en adultos y juveniles sugieren que no se producirían cambios en la capacidad para pasos iniciales de la digestión proteica. Sin embargo, la menor actividad específica de APN podría sugerir una menor importancia relativa de esta enzima y por ende modificaciones para la digestión final proteica en individuos adultos. En varias especies de peces, se ha descrito la presencia de leucina-aminopeptidasa en intestino anterior la que también cumple un rol esencial en los pasos finales de la digestión proteica (Bakke et al., 2011; Steimberg, 2018; Kamaszewski et al., 2019; Wang et al., 2019). Nuestros resultados no nos permiten establecer si este es el caso para adultos de *P. orbignyanus*. Por otro lado, la marcada mayor actividad específica de lipasa en intestino anterior de adultos y consecuentemente una mayor capacidad digestiva para ítems lipídicos sugiere un cambio en el perfil digestivo (ej. mayor relevancia de la utilización de lípidos dietarios) en individuos

adultos. Se considera que el hábito alimenticio es el principal factor de selección que determina el tipo y funcionalidad de enzimas digestivas presentes en tracto digestivo de peces (Karasov y Douglas, 2013; Sánchez-Hernández et al., 2019). En la Laguna Costera Mar Chiquita, se ha observado que ocurre un cambio en la dieta de *P. orbignyanus* hacia presas de mayor tamaño y a la incorporación de peces en adultos (Rivero Prisco et al., 2001), lo que podría conducir a una mayor disponibilidad de lípidos en la dieta. Al modificarse las características del alimento y condiciones de alimentación, la información obtenida para una determinada especie en el ambiente natural, no puede extrapolarse totalmente a las condiciones en cautiverio. Sin embargo, se ha sugerido que cambios en el perfil digestivo tanto en el ambiente natural como en condiciones controladas pueden ser disparados y/o regulados por mecanismos intrínsecos (Pujante et al., 2017; Sánchez-Hernández et al., 2019). En el pez *Chelon labrosus* (familia Mugilidae) se han observado cambios diferenciales en la actividad específica de lipasa en intestino entre juveniles y adultos en cautiverio que han sido relacionados con los cambios en la dieta en el ambiente natural (Pujante et al., 2017; Arantzamendi et al., 2018; Sanchez Hernandez et al., 2018).

En varias especies de peces teleósteos se ha observado la modulación de enzimas digestivas en respuesta a diferentes tiempos postingesta y/o de privación de alimento siendo estos ajustes especie-específicos (Grosell et al., 2011; Yúfera et al., 2012; Ballantyne, 2014; Aslam et al., 2018; Vizcaino et al., 2018). En el capítulo anterior de la presente tesis mostramos la existencia de modulación postingesta de la actividad de amilasa y maltasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* sugiriendo la existencia de mecanismos de modulación postprandial de componentes clave en la digestión de hidratos de carbono. Los

resultados de este capítulo que muestran la existencia de modulación diferencial de las actividades de tripsina, APN y lipasa en intestino anterior de adultos a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento sugieren también la capacidad de adultos para la regulación postprandial de componentes claves del metabolismo de proteínas y lípidos. Además, los cambios a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento de la actividad de enzimas digestivas específicas soportan la idea del rol del intestino anterior como sitio involucrado en procesos de regulación del metabolismo proteico y lipídico postprandial en adultos de *P. orbignyana*. La menor actividad de tripsina a las 24 h luego de la ingesta de alimento y su mantenimiento en niveles similares hasta las 72 h sugiere la modulación (disminución) postprandial de pasos iniciales de la digestión de ítems proteicos. Por otro lado, la actividad de tripsina en niveles similares a t0 a las 360 h postingesta, sugeriría la recuperación de la capacidad para digestión inicial de proteínas. Si la recuperación de la actividad específica de tripsina hasta valores similares a t0 se debe a diferentes fases temporales en la digestión proteica y/o a mecanismos intrínsecos de regulación (ej. modulación de la actividad preexistente y/o de la síntesis y liberación de enzimas digestivas por mensajeros químicos) requiere mayor investigación.

El aumento de la actividad de APN a las 24 h luego de la ingesta de alimento (concomitante a la disminución en la actividad de tripsina) sugiere que a este tiempo podrían llevarse a cabo etapas finales de la digestión proteica. Además, soporta la idea de una modulación coordinada de diferentes etapas de la digestión proteica. El transporte de péptidos y aminoácidos es de importancia central en la nutrición proteica de animales (Karasov y Duglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Tian, 2015). Los aminoácidos, en forma

de aminoácidos libres y oligopéptidos, son nutrientes vitales e importantes reguladores de rutas metabólicas y de procesos fisiológicos clave. Los aminoácidos u oligopeptidos resultantes de la digestión de ítmes proteicos se transportan desde el lumen a través de las células epiteliales intestinales hacia la sangre vía transportadores presentes en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales intestinales. La APN, la cual es una enzima multifuncional, además de estar involucrada en pasos finales de la digestión proteica cumple un rol en la facilitación del transporte de varios aminoácidos. En intestino de mamíferos, la APN puede formar complejos con transportadores de aminoácidos neutros modulando su absorción (Fairweather et al., 2012). En tracto digestivo de algunos peces se han identificado transportadores de péptidos y/o aminoácidos de alta capacidad (Bakke et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Tian, 2015; Steinberg, 2018; Orozco et al., 2019). Se desconoce la existencia de este tipo de transportadores en intestino de *P. orbignyanus*. La disminución de la actividad de APN a las 72 h postingesta hasta valores similares a t0, en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus*, junto con la recuperación de la actividad de tripsina soporta aún más la idea de ajustes coordinados de diferentes etapas de la digestión proteica y probablemente la existencia de mecanismos intrínsecos de regulación de procesos digestivos.

En varios peces teleósteos, se ha demostrado el rol del hígado como sitio de síntesis proteica postprandial (Ballantyne, 2014; Mente et al., 2017), reconociendo el rol del hígado como sitio de síntesis proteica postprandial en juveniles de *P. orbignyanus* (Albanesi., 2018). Los resultados de la presente tesis muestran que, similarmente a lo encontrado en juveniles, el hígado y el músculo constituyen sitios de reserva de proteína en

individuos adultos de *P. orbignyana*. Sin embargo, y diferencialmente a juveniles, el mantenimiento de la concentración de proteínas en hígado y músculo a los distintos tiempos postingesta estudiados (junto con la modulación diferencial de la actividad de proteasas) sugiere diferencias en la dinámica postprandial de componentes clave del metabolismo proteico en relación a la edad. Igualmente se observa una tendencia hacia un aumento a las 72 h de la concentración de proteínas en hígado y en músculo, aunque las mismas no son estadísticamente significativas. Se necesitaría evidencia experimental (ej. aumentando la muestra) para confirmar o descartar esta tendencia.

Los cambios a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento de la actividad de lipasa soportan la idea del rol de intestino anterior como sitio involucrado en procesos de regulación del metabolismo lipídico postprandial en adultos de *P. orbignyana*. La disminución de la actividad de lipasa a las 24 h luego de la ingesta de alimento y el posterior incremento a las 72 h hasta valores similares a t_0 y el mantenimiento de la misma a las 360 h sugiere la existencia de ajustes diferenciales temporales postprandiales (disminución y posterior mantenimiento en niveles basales) en la capacidad digestiva de lípidos dietarios. Si la diferencia temporal en la recuperación de las actividades específicas de tripsina y lipasa en intestino de adultos de *P. orbignyana* se debe a una diferente dinámica postprandial de la digestión de proteínas y lípidos dietarios y/o de mecanismos de regulación (ej. modulación de la actividad preexistente y/o de la síntesis y liberación de enzimas digestivas por mensajeros químicos) requiere mayor investigación. Por otro lado, las diferencias en las respuestas postingesta en la actividad de lipasa a la de juveniles

sugieren también una diferente dinámica postprandial de la digestión lipídica en relación a la edad.

En varios animales, los productos de la digestión de lípidos dietarios son almacenados como triglicéridos en órganos de reserva (Tocher, 2003; Peng et al., 2015; Xie, 2017). Los procesos de absorción de lípidos en peces parecen ocurrir principalmente en las regiones proximales del intestino y se piensa son similares a los de mamíferos (Tocher, 2003; Hernández-Blazquez et al., 2006; Bakke et al., 2011; Castro 2015, 2016). Durante la alimentación, el exceso de ácidos grasos en la dieta se exporta desde el hígado en forma de lipoproteínas y se acumulan y almacenan en forma de triglicéridos en sitios específicos de almacenamiento de lípidos (Tocher, 2003; Grosell et al., 2011; Ballantyne, 2014). En varias especies de peces, el músculo constituye un sitio de reserva de triglicéridos (Tocher, 2003; Bakke et al., 2011). Similarmente a juveniles (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018), el hígado parece ser el principal sitio de reserva de triglicéridos en individuos adultos de *P. orbignyanus*. Nuestros resultados no nos permiten establecer si la menor concentración de triglicéridos en músculo con respecto a hígado se debe al sedentarismo en cautiverio o a una característica del perfil digestivo de estos organismos en el ambiente natural. El mantenimiento a las 24 h de la concentración de triglicéridos en hígado sugeriría que la disminución en la actividad de lipasa en intestino anterior no afectaría las reservas. Sin embargo, no podemos descartar un aumento de la actividad de lipasa a tiempos postingesta más cortos (menores a 24 h). El mantenimiento en la concentración de triglicéridos en hígado junto con la recuperación de la actividad de lipasa en intestino anterior a las 72 h postingesta sugiere la existencia de mecanismos de ajuste

postprandiales coordinados de diferentes componentes del metabolismo lipídico en adultos de *P. orbignyanus*. Contrariamente a lo observado en juveniles (Albanesi, 2018), el mantenimiento de la concentración de triglicéridos en hígado y músculo de adultos sugiere una dinámica postprandial diferencial del metabolismo lipídico en estos sitios de reserva en relación a la edad. Similarmente a lo observado para la concentración de proteínas en hígado y músculo, existe una tendencia a aumentar la concentración de triglicéridos a las 72 y 360 h en hígado y a las 72 h en músculo. En estos casos la variabilidad en las muestras tomadas no permite observar una significancia estadística. Así, tal como se señaló más arriba para el caso de la concentración de proteínas, se necesitaría evidencia experimental (ej. aumentando la muestra) para confirmar o descartar esta tendencia. Para sobrevivir al ayuno (condición extrema de privación de alimento), varias especies de peces movilizan reservas de energía para enfrentar el déficit energético y mantener procesos vitales (Salem, et al., 2007; Furné, et al., 2012; Yang et al., 2019). Sin embargo, como señalamos en el capítulo 4, faltan estudios para evaluar la dinámica de los cambios metabólicos involucrados en la transición alimentación a ayuno (ayuno postprandial) (Yang et al., 2019). Los resultados de este capítulo similarmente a lo observado con respecto a las reservas de glucógeno (Capítulo 4) sugerirían que, tomando como parámetro la concentración de proteínas y triglicéridos en hígado y músculo, un tiempo de privación de alimento de 360 h no representaría una situación de ayuno para adultos de *P. orbignyanus*.

En conclusión, las respuestas de diferentes componentes clave de la digestión de hidratos de carbono (capítulo 4 de la presente tesis), proteínas y lípidos (modulación de enzimas digestivas en intestino anterior) sugieren la existencia de ajustes digestivos y

metabólicos postprandiales diferenciales a nivel bioquímico en adultos de *P. orbignyanus*, como así también de distintos mecanismos de regulación. Las diferentes respuestas de la actividad de enzimas digestivas en intestino y de la concentración de sustratos de reserva en adultos y juveniles sugieren, además, una diferente dinámica postprandial a nivel bioquímico y consecuentemente de ajustes digestivos y metabólicos postprandiales en relación a la edad en *P. orbignyanus*, los cuales podrían deberse a mecanismos endógenos (ej. mensajeros químicos, utilización de vías metabólicas) que siguen operando en condiciones controladas. Por otro lado, los resultados que muestran la alta actividad de lipasa y su modulación en individuos adultos son de potencial aplicación en acuicultura debido a la importancia de la incorporación de lípidos en la dieta en un nivel adecuado para minimizar el uso de proteínas.

CAPÍTULO 6:

Actividad de Fosfatasa Alcalina en intestino del lenguado *Paralichthys orbignyanus*: caracterización parcial y dinámica postprandial

INTRODUCCIÓN

Muchos procesos biológicos son regulados por la formación (fosforilación) y el clivaje (defosforilación) de ésteres de fosfato, dos de las reacciones químicas más cruciales llevadas a cabo en todos los organismos vivientes. El proceso de defosforilación es catalizado por diferentes fosfatasas. La fosfatasa alcalina (AP), una enzima de membrana ubicua que cataliza la hidrólisis de monoésteres de fosfato de un amplio rango de sustratos a pH superiores a 7,0, regula diferentes procesos fisiológicos esenciales en animales (Millan, 2006; Buchet et al., 2013; Linder et al., 2013; Lallès, 2019a). La AP ha sido ampliamente estudiada en mamíferos habiéndose identificado varias formas las cuales exhiben una distribución diferencial en distintos órganos y tejidos (Muginova et al., 2007; Sharp et al., 2007; Buchet et al., 2013; Linder et al., 2013; Lallès, 2014, 2019a; Sharma et al., 2014). Las formas de AP se clasifican usualmente como AP tejido-inespecífica que se encuentra principalmente en hueso, hígado y riñón y AP tejido-específicas como la AP intestinal y de placenta (Millan 2006; Sharma et al 2014; Lallès 2014; 2019a). Las formas de AP exhiben propiedades bioquímicas diferenciales, entre ellas, la distinta sensibilidad a inhibidores, tales como el levamisol (Calhau et al., 2000; Ali et al., 2006; Sharma et al., 2014; Lallès, 2019a). La inhibición diferencial por levamisol se utiliza comúnmente para identificar diferentes formas de AP ya que es un potente inhibidor de la AP tejido-inespecífica mientras que no inhibe o tiene poco efecto inhibitorio sobre las formas tejido-específicas tales como la AP intestinal (Mota et al., 2008; Sharma et al., 2014; Lallès, 2019a).

En tracto digestivo de mamíferos y algunas especies de vertebrados no mamíferos, varias enzimas y sistemas de transporte involucrados en funciones claves tales como la digestión y absorción de nutrientes son regulados por procesos de fosforilación/desfosforilación (Chang y Leung, 2014; Con et al., 2017). Diversos estudios realizados principalmente en líneas celulares de mamíferos y en varias especies de mamíferos terrestres sugieren múltiples funciones de la AP intestinal (Lallès 2014, 2019a). La AP en intestino participa en la digestión y absorción de nutrientes, regulación de la secreción de bicarbonato y mantenimiento del pH de la mucosa duodenal y en varias especies protege al organismo de la invasión de microorganismos patógenos cumpliendo un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal por lo que se la considera una proteína de defensa (Estaki et al., 2014; Bilski et al., 2017; Ducatelle et al., 2018; Lallès 2014, 2019a). La existencia y/o nivel de la actividad de AP intestinal serían indicativos de la diferenciación funcional en la digestión y absorción de nutrientes (Bates et al., 2007; Goldberg et al., 2008; Wang et al., 2018; Nepal et al., 2019). Por otra parte, en varias especies de vertebrados, la expresión y/o actividad de AP en intestino es afectada por diferentes factores tales como la dieta y la privación de alimento (Geddes y Philpott, 2008; Guerville y Boudry 2016; Bilski et al., 2017; Lallès, 2019a). En varias especies de peces se ha detectado actividad de AP en intestino en donde cumpliría funciones similares a la AP de intestino de mamíferos (Villanueva et al., 1997; Harpaz y Uni, 1999; Silva et al., 2010; Facioli et al., 2016; Wu et al., 2017; Wang et al., 2018; Lallès, 2019b). En el pez cebra *Danio rerio* se demostró que la AP intestinal juega un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Bates et al., 2007; Lallès, 2019b).

Los resultados presentados en los capítulos 4 y 5 muestran la existencia de actividad de diferentes enzimas digestivas (actividad de carbohidrasas, proteasas y lipasas) en intestino de adultos de *P. orbignyana*. Se encontró además una modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. Esto sugiere la existencia de una adecuada batería digestiva para la hidrólisis completa de varios sustratos dietarios y de ajustes digestivos y metabólicos postprandiales diferenciales a nivel bioquímico. En este contexto, determinar la existencia y características bioquímicas de actividad de enzimas involucradas en funciones clave en intestino, como por ejemplo la actividad de AP, resulta una herramienta importante para conocer diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva y metabólica a nivel bioquímico.

En este capítulo se describen estudios para: a) determinar la existencia de actividad de AP y realizar una caracterización parcial de la misma en intestino de individuos adultos de *P. orbignyana* b) determinar la actividad de AP a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos juveniles y adultos de *P. orbignyana* para evaluar la dinámica temporal postprandial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de animales

Se trabajó con individuos juveniles y adultos de *P. orbignyana* nacidos en cautiverio en el Programa de Maricultura y Biología Experimental del Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) mantenidos durante 150 días (Albanesi, 2018) y 15 meses, respectivamente, en condiciones controladas de alimentación, salinidad, temperatura y fotoperíodo como se describió en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 4 de la presente tesis.

Para la caracterización parcial de AP, individuos adultos fueron privados de alimento durante 24 h (del Valle et al., 2016), se crioanestesiaron y se procedió como se describe posteriormente para la determinación de la actividad de AP en intestino. Para la determinación de la actividad de AP en intestino a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos juveniles y adultos se procedió como se describió en la sección de Materiales y Métodos del capítulo 4 de la presente tesis. Los individuos fueron mantenidos y alimentados en el INIDEP. Las determinaciones cuantitativas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología Bioquímica y Adaptativa, Departamento de Biología-IIMYC-CONICET-UNMDP.

Preparación de homogenatos

Se realizó según lo descripto en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 4 de la presente tesis.

Determinaciones cuantitativas

La actividad de AP se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de pNPP en un medio conteniendo SO_4Mg 4 mM en buffer Tris 100 mM / HCl (pH 7,7) acorde a Pinoni et al., (2015). Una alícuota adecuada de muestra se agregó a la mezcla de reacción y se preincubó 5 minutos a 37° C. La reacción de fosfatasa se inició por la adición de pNPP (concentración final 10 mM). La incubación se realizó a 37°C durante 10 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de KOH 0,1 M. El pNP liberado se cuantificó por medición de la absorbancia en 410 nm. Para los estudios de caracterización en adultos, la actividad de AP se determinó como se describió anteriormente pero a diferentes pH (7,4 a 10,0) del medio de reacción, en presencia de distintas concentraciones de pNPP, o en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de levamisol según se indica para cada experimento. (16mM o 32 mM) El efecto de la temperatura sobre la actividad de AP se determinó como se describió previamente, pero variando la temperatura de incubación (4 - 37°C). Para los experimentos de privación de alimento la actividad de AP se determinó como se describió anteriormente a pH 7,7.

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

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas

y normalidad. Se realizaron análisis paramétricos, t-test o One-Way ANOVA, para estimar diferencias estadísticas. Un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias. Los resultados del efecto de diferentes concentraciones de pNPP se analizaron por medio de análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 5.01). Las curvas que se muestran son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) fueron estimados por el programa a partir de esas curvas (GraphPad Prism 5.01).

RESULTADOS

*Actividad de AP en intestino anterior de individuos adultos de P. orbignyanus:
caracterización parcial*

Inicialmente, se determinó la actividad total de AP dentro del rango de pH de 7,4 a 9,0. La actividad de AP fue similar dentro del rango de pH de 7,4 a 8,4; mientras que a pH 9,0 la actividad fue mayor (alrededor de un 54 %) a la actividad a pH 8,4.

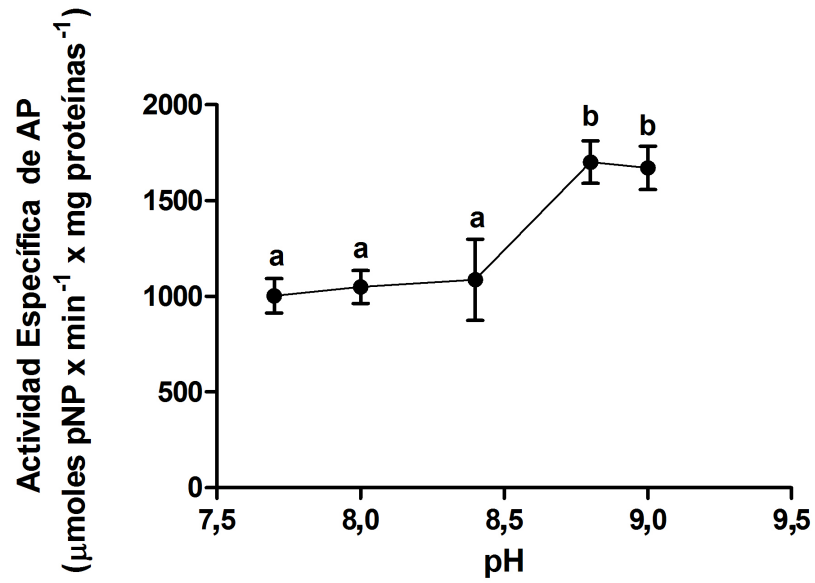


Figura 6.1. Actividad específica de AP a diferentes pH en intestino anterior de *P. orbignyana*. Letras distintas indican diferencias entre sí (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S para 7 individuos.

El efecto de concentraciones crecientes de pNPP sobre la actividad total de AP a pH 9,0 se muestra en la Figura 6.2. La actividad de AP exhibió una cinética de tipo michaeliana (K_m aparente=0,71 mM).

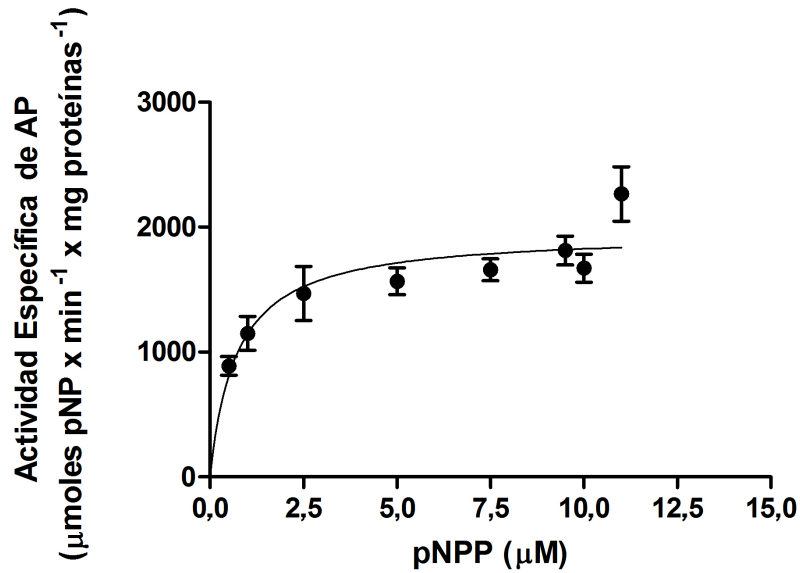


Figura 6.2. Efecto de concentraciones crecientes de pNPP sobre la actividad total de AP a pH 9,0 en intestino anterior de *P. orbignyana*. Los valores son las medias \pm E.S. para 7 individuos.

Se determinó el efecto de concentraciones crecientes de levamisol sobre la actividad total de AP a pH 9,0 (Figura 6.3). La actividad total de AP en intestino anterior fue inhibida parcialmente (alrededor de 60%) por levamisol 16 mM manteniéndose dicha inhibición a 32 mM. La inhibición por levamisol reveló la existencia en intestino anterior de *P. orbignyana* de dos actividades de AP, una sensible a levamisol y otra insensible a levamisol.

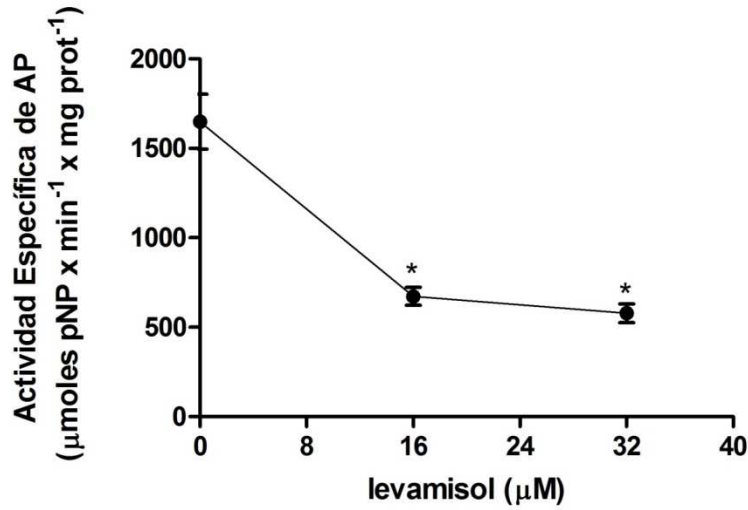


Figura 6.3. Actividad específica de AP en intestino anterior de *P. orbignyanus* en presencia de levamisol 16 mM y 32 mM. La actividad se midió a pH 9,0. Los valores son las medias \pm E.S. para 7 individuos.

Posteriormente, se determinó la actividad de AP en ausencia o presencia de levamisol 16 mM a diferentes pH (7,7 – 9,0) (Figura 6.4). A pH 7,7 la actividad de AP fue similar en ausencia y presencia de levamisol, por lo que podría corresponder a una actividad de AP insensible a levamisol, tal como la AP intestinal. En base a estos resultados, para los posteriores experimentos se determinó la actividad de AP a pH 7,7 (insensible a levamisol).

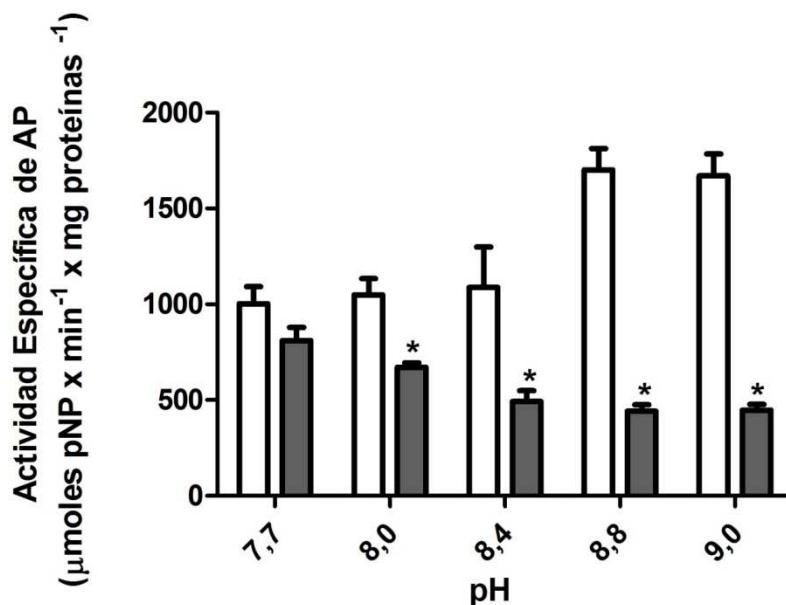


Figura 6.4. Actividad específica de AP a diferentes pH en ausencia o presencia de levamisol 16 μM en intestino anterior de *P. orbignyanus*. \square Actividad de AP en ausencia de levamisol (actividad total de AP). \blacksquare Actividad de AP en presencia de levamisol (actividad de AP insensible a levamisol). Los valores son las medias \pm E.S. para 7 individuos.

La figura 6.5 muestra el efecto de concentraciones crecientes de pNPP sobre la actividad de AP en intestino anterior de *P. orbignyanus* a pH 7,7. El análisis cinético de este experimento muestra que en intestino anterior la actividad de AP a pH 7,7 presentó un comportamiento alostérico.

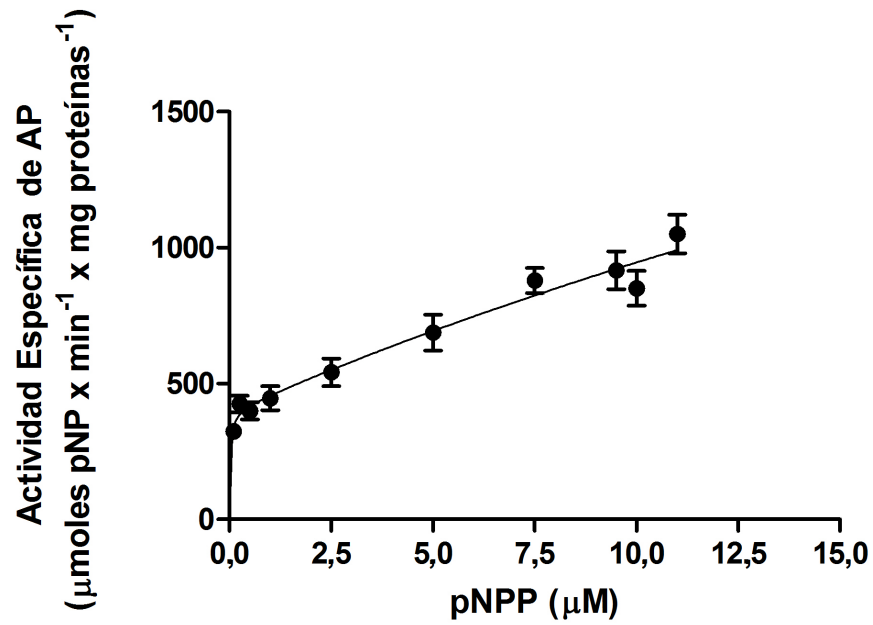


Figura 6.5. Efecto de concentraciones crecientes de pNPP sobre la actividad de AP a pH 7,7 pNPP en intestino anterior de *P. orbignyanus*. Los valores son las medias \pm E.S. para 7 individuos

La actividad de AP fue similar a 4°C y 25°C (4°C: 191 ± 29 ; 25°C= 213 ± 37 nmoles de pNP x min⁻¹ x mg prot⁻¹) mientras que a 37°C la actividad aumentó alrededor de un 100 % con respecto a la actividad a 4°C (37°= 428 ± 82 nmoles de pNP x min⁻¹ x mg prot⁻¹).

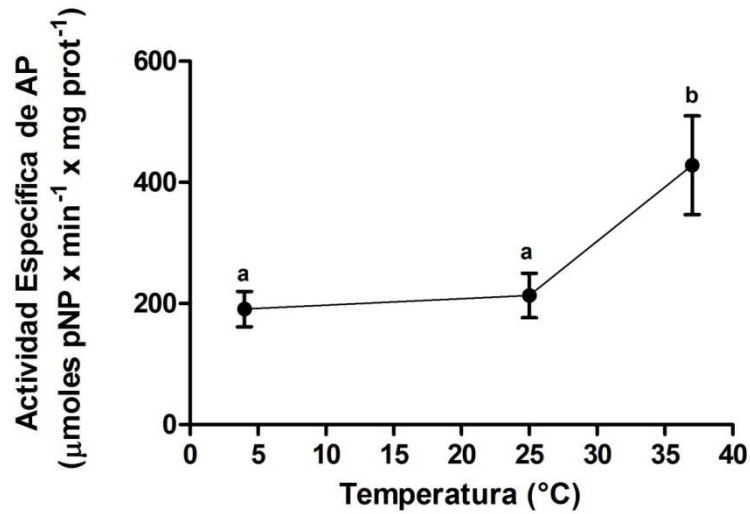


Figura 6.6. Efecto de la temperatura (4-37°C) sobre la actividad de AP a pH 7.7 en intestino anterior de *P. orbignyana*. Los valores son las medias \pm E.S. para 7 individuos.

Actividad de AP en intestino a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en individuos de adultos de P. orbignyana

La actividad de AP en intestino anterior a las 24 y 72 h luego de la ingesta de alimento fue similar a la actividad a t0. A las 360 h post-ingesta, la actividad de AP fue mayor (82%) respecto a t0 (Figura 6.7).

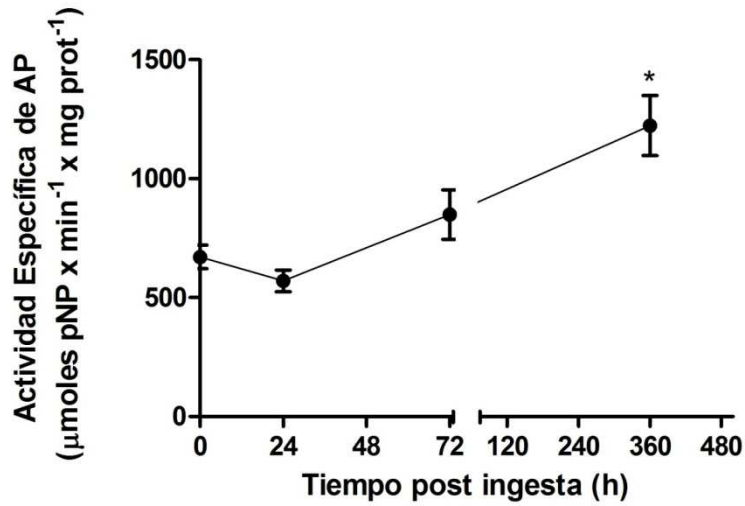


Figura 6.7. Actividad de AP en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 7 individuos.

Actividad de AP en intestino de individuos juveniles de P. orbignyana

El intestino anterior de juveniles de *P. orbignyana* también exhibió actividad de AP a pH 7,7 (Figura 6.8).

La actividad de AP en intestino anterior de juveniles a las 24 h luego de la ingesta de alimento fue similar a la actividad a t0. A las 72 h disminuyó (alrededor de un 39%) con respecto a t0 y se mantuvo constante a las 360 h luego de la ingesta de alimento (Figura 6.8).

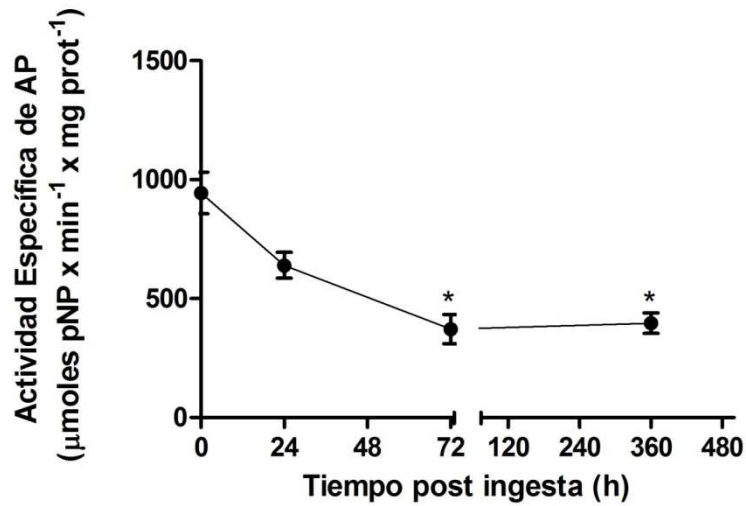


Figura 6.8. Actividad de AP en intestino anterior de juveniles de *P. orbignyanus* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. * indica diferencias significativas respecto a t0 (ANOVA, $p < 0,05$). Los valores son la media \pm E.S. para 7 individuos.

DISCUSIÓN

La inhibición diferencial por levamisol permite identificar diferentes formas de AP ya que es un potente inhibidor de la AP tejido-inespecífica mientras que no inhibe las formas tejido-específicas (Mota et al., 2008; Sharma et al., 2014; Lallès, 2019a). Diversos trabajos han demostrado que el levamisol no inhibe a la AP intestinal (Sergienko y Millán, 2010; Sharma et al., 2014; Lallès, 2019a). La inhibición de la actividad de AP por levamisol muestra la existencia de actividades de AP insensible y sensible a levamisol en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus*. Las actividades de AP en mamíferos y en

varios vertebrados no mamíferos se caracterizan por exhibir pH óptimos por encima de 7,0 o en algunos casos a valores más altos (9,0 o mayor) (Chan y Stinson, 1986; Bortolato et al., 2002; Simao et al., 2007; Millan, 2006). Este parece ser el caso también para las actividades de AP en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana*. La insensibilidad a levamisol de la actividad de AP a pH 7,7 en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* sugiere que esta actividad correspondería a actividad de AP intestinal (Sergienko y Millán, 2010; Sharma et al., 2014; Lallès 2019b). En base a esto, se continuó una caracterización parcial de la actividad de AP a pH 7,7 y se determinó su respuesta a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento. El comportamiento alostérico de la actividad de AP a pH 7,7 en respuesta a concentraciones crecientes de pNPP coincide a lo descrito en mamíferos (Hoylaerts et al., 1997; Millan, 2006). Las AP de diferentes tejidos animales muestran una sensibilidad variable a la temperatura (Olsen et al., 1991; Àsgeirsson et al., 1995; Funk et al., 2001; Bortolato et al., 2002; Millan, 2006). La AP en tracto digestivo de varios animales es estable a temperaturas extremas (Hani et al., 2018). La respuesta a la temperatura de la actividad de AP intestinal (mantenimiento de la actividad a baja temperatura y una mayor actividad a 37°C) sugiere una actividad de AP tolerante a temperaturas extremas. En la Laguna Costera Mar Chiquita *P. orbignyana* puede encontrarse expuesto a rangos de temperatura entre 4° y 28° C (Rivera-Prisco et al., 2001; observaciones personales). Hemos demostrado previamente que la actividad de enzimas digestivas (carbohidrasas, lipasa y proteasas) en el intestino de juveniles de *P. orbignyana* se mantiene dentro de un amplio rango de temperatura (4-45°C) (del Valle et al., 2016).

Los resultados presentados en los capítulos 4 y 5 de la presente tesis muestran la modulación diferencial de la actividad de carbohidrasas, proteasas y lipasa en intestino anterior a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento sugiriendo una diferente dinámica postprandial del metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos en adultos de *P. orbignyanus*. En intestino de mamíferos, se ha sugerido que la AP participa en la digestión y absorción de nutrientes tales como lípidos y proteínas, regulación de la secreción de bicarbonato, mantenimiento del pH de la mucosa duodenal y en funciones de defensa (Estaki et al., 2014; Lallès, 2014, 2019a; Bilski et al., 2017; Ducatelle et al., 2018). En intestino de varias especies de peces se ha detectado actividad de AP que parece cumplir funciones similares a la AP de intestino de mamíferos (Villanueva et al., 1997; Harpaz y Uni; 1999; Silva et al., 2010; Facioli et al., 2016; Wu et al., 2017; Wang et al., 2018; Lallès, 2019b). En intestino delgado de mamíferos la actividad de AP es regulada por varios factores tales como la dieta y la privación de alimento (Geddes y Philpott, 2008; Lallès, 2014, 2019a; Guerville y Boudry, 2016; Bilski et al., 2017). El mantenimiento de la actividad de AP en intestino anterior de adultos de *P. orbignyanus* en valores similares a t_0 a las 24 y 72 h luego de la ingesta de alimento sugiere que esta actividad no constituiría un componente de ajustes digestivos postprandiales a nivel bioquímico concomitantemente a la modulación de enzimas digestivas clave. Sin embargo, el aumento de la actividad de AP a las 360 h luego de la ingesta de alimento sugiere su participación en ajustes a tiempos prolongados. Tomando como parámetro la concentración de reservas de energía en hígado y músculo, un tiempo de privación de alimento de hasta 360 h no implicaría una condición de ayuno (condición extrema de privación de alimento en la cual se produce movilización

de reservas de energía) para adultos de *P. orbignyanus* (ver capítulos 4 y 5 de la presente tesis). Si el aumento de la actividad de AP está relacionado con el mantenimiento de procesos absorbivos (ej. de proteínas y/o lípidos o proteínas) y/o de la homeostasis intestinal a tiempos prolongados luego de la ingesta de alimento requiere mayor investigación.

En varias especies de peces se ha demostrado la presencia de actividad de AP intestinal en etapas tempranas del desarrollo aunque en bajos niveles. En general, la expresión y cantidad de AP intestinal aumenta a medida que se diferencian las células epiteliales intestinales por lo que incrementos en la actividad de AP en intestino serían indicativos de la diferenciación funcional en digestión y absorción de nutrientes (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Goldberg et al., 2008; Wang et al., 2018). Sin embargo, existen diferencias sustanciales en el patrón de cambios temporales en la actividad de AP intestinal en diferentes especies de peces. En aquellas carnívoras, por ejemplo, no se han encontrado variaciones en la actividad de AP intestinal durante el desarrollo (Lallès, 2019b). La existencia de actividad de AP en intestino anterior, juntamente con la presencia de enzimas digestivas en membrana de borde estriado (maltasa, sacarasa y APN) (del Valle et al., 2016; Albanesi, 2018) sugiere la diferenciación funcional en digestión y absorción de nutrientes de juveniles de *P. orbignyanus*. Sin embargo, el hecho que, contrariamente a lo observado en adultos, la actividad de AP en intestino anterior de juveniles disminuyó a las 72 h (manteniéndose constante a las 360 h) luego de la ingesta de alimento soportan la idea de la existencia de ajustes diferenciales postprandiales a nivel bioquímico en relación a la edad como describimos previamente para enzimas digestivas (capítulos 4 y 5). Esta

disminución postprandial de AP en intestino de juveniles fue concomitante a la observada para la actividad de APN (enzima clave en pasos finales de la digestión proteica). Futuros estudios deberían focalizarse en establecer si existe una relación funcional entre ambas enzimas en la degradación y absorción de ítems proteicos.

En conclusión los resultados del presente capítulo sugieren la existencia de actividad de AP intestinal en adultos y juveniles de *P. orbignyana*. La respuesta postprandial de esta actividad sugiere su participación diferencial en ajustes a tiempos prolongados luego de la ingesta de alimento en adultos y juveniles. Los resultados de este capítulo constituyen el primer trabajo en demostrar la existencia de actividad de AP en intestino anterior de peces planos del género *Paralichthys*.

CONSIDERACIONES FINALES

Los estudios sobre existencia, caracterización y modulación de enzimas claves en tracto digestivo y de reservas de energía permiten conocer ajustes digestivos y metabólicos a nivel bioquímico, evaluar la condición de los individuos y establecer la naturaleza de los componentes dietarios y/o de reserva que pueden ser potencialmente utilizados en relación a distintas condiciones fisiológicas y/o ambientales. Es evidente la importancia de realizar este tipo de estudios en especies de interés regional, ecológico y/o económico ya que determinar el perfil digestivo, de reservas y los ajustes en los mismos constituye una herramienta de gran valor para la comprensión de diferentes aspectos de la fisiología bioquímica digestiva y metabólica, aspectos ecofisiológicos y selección de condiciones adecuadas de alimentación y mantenimiento.

Se demostró la co-existencia en hepatopáncreas de *N. granulata* de las actividades de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (bomba clásica de sodio) y de Na^+ ATPasa insensible a ouabaína e inhibible por furosemida (segunda bomba de sodio). La estimulación por Na^+ bajo total inhibición de la actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa reveló la existencia de actividad de Na^+ ATPasa. La identificación de la actividad de Na^+ ATPasa ha sido un hallazgo relevante, ya que constituye la primera evidencia de su existencia en hepatopáncreas de un cangrejo eurihalino intermareal (Capítulo 1). La Na^+ ATPasa fue totalmente inhibida por furosemida 2 mM, exhibió cinética de Michaelis-Menten para ATP y actividad más alta alrededor de

pH 7,4 (Capítulo 1). La estimulación por Na^+ bajo total inhibición de la actividad de Na^+ - K^+ ATPasa reveló la existencia de actividad de Na^+ ATPasa la cual fue totalmente inhibida por furosemida 2 mM, exhibe cinética de Michaelis-Menten para ATP y actividad más alta alrededor de pH 7,4 (Capítulo 1).

Se determinó la existencia de una modulación específica y diferencial de la actividad de Na^+ ATPasa luego de la ingesta de alimento en hepatopáncreas de *N. granulata*. Se observó un marcado aumento de la actividad de Na^+ ATPasa en 35 ups 48 h después de la ingesta de alimento. A 10 ups hubo una disminución 1 h luego de la ingesta de alimento que se mantuvo hasta las 24 h de dicha actividad. Esto sugiere su rol en ajustes digestivos y metabólicos postprandiales y como componente de respuestas post-ingesta a nivel bioquímico a la salinidad ambiental (Capítulo 2).

Se demostró que la concentración de triglicéridos y las actividades de lipasa y de AP sensible a levamisol e insensible a levamisol en hepatopáncreas son afectados diferencialmente por la exposición a una misma dieta en individuos de *N. granulata* de planicie de mareas y espartillar, sugiriendo la influencia del hábitat de origen en las respuestas de parámetros digestivos y metabólicos clave (Capítulo 3). La modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas clave y del contenido de reservas de energía en hepatopáncreas de individuos de ambos sitios expuestos a las mismas condiciones de alimentación sugiere que diferentes mecanismos intrínsecos podrían conducir al uso diferencial de vías digestivas y metabólicas en relación con el hábitat (Capítulo 3).

Se demostró la existencia de actividad de amilasa y de maltasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* y de glucógeno en hígado y músculo lo que sugiere su potencial capacidad para la digestión de diferentes tipos de carbohidratos glucogénicos (almidón, glucógeno, dextrina y maltosa), así como el rol del intestino anterior en pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y absorción de metabolitos resultantes (ej. glucosa) y la capacidad de almacenamiento de reservas de glucógeno en hígado y músculo (Capítulo 4). La similar actividad específica de amilasa y de maltasa en adultos y juveniles sugiere el mantenimiento de la potencial capacidad digestiva para sustratos glucogénicos en relación a la edad.

Se demostró la existencia de actividad de tripsina, N-aminopeptidasa (APN) y de lipasa en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* lo que sugiere su potencial capacidad para la digestión completa de ítems proteicos y el rol del intestino anterior en pasos finales de la digestión proteica. Además, los resultados sugieren la capacidad de almacenamiento de reservas de proteínas y triglicéridos en hígado y músculo (Capítulo 5). Las diferencias en actividad específica de APN y de lipasa en intestino anterior de adultos con respecto a juveniles sugieren cambios en el perfil digestivo para pasos finales de la digestión de proteínas y para la importancia relativa de la digestión de lípidos en relación a la edad.

Se demostró la existencia de respuesta diferencial de la actividad de amilasa, maltasa, tripsina, APN y lipasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en intestino anterior de adultos de *P. orbignyana* y de reservas en hígado y músculo

(Capítulos 4 y 5). Los resultados sugieren la existencia de una diferente dinámica postprandial de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos (enzimas digestivas/reservas) a nivel bioquímico y consecuentemente de ajustes digestivos y metabólicos postprandiales en adultos de *P. orbignyana*. Las diferencias observadas con respecto a individuos juveniles sugieren además, una diferente dinámica postprandial para enzimas digestivas y reservas de energía en relación a la edad.

Se demostró la existencia de actividad de AP en intestino de adultos de *P. orbignyana* la cual se caracterizó parcialmente. La insensibilidad a levamisol de la actividad total de AP a pH 7,7 sugiere que esta actividad podría corresponder a AP intestinal (Capítulo 6). El aumento de esta actividad a tiempos prolongados luego de la ingesta de alimento sugiere su participación en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Capítulo 6).

Se demostró la existencia de alta actividad de AP en intestino de juveniles de *P. orbignyana* sugiriendo la existencia de características digestivas de adulto. Sin embargo, la diferente respuesta de la actividad de AP en intestino a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento sugiere la existencia de ajustes postprandiales diferenciales en relación a la edad (Capítulo 6).

Los resultados de la presente tesis aportan importante información y contribuyen al conocimiento sobre la fisiología bioquímica digestiva y metabólica de crustáceos decápodos y peces teleósteos en general y de cangrejos eurihalinos estuariales y peces planos estuario-dependientes de importancia regional, ecológica y/o comercial, en

particular. Además, constituyen un punto de partida para futuros estudios sobre vías metabólicas y mecanismos de regulación involucrados en la modulación de componentes clave del metabolismo de las principales macromoléculas. Los resultados son de impacto y potencial aplicación en acuicultura debido a la importancia para la misma del conocimiento del perfil digestivo y metabólico a nivel bioquímico (existencia y modulación de enzimas digestivas específicas y reservas de energía) para el mejoramiento del cultivo y explotación de especies de interés comercial.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahearn, G. A., Duerr, J. M., Zhuang, Z., Brown, R. J., Aslamkhan, A., y Killebrew, D. A. (1999). Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72:1–18.
- Akiba, Y., Said, H., y Kaunitz, J.D. (2018). Luminal Chemosensing and Mucosal Defenses in the Upper GI Tract. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*, pp. 709-719.
- Albanesi, C.P; Radonic, M.; López, A.y López Mañanes, A.A. “Modulación post-ingesta de la actividad de amilasa y N-aminopeptidasa (APN) en intestino del lenguado (*Paralichthys orbignyanus*)” XII Encuentro Biólogos En Red, 13 y 14 de noviembre de 2017, Pág. 72; Mar del Plata, Argentina ISSN: 1853-3426.
- Albanesi, C.P. (2018). Flexibilidad fenotípica en el lenguado *Paralichthys orbignyanus*: ajustes digestivos y metabólicos a nivel bioquímico. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.
- Albanesi, C.; Radonic, M.; López, A. y López Mañanes, A.A. “Modulación postprandial de componentes del metabolismo lipídico en juveniles del lenguado *Paralichthys orbignyanus*” XIII Encuentro Biólogos En Red, 20 y 21 de noviembre de 2018, Pág. 116; Mar del Plata, Argentina ISSN: 1853-3426.
- Alberti, J., Escapa, M., Daleo, P., Iribarne, O., Silliman, B.R., y Bertness, M. (2007). Local and geographic variation in grazing intensity by herbivorous crabs in SW Atlantic salt marshes. *Marine Ecology Progress Series*, 349: 235-243.
- Al-Gharrawi, A.H., Al-Saadi, D.O. y Alasha, M.H. (2019). Effect of starvation and re-feeding on α -amylase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Plant Archives*, 19, 708-710.

- Ali, A.T., Penny, C.B., Paiker, J. E., Psaras, G., Ikram, F. y Crowther, N.J. (2006). The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue. *Annals of clinical biochemistry*, 43: 207-213.
- Alpers, D.H. (1987). Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. In: *Johnson L.R (ed). Physiology of the Gastro-intestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 1469–1487.
- Angeletti, S., Cervellini, P.M. y Lescano, L. (2018). Burrowing activity of the *Neohelice granulata* crab (Brachyura, Varunidae) in southwest Atlantic intertidal areas. *Ciencias Marinas*, 44: 155-167.
- Apell, H-J. (2019). Finding Na,K-ATPase II - From fluxes to ion movements. Erschienen In: *Substantia: An International Journal of the History of Chemistry*, 1:19-41
- Arantzamendi, L., Roo, F., Hernández-Cruz, C.M., Fernández-Palacios, H. e Izquierdo, M. (2019). Lipid digestion capacity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) from first feeding to commercial size. *Fish physiology and biochemistry*, 45: 469-484.
- Asaro, A., del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2009). Sucrase and maltase activities in hepatopancreas of *Neohelice granulata*: post-ingesta response. *Biocell*, 33: A197.
- Asaro, A., del Valle J.C. y López Mañanes A.A. (2011). Amylase, maltase and sucrase activities in hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata* (Decapoda: rachyura: Varunidae): partial characterization and response to low environmental salinity. *Scientia Marina*, 75: 517-524.
- Asaro, A. 2016. Estrategias a nivel bioquímico-fisiológico en cangrejos eurihalinos: mecanismos de ajustes digestivos en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

- Asaro, A., Martos-Sitcha, J.A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M. y López Mañanes, A.A. (2017a). In silico analysis and effects of environmental salinity in the expression and activity of digestive α -amylase and trypsins from the euryhaline crab *Neohelice granulata*. *Canadian Journal of Zoology*, 96: 127-139.
- Asaro, A., Paggi, R.A, De Castro, R. y López Mañanes, A. (2017b). Amylase in the hepatopancreas of a euryhaline burrowing crab: characteristics and modulation. *Turkish Journal of Zoology*, 41: 443-453.
- Asaro, A., Paggi, R.A., del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2018). Glucose homeostasis in the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*: Effects of the salinity in the amylase, maltase and sucrase activities in the hepatopancreas and in the carbohydrate reserves in different tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 216: 39-47.
- Ásgeirsson, B., Hartemink, R., y Chlebowski, J.F. (1995). Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110: 315-329.
- Aslam, S., Zuberi, A. y Shoaib, A. (2018). Effect of experimental diets on the activities of intestinal digestive enzymes of Grass carp, (*Ctenopharyngodon idella*) and Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *International Journal of Aquatic Science*, 9: 51-57
- Azzopardi, E., Lloyd, C., Teixeira, S.R., Conlan, R.S. y Whitaker, I.S. (2016). Clinical applications of amylase: novel perspectives. *Surgery*, 160: 26-37.
- Bakke, A.M., Sissener, N.H., Sanden, M., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., Johannessen, L.E. y Hemre, G.I. (2011). Genetically modified plants as fish feed ingredients. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68: 563-574.

- Ballantyne, J.S. (2014). Membranes and metabolism of fishes. En: *The Physiology of Fishes*. CRC Press Boca Raton, FL, pp: 81-147.
- Baloch, A.R., Franěk, R., Saito, T. y Pšenička, M. (2019). Dead-end (dnd) protein in fish. A review. *Fish physiology and biochemistry*, 1-8.
- Bambill, G.A., Oka, M., Radonic, M., López, A.V., Müller, M.I., Boccanfuso, J.J. y Bianca, F.A. (2006). Broodstock management and induced spawning of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) under a closed recirculated system. *Revista de biología marina y oceanografía*, 41: 45–55.
- Banday, A.A., Diaz, A.D. y Lokhandwala, M. (2019). Kidney dopamine D1-like receptors and angiotensin 1–7 interaction inhibits renal Na⁺ transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 317: 949-956.
- Barker, P.L. y Gibson, R. (1977). Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.)(Decapoda: Nephropidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 26: 297-324.
- Bas, C., Lancia, J.P., Luppi, T., Méndez-Casariago, A., Kittlein, M. y Spivak, E. (2014). Influence of tidal regime, diurnal phase, habitat and season on feeding of an intertidal crab. *Marine ecology*, 35: 319-331.
- Bates, J.M., Akerlund, J., Mittge, E. y Guillemin, K. (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell host & microbe*, 2: 371-382.
- Belgrad, B.A. y Griffen, B.D. (2016). Predator–prey interactions mediated by prey personality and predator hunting mode. *Proceedings of .Royal Society B*, 283(1828), 20160408.

- Beltowski, J., Jamroz-Wisniewska, A., Borkowska, E. y Wójcicka, G. (2004). Up-regulation of renal Na, K ATPase: the possible novel mechanism of leptin-induced hypertension. *Polish Journal Pharmacology*, 56: 213-222.
- Biesiot, P.M. y Capuzzo, J.M. (1990). Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 136: 107-122.
- Bilski, J., Mazur-Bialy, A., Wojcik, D., Zahradnik-Bilska, J., Brzozowski, B., Magierowski, M., ... y Brzozowski, T. (2017). The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. *Mediators of inflammation*, 9074601
- Bolasina, S.N. (2011). Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. *Aquaculture*, 313: 140-143.
- Bonting, S.L. (1970). Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase and cation transport. *Membrane ion transport*. Wiley Interscience, London, p: 257.
- Bortolus, A. e Iribarne, O. (1999). Effects of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Marine Ecology Progress Series*, 178: 79-88.
- Bortolato, M., Besson, F. y Roux, B. (2002). An infrared study of the thermal and pH stabilities of the GPI-alkaline phosphatase from bovine intestine. *Biochemical and biophysical research communications*, 292: 874-879.
- Bortolus, A., Schwindt, E. e Iribarne, O. (2002). Positive plant–animal interactions in the high marsh of an Argentinean coastal lagoon. *Ecology*, 83: 733-742.
- Bortolus, A., Lattera, P. y Iribarne, O. (2004). Crab-mediated phenotypic changes in *Spartina densiflora* Brong. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 59: 97-107.

- Botto, F., Valiela, I., Iribarne, O., Martinetto, P. y Alberti, J. (2005). Impact of burrowing crabs on C and N sources, control, and transformations in sediments and food webs of SW Atlantic estuaries. *Marine Ecology Progress Series*, 293: 155-164.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buchet, R., Millán, J.L. y Magne, D. (2013). Multisystemic functions of alkaline phosphatases. In: *Phosphatase Modulators*. Humana Press, Totowa, NJ, pp: 27-51.
- Buckup, L., Dutra, B.K., Ribarcki, F.P., Fernandes, F.A., Noro, C.K., Oliveira, G.T. y Vinagre, A.S. (2008). Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149: 59-67.
- Cadiz, L., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel, P., Madec, L., Le Delliou, H. y Mazurais, D. (2018). Metabolic response to hypoxia in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) displays developmental plasticity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 215: 1-9.
- Calhau, C., Martel, F., Hipólito-Reis, C. y Azevedo, I. (2000). Effect of P-glycoprotein modulators on alkaline phosphatase activity in cultured rat hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 10: 195-202.
- Calí, C., Tauffenberger, A. y Magistretti, P. (2019). The strategic location of glycogen and lactate: from body energy reserve to brain plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13: 82.
- Candiotto, F.B., Freitas-Júnior, A.C.V., Neri, R.C.A., Bezerra, R.S., Rodrigues, R.V., Sampaio, L.A., Y Tesser, M. B. (2018). Characterization of digestive enzymes

from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78: 281-288.

Carneiro, M. H. (1995). Reprodução e alimentação dos linguados *Paralichthys patagonicus* e *P. orbignyanus* (Pleuronectiformes: Bothidae), no Rio Grande do Sul, Brasil (Doctoral dissertation, Dissertação de mestrado. Rio Grande. FURG).

Carter, C. y Mente, E. (2014). Protein synthesis in crustaceans: a review focused on feeding and nutrition. *Open Life Sciences*, 9: 1-10.

Caruso-Neves, C., Francisco-Pedro, L.G., Souza, L.P., Chagas, C. y Lopes, A.G. (1997). Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1329: 336-344.

Caruso-Neves, C., Einicker-Lamas, M., Chagas, C., Oliveira, M. M., Vieyra, A. y Lopes, A.G. (1999). Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54: 100-104.

Caruso-Neves, C. y Lopes, A.G. (2000). Sodium pump in the Malpighian tubules of *Rhodnius sp.* *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72: 407-412.

Caruso-Neves, C., Rangel, L.B.A., Vives, D., Vieyra, A., Coka-Guevara, S. y Lopes, A.G. (2000). Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity is an effector protein for cAMP regulation in basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1468: 107-114.

Caruso-Neves, C., Rangel, L.B.A., Lara, L.S. y Lopes, A.G. (2001). Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 1079-1084.

- Caruso-Neves, C., Coelho-Souza, S.A., Vives, D., Goes, G., Lara, L.S. y Lopes, A.G. (2002). Modulation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg²⁺, MgATP and furosemide. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34: 1586-1593.
- Caruso-Neves, C., Vives, D., Dantas, C., Albino, C.M., Fonseca, L.M., Lara, L.S., ... y Lopes, A.G. (2004). Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1660: 93-98.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. y Marty, A. (2012). Lipases: an overview. In: *Lipases and phospholipases*. Humana Press, pp. 3-30.
- Castilho, P.C., Martins, I.A., y Bianchini, A. (2001). Gill Na⁺, K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 256: 215-227.
- Castillo, J., Crespo, D., Capilla, E., Diaz, M., Chauvigne, F., Cerda, J. y Planas, J.V. (2009). Evolutionary structural and functional conservation of an ortholog of the GLUT2 glucose transporter gene (SLC2A2) in zebrafish. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297: 1570–1581.
- Castro, C., Corraze, G., Panserat, S. y Oliva-Teles, A. (2015). Effects of fish oil replacement by a vegetable oil blend on digestibility, postprandial serum metabolite profile, lipid and glucose metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture nutrition*, 21: 592-603.
- Castro, C., Couto, A., Pérez-Jiménez, A., Serra, C.R., Díaz-Rosales, P., Fernandes, R., ... y Oliva-Teles, A. (2016). Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on

- digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish physiology and biochemistry*, 42: 203-217.
- Cebada, J. y García, U. (2007). Histamine operates Cl^- -gated channels in crayfish neurosecretory cells. *Journal of Experimental Biology*, 210: 3962-3969.
- Chan, J.R. y Stinson, R.A. (1986). Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 7635-7639.
- Chang, E.B. y Leung, P.S. (2014). Intestinal water and electrolyte transport. In: *The Gastrointestinal System*. Springer, Dordrecht, pp: 107-134.
- Chassaing, B. y Gewirtz, A.T. (2018). Not so splendid for the gut microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24: 1055–1056.
- Chen, Y.J., Zhang, T.Y., Chen, H.Y., Lin, S.M., Luo, L. y Wang, D.S. (2017). An evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus* during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism. *Aquaculture*, 473: 375-382.
- Chen, Y.J., Wang, X.Y., Pi, R.R., Feng, J.Y., Luo, L., Lin, S.M. y Wang, D.S. (2018). Preproinsulin expression, insulin release, and hepatic glucose metabolism after a glucose load in the omnivorous GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 482: 183-192.
- Choi, C.Y., Shin, H.S., Choi, Y.J., Kim, N.N., Lee, J. y Kil, G.S. (2012). Effect of LED light spectra on starvation-induced oxidative stress in the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163: 357-363.

- Choi, C.Y., Kim, T.H., Oh, Y.H., Min, T.S., Choi, J.Y. y Song, J.A. (2019). Effects of various LED light spectra on circadian rhythm during starvation in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biological Rhythm Research*, 50: 355-365.
- Christie, A.E., Fontanilla, T.M., Roncalli, V., Cieslak, M.C. y Lenz, P.H. (2014). Identification and developmental expression of the enzymes responsible for dopamine, histamine, octopamine and serotonin biosynthesis in the copepod crustacean *Calanus finmarchicus*. *General and comparative endocrinology*, 195: 28-39.
- Clark, M.C., Khan, R. y Baro, D.J. (2008). Crustacean dopamine receptors: localization and G protein coupling in the stomatogastric ganglion. *Journal of neurochemistry*, 104: 1006-1019.
- Clausen, M.V., Hilbers, F. y Poulsen, H. (2017). The structure and function of the Na, K-ATPase isoforms in health and disease. *Frontiers in physiology*, 8: 371.
- Con, P., Nitzan, T. y Cnaani, A. (2017). Salinity-dependent shift in the localization of three peptide transporters along the intestine of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Frontiers in physiology*, 8: 8.
- Conde-Sieira, M. y Soengas, J.L. (2017). Nutrient sensing systems in fish: impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Frontiers in neuroscience*, 10: 603.
- Corotto, F.S. y Holliday, C.W. (1996). Branchial Na, K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 113: 361-368.
- Date, K., Satoh A., Iida K. y Ogawa H. (2015). Pancreatic α -Amylase Controls Glucose Assimilation by Duodenal Retrieval through N-Glycan-specific Binding, Endocytosis, and Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 290:17439-17450.

- Date, K., Yamazaki, T., Toyoda, Y., Hoshi, K. y Ogawa, H. (2019). α -Amylase expressed in human small intestinal epithelial cells is essential for cell proliferation and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, p:12.
- de Almeida-Amaral, E.E., Caruso-Neves, C., Pires, V.M.P. y Meyer-Fernandes, J.R. (2008). *Leishmania amazonensis*: characterization of an ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. *Experimental parasitology*, 118: 165-171.
- Del Castillo, J.R. y Robinson, J.W.L. (1985a). Mg²⁺-ATP-dependent sodium transport in inside-out basolateral plasma membrane vesicles from guinea-pig small intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 812: 402-412.
- Del Castillo, J.R. y Robinson, J.W.L. (1985b). Na⁺-stimulated ATPase activities in basolateral plasma membranes from guinea-pig small intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 812: 413-422.
- del Valle, J.C., Busch, C. y López Mañanes, A.A. (2006). Phenotypic plasticity in response to low quality diet in the South American omnivorous rodent *Akodon azarae* (Rodentia: Sigmodontinae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145: 397-405.
- del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2008). Digestive strategies in the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 150: 387-394.
- del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2011). Digestive flexibility in females of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* in their natural habitat. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315: 141-148.

- del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2012). Glucose homeostasis in the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* from Mar Chiquita coastal lagoon: regulation by dopamine. XIII Congreso –XXXI Reunión Annual de la Sociedad de Biología de Rosario. *Biocell*, 35: 66.
- del Valle, J.C; Michiels, M.S y López Mañanes A.A. (2016). Digestive and metabolic profile at the biochemical level of juvenile flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: *Paralichthyidae*). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 11: 309-323.
- Dhital, S., Lin, A.H.M., Hamaker, B.R., Gidley, M.J. y Muniandy, A. (2013). Mammalian mucosal α -glucosidases coordinate with α -amylase in the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis. *PloS one*, 8: e62546.
- Dhital, S., Warren, F.J., Butterworth, P.J., Ellis, P.R. y Gidley, M.J. (2017). Mechanisms of starch digestion by α -amylase—Structural basis for kinetic properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57: 875-892.
- Dias, J., Ferrão, F.M., Axelband, F., Carmona, A.K., Lara, L.S. y Vieyra, A. (2014). ANG-(3–4) inhibits renal Na⁺-ATPase in hypertensive rats through a mechanism that involves dissociation of ANG II receptors, heterodimers, and PKA. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306: 855-863.
- Díaz de Astarloa, J.M. (1994). Las especies del género *Paralichthys* (Pisces, *Paralichthyidae*) del mar argentino. Morfología y sistemática. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Díaz de Astarloa, J.M. (2002). A review of the flatfish fisheries of the south Atlantic Ocean. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37: 113-125.

- Dópido, R., Rodríguez, C., Gómez, T., Acosta, N.G. y Díaz, M. (2004). Isolation and characterization of enterocytes along the intestinal tract of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 139: 21-31.
- D'Orazio, S.E. y Holliday, C.W. (1985). Gill Na, K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiological zoology*, 58: 364-373.
- Drach P, Tchernigovtzeff C (1967) Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie Milieu*, 18: 595-607.
- Ducatelle, R., Goossens, E., Meyer, F., Eeckhaut, V., Antonissen, G., Haesebrouck, F. e Immerseel, F. (2018). Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Veterinary research*, 49: 43.
- Duka, A. y Ahearn, G.A. (2013). l-leucine, l-methionine, and l-phenylalanine share a Na⁺/K⁺-dependent amino acid transporter in shrimp hepatopancreas. *Journal of Comparative Physiology B*, 183: 763-771.
- Duka, A. y Ahearn, G.A. (2014). Comparative cation dependency of sugar transport by crustacean hepatopancreas and intestine. *Biology open*, 3: 635-643.
- Dutta, T.K., Jana, M., Pahari, P.R. y Bhattacharya, T. (2006). The effect of temperature, pH, and salt on amylase in *Heliodyptomus viduus* (Gurney)(Crustacea: Copepoda: Calanoida). *Turkish journal of Zoology*, 30: 187-195.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 519-539.
- Estaki, M., DeCoffe, D. y Gibson, D.L. (2014). Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20: 15650.

- Faccioli, C.K., Chedid, R.A., Mori, R.H., do Amaral, A.C., Franceschini-Vicentini, I.B. y Vicentini, C.A. (2016). Acid and alkaline phosphatase localization in the digestive tract mucosa of the *Hemisorubim platyrhynchos*. *Acta histochemica*, 118: 722-728.
- Fairweather, S.J, Bröer, A., O'Mara, L.M. y Broer, S. (2012). Intestinal peptidases form functional complexes with the neutral amino acid transporter B0AT1. *Biochemical Journal*, 446: 135–148.
- Fanjul, E., Grela, M.A., Canepuccia, A. y Iribarne, O. (2008). The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79: 300-306.
- Figueiredo, M.S.R.B. y Anderson, A.J. (2009). Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (*Palaemonidae*, *Portunidae* and *Penaeidae*) feeding in the natural habitat. *Aquaculture Research*, 40: 282-291.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Sarojini, R. y Reddy, P.S. (1994). Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *Journal of Crustacean Biology*, 14: 413–437.
- Funk, C., Pantze, M., Jehle, L., Ponelle, C., Scheuermann, G., Lazendic, M. y Gasser, R. (2001). Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology*, 167: 83-98.
- Furné, M., Morales, A. E., Trenzado, C. E., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Domezain, A. y Rus, A. S. (2012). The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology, Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 182(1), 63-76.

- Gibson, R. y Barker, P.L. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanographic Marine Biology annual review*, 17: 285-346.
- Geddes, K., y Philpott, D.J. (2008). A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135: 8-12.
- Gioda, C.R., Pretto, A., Freitas, C.D.S., Leitemperger, J., Loro, V.L., Lazzari, R., ... y Salbego, J. (2017). Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural*, 47, p. 1-7.
- Gisbert, E., Nolasco, H. y Solovyev, M. (2018). Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture*, 487: 102-108.
- Goldberg, R.F., Austen, W.G., Zhang, X., Munene, G., Mostafa, G., Biswas, S., ... y Warren, H.S. (2008). Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 3551-3556.
- Gomes, C.P., Leao-Ferreira, L.R., Pinheiro, A.A.S., Gomes-Quintana, E., Wengert, M., Lopes, A.G., y Caruso-Neves, C. 2008. Crosstalk between the signaling pathways triggered by angiotensin II and adenosine in the renal proximal tubules: implications for modulation of Na⁺-ATPase activity. *Peptides*, 29: 2033-2038.
- Gominho-Rosa, M., Rodrigues, A.P.O., Mattioni, B., de Francisco, A., Moraes, G. y Fracalossi, D.M. (2015). Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture*, 435:92-99.
- Goodman, B.E. (2010). Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*, 34: 44-53.

- Grosell, M., Farrell, A.P. y Brauner, C.J. (2011). Fish physiology: The multifunctional gut of fish (*Vol. 30*). *Academic Press*, p:1-55.
- Guerville, M. y Boudry, G. (2016). Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311: 1-15.
- Guo, C., Sun, D., Wang, X. y Mao, S. (2019). An integrated metabolomic and proteomic study revealed the difference in metabolite and protein expression profiles in ruminal tissue from goats fed hay or high grain diets. *Frontiers in physiology*, 10: 66.
- Hamre, K., Øfsti, A., Næss, T., Nortvedt, R. y Holm, J.C.(2003). Macronutrient composition of formulated diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) juveniles. *Aquaculture*, 227: 233-244.
- Hani, Y.M.I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O. y Bado-Nilles, A. (2018) Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. *PLoS ONE*, 13: e0194932.
- Harpaz, S. y Uni, Z. (1999). Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124: 155-160.
- Hernandez-Blazquez, F.J., Guerra, R.R., Kfoury, J.R., Bombonato, P.P., Cogliati, B. y Da Silva, J.R.M.C. (2006). Fat absorptive processes in the intestine of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). *Polar Biology*, 29: 831-836.

- Hixson, S.M. (2014). Fish nutrition and current issues in aquaculture: the balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5: 234.
- Holmgren, S. y Olsson, C. (2009). The neuronal and endocrine regulation of gut function. *Fish Physiology*, 28: 467-512.
- Hoylaerts, M.F., Manes, T. y Millán, J.L. (1997). Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 22781-22787.
- Huang, H., Haihui, Y., Shaojing, L. y Guizhong, W. (2005). Immunocytochemical localization of endocrine cells in the digestive system of the mud crab, *Scylla serrata*. *Journal of Xiamen University. Natural Science*, 44:94-97.
- Imran, M., Nazar, M., Saif, M., Khan, M. A., Vardan, M. y Javed, O. (2016). *Role of Enzymes in Animal Nutrition: A Review. PSM Veterinary Research*, 1: 38-45.
- Iribarne, O., Bortolus, A. y Botto, F. (1997). Between-habitat differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. *Marine Ecology Progress Series*, 155: 137-145.
- Iribarne, O., Martinetto, P., Schwindt, E., Botto, F., Bortolus, A. y Borboroglu, P.G. (2003). Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296: 167-182.
- Jaitovich, A.A. y Bertorello, A.M. (2006). Na⁺, K⁺-ATPase: an indispensable ion pumping-signaling mechanism across mammalian cell membranes. In: *Seminars in nephrology*, WB Saunders, Vol. 26, No. 5, pp: 386-392).

- Janeček, Š., Svensson, B. y MacGregor, E.A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and molecular life sciences*, 71: 1149-1170.
- Janeček, Š. y Svensson, B. (2016). Amylolytic glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73: 2601-2602.
- Jimenez, A.G. y Kinsey, S.T. (2015). Energetics and metabolic regulation. *The natural history of the Crustacea*, 4: 391-419.
- Jorgensen, P.L., Håkansson, K.O. y Karlsh, S.J. (2003). Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology*, 65: 817-849.
- Kamaszewski, M., Ostaszewska, T., Napora-Rutkowski, Ł., Wójcik, M. y Dabrowski, K. (2019). The role of dipeptide on fish growth and digestive enzyme activity modulation in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Animal Science Papers & Reports*, 37(1).
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annual review of biochemistry*, 71: 511-535.
- Karasov, W.H., Martinez del Rio, C. y Caviedes-Vidal, E. (2011). Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annual review of physiology*, 73: 69-93.
- Karasov, W.H. y Douglas, A.E. (2013). Comparative digestive physiology. *Comprehensive Physiology*, 271-283.
- Karatas, T. (2018). Effect of Short-Term Starvation on Serum Metabolites, Antioxidant Enzymes and Endogenous Reserves of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Pakistan Journal of Zoology*, 50: 1723-1729.

- Kelly, S.A., Panhuis, T.M. y Stoehr, A.M. (2012). Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance. *Comparative Physiology*, 2:1417-1439.
- Kurtovic, I., Marshall, S.N., Zhao, X. y Simpson, B.K. (2009). Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 17: 18-40.
- La Fleur, S.E., Fliers, E. y Kalsbeek, A. (2014). Neuroscience of glucose homeostasis. *Handbook of Clinical Neurology*, 126: 341- 351
- Lallès, J.P. (2014). Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutrition reviews*, 72: 82-94.
- Lallès J.P. (2019a). Intestinal alkaline phosphatase, inflammation and nutrition: Recent advances. *Nutrition Reviews*.
- Lallès J.P. (2019b). Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation. *Reviews in Aquaculture*, 1–27.
- Lancia, J.P., Bas, C. y Spivak, E. (2014). Food manipulation and selection in the omnivorous grapsoid crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Varunidae). *Scientia Marina*, 78: 529-536.
- Leone, F.A., Bezerra, T.M., Garçon, D.P., Lucena, M.N., Pinto, M.R., Fontes, C.F. y McNamara, J.C. (2014). Modulation by K⁺ plus NH₄⁺ of microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the diadromous river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *PLoS One*, 9: e89625.
- Leone, F.A., Lucena, M.N., Garçon, D.P., Pinto, M.R. y McNamara, J.C. (2017). Gill ion transport ATPases and ammonia excretion in aquatic crustaceans. In: *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. Springer, Cham, pp: 61-107.

- Liang, H., Mokrani, A., Chisomo-Kasiya, H., Wilson-Arop, O.M., Mi, H., Ji, K., ... y Ren, M. (2018). Molecular characterization and identification of facilitative glucose transporter 2 (GLUT2) and its expression and of the related glycometabolism enzymes in response to different starch levels in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish physiology and biochemistry*, 44: 869-883.
- Líbano-Soares, J.D., Landgraf, S.S., Gomes-Quintana, E., Lopes, A.G. y Caruso-Neves, C. (2011). Prostaglandin E2 modulates proximal tubule Na⁺-ATPase activity: cooperative effect between protein kinase A and protein kinase C. *Archives of biochemistry and biophysics*, 507: 281-286.
- Lignot, J.H. y Charmantier, G. (2015). Osmoregulation and excretion. *The Natural History of Crustacea*, 4: 249-285.
- Lin, A.H.M., Lee, B.H. y Chang, W.J. (2016). Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*, 53:163-171.
- Linder, C.H., Englund, U.H., Narisawa, S., Millán, J.L. y Magnusson, P. (2013). Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. *Bone*, 53: 399-408.
- Liu, Y.T., Luo, Y., Gu, J., Jiang, S., da Yong, L.I. y Liao, W.B. (2018). The relationship between brain size and digestive tract length do not support expensive-tissue hypothesis in *Hylarana guentheri*. *Acta Herpetologica*, doi: 10.13128
- López, A.V., Radonic, M., Müller, M.I. y Bambill, G.A. (2009). Influencia de la temperatura en la proporción de sexos en juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Revista AquaTIC*, 31: pp: 1-5.
- Lucena, M.N., Garçone, D.P., Fontesd, C.F.L., Fabria, L.M., Moraesa, C.M., McNamara, J.C. y Leone, F.A. (2019). Dopamine binding directly up-regulates (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum*.

- Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 233: 39–47.
- Lucu, Č., y Towle, D.W. (2003). Na⁺⁺ K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 135: 195-214.
- Luppi, T., Bas, C., Casariego, A.M., Albano, M., Lancia, J., Kittlein, M., ... e Iribarne, O. (2013). The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgoland Marine Research*, 67(1), 1.
- Ma, H.J., Mou, M.M., Pu, D.C., Lin, S.M., Chen, Y. J. y Luo, L. (2019). Effect of dietary starch level on growth, metabolism enzyme and oxidative status of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 498: 482-487.
- Magnone, L., Bessonart, M., Rocamora, M., Gadea, J. y Salhi, M. (2015). Diet estimation of *Paralichthys orbignyanus* in a coastal lagoon via quantitative fatty acid signature analysis. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 462: 36-49.
- Marín-Juez, R., Diaz, M., Morata, J., y Planas, J.V. (2013). Mechanisms regulating GLUT4 transcription in skeletal muscle cells are highly conserved across vertebrates. *PLoS One*, 8: e80628.
- Markweg-Hanke, M., Lang, S., y Wagner, F. (1995). Dodecanoic acid inhibition of a lipase from *Acinetobacter* sp. OPA 55. *Enzyme and microbial technology*, 17: 512-516.
- McCue, M.D. (2006). Specific dynamic action: a century of investigation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 144: 381-394.
- McGaw, I.J. y Curtis, D.L. (2013). A review of gastric processing in decapod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*, 183: 443-465.

- Méndez, E., López Mañanes, A.A. y Pinoni, S.A. (2011). Lipase activity in the hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: short and long term postfeeding response. *Biocell*, 35: 142
- Méndez, E., López Mañanes, A.A. y Pinoni, S.A. (2012). Proteolytic activity in hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: response to hyper-regulation and feeding. *Biocell*, 36: 32.
- Méndez, E., Caruso Neves, C., López Mañanes, A.A. (2018). Two sodium pumps in the hepatopancreas of the intertidal euryhaline crab *Neohelice granulata*: biochemical characteristics and differential modulation after feeding. *Canadian Journal of Zoology*, 96: 576-584.
- Méndez, E., López Mañanes, A.A. y Pinoni, S.A. (2019). Feeding and osmoregulation in the euryhaline crab *Neohelice granulata*: digestive parameter responses. *Animal Biology*, 1: 1-17.
- Mendez-Casariego, A.M., Luppi, T., Iribarne, O. y Daleo, P. (2011). Increase of organic matter transport between marshes and tidal flats by the burrowing crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* Dana in SW Atlantic salt marshes. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 401: 110-117.
- Mente, E., Pierce, G.J., Antonopoulou, E., Stead, D., y Martin, S.A. (2017). Expresión de proteína hepática posprandial en trucha *Oncorhynchus mykiss* a examen proteómico. *Informes de bioquímica y biofísica*, 9: 79-85.
- Mentlein, R. (2004). Cell-surface peptidases. *International Review of Cytology*, 235: 165–213.
- Michiels, M.S., del Valle, J.C. y Lopez Mañanes, A.A. (2013). Effect of environmental salinity and dopamine injections on key digestive enzymes in hepatopancreas of the

euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda: Brachyura: Varunidae). *Scientia Marina*, 77: 129-136.

Michiels, M.S. (2015). Fisiología bioquímica digestiva de crustáceos decápodos: estudio integrativo sobre la actividad de enzimas digestivas en cangrejos eurihalinos. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina

Michiels, M.S., del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2015a). Biochemical characteristics and modulation by external and internal factors of aminopeptidase-N activity in the hepatopancreas of a euryhaline burrowing crab. *Journal of Comparative Physiology Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 185: 501-510.

Michiels, M.S., del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2015b). Lipase activity sensitive to dopamine, glucagon and cyclic AMP in the hepatopancreas of the euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). *Crustaceana*, 88: 51-65.

Michiels, M.S., del Valle, J.C. y López Mañanes, A.A. (2017). Trypsin and N-aminopeptidase (APN) activities in the hepatopancreas of an intertidal euryhaline crab: Biochemical characteristics and differential modulation by histamine and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 204: 228-235.

Miles, A.J., Fedosova, N.U., Hoffmann, S.V., Wallace, B.A. y Esmann, M. (2013). Stabilisation of Na, K-ATPase structure by the cardiotoxic steroid ouabain. *Biochemical Biophysical Research Commun*, 435: 300-305.

Millán, J.L. (2006). Alkaline phosphatases. *Purinergic signalling*, 2: 335p.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31: 426-428.

- Miller, K.M., Schulze, A.D., Ginther, N., Li, S., Patterson, D.A., Farrell, A.P. y Hinch, S.G. (2009). Salmon spawning migration: metabolic shifts and environmental triggers. *Comparative Biochemistry and Physiology: Genomics and Proteomics*, 4: 75-89.
- Mo, A.J., Sun, J.X., Wang, Y.H., Yang, K., Yang, H.S. y Yuan, Y.C. (2019). Apparent digestibility of protein, energy and amino acids in nine protein sources at two content levels for mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Aquaculture*, 499: 42-50.
- Moretti, R., Martín, M., Proverbio, T., Proverbio, F. y Marín R. (1991). Ouabain-insensitive Na-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry & Molecular Biology*, 98: 623-626.
- Mota, A., Silva, P., Neves, D., Lemos, C., Calhau, C., Torres, D., ... y Pinho, M.J. (2008). Characterization of rat heart alkaline phosphatase isoenzymes and modulation of activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41: 600-609.
- Moyano López, F.J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. *Avances en Nutrición Acuicola*. 396-409
- Mueller, S.N. (2017) Grand challenges in immunological memory. *Frontiers in immunology*, 8: 385.
- Muginova, S.V., Zhavoronkova, A.M., Polyakov, A.E. y Shekhovtsova, T.N. (2007). Application of alkaline phosphatases from different sources in pharmaceutical and clinical analysis for the determination of their cofactors; zinc and magnesium ions. *Analytical Sciences*, 23: 357-363.
- Müller, M.I., Radonic, M., López, A.V. y Bambill, G.A. (2006). Crecimiento y rendimiento en carne del Lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) cultivado en Argentina. *Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 4 § . 15 noviembre-15 diciembre*, 267: p. 273.

- Munroe, T.A. (2015). Distributions and biogeography. pp.52-82. En: Gibson, R.N., Nash, R.M., Geffen, A.J. y Van der Veer, H.W., Flatfishes: Biology and Exploitation 2nd Edition. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Murashita, K., Furuita, H., Matsunari, H., Yamamoto, T., Awaji, M., Nomura, K. y Tanaka, H. (2013). Partial characterization and ontogenetic development of pancreatic digestive enzymes in Japanese eel *Anguilla japonica* larvae. *Fish physiology and biochemistry*, 39:895-905.
- Navarro, I. y Gutiérrez, J. (1995). Fasting and starvation. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier, Vol. 4, pp: 393-434.
- Negi, S. (2019). Lipases: A Promising Tool for Food Industry. En: *Green Bio-processes*. Springer, Singapore, pp: 181-198.
- Nepal, N., Arthur, S. y Sundaram, U. (2019). Unique Regulation of Na-K-ATPase during Growth and Maturation of Intestinal Epithelial Cells. *Cells*, 8, 593.
- Neufeld, M., Maclaren, N.K., Riley, W.J., Lezotte, D., McLaughlin, J.V., Silverstein, J. y Rosenbloom, A.L. (1980). Islet cell and other organ-specific antibodies in US Caucasians and Blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 29: 589-592.
- Norbis, W., y Galli, O. (2004). Feeding habits of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean: Rocha, Uruguay. *Ciencias Marinas*, 30: 619-625.
- Olsen, R.L., Øvervø, K. y Myrnes, B. (1991). Alkaline Phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): a dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comparative Biochemistry and Physiology, Comparative Biochemistry*, 99: 755-761.

- Orozco, Z.G.A., Soma, S., Kaneko, T. y Watanabe, S. (2018). Spatial mRNA expression and response to fasting and refeeding of neutral amino acid transporters slc6a18 and slc6a19a in the intestinal epithelium of *Mozambique tilapia*. *Frontiers in physiology*, 9: 212.
- Pagliarani, A., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Trigari, G. y Borgatti, A.R. (1996). Mussel microsomal Na⁺-Mg²⁺-ATPase sensitivity to waterborne mercury, zinc and ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113: 185-191.
- Pagliarani, A., Bandiera, P., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M. y Borgatti, A.R. (2006). Response to alkyltins of two Na⁺-dependent ATPase activities in *Tapes philippinarum* and *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicology in vitro*, 20: 1145-1153.
- Pagliarani, A., Bandiera, P., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Nesci, S. y Borgatti, A.R. (2008). Tributyltin (TBT) inhibition of oligomycin-sensitive Mg-ATPase activity in mussel mitochondria. *Toxicology in vitro*, 22: 827-836.
- Palaniappan, B., Arthur, S., Sundaram, V.L., Butts, M., Sundaram, S., Mani, K., ... y Sundaram, U. (2019). Inhibition of intestinal villus cell Na/K-ATPase mediates altered glucose and NaCl absorption in obesity-associated diabetes and hypertension. *The FASEB Journal*, fj-201802673R.
- Pamuru, R.R. (2019). Endocrinology of Reproduction in Crustaceans. En: *Comparative Endocrinology of Animals*. IntechOpen.
- Pan, L., Si, L. y Hu, D. (2019). Ion Transport Signal Pathways Mediated by Neurotransmitter (Biogenic Amines) of *Litopenaeus vannamei* Under Low Salinity Challenge. *Journal of Ocean University of China*, 18: 210-218.

- Pavasovic, A., Anderson, A. J., Mather, P. B. y Richardson., N. A. (2007). Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research*, 38:644-652.
- Peng, T., Wang, D., Yu, Y., Liu, C., y Zhu, B. (2015). Identification and expression of an ecdysteroid-responsive amylase from red crayfish *Procambarus clarkii*. *Fisheries Science*, 81: 345-352.
- Perera, E., Rodríguez-Viera, L., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G. y Mancera, J.M. (2015). Trypsin isozymes in the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): from molecules to physiology. *Journal of Comparative Physiology, Biochemistry & Molecular Biology*, 185: 17-35.
- Pinoni, S.A, Goldemberg, A.L. y Lopez Mananes, A.A. (2005). Alkaline phosphatase activities in muscle of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*: response to environmental salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326: 217-226.
- Piersma, T. y Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 228-233.
- Pinoni, S.A. y López Mañanes, A.A. (2008). Partial characterization and response under hyperregulating conditions of Na⁺-K⁺ ATPase and levamisole-sensitive alkaline phosphatase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Scientia Marina*, 72: 15-24.
- Pinoni, S.A. (2009). Mecanismos de mantenimiento del medio interno en respuesta a estrés ambiental en crustáceos decápodos de interés regional. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina.

- Pinoni, S.A. y López Mañanes, A.A. (2009). Na⁺ ATPase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: differential response to environmental salinity. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 372: 91-97.
- Pinoni, S.A., Iribarne, O. y López Mañanes, A.A. (2011). Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 158: 552-559.
- Pinoni, S.A., Michiels, M.S. y López Mañanes, A.A. (2013). Phenotypic flexibility in response to environmental salinity in the euryhaline crab *Neohelice granulata* from the mudflat and the saltmarsh of a SW coastal lagoon. *Marine biology*, 160, 2647-2661.
- Pinoni, S.A., Méndez, E., y López Mañanes, A.A. (2015). Digestive flexibility in a euryhaline crab from a SW Atlantic coastal lagoon: alkaline phosphatase activity sensitive to salinity in the hepatopancreas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95: 1133-1140.
- Pinoni, S.A. y López Mañanes, A.A. (2016). Digestive flexibility in the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda, Brachyura, Varunidae) from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina): responses to salinity of key enzymes in hepatopancreas. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 11, 345-355.
- Pinoni, S.A., Jerez-Cepa, I., López Mañanes, A.A. y Mancera Romero, J.M. (2018). The euryhaline crab *Uca tangeri* showed metabolic differences to sex and environmental salinity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98: 1465-1475.
- Pirahanchi, Y. y Aeddula, N.R. (2019). Physiology, Sodium Potassium Pump (Na⁺ K⁺ Pump). En: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

- Polakof, S., Mommsen, T.P. y Soengas, J.L. (2011). Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 160: 123-149.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L. y Moon, T.W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology, Biochemical, Systems and Environmental Physiology*, 182: 1015-1045.
- Proverbio, F., Proverbio, T. y Marín, R. (1986). Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 858: 202-205.
- Proverbio, F., Marín, R., y Proverbio, T. (1991). The ouabain-insensitive sodium pump. *Comparative Biochemistry and Physiology, Physiology*, 99: 279-283.
- Pujante, I.M., Martos-Sitcha, J.A., Moyano, F.J., Ruiz-Jarabo, I., Martínez-Rodríguez, G. y Mancera, J.M. (2015). Starving/re-feeding processes induce metabolic modifications in thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Comparative Biochemistry and Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 180: 57-67.
- Pujante, I.M., Díaz-López, M., Mancera, J.M. y Moyano, F.J. (2017). Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Aquaculture Research*, 48: 367-376.
- Pujante Rodriguez, I.M. (2019). Fisiología y Bioquímica Digestiva de la liseta (*Chelon labrosus*). Tesis Doctoral. Universidad de Cadiz. Puerto Real, España.
- Qu, F., Liu, S., He, C., Zhou, J., Zhang, S., Ai, Z., ... y Ni, D. (2019). Comparison of the effects of green and black tea extracts on Na⁺/K⁺-ATPase activity in intestine of type 1 and type 2 diabetic mice. *Molecular nutrition & food research*, 1801039.

- Radonic, M., Muller, M.I., López, A.V., Bambill, G.A., Spinedi, M. y Boccanfuso, J.J. (2007). Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina. *Ciencias Marinas*, 33: 187-196.
- Radonic, M. y Macchi, G.J. (2009). Gonadal sex differentiation in cultured juvenile flounder, *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Journal of the World Aquaculture Society*, 40: 129-133.
- Radonic, M., Bianca, F.A., Hernández, D. y Aristizabal, E. (2016). Evaluación de dietas balanceadas en el crecimiento de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. Informe de Asesoramiento y Transferencia INIDEP N° 53/2016. 10 pp.
- Rahman, M., Rahman, M.M., Deb, S.C., Alam, M.S., Alam, M.J. e Islam, M.T. (2017). Molecular identification of multiple antibiotic resistant fish pathogenic *Enterococcus faecalis* and their control by medicinal herbs. *Scientific reports*, 7: 3747.
- Ramirez-Otarola, N., Narváez, C. y Sabat, P. (2011). Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds: dietary and phylogenetic correlates. *Journal of Comparative Physiology, Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 181: 817-827.
- Ramirez-Otarola, N., Naya, D.E. y Sabat, P. (2018). Seasonal changes in digestive enzymes in five bird species. *Canadian Journal of Zoology*, 96: 707-712.
- Raubenheimer, D., Simpson, S.J. y Mayntz, D. (2009). Nutrition, ecology and nutritional ecology: toward an integrated framework. *Functional Ecology*, 4-16.
- Ribeiro, K., Papa, L.P., Vicentini, C.A. y Franceschini-Vicentini, I.B. (2016). The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopancreas of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture research*, 47(4), 1251-1259.

- Rittschof, D. (2017). Trypsins: Keystone Enzymes. En: Estuarine Invertebrate Communities. *JSM Enzymology and Protein Science*, 2: 1009.
- Rivera-Prisco, A., García de la Rosa, S.B. y Díaz de Astarloa, J.M. (2001). Feeding ecology of flatfish juveniles (Pleuronectiformes) in Mar Chiquita coastal lagoon. *Estuaries*, 24: 917–925.
- Rocafull, M.A., Romero, F.J., Thomas, L.E. y del Castillo, J.R. (2011). Isolation and cloning of the K⁺-independent, ouabain-insensitive Na⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808, 1684-1700.
- Rocafull, M.A., Thomas, L.E. y Del Castillo, J.R. (2012). The second sodium pump: from the function to the gene. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 463: 755-777.
- Rodríguez-Viera, L., Perera, E., Martos-Sitcha, J.A., Perdomo-Morales, R., Casuso, A., Montero-Alejo, V., ... y Mancera, J.M. (2016). Molecular, biochemical, and dietary regulation features of α -amylase in a carnivorous crustacean, the spiny lobster *Panulirus argus*. *PloS one*, 11: e0158919.
- Romano, N. y Zeng, C. (2012). Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334: 12-23.
- Roncari, G., y Zuber, H. (1969). Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*. Isolation, specificity, and general properties of the thermostable aminopeptidase. *International journal of protein research*, 1, 45-61.
- Rossi, A., Bacchetta, C., & Cazenave, J. (2017). Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). *Ecological Indicators*, 79: 361-370.

- Ruiz-Jarabo, I., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Vargas-Chacoff, L., Mancera, J.M. y Arjona, F.J. (2015). Environmental salinity and osmoregulatory processes in cultured flatfish. *Aquaculture Research*, 46: 10-29.
- Saborowski, R. (2015). Nutrition and digestion. *The natural history of the Crustacea*, 4: 285-319.
- Sainz, J.C., García-Carreño, F., Sierra-Beltrán, A. y Hernández-Cortés, P. (2004). Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean biology*. 24: 266-273.
- Salas-Leiton, E., Conde-Sieira, M., Pelusio, N., Marques, A., Maia, M.R.G., Soengas, J.L. y Valente, L.M.P. (2018). Dietary protein/carbohydrate ratio in low-lipid diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles. Influence on growth performance, nutrient utilization and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*. 24: 131-142.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad, C.E. y Yao, J. (2007). Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC genomics*, 8: 328.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A. y Cerqueira, V.R. (2001). Growth of juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *Journal of Applied Aquaculture*, 11: 67-75.
- Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V. y Robaldo, R.B. (2007). Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture*, 262: 340-346.

- Sampaio, L.A., Robaldo, R.B. y Bianchini, A. (2008). Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquaculture Research*, 39, 712-717.
- Sánchez-Hernández, J., Nunn, A.D., Adams, C.E. y Amundsen, P.A. (2019). Causes and consequences of ontogenetic dietary shifts: a global synthesis using fish models. *Biological Reviews*, 94: 539-554.
- Sandre, L.C.G., Buzollo, H., Neira, L.M., Nascimento, T.M.T., Jomori, R.K. y Carneiro D.J. (2017). Growth and Energy Metabolism of Tambaqui (*Colossoma Macropomum*) Fed Diets with Different Levels of Carbohydrates and Lipids. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8: 1-8.
- Sanz, F. y Zamora, S. (2009). La nutrición y alimentación en piscicultura. Madrid Fundación Observatorio Español Acuicultura.
- Sanz, A., Furné, M., Hidalgo, M.C., Domezain, A. y García-Gallego, M. (2015). Growth and Digestive Enzymatic Profile of *Acipenser naccarii* and *Oncorhynchus mykiss* Fed on Different Dietary Macronutrient Levels. A Comparative Study. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6: 1-6.
- Scheiner-Bobis, G. (2002). The sodium pump. *European Journal of Biochemistry*, 269: 2424-2433.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V. y Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 34: 5-28.
- Scheffler, O. y Ahearn, G.A. (2017). Functional characterization of a novel disaccharide transporter in lobster hepatopancreas. *Journal of Comparative Physiology Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 187: 563-573.

- Secor, S.M. (2001). Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 128: 563-575.
- Sergienko, E.A. y Millán, J.L. (2010). High-throughput screening of tissue-nonspecific alkaline phosphatase for identification of effectors with diverse modes of action. *Nature protocols*, 5: 1431.
- Shan, X.J., Cao, L., Huang, W. y Dou, S.Z. (2008). Feeding, morphological changes and allometric growth during starvation in miiuy croaker larvae. En: Chinese Fishes. Springer, Dordrecht, pp: 121-130.
- Sharma, U., Pal, D. y Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29: 269-278.
- Sharp, C.M., Linder, C. y Magnusson, P. (2007). Analysis of human bone alkaline phosphatase isoforms: Comparison of isoelectric focusing and ion-exchange high-performance liquid chromatography. *Cliica. Chimica Acta*, 379: 105–112.
- Silva, F.C., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J.L., Le Gall, M.M., Kaushik, S. y Gatesoupe, F.J. (2010). Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306: 233-237.
- Simao, A.M.S., Beloti, M.M., Rosa, A.L., De Oliveira, P.T., Granjeiro, J.M., Pizauro, J.M. y Ciancaglini, P. (2007). Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell biology international*, 31: 1405-1413.
- Simmons, T., Mozo, J., Wilson, J. y Ahearn, G.A. (2012). Cation-dependent nutrient transport in shrimp digestive tract. *Journal of Comparative Physiology Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 182: 209-216.

- Sjoboen, A.D., Dunbar, S.G. y Boskovic, D.S. (2010). Temporal fluctuations of fatty acids in *Pachygrapsus crassipes* from Southern California. *Journal of Crustacean Biology*, 30: 257-265.
- Skou, J.C., 1997. The identification of the sodium pump. *Bioscience Report*, 18: 437-451.
- Spivak, E.D. (1997). Life history of a brackish-water population of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea) in Argentina. En: *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences, Vol. 33, No. 3, pp: 179-190.
- Spivak, E.D. (2010). The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, 64: 149-154.
- Spivak, E.D, Silva, P.V. y Luppi, T. (2012). Habitat related variation in reproductive traits among intertidal crabs from the southwestern Atlantic. *Journal of Crustacean Biology*, 32: 57–66.
- Steinberg, C.E. (2018). Diets and Digestive Tracts–‘Your Food Determines Your Intestine’. En: *Aquatic Animal Nutrition*. Springer, Cham, pp: 9-59.
- Thimm, D., Schiedel, A.C., Peti-Peterdi, J., Kishore, B.K. y Müller, C.E. (2015). The nucleobase adenine as a signalling molecule in the kidney. *Acta Physiologica*, 213: 808-818.
- Thomas, L.E., Rocafull, M.A. y del Castillo, J.R. (2013). Is the second sodium pump electrogenic? *BioMed research international*, 2013.
- Tian, J., He, G., Mai, K. y Liu, C. (2015). Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish physiology and biochemistry*, 41: 773-787.

- Tiwari, S.P., Srivastava, R., Singh, C.S., Shukla, K., Singh, R.K., Singh, P. y Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Bioscience*, 4: 1886-1901.
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11: 107-184.
- Tseng, Y.C. y Hwang, P.P. (2008). Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology*, 148: 419-429.
- Vandermarliere, E., Mueller, M. y Martens, L. (2013). Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 32: 453-465
- Ventrella, V., Pagliarani, A., Trombetti, F., Pirini, M., Trigari, G. y Borgatti, A.R. (2001). Response of rainbow trout gill Na⁺-ATPase to T3 and NaCl administration. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74: 694-702.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., ... y Storelli, C. (2001). D-glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 130, 585-606.
- Vieira-Filho, L.D., Cabral, E.V., Farias, J.S., Silva, P.A., Muzi-Filho, H., Vieyra, A. y Paixao, A.D. (2014). Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *British Journal of Nutrition*, 111: 1932-1944.
- Vieyra, A., Silva, P.A., Muzi-Filho, H., Dick, C.F., Araujo-dos-Santos, A.L., Dias, J., ... y Paixão, A.D. (2016). The Role of the Second Na⁺ Pump in Mammals and Parasites. In Regulation of Membrane Na⁺-K⁺ ATPase. Editado por: S. Chakraborti, y N.S. Springer International Publishing, pp: 93-112.

- Villanueva, J., Vanacore, R., Goicoechea, O. y Amthauer, R. (1997). Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: regional distribution and membrane association. *Journal of Experimental Zoology*, 279: 347-355.
- Vizcaíno, A.J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M.I., Herrera, M., Hachero, I., ... y Alarcón, F.J. (2018). Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-17.
- Vogt, G. (2019). Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of morphology*, 280: 1405-1444.
- Vuille-dit-Bille, R.N., Camargo, S.M., Emmenegger, L., Sasse, T., Kummer, E., Jando, J., ... y Kuyumcu, S. 2015. Human intestine luminal ACE2 and amino acid transporter expression increased by ACE-inhibitors. *Amino acids*. 47: 693-705.
- Walsh, S.J., Diaz de Astarloa, J.M. y Poos, J.J. (2015). Atlantic flatfish fisheries. *Flatfishes: Biology and exploitation. (2nd edition)*. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell, 346-394.
- Wanat, W., Talma, M., Pawełczak, M. y Kafarski, P. (2019). Phosphonic Acid Analogues of Phenylglycine as Inhibitors of Aminopeptidases: Comparison of Porcine Aminopeptidase N, Bovine Leucine Aminopeptidase, Tomato Acidic Leucine Aminopeptidase and Aminopeptidase from Barley Seeds. *Pharmaceuticals*, 12(: 139.
- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H. y Cheng, Y. (2014). Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PloS one*, 9: e84921.

- Wang, X., Li, E. y Chen, L. (2016). A review of carbohydrate nutrition and metabolism in crustaceans. *North American journal of aquaculture*, 78: 178-187.
- Wang, L. y Karasov, W. (2017). Diet Composition Modulates Intestinal Hydrolytic Enzymes in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*). *The FASEB Journal*, 31: 889-4.
- Wang, Y.Z., Sun, J.F., Lv, A.J., Zhang, S.L., Sung, Y.Y., Shi, H.Y., ... y Xing, K.Z. (2018). Histochemical distribution of four types of enzymes and mucous cells in the gastrointestinal tract of reared half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of fish biology*, 92: 3-16.
- Wang, J., Zuo, Y.Y., Li, L.L., Wang, H., Liu, S.Y., Yang, Y.H. y Wu, Y.D. (2019). Knockout of three aminopeptidase N genes does not affect susceptibility of *Helicoverpa armigera* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A and Cry2A toxins. *Insect science*.
- Wengert, M., Berto, C., Kaufman, J., Leão-Ferreira, L.R., Paes-de-Carvalho, R., Lopes, A.G., y Caruso-Neves, C. (2005). Stimulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase activity by adenosine A2A receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 155–165.
- Wengert, M., Adao-Novaes, J., Assaife-Lopes, N., Leao-Ferreira, L.R., y Caruso-Neves, C. (2007). Adenine-induced inhibition of Na⁺-ATPase activity: evidence for involvement of the Gi protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467: 261-267.
- Wu, M., Wang, J., Wang, Z., Zhao, J., Hu, Y. y Chen, X. (2017). Sequence and functional analysis of intestinal alkaline phosphatase from *Lateolabrax maculatus*. *Fish physiology and biochemistry*, 43: 1463-1476.

- Xie, D., Yang, L., Yu, R., Chen, F., Lu, R., Qin, C. y Nie, G. (2017). Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 479: 696-703.
- Xu, C., Liu, W.B., Dai, Y.J., Jiang, G.Z., Wang, B.K. y Li, X.F. (2017). Long-term administration of benfotiamine benefits the glucose homeostasis of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high-carbohydrate diet. *Aquaculture*, 470: 74-83.
- Yang, M., Deng, K., Pan, M., Gu, Z., Liu, D., Zhang, Y., ... y Mai, K. (2019). Glucose and lipid metabolic adaptations during postprandial starvation of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* previously fed different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture*, 501: 416-429.
- Yúfera, M., Moyano, F.J., Astola, A., Pousão-Ferreira, P. y Martínez-Rodríguez, G. (2012). Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS One*, 7: e33687.
- Zaldúa, N. y Naya, D.E. (2014). Digestive flexibility during fasting in fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular & Integrative Physiology*, 169: 7-14.
- Zambonino-Infante, J. y Cahu, C.L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology*, 130: 477-487.
- Zeng, H., Ye, H., Li, S., Wang, G. y Huang, J. (2010). Hepatopancreas cell cultures from mud crab, *Scylla paramamosain*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 46: 431-437.

Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., Qi, X., Ding, X., ... y Li, J. 2016. The effect of oat β -glucan on in vitro glucose diffusion and glucose transport in rat small intestine. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 96: 484-491.

Zilli, L., Schiavone, R., Scordella, G., Zonno, V., Verri, T., Storelli, C. y Vilella, S. (2003). Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the moulting cycle. *Journal of comparative physiology, Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 173: 355-363.