

**Crecimiento compensatorio en juveniles de la langosta de agua dulce
“pinzas rojas” *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae) y sus
aplicaciones al cultivo.**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área
Ciencias Agropecuarias*

Liane Stumpf

Ingeniera de Acuicultura – Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil - 2007

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología de la Reproducción, Crecimiento & Nutrición de
Crustáceos Decápodos, DBBE, FCEN-UBA e IBBEA, CONICET - UBA, Argentina



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Dra. Laura López Greco

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Dr. Wagner Cotroni Valenti

Licenciado y bachiller en Ciencias Biológicas (Universidade de São Paulo)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidade de São Paulo)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Dra. Laura López Greco

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Dr. Gustavo Alejandro Lovrich

Licenciado Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Dr. Gustavo Manuel Somoza

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Dr. Tomás Atilio Luppi

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 21 de marzo de 2016

DEDICATORIA

“Este trabajo vá dedicado a mi compañero en la vida Ignacio Lugones, a mi familia brasileña Tessmer Stumpf y a mi familia argentina Chiaminut Lugones.”

AGRADECIMIENTOS

A mi compañero Ignacio Lugones, por la hermosa inspiración cotidiana y el apoyo en el día a día motivándome a dar siempre mas.

A mis familias: Tessmer Stumpf y Chiaminut Lugones, por el apoyo incondicional desde que decidí comenzar la carrera y continuar mi experiencia en Argentina.

A la Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano de Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires por aceptar el desarrollo de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, por el lugar de trabajo para desarrollar la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca doctoral.

A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por los proyectos otorgados a la Dra. Laura S. López Greco que financiaron parcialmente esta tesis doctoral: UBACYT 2008-2010, (X458-Cs Agropecuarias y salud animal), 2011-2014 (20020100100003- Cs Agropecuarias y salud animal), 2014-2017 (20020130100186BA - Cs Agropecuarias y salud animal), CONICET PIP 2009-2011 (112-200801-00129), PIP 2012-2014 (112-201101-00212), PICT 2007 (01187) y PICT 2012 (01333).

A mi directora, Dra. Laura López Greco, por haberme abierto la puerta y confiado en mí, además de todos los conocimientos transmitidos en estos años.

A mi consejero de estudios, Wagner C. Valenti, por su opinión siempre considerada.

Al Dr. Daniel Medesani, por la ayuda en el día a día del trabajo.

A la Dra. Juliana Gimenez, Dra. Gladys Hermida y Dr. Gerardo Cueto, por la disposición a ayudarme en los momentos claves.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 50: Ana Laura Tomas, Agustina Marciano Veronica Viau, Karine Colpo, Amir Dyzenchouz, Lucila Babio y Nicolás Vázquez. A mis compañeros del laboratorio 101: Luciana Avigliano, Gabriela Silveyra e Ivana Canosa. A todos ellos doy gracias por la ayuda y por hacer que el trabajo diario un disfrute. Y a los compañeros y amigos que ya no están en el laboratorio: Fernando Castillo Díaz, Silvia Pietrokovsky, Anouk Chaulet y Natalia Prymaczok.

A mi amiga Natalia Calvo, la cual agradezco mucho por la ayuda, el apoyo, el compañerismo y amistad en todos los años que compartimos. Extraño tu amistad y alegría en lo cotidiano.

A mi amiga Carolina Tropea, por la ayuda, el apoyo, el compañerismo y amistad en todos los años que compartimos. El cotidiano con tu presencia se hace mucho más agradable.

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Ing. Liane Stumpf

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- ✓ **Stumpf, L., Calvo N.S., Pietrokovsky, S., López Greco, L.S. 2010.** Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). *Aquaculture* 304: 34-41.
- ✓ **Stumpf, L., Calvo N.S., Castillo Díaz, F., Valenti, W.C., López Greco, L.S. 2011.** Effect of intermittent feeding on compensatory growth in early juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 319: 98–104.
- ✓ **Stumpf, L., Díaz, F.C., Viau, V.E., Valenti, W.C., López Greco, L.S. 2014.** Effect of Food Shortage on Growth, Energetic Reserves Mobilization, and Water Quality in Juveniles of the Redclaw Crayfish, *Cherax Quadricarinatus* Reared in Groups. *Journal of Crustacean Biology*. 34 (5): 639–646.
- ✓ **Stumpf, L., Tropea, C., López Greco, L.S. 2014.** Recovery growth of *Cherax quadricarinatus* juveniles fed on two high-protein diets: Effect of daily feeding following a cyclic feeding period on growth, biochemical composition and activity of digestive enzymes. *Aquaculture*. 433: 404–410.
- ✓ **Stumpf, L., López Greco, L.S. 2015.** Compensatory growth in juveniles of freshwater redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* reared at three different temperatures: hyperphagia and food efficiency as primary mechanisms. *Plos One*. 10(9): e0139372.

Se han presentado también 14 resúmenes en Congresos Internacionales y Nacionales con los resultados de la tesis durante el periodo (2009-2014).

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DECLARACIÓN.....	v
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMEN.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
CAPÍTULO 1: Introducción general.....	1
1.1. Acuicultura de crustáceos y el manejo alimenticio.....	2
1.2. Crecimiento compensatorio.....	2
1.3. Langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>	4
1.4. Objetivos generales.....	6
1.5. Organización de la tesis.....	6
CAPÍTULO 2: Evaluación del crecimiento y sobrevivencia en juveniles de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> expuestos a diferentes regímenes de restricción alimenticia:	

selección de tratamientos para el estudio del crecimiento compensatorio.....	7
2.1. Introducción.....	8
2.2. Objetivo.....	9
2.3. Materiales y métodos.....	9
2.3.1. Condiciones experimentales del plantel de reproductores para la obtención de los juveniles.....	9
2.3.2. Procedimiento experimental.....	10
2.3.2.1. Experimento 1.....	13
2.3.2.2. Experimento 2.....	13
2.3.3. Variables registradas, cálculos y análisis estadístico.....	14
2.4. Resultados.....	15
2.5. Discusión.....	21
CAPÍTULO 3: Evaluación de la alimentación intermitente en juveniles de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> : selección de tratamientos y tiempos de restricción alimenticia para el estudio del crecimiento compensatorio.....	24
3.1. Introducción.....	25
3.2. Objetivo.....	26
3.3. Materiales y métodos.....	26
3.3.1. Obtención de los juveniles.....	27
3.3.2. Procedimiento experimental.....	27
3.3.2.1. Experimento 1.....	28

3.3.2.2. Experimento 2.....	28
3.3.2.3. Experimento 3.....	29
3.3.3. Variables registradas y cálculos.....	30
3.3.3.1. Análisis histológico.....	31
3.3.4. Análisis estadístico.....	31
3.4. Resultados.....	32
3.4.1. Experimento 1.....	32
3.4.2. Experimento 2.....	38
3.4.3. Experimento 3.....	42
3.5. Discusión.....	44
CAPÍTULO 4: Inducción del crecimiento compensatorio en juveniles de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>: factores moduladores y efecto de la restricción alimenticia en la calidad de agua.....	48
4.1. Introducción.....	49
4.2. Objetivo.....	50
4.3. Materiales y métodos.....	51
4.3.1. Obtención de los juveniles.....	51
4.3.2. Procedimiento experimental.....	51
4.3.2.1. Experimento 1.....	54
4.3.2.2. Experimento 2.....	54
4.3.2.3. Experimento 3.....	55
4.3.2.4. Experimentos 4 y 5.....	56
4.3.2.5. Experimentos 6.....	56

4.3.2.6. Experimento 7.....	57
4.3.3. Variables registradas y cálculos.....	57
4.3.3.1. Análisis bioquímico.....	59
4.3.3.2. Análisis enzimático.....	59
4.3.3.3. Análisis de calidad de agua.....	60
4.3.4. Análisis estadístico.....	60
4.4. Resultados.....	61
4.4.1. Experimento 1.....	61
4.4.2. Experimento 2.....	61
4.4.3. Experimento 3.....	64
4.4.4. Experimentos 4 y 5.....	65
4.4.5. Experimentos 6.....	68
4.4.6. Experimentos 7.....	81
4.5. Discusión.....	89
CAPÍTULO 5: Efecto de la temperatura en el crecimiento compensatorio en el crecimiento de los juveniles de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>	94
5.1. Introducción.....	95
5.2. Objetivo.....	95
5.3. Materiales y métodos.....	96
5.3.1. Obtención de los juveniles.....	96
5.3.2. Procedimiento experimental.....	96
5.3.3. Variables registradas, cálculos y análisis.....	98
5.3.4. Análisis estadístico.....	101

5.4. Resultados.....102

5.5. Discusión.....105

CAPÍTULO 6: Discusión General.....118

Bibliografía.....122

INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Coeficiente de variación (CV), conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar los experimentos 4 y 5.....	69
Tabla 4.2. Reservas energéticas en la glándula digestiva y músculo abdominal (base húmeda) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> después de un periodo de restricción de 45 días.....	72
Tabla 4.3. Índices de calidad de agua de los juveniles <i>C. quadricarinatus</i> después de un periodo de 45 días. NH ₃ + NH ₄ ⁺ : amonio total, NO ₂ : nitritos, y NO ₃ : nitratos.....	73
Tabla 4.4. Coeficiente de variación (CV), conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	79
Tabla 4.5. Índices de la glándula digestiva en base húmeda (IGD h) y base seca (IGD s) e relativo del pleon en base húmeda (IRP h) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	79
Tabla 4.6. Reservas energéticas en la glándula digestiva y en el músculo abdominal (base húmeda) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	80

Tabla 4.7. Actividad de las enzimas digestivas (U/mg de proteína * min) en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	81
Tabla 4.8. Coeficiente de variación (CV), conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	87
Tabla 4.9. Índices de la glándula digestiva en base húmeda (IGD h) y base seca (IGD s) e relativo del pleon en base húmeda (IRP h) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	87
Tabla 4.10. Reservas energéticas en la glándula digestiva y músculo abdominal (base húmeda) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	88
Tabla 4.11. Actividad de las enzimas digestivas (U/mg de proteína * min) en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimentos 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).....	89

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1. Número de réplicas (cada réplica corresponde a un juvenil de la langosta <i>C. quadricarinatus</i>) utilizadas en cada tratamiento para el análisis de los índices órgano-somáticos durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación.....	98
---	----

Tabla 5.2. Número de réplicas utilizadas en cada tratamiento para el análisis bioquímico en la glándula digestiva durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación (varias de las réplicas corresponden al agrupamiento de 2 juveniles de la langosta <i>C. quadricarinatus</i>).....	99
Tabla 5.3. Número de réplicas (cada réplica corresponde a un juvenil de la langosta <i>C. quadricarinatus</i>) utilizadas en cada tratamiento para el análisis bioquímico en el músculo abdominal durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación.....	99
Tabla 5.4. Número de réplicas utilizadas en cada tratamiento para el análisis enzimático en la glándula digestiva durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación.....	100
Tabla 5.5. Conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> después de 45 días de alimentación diaria (periodo de recuperación).....	105

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1.** Juveniles de *Cherax quadricarinatus* recién independizados de la hembra. Juvenil en estadio III (detalle en el lado derecho inferior).....11
- Figura 2.2.** Envases plásticos (u.e.) utilizados en ambos experimentos. Agregado de red cebollera como refugio para el juvenil en estadio III de *C. quadricarinatus* (detalle en el lado derecho inferior).....11
- Figura 2.3.** Protocolo experimental utilizado en los juveniles en estadio III de *C. quadricarinatus*. (a) Esquema general de alimentación utilizado en ambos experimentos; (b) tratamientos y controles aplicados durante el *Periodo de Restricción* en el experimento 1 y (c) tratamientos y controles aplicados durante el *Periodo de Restricción* en el experimento 2. Día de alimentación y día de inanición.....13
- Figura 2.4.** Frecuencia de juveniles III de *C. quadricarinatus* que mudaron exitosamente del estadio III al estadio IV durante el periodo de restricción. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2.....15
- Figura 2.5.** Tiempo de intermuda del estadio III al estadio IV de *C. quadricarinatus* durante el periodo de restricción. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2.....17
- Figura 2.6.** Días de alimentación durante el periodo de restricción en juveniles de *C. quadricarinatus*. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2.....18
- Figura 2.7.** Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante los periodos de restricción y recuperación. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2.....19

Figura 2.8. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar los experimentos. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2.....	21
--	----

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Sistema de control de la temperatura y aireación, además de los envases plásticos (u.e.) utilizados en los tres experimentos.....	28
--	----

Figura 3.2. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de <i>Cherax quadricarinatus</i> . (a) Restricción alimenticia a corto plazo aplicada en los juveniles III (b) Restricción alimenticia a largo plazo aplicada en los juveniles recién independizados y (c) Restricción alimenticia a largo plazo aplicada en los juveniles avanzados.....	30
--	----

Figura 3.3. Frecuencia de juveniles III de <i>C. quadricarinatus</i> que mudaron exitosamente del estadio III al estadio IV durante el periodo de restricción.....	32
---	----

Figura 3.4. Tiempo de intermuda del estadio III al estadio IV de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de restricción.....	33
--	----

Figura 3.5. Días de alimentación durante el periodo de restricción en juveniles de <i>C. quadricarinatus</i>	33
---	----

Figura 3.6. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> . (a) Al finalizar el periodo de restricción y (b) al finalizar el periodo de recuperación.....	34
--	----

Figura 3.7. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de recuperación.....	35
---	----

Figura 3.8. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar el experimento 1.....	36
---	----

Figura 3.9. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar el experimento 1.....	36
---	----

Figura 3.10. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles <i>C. quadricarinatus</i> al final del experimento 1. (a) Vista general de la glándula digestiva en fresco (b) control de alimentación continua (AC), (c) alimentación por 1 día + inanición por 1 día (AI1), (d) alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (e) alimentación por 3 días + inanición por 3 días (AI3) y (f) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4).....	37
Figura 3.11. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 2.....	38
Figura 3.12. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 2.....	39
Figura 3.13. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar el experimento 2.....	40
Figura 3.14. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar el experimento 2.....	40
Figura 3.15. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles <i>C. quadricarinatus</i> al final del experimento 2. (a) Control de alimentación continua (AC), (b) alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (c) alimentación por 3 días + inanición por 3 días (AI3) y (d) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4).....	41
Figura 3.16. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 3.....	42
Figura 3.17. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 3.....	42
Figura 3.18. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar el experimento 3.....	43

Figura 3.19. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> al finalizar el experimento 3.....	43
Figura 3.20. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles <i>C. quadricarinatus</i> al final del experimento 3. (a) Control de alimentación continua (AC), (b) alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (c) alimentación por 3 días + inanición por 3 días (AI3) y (d) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4).....	44

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Envases plásticos (u.e.) utilizados en los experimentos 1 y 2.....	52
Figura 4.2. Acuarios plásticos (u.e.) utilizados en los experimentos 3, 4 y 5.....	52
Figura 4.3. Acuarios de vidrio (u.e.) utilizados en los experimentos 6 y 7.....	53
Figura 4.4. Protocolo experimental utilizado en los juveniles III de <i>Cherax quadricarinatus</i> en los experimentos 1 y 2.....	55
Figura 4.5. Protocolo experimental utilizado en los juveniles III de <i>C. quadricarinatus</i> en el experimento 3.....	55
Figura 4.6. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de 1 gramis de <i>C. quadricarinatus</i> en los experimentos 4 y 5.....	56
Figura 4.7. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de 1 gramo de <i>C. quadricarinatus</i> en los experimentos 6 y 7.....	57
Figura 4.8. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 1.....	61
Figura 4.9. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 2.....	62

Figura 4.10. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 2.....	63
Figura 4.11. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 2.....	63
Figura 4.12. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 3.....	64
Figura 4.13. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> . (a) Al final del experimento 4 y (b) al final del experimento 5.....	66
Figura 4.14. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 4.....	67
Figura 4.15. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el experimento 5.....	68
Figura 4.16. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> . (a) Al finalizar el experimento 4 y (b) al finalizar el experimento 5.....	70
Figura 4.17. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles <i>C. quadricarinatus</i> al final de los experimentos 4 y 5. (a) Control de alimentación continua (AC) del experimento 4, (b) alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (d) control de alimentación continua (AC) del experimento 4 y (e) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4).....	71
Figura 4.18. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> en el experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación.....	74

Figura 4.19. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> en el experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación.....	76
Figura 4.20. Biomasa de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de recuperación en el experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA®).....	76
Figura 4.21. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de recuperación del experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA®).....	78
Figura 4.22. Supervivencia de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> en el experimento 7 (alimentados con la dieta REFERENCIA).....	82
Figura 4.23. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> en el experimento 7 (alimentados con la dieta REFERENCIA). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación.....	84
Figura 4.24. Biomasa de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de recuperación en el experimento 6 (alimentados con la dieta REFERENCIA).....	84
Figura 4.25. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de recuperación del experimento 7 (alimentados con la dieta REFERENCIA). (a) TCE de la masa corporal y (b) TCE de la biomasa.....	88

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i>	97
Figura 5.2. Esquema de los tratamientos evaluados en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i>	97

Figura 5.3. Crecimiento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> . (a) Al final del periodo de restricción y (b) al final del periodo de recuperación.....	103
Figura 5.4. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> después de 45 días de alimentación diaria (periodo de recuperación).....	104
Figura 5.5. Ingesta de alimento de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo de recuperación.....	105
Figura 5.6. Índice de la glándula digestiva (IGD) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo experimental.....	106
Figura 5.7. Índice relativo del pleon (IRP) de los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo experimental.....	107
Figura 5.8. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles <i>C. quadricarinatus</i> al final del experimento. (a) Control de alimentación continua (AC) al finalizar el periodo de restricción, (b) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4) al finalizar el periodo de restricción, (d) control de alimentación continua (AC) al finalizar el periodo de recuperación y (e) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4) al finalizar el periodo de recuperación.....	108
Figura 5.9. Concentración de proteínas totales en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo experimental.....	109
Figura 5.10. Concentración de lípidos totales en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo experimental. (a) En la glándula digestiva y (b) en el músculo abdominal.....	111
Figura 5.11. Concentración de glucógeno en los juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> durante el periodo experimental. (a) En la glándula digestiva y (b) en el músculo abdominal.....	112

Figura 5.12. Actividad de las enzimas digestivas en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. (a) Proteasas, (b) Lipasas y (c) Amilasas.....111

ABREVIATURAS

AC	Alimentación continua
AI1	Alimentación por 1 día + inanición por 1 día
AI2	Alimentación por 2 días + inanición por 2 días
AI3	Alimentación por 3 días + inanición por 3 días
AI4	Alimentación por 4 días + inanición por 4 días
AI5	Alimentación por 5 días + inanición por 5 días
AI6	Alimentación por 6 días + inanición por 6 días
AI7	Alimentación por 7 días + inanición por 7 días
AI8	Alimentación por 8 días + inanición por 8 días
B	Biomasa
CA apar	Conversión alimenticia aparente
CV	Coefficiente de variación
EP apar	Eficiencia proteica aparente
FM	Frecuencia de individuos que mudaron exitosamente
IA	Ingesta de alimento
IA1	Inanición por 1 día + alimentación por 1 día
IA2	Inanición por 2 días + alimentación por 2 días
IA3	Inanición por 3 días + alimentación por 3 días
IA4	Inanición por 4 días + alimentación por 4 días
IA5	Inanición por 5 días + alimentación por 5 días
IA6	Inanición por 6 días + alimentación por 6 días
IA7	Inanición por 7 días + alimentación por 7 días

IA8	Inanición por 8 días + alimentación por 8 días
IC	Inanición continua
IGD	Índice de la glándula digestiva
IRP	Índice relativo del pleon
JIII	Juvenil en estadio III
JIV	Juvenil en estadio IV
NM	Número de mudas
S	Supervivencia
TCE	Tasa de crecimiento específico

RESUMEN

Un adecuado manejo alimenticio es determinante en el éxito en la acuicultura, dado que el consumo de alimentos influye directamente en el crecimiento y en la conversión alimenticia de los organismos. En una producción semi-intensiva e intensiva, los costos de alimentación representan hasta el 80% del total y por esta razón un manejo alimenticio alternativo al habitualmente empleado (alimentación diaria) puede ser una estrategia viable para reducir dichos costos. Explorar el crecimiento compensatorio en los organismos después de una reducción en la cantidad de alimento suministrado es una herramienta que puede ser utilizada para dicho fin. Los juveniles tempranos de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* presentaron la capacidad de compensar tanto un moderado como prolongado periodo de restricción alimenticia (alimentación intermitente) y los mecanismos involucrados fueron la hiperfagia y la mayor conversión alimenticia. La recuperación del crecimiento fue total o parcial, dependiendo de la extensión del periodo de alimentación diaria post-restricción (periodo de recuperación). La aplicación de un período de recuperación fue imprescindible para inducir la capacidad compensatoria en esta especie. De los factores que modulan el crecimiento compensatorio, se observó que las dietas altamente proteicas no afectan dicha capacidad, así como las tres temperaturas ensayadas (inferior a la óptima, óptima y superior a la óptima, para el crecimiento de la especie). La talla tampoco afectó dicha capacidad, pero, influye en la severidad de la respuesta del periodo restricción y consecuentemente en el tiempo de recuperación. La restricción no causó severas alteraciones en la estructura, composición bioquímica y actividad de las enzimas digestivas de la glándula digestiva, lo que refleja que estos juveniles no presentarían deficiencias nutricionales. La alta supervivencia observada en los juveniles

que compensan es otro indicador de que tanto la restricción alimenticia como la propia compensación no causan posteriores daños en el organismo.

PALABRAS CLAVE: alimentación intermitente, *Cherax quadricarinatus*, conversión alimenticia, crecimiento compensatorio, glándula digestiva, hiperfagia, recuperación del crecimiento, reservas energéticas, supervivencia.

ABSTRACT

An adequate food management is crucial for aquaculture success, due to the fact that food consumption affects directly the growth and food conversion of organisms. In an intensive or semi-intensive production, the costs of feeding add up to 80% of the total cost, therefore an alternate feeding management of the conventionally applied (daily feeding), may be a feasible strategy to reduce such costs. The exploration of the animals compensatory growth after a reduction on the amount of food supplied is a tool that can be used for that purpose. Early juveniles of freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*, exhibited the ability to compensate both moderate and extended period of food restriction (intermittent feeding), where hyperphagia and feeding conversion were the mechanisms involved. Growth recovery was total or partial depending on the extent of the daily feeding period post restriction (recovery period). The application of a recovery period was essential for the promotion of the compensatory ability in this species. Among the factors that modulate compensatory growth, protein rich diets did not affect this ability, as well as the three different temperatures assayed (below optimal, optimal, and above optimal for the growth of this species). Neither did stage of development affect such capacity, but it had an influence over the severity of the restriction period answer, and the consequent time of recovery. The restriction did not cause severe alterations upon the structure, biochemical composition, and digestive enzyme activity of the digestive gland, which reflects the fact that these juveniles would not have nutritional deficiencies. The high survival rate observed among the juveniles that compensate is another indicator that feeding restriction as well as compensation does not cause further damage to the organism.

KEYWORDS: intermittent feeding, *Cherax quadricarinatus*, food conversion, compensatory growth, digestive gland, hyperphagia, recovery growth, energetic reserves, survival.

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1. Acuicultura de crustáceos y el manejo alimenticio

La acuicultura, es la actividad que permite obtener producción por medio del cultivo de organismos acuáticos (animales, vegetales, microorganismos). Según el informe de la FAO (2014), la producción acuícola alcanzó a nivel mundial unos 90,4 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) en 2012 (144 400 millones de USD), de los que 66,6 millones de toneladas correspondieron a la producción de peces óseos, crustáceos, moluscos, anfibios, tortugas de agua dulce y otros animales acuáticos destinados como alimento para el consumo humano. La producción de crustáceos se ha incrementado anualmente en cantidad y en variedad, representando el 9,7 % del total del volumen mundial de organismos comestibles y el 22,4 % (30 900 millones de USD) en valor (FAO 2014).

El adecuado manejo alimenticio es uno de los factores determinantes en el éxito de un proceso productivo en acuicultura, dado que el consumo de alimentos influye directamente en el crecimiento y en la conversión alimenticia de los organismos (Mohseni et al. 2006). La elección de un manejo alimenticio ideal, en las diferentes etapas de desarrollo de una especie, permite mejorar su crecimiento, supervivencia y conversión alimenticia, contribuyendo así a la reducción del desperdicio del alimento suministrado (Kindischi 1988). En este sentido, en la acuicultura moderna se busca desarrollar protocolos alimenticios que disminuyan los costos y el efecto negativo sobre el medio ambiente, sin afectar la eficiencia en la producción. De hecho, en una producción semi-intensiva e intensiva, los costos de alimentación representan del 50 al 80% del total de los costos (Cortes-Jacinto et al. 2003; Thompson et al. 2010) y por esta razón la aplicación de un manejo alimenticio alternativo (restricción alimenticia) al habitualmente empleado (alimentación diaria) puede ser una estrategia viable para reducir dichos costos.

En muchos estudios de crecimiento realizados en especies acuáticas comercialmente importantes se han utilizado diferentes regímenes de restricción alimenticia con el objetivo de mejorar la productividad en los sistemas de producción. Además, existe un particular interés en el manejo alimenticio que no involucre un suministro diario de alimento y al mismo tiempo no comprometa la supervivencia y la masa corporal final del organismo cultivado. Dichas respuestas en la *performance* de los organismos cultivados pueden ser logradas con un ahorro en los costos de alimentación a través del crecimiento compensatorio (Ali et al.2003; Jobling 2010).

1.2. Crecimiento compensatorio

El crecimiento compensatorio es un proceso fisiológico caracterizado por una fase de acelerado crecimiento (alta tasa de crecimiento específico) después de un periodo de restricción alimenticia (o cualquier otra condición desfavorable), y el organismo que lo presenta puede alcanzar la masa corporal que hubiese obtenido en ausencia de dicha restricción. Durante el crecimiento compensatorio, cuando la trayectoria de crecimiento de los animales previamente restringidos converge completamente con la trayectoria de crecimiento de los animales que experimentaron condiciones favorables durante todo el periodo (como por ejemplo constante disponibilidad de alimento), significa que ocurrió la completa recuperación del crecimiento (Jobling 2010). Implícito a la convergencia de las diferentes trayectorias de crecimiento está un mayor crecimiento absoluto presentado por el organismo previamente restringido. En este sentido, el grado de recuperación del

crecimiento post-restricción también puede ser del tipo parcial, cuando el organismo previamente restringido muestra una convergencia hacia la trayectoria de crecimiento de aquellos animales que no fueron restringidos pero su masa corporal final sigue siendo menor. Por otro lado, la recuperación también puede ser de tipo mayor (*sobrecompensación*), cuando el organismo previamente restringido no sólo muestra una convergencia hacia la trayectoria de crecimiento de aquellos animales que no fueron restringidos sino que además la supera presentando una masa corporal final mayor. También existen casos en que no ocurre convergencia hacia la trayectoria de crecimiento del control, incluso presentando crecimiento compensatorio (Jobling 2010).

La respuesta compensatoria en organismos acuáticos y la recuperación del crecimiento es dependiente de diversos factores como la intensidad y extensión de la restricción alimenticia, la extensión del periodo de recuperación, la calidad y cantidad de la dieta durante los periodos de restricción y recuperación, las variaciones estacionales (cambios en la temperatura del agua), el comportamiento social (donde la densidad de cultivo jugará un papel importante) y la ontogenia (cambios en el hábito alimenticio asociados al estadio de desarrollo) (Hayward et al. 2000; Gaylord y Gatlin 2001; Ali et al. 2003; Cho 2005; Nykänen 2006; Hagen et al. 2009; Oh et al. 2008; Dong et al. 2013).

Se puede considerar el crecimiento compensatorio como una herramienta a ser utilizada en la acuicultura y de hecho su aplicabilidad ha sido evaluada en diversas especies de organismos acuáticos, principalmente en peces (Ali et al. 2003; Sevgili et al. 2012). En crustáceos decápodos, a pesar de que se registra una menor cantidad de trabajos que en peces, el crecimiento compensatorio fue evaluado en los camarones *Fenneropenaeus chinensis* (Wu et al. 2000, 2001; Wu y Dong 2001, 2002a,b; Wei et al. 2008), *Litopenaeus vannamei* (Zheng et al. 2008; Wasielesky et al. 2013; Zhu et al. 2014), *Macrobrachium nipponense* (Li et al. 2009), *M. roosembergii* (Singh y Balange 2007; Marques y Lombardi 2011) y en la langosta *Astacus leptodactylus* (Mazlum et al. 2011).

Existen varias estrategias para la inducción al crecimiento compensatorio como por ejemplo el uso de restricciones alimenticias. Estas pueden implicar la aplicación de un periodo de inanición continua seguido de un periodo de alimentación diaria (Wu et al. 2000; Singh y Balange 2007; Wen et al. 2006; entre otros), la aplicación de periodos de inanición cíclica (Wu y Dong 2002a; Li et al. 2009; Mazlum et al. 2011; entre otros), la aplicación de un periodo de baja disponibilidad de alimento seguido de un periodo de alimentación en los niveles considerados óptimos para el crecimiento de la especie (Wu et al. 2001; Jiwyam 2010), la utilización de una dieta subóptima seguida de la utilización de una dieta óptima para el crecimiento de la especie (Schwarz et al. 1985; Saether y Jobling 1999; Wu et al. 2001; Sevgili et al. 2012; entre otros). También se registran estudios que inducen al crecimiento compensatorio manipulando la concentración de oxígeno y la temperatura (Wu y Dong 2002b; Wei et al. 2008).

Explorar el crecimiento compensatorio, con el objetivo de lograr una convergencia completa del crecimiento, en un emprendimiento acuícola trae importantes ventajas porque se puede obtener una alta producción de organismos con una reducción en la cantidad de alimento suministrado y consecuentemente un ahorro en los costos de producción. Además, se puede obtener una mejor calidad de agua en el cultivo debido a la reducción en el desperdicio del alimento y un aumento en la eficiencia alimenticia (Ali, et al. 2003; Jobling 2010; Turano et al. 2008; Cho y Heo 2011; Sevgili et al., 2012; Yengkokpam et al. 2014).

1.3. Langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

El cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* ha comenzado a desarrollarse en tiempos relativamente recientes, no sólo en Australia, de donde son nativas y habitan en cuerpos de agua dulce como ríos y lagos, sino también en varios países tropicales y subtropicales, tales como China, Japón, Vietnam, Israel, Ecuador, México, España, Grecia, Estados Unidos y Argentina (Saoud et al. 2012, 2013). Esta especie presenta varios atributos biológicos y comerciales que la convierten en un organismo interesante para la acuicultura de crustáceos en nuestro país. Si bien la especie es nativa de una región tropical, crece bien a temperaturas comprendidas entre 24 y 30°C, bajo las cuales alcanza la talla comercial (50-100 g) en un periodo aproximado de 7 meses. Por otro lado, es capaz de tolerar un amplio rango de condiciones de calidad de agua (incluyendo bajas concentraciones de oxígeno) y una relativa alta densidad de cultivo. Las hembras poseen una fecundidad relativamente alta y pueden desovar entre 3 y 5 veces por año a lo largo de un periodo de 6 meses, a temperaturas superiores a los 22°C. La fecundación es externa y el desarrollo de esta especie es directo, lo que significa que la morfología del adulto se alcanza sin atravesar estadios larvales. Durante la oviposición, los huevos se adhieren a los pleópodos de la hembra y son transportados y ventilados durante todo el desarrollo embrionario. Luego de la eclosión, los juveniles I y II (lecitotróficos) permanecen sujetos de los pleópodos de la hembra hasta que la reserva de vitelo se agota siendo el juvenil III el primer estadio de vida libre en donde se independizan de la hembra y buscan la alimentación exógena (Levi et al. 1999). Esta característica simplifica en gran medida la tecnología empleada para el cultivo de la especie en las distintas etapas de producción.

Acerca de su fisiología digestiva, la especie puede modular algunas características en respuesta a los cambios en los requerimientos nutricionales, en la disponibilidad de alimento y en el perfil dietario (Masser y Rouse 1997; Panné Huidobro et al. 2004; Saoud et al. 2013; Sacristán et al. 2014, 2015). Sin embargo, la intensificación de la producción se ve obstaculizada en los sistemas de *hatchery* y *nursery* (correspondientes a las etapas iniciales de desarrollo) por la falta de protocolos eficientes, además de una formulación de dietas que contengan los requerimientos específicos para el óptimo crecimiento de la langosta *C. quadricarinatus* (Saoud et al. 2012,2013).

En Argentina, *C. quadricarinatus* fue introducida en la década del '90 pero su crecimiento productivo en campo ha sido poco significativo y en los últimos años su volumen osciló debido a diferentes motivos según Wicki et al. (2008): la ausencia de tecnología de cultivo desarrollada desde el Estado y el sector privado, lo que supondría su puesta a disposición de todos los potenciales productores; a una mala elección del sitio de cultivo en algunos casos y principalmente, a la falta de disponibilidad de juveniles para la comercialización, lo que obliga a un productor novel a realizar el ciclo de vida completo de la especie. Esta carencia produce un “cuello de botella” en su desarrollo inicial, sobre todo para pequeños agro-acuicultores que no poseen capacidad financiera para asociarse a empresas que ofrecen sus servicios. Ante esta situación, el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC) emprendió en el 2005 el desarrollo de las tecnologías de sus diferentes fases de cultivo, con el objeto de transferirlas a aquellos productores interesados en adoptarlas. El sistema de cultivo de la especie es por lo general del tipo semi-intensivo (utiliza una mayor densidad de organismos y hay aporte complementario de alimento externo, además del alimento natural producido) abarcando 4 fases: reproducción, *hatchery*,

nursery y engorde. En los estudios desarrollados por el CENADAC, las etapas de *hatchery* e *nursery* corresponden a la sembra de los organismos en alta densidad (100 a 120 individuos/m²) mientras que en la etapa de engorde se siembra con una densidad baja (1 o 2 individuos/m²) (Wicki et al. 2008).

Acerca de los aspectos nutricionales de la especie, la misma posee un hábito alimenticio no selectivo lo que permite la incorporación de una amplia gama de ingredientes a base de plantas y animales en formulaciones de los alimentos balanceados para la acuicultura (Jones 1990; Campaña-Torres et al. 2005, 2006, 2008). Dicha característica podría estar relacionado con la gran variedad de enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas) encontradas en la glándula digestiva (Figueiredo et al. 2001), comúnmente llamada hepatopáncreas (Van Weel 1974). En los crustáceos, la glándula digestiva es utilizada para monitorear la salud de los animales en cultivo dado que es el sitio donde ocurre la digestión, absorción y reserva de nutrientes, además de la síntesis y secreción de enzimas digestivas (Vogt et al. 1985; Icely y Nott 1992; Johnston et al. 1998; Sousa y Petriella 2000). Este órgano es compacto, bilobulado y ocupa la mayor parte del cefalotórax. Histológicamente, presenta una estructura tubular (Cuartas et al. 2002; Sousa y Petriella 2006), formado por un epitelio con distintos tipos celulares. Las *células E* o embrionarias son escasas y se ubican en el extremo distal de los túbulos. Presentan las características histológicas típicas de células indiferenciadas, y son el único tipo celular que sufre mitosis. Las *células R* o de resorción, son las células más comunes en el epitelio de la glándula digestiva y se encuentran en la zona media y proximal de los túbulos; son cilíndricas, presentan vacuolas sub-apicales características y su núcleo se ubica hacia la región basal de la célula. Su función es la reserva de lípidos y glucógeno que pueden ser movilizados para proveer energía durante periodos de restricción de alimento, muda o reproducción. Las *células B* o “blisterlike” se encuentran en la zona media y proximal de los túbulos y presentan una gran vacuola central que desplaza al núcleo hacia su base. Estas células son responsables de la digestión intracelular, concentrando los materiales absorbidos del lumen en la gran vacuola. Las *células F* o fibrilares son menos frecuentes y se encuentran dispersas entre las células B y las R células a lo largo de las zonas media y proximal de los túbulos. Estas células son cilíndricas y se caracterizan por presentar un citoplasma basófilo y un gran núcleo basal con nucléolo evidente. Su función comprende la síntesis de enzimas digestivas (Verri et al. 2001).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre los requerimientos nutricionales de *C. quadricarinatus* desarrolladas en juveniles de masa corporal mayor a 1 gramo, juveniles pre-adultos (10-30 gramos y que no están en la etapa de maduración) y adultos (> 30 gramos y en la etapa de maduración) (Villarreal-Colmenares 2002; Cortés-Jacinto et al. 2004a,b), sin embargo, se registran escasas investigaciones sobre la nutrición de juveniles en las etapas iniciales de desarrollo que involucra a los juveniles en estadio III (primer estadio que se independiza de la madre) de 20 mg hasta los juveniles de 1 gramo (Calvo et al. 2011, 2012, 2013).

1.4. Objetivos generales

En base a los aspectos previamente introducidos, la propuesta de la tesis es investigar si los juveniles de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* poseen la capacidad de compensar una restricción alimenticia (objetivo 1), si ocurre dicha compensación cuales serían los factores que estarían modulando esta respuesta (objetivo 2) y si la aplicación de la restricción alimenticia ocasiona algún impacto en la calidad de agua del cultivo (objetivo 3).

La presente tesis brindará informaciones sobre la posibilidad de la aplicación del crecimiento compensatorio como un herramienta para incrementar la productividad en las haciendas acuícolas de la langosta de agua dulce a través de un ahorro en la cantidad de alimento utilizado. Además, este tipo de respuesta puede generar una reducción del desperdicio del alimento y a su vez podría reducir la descarga de los nutrientes de dichos cultivos hacia el medio ambiente.

1.5. Organización de la tesis

La tesis está organizada en 6 capítulos. En el **Capítulo 1** se realiza una breve descripción del estado de la acuicultura resaltando la importancia de la producción de crustáceos. En este contexto, el concepto del crecimiento compensatorio y su importancia en los sistemas de producción acuícola también son incluidos, así como una breve información sobre el modelo experimental utilizado.

En el **Capítulo 2** se evaluó el efecto de la alimentación intermitente sobre las respuestas de crecimiento y supervivencia en los juveniles de *C. quadricarinatus*, con el objetivo de buscar un protocolo de restricción alimenticia adecuado para inducir al crecimiento compensatorio en la especie.

En el **Capítulo 3**, se evaluaron las respuestas de crecimiento, supervivencia y estado nutricional de juveniles de *C. quadricarinatus* después de exponerlos a diferentes extensiones de restricción alimenticia, con el objetivo de buscar un protocolo que sea nutricionalmente adecuado para la especie y que pueda inducir al crecimiento compensatorio.

En el **Capítulo 4**, se evaluó la inducción al crecimiento compensatorio en los juveniles de *C. quadricarinatus* y algunos factores moduladores de dicha respuesta (talla y dieta), además de las respuestas fisiológicas asociadas a la respuesta compensatoria y el impacto de la restricción alimenticia en la calidad de agua.

En el **Capítulo 5**, se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento compensatorio en los juveniles de *C. quadricarinatus*, además de los mecanismos responsables por dicha respuesta.

Finalmente los resultados obtenidos en los capítulos anteriores fueron integrados en una discusión general, en la cual se destacan las conclusiones y principales aportes de la tesis. Dichas consideraciones finales constituyen el **Capítulo 6**.

CAPÍTULO 2

Evaluación del crecimiento y sobrevida en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* expuestos a diferentes regímenes de restricción alimenticia: selección de tratamientos para el estudio del crecimiento compensatorio

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Stumpf, L., Calvo N.S., Pietrokovsky, S., López Greco, L.S.

*Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae).*

Aquaculture Junio 2010; 304 (1-4): 34-41.

2.1. Introducción

El adecuado manejo del alimento en la acuicultura es esencial para reducir los costos de producción, de los cuales la alimentación comprende alrededor del 50% o más dependiendo del sistema de cultivo (Cortés-Jacinto et al. 2003; Thompson et al. 2010). En este sentido, la investigación sobre la resistencia o tolerancia de la especie a ser cultivada frente a periodos de escasez del alimento o inanición, se hace primordial para lograr una eficiente reducción de dichos costos. En la naturaleza, la capacidad de las larvas/juveniles de crustáceos para tolerar periodos de inanición suele ser esencial para la supervivencia ya que en sus hábitats puede ocurrir gran variabilidad en la disponibilidad de alimento (Anger 2001). En ese contexto, el conocimiento de la vulnerabilidad nutricional durante el estadio inicial de desarrollo es importante para buscar un protocolo de restricción alimenticia sin que el mismo comprometa la supervivencia y el crecimiento del organismo.

Otro modo de reducir los costos en la alimentación es obtener ventaja del proceso conocido como crecimiento compensatorio (Ali et al. 2003; Jobling 2010), considerado como una viable herramienta de manejo a ser aplicada en la acuicultura (Miglavys y Jobling 1989; Jobling y Kostela 1996; Gaylord y Gatlin 2001; Ali et al. 2003; Eroldogan et al. 2006; entre otros). Particularmente, el crecimiento compensatorio ha sido investigado en diversas especies de peces, mientras que en crustáceos decápodos se registran una menor cantidad de trabajos. Por consiguiente, una adecuada exploración del crecimiento compensatorio puede traer muchas implicaciones prácticas en un emprendimiento acuícola como por ejemplo: la maximización de la tasa de crecimiento, la maximización de la eficiencia alimenticia, la reducción de los desperdicios alimenticios, lo cual mejoraría la calidad del agua y la reducción de los costos directos con alimento y personal, al no tener que alimentar a los animales diariamente (Heide et al. 2006; Oh et al. 2008).

Los estudios que evalúan el crecimiento compensatorio en crustáceos que son cultivados han sido desarrollados en el camarón marino chino *F. chinensis* (Wu et al. 2001; Wu y Dong 2001, 2002a, 2002b; Wei et al. 2008), en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (Zheng et al. 2008; Wasielesky et al. 2013; Zhu et al. 2014), en el camarón de agua dulce *M. nipponense* (Li et al. 2009) y en el camarón gigante de Malasia *M. rosenbergii* (Singh y Balange 2007; Marques y Lombardi 2011). En dichos estudios se utilizaron diferentes protocolos de restricción alimenticia para la inducción de una respuesta compensatoria como por ejemplo: cultivos en condiciones de alta densidad, en condiciones de hipoxia, en diferentes temperaturas, con reducción de la proteína dietaria, con reducción de la cantidad de alimento ofrecido y periodos de inanición. Cuando se utilizó la inanición, ésta fue aplicada como un único periodo (a corto o largo plazo) o como múltiples periodos de inanición (alternando días de inanición con días de alimentación).

Con respecto a los estudios realizados sobre la nutrición y alimentación de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, éstos han sido desarrollados principalmente en las etapas de engorde de la especie, es decir, organismos pre-adultos (masa corporal entre 10 a 30g) y adultos (masa corporal mayor a 30g) (Villareal-Colmenares 2002), mientras que hay pocos estudios en las etapas de *hatchery* (masa corporal entre 0,015g a 1g) y de *nursery* (masa corporal entre 1g a 10g) (Jones 1995; Parnes y Sagi 2002; De Yta 2009). Hasta el momento, Calvo et al. (2009, 2011, 2012, 2013) han aportado significativamente en el conocimiento sobre la nutrición durante la fase inicial de desarrollo de la especie a través del estudio de la flexibilidad nutricional de los estadios juveniles. Por otro lado, no hay

registros de la exploración de protocolos de alimentación que sean alternativos al utilizado en la práctica habitual de cultivo (alimentación diaria) de la especie.

2.2. Objetivo

Con todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este capítulo fue evaluar las respuestas de crecimiento y supervivencia en los juveniles recién independizados de la madre (juveniles en estadio III) y expuestos a diferentes días de alimentación intermitente. Los tratamientos con las mejores respuestas en la *performance* serán seleccionados para la búsqueda de un protocolo de restricción alimenticia con el propósito de inducir el crecimiento compensatorio en la especie.

En el marco de este objetivo se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis 2.1: Los juveniles sometidos a la alimentación intermitente son capaces de compensar tales restricciones, presentando similar crecimiento y sobrevida que aquellos juveniles sometidos a la alimentación diaria.

Hipótesis 2.2: Los juveniles que empiezan el ciclo de alimentación intermitente con alimentación presentan mejor respuesta en crecimiento y sobrevida que aquellos que empiezan el ciclo de alimentación intermitente con inanición.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Condiciones experimentales del plantel de reproductores para la obtención de los juveniles

El plantel de reproductores utilizados para la obtención de los juveniles provino de la hacienda acuícola *Las Golondrinas*, ubicada en la provincia de Entre Ríos, Argentina, en el año 2007. En el laboratorio, fueron seleccionadas hembras con masa corporal entre 50 a 70g y machos entre 70 a 100g. Las langostas fueron distribuidas separadamente por sexo y aclimatadas en acuarios de 60cm x 40cm x 30cm conteniendo 30L de agua de clorada a temperatura ambiente, pH 7,5-7,8, dureza 50-200mg/L CaCO₃ y con un sistema de aireación constante. Se armaron grupos de 5 ejemplares por acuario con la inclusión de 4 cilindros de PVC de 10cm de diámetro por 25cm de largo que se utilizaron como refugios (Jones 1995; Vázquez y López Greco 2007). Esta fase de aclimatación tuvo una duración de 2 a 3 semanas, con un aumento gradual de la temperatura en el transcurrir de las semanas, mediante calefactores ATMAN de 75 o 100W, hasta que alcanzaron la temperatura óptima para la reproducción de la especie que es de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Jones 1997). El fotoperiodo fue de 14h luz: 10h oscuridad (Jones 1997) y el plantel fue alimentado diariamente *ad libitum* con *Elodea* sp y alimento balanceado para peces tropicales (TETRA[®]), compuesto por 47,5% de proteína bruta, 6,5% de lípidos, 2,0% de fibra, 6,0% de humedad, 1,5% de fósforo, 0,01% de vitamina C y 0,8 % de ácidos grasos omega-3. Este alimento es habitualmente utilizado en el laboratorio con excelentes resultados en la supervivencia, crecimiento y reproducción (Sánchez De Bock y López Greco 2010; Tropea

et al. 2010; entre otros). Semanalmente se extrajo agua de los acuarios mediante sifoneo, con 100% de recambio del volumen de agua.

Luego de la etapa de aclimatación, las langostas fueron redistribuidas utilizando una proporción sexual de 4 hembras: 1 macho en cada acuario y se mantuvieron las mismas condiciones controladas de temperatura, calidad de agua, fotoperiodo y alimentación mencionados anteriormente. Semanalmente se revisaron los acuarios para la detección de hembras ovígeras y una vez detectadas, las hembras fueron separadas y colocadas individualmente en un acuario con un cilindro de PVC, en las mismas condiciones experimentales que estaban expuestas. Los juveniles (alrededor de 300 juveniles eclosionados por hembra) fueron separados de la hembra una vez independizados (estadio juvenil III).

2.3.2. Procedimiento experimental

Se realizaron dos experimentos. Para cada experimento fueron utilizados juveniles de al menos 4 hembras ovígeras para garantizar la variabilidad genética. Un total de 200 juveniles en estadio JIII (masa corporal de $15,79 \pm 1,71$ mg) fueron utilizados en cada uno de los experimentos (Figura 2.1). Al iniciar los experimentos, 10 juveniles recién independizados de cada hembra fueron secados con papel absorbente para la determinación de la masa corporal inicial (en base húmeda) utilizando una balanza analítica “OHAUS, PioneerTM” (precisión de 0,0001g). Luego, un pool de los juveniles restantes de cada hembra fue seleccionado y transferido individualmente a un envase plástico (250 cm³) con 200 ml de agua de clorada (proveniente de un tanque de 200 L de agua dulce expuesto a aireación constante) con el agregado de un trozo de red cebollera (3cm x 3 cm) utilizada como refugio (Figura 2.2). Durante los ensayos, los envases plásticos fueron limpiados diariamente con renovación del 100% del agua para asegurar la remoción del alimento no consumido. Los cambios diarios del agua fueron necesarios para mantener los niveles de amonio y nitrito indetectables, asegurando una alta calidad de agua (Meade y Watts 1995). Se realizaron observaciones 2 veces al día (a la mañana y a la tarde) para el registro de mudas y muertes. La unidad experimental (u.e.) fue cada juvenil individualizado en un envase plástico.



Figura 2.1. Juveniles de *Cherax quadricarinatus* recién independizados de la hembra. Juvenil en estadio III (detalle en el lado derecho inferior).



Figura 2.2. Envases plásticos (u.e.) utilizados en ambos experimentos. Agregado de red cebollera como refugio para el juvenil en estadio III de *C. quadricarinatus* (detalle en el lado derecho inferior).

El tipo de restricción alimenticia aplicada en ambos experimentos fue considerada moderada ya que consistió en días de alimentación alternados con días de inanición (**ALIMENTACIÓN INTERMITENTE**). La extensión de la restricción fue hasta que el juvenil en estadio III mudara al estadio IV. Este periodo fue denominado *PERIODO DE RESTRICCIÓN* y al finalizar (cuando se produjo la ecdisis al estadio IV) fue seguido por un periodo de alimentación diaria, que fue denominado *PERIODO DE RECUPERACIÓN* y se extendió hasta el día 30 del experimento (Figura 2.3a). Cada experimento tuvo 10 regímenes alimenticios: 8 tratamientos de alimentación-inanición y dos controles (alimentación continua e inanición continua). Los individuos del experimento 1 empezaron la alimentación intermitente recibiendo alimento y los individuos del experimento 2 lo empezaron siendo expuestos a la inanición. En los días de alimentación el alimento fue suministrado *ad libitum* y con la frecuencia de 1 vez al día. El alimento utilizado (TETRA[®]) fue el mismo utilizado para la alimentación del plantel reproductivo, descrito anteriormente.

c)



Figura 2.3. Protocolo experimental utilizado en los juveniles en estadio III de *C. quadricarinatus*. (a) Esquema general de alimentación utilizado en ambos experimentos; (b) tratamientos y controles aplicados durante el *Periodo de Restricción* en el experimento 1 y (c) tratamientos y controles aplicados durante el *Periodo de Restricción* en el experimento 2. ■ Día de alimentación y □ día de inanición.

2.3.2.1. Experimento 1- Juveniles que empiezan el *Periodo de Restricción* con ALIMENTACIÓN

Los regímenes alimenticios fueron: AI1 (alimentación por 1 día + inanición por 1 día), AI2 (alimentación por 2 días + inanición por 2 días), AI3 (alimentación por 3 días + inanición por 3 días), AI4 (alimentación por 4 días + inanición por 4 días), AI5 (alimentación por 5 días + inanición por 5 días), AI6 (alimentación por 6 días + inanición por 6 días), AI7 (alimentación por 7 días + inanición por 7 días), AI8 (alimentación por 8 días + inanición por 8 días), AC* (alimentación continua) y IC (inanición continua) (Figura 2.3b). Cada régimen fue aplicado a 20 juveniles (réplicas). *Cabe aclarar que se ha utilizado el término *alimentación continua* (AC) a lo largo de toda la tesis está siguiendo el uso habitual en la literatura del tema pero la alimentación continua significa que todos los días (1 vez al día) los animales reciben alimento.

2.3.2.2. Experimento 2 - Juveniles que empiezan el *Periodo de Restricción* con INANICIÓN

Los regímenes alimenticios fueron: IA1 (inanición por 1 día + alimentación por 1 día), IA2 (inanición por 2 días + alimentación por 2 días), IA3 (inanición por 3 días + alimentación por 3 días), IA4 (inanición por 4 días + alimentación por 4 días), IA5 (inanición por 5 días + alimentación por 5 días), IA6 (inanición por 6 días + alimentación por 6 días), IA7 (inanición por 7 días + alimentación por 7 días), IA8 (inanición por 8 días

+ alimentación por 8 días), AC (alimentación continua) y IC (inanición continua) (Figura 2.3c). Cada régimen fue aplicado a 20 juveniles (réplicas).

2.3.3. Variables registradas, cálculos y análisis estadístico

La frecuencia de individuos que mudaron del estadio III al estadio IV y sobrevivieron (muda exitosa), así como el tiempo de intermuda fueron registrados. La masa corporal (en miligramos y en base húmeda) fue determinada al final del periodo de restricción y al final del periodo de recuperación (día 30). El número de mudas fue registrado durante todo el periodo experimental y la supervivencia fue calculada al finalizar los experimentos.

Los cálculos utilizados fueron:

- (1) Frecuencia de individuos que mudaron exitosamente al estadio IV (**FM, %**) = [número de individuos que mudaron al estadio IV/ número de individuos en estadio III] *100.
- (2) Intermuda III – IV = tiempo en días que cada individuo en estadio III demoró en mudar al estadio IV.
- (3) Tasa de crecimiento específico (**TCE, %/día**) = [ln (masa final) – ln (masa inicial) / (tiempo)] *100.
- (4) Número de mudas (**NM**) = número de mudas exitosas de cada individuo durante todo el tiempo experimental.
- (5) Supervivencia (**S, %**) = [número de individuos vivos al finalizar el experimento/ número de individuos vivos al iniciar el experimento] *100.

Para el cálculo de la intermuda III-IV no fueron considerados los datos de los individuos que murieron al mudar. Lo mismo fue aplicado para el cálculo de los días de alimentación durante el periodo de restricción. Para el cálculo del número de mudas, fueron considerados los datos de los juveniles que llegaron vivos al final del experimento.

Los valores expresados para cada variable estudiada fueron el promedio de las réplicas con su error estándar, excepto para la FM y S, que son proporciones. Las diferencias entre promedios y proporciones fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$. El programa estadístico utilizado fue el INFOSTAT (Infostat version 2014, Grupo Infostat, FCA-UNC, Argentina).

El diseño experimental fue el completamente aleatorizado (DCA). La prueba paramétrica (Análisis de Varianza – ANOVA) fue aplicada a las variables después del cumplimiento de los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene) de los residuos y cuando fue necesario los datos fueron log-transformados para cumplir con dichos supuestos. En el caso de incumplimiento de los supuestos fue aplicada la prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis). Las comparaciones múltiples entre tratamientos y control AC fueron realizadas a través del test de Dunnet (paramétrico) o Mann-Whitney (no paramétrico) (Zar 1999).

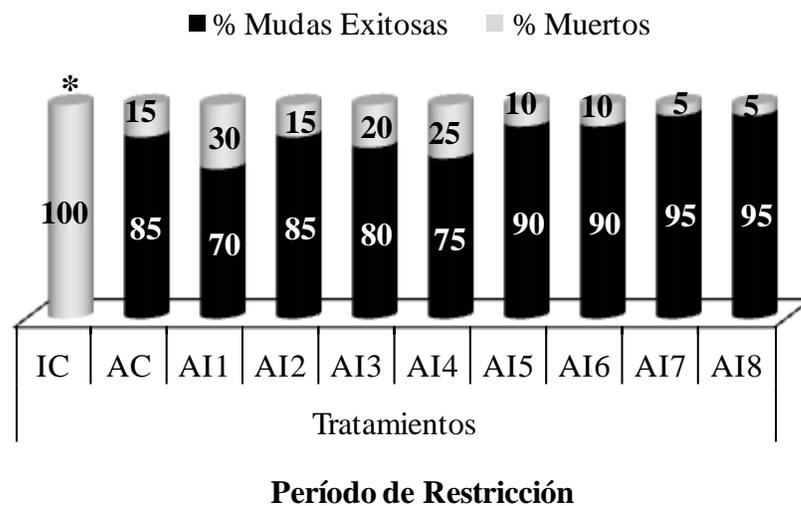
Los datos categóricos como frecuencia de muda y supervivencia fueron analizados a través de la tabla de contingencia utilizando la prueba del Chi-cuadrado de Pearson y las comparaciones múltiples entre tratamientos y control de alimentación continua fueron realizados a través de la prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones (Zar 1999).

2.4. Resultados

En ambos experimentos la ecdisis durante el periodo de restricción fue dependiente de los regímenes alimenticios ($\chi^2_{9; 0,95} = 79,01$; $P < 0,0001$ en el experimento 1 y $\chi^2_{9; 0,95} = 98,72$; $P < 0,0001$ en el experimento 2) y no se observaron mudas en los juveniles expuestos a la inanición continua (IC) (Figura 2.4a y b). En el experimento 1, los juveniles expuestos a la restricción que empezó con alimentación tuvieron una proporción de mudas exitosas similar a los juveniles expuestos a la alimentación continua (AC) (Figura 2.4a).

En el experimento 2, la mayoría de los juveniles expuestos a la restricción que empezaron con inanición (IA4, IA5, IA6, IA7 e IA8) tuvieron un menor porcentaje de mudas exitosas en relación al control AC (Figura 2.4b).

a) Empezaron con alimentación



b) Empezaron con inanición

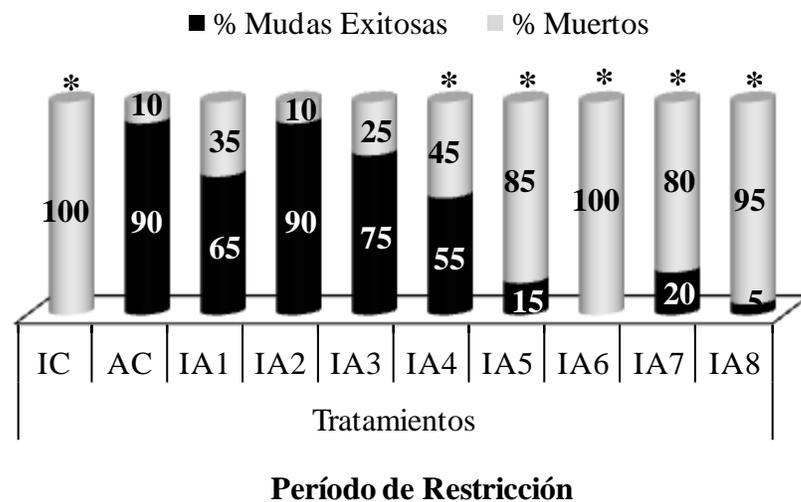
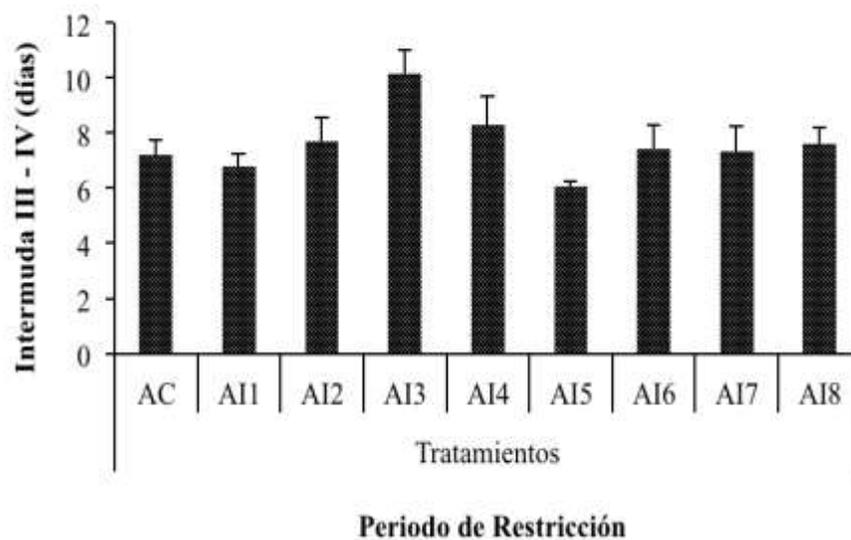


Figura 2.4. Frecuencia de juveniles III de *C. quadricarinatus* que mudaron exitosamente del estadio III al estadio IV durante el periodo de restricción. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). AI1: alimentación por 1 día + inanición por 1 día, AI2: alimentación por 2 días + inanición por 2 días, AI3: alimentación por 3 días + inanición por 3 días, AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días, AI5: alimentación por 5 días + inanición por 5 días, AI6: alimentación por 6 días + inanición por 6 días, AI7: alimentación por 7 días + inanición por 7 días, AI8: alimentación por 8 días + inanición por 8 días, IA1: inanición por 1 día + alimentación por 1 día, IA2: inanición por 2 días + alimentación por 2 días, IA3: inanición por 3 días + alimentación por 3 días, IA4: inanición por 4 días + alimentación por 4 días, IA5: inanición por 5 días + alimentación por 5 días, IA6: inanición por 6 días + alimentación por 6 días, IA7: inanición por 7 días + alimentación por 7 días, IA8: inanición por 8 días + alimentación por 8 días, IC: inanición continua y AC: alimentación continua.

En el experimento 1, el tiempo de intermuda durante el periodo de restricción no difirió significativamente entre los regímenes alimenticios ($H_8=14,56$; $P= 0,0583$), aunque se observó una tendencia a una intermuda más prolongada en juveniles expuestos al tratamiento AI3 en relación a AC (Figura 2.5a).

En el experimento 2, el tiempo de intermuda difirió significativamente entre los regímenes alimenticios ($H_7= 25,34$; $P= 0,0006$). Se observó una intermuda más prolongada en juveniles expuestos a los tratamientos IA3, IA4, IA5 e IA7 en relación a AC y un solo individuo logró alcanzar el estadio IV en el tratamiento IA8 (Figura 2.5b).

a) **Empezaron con alimentación**



b) Empezaron con inanición

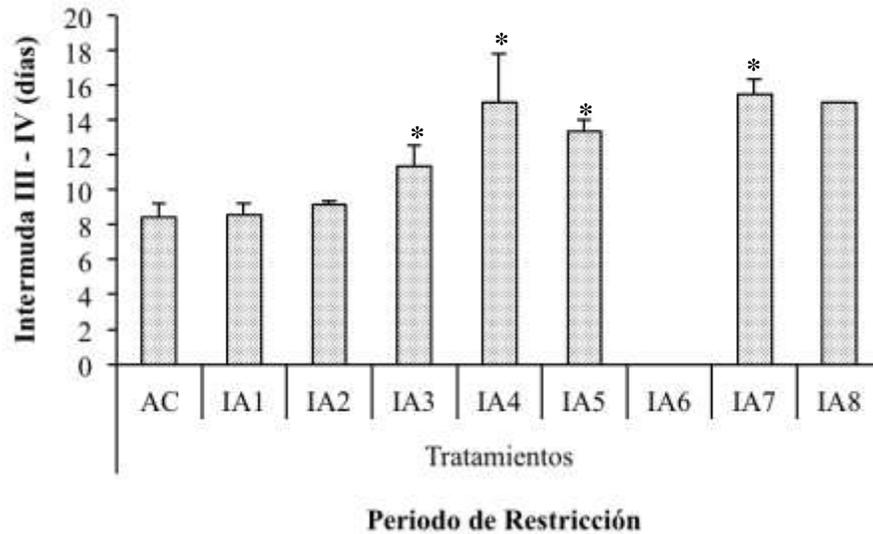
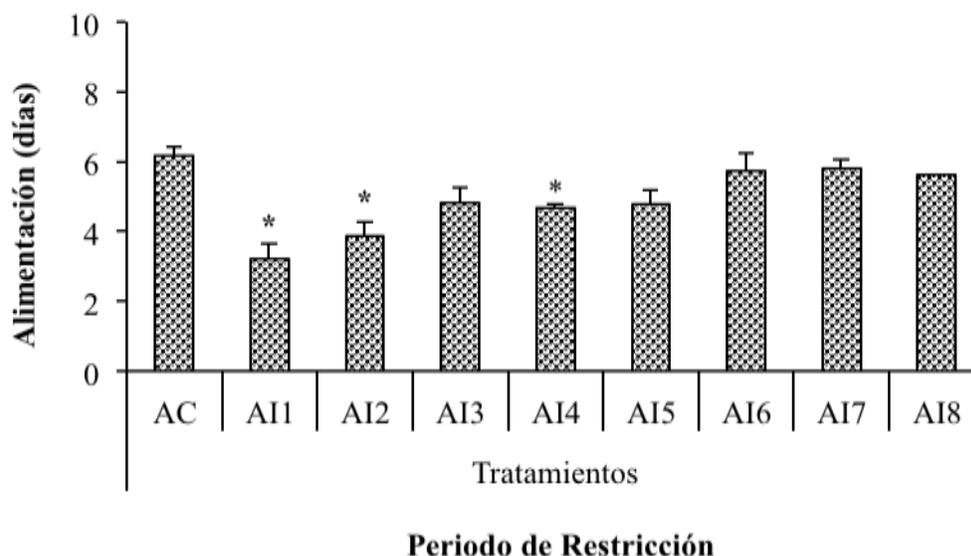


Figura 2.5. Tiempo de intermuda del estadio III al estadio IV de *C. quadricarinatus* durante el periodo de restricción. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 2.4.

En el experimento 1, los juveniles expuestos a tratamientos AI1, AI2 y AI4 recibieron significativamente menos alimento ($H_8 = 41,54$; $P < 0,0001$) en relación al control AC, durante el periodo de restricción (Figura 2.6a). En el experimento 2, los juveniles expuestos a tratamientos IA1, IA2, IA3 e IA4 recibieron significativamente menos alimento ($H_7 = 28,96$; $P = 0,0001$) en relación al control AC (Figura 2.6b).

a) **Empezaron con alimentación**



b) **Empezaron con inanición**

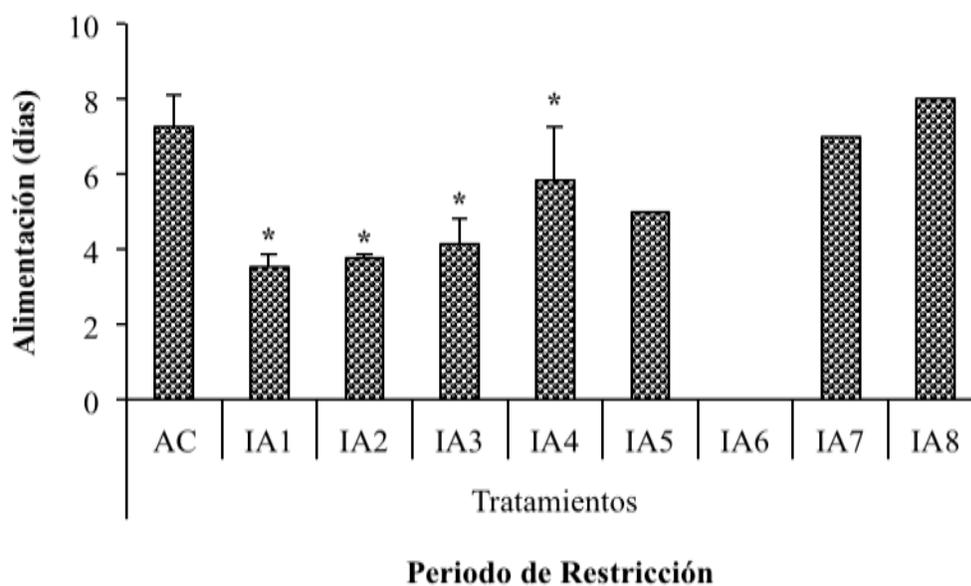


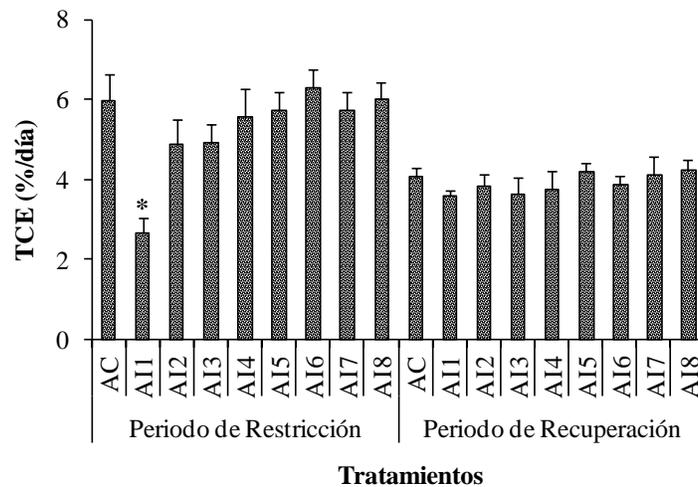
Figura 2.6. Días de alimentación durante el periodo de restricción en juveniles de *C. quadricarinatus*. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 2.4.

En el experimento 1, al finalizar el periodo de restricción, los juveniles expuestos al tratamiento AI1 crecieron significativamente menos ($H_8 = 25,24$; $P = 0,0014$) que los

juveniles expuestos a AC (Figura 2.7a) mientras los juveniles expuestos a los demás tratamientos presentaron la misma tasa de crecimiento que el control de alimentación. Al finalizar el periodo de recuperación, los juveniles de todos los tratamientos presentaron la misma tasa de crecimiento que AC y no se observaron diferencias significativas ($H_8= 6,25$; $P= 0,6190$) (Figura 2.7a).

En el experimento 2, al finalizar el periodo de restricción, los juveniles expuestos al tratamiento IA1, IA2, IA3, IA4, IA5 e IA7 crecieron significativamente menos ($H_7= 41,44$; $P< 0,0001$) que los juveniles expuestos a AC (Figura 2.7b). Al finalizar el periodo de recuperación, se observaron diferencias significativas ($H_5= 13,13$; $P= 0,0219$) y los juveniles de los tratamientos IA2 y IA3 presentaron una tasa de crecimiento mayor que la de AC (Figura 2.7b).

a) **Empezaron con alimentación**



b) **Empezaron con inanición**

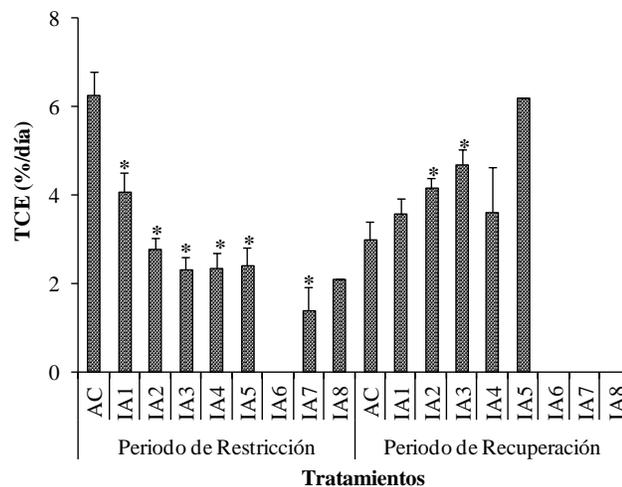
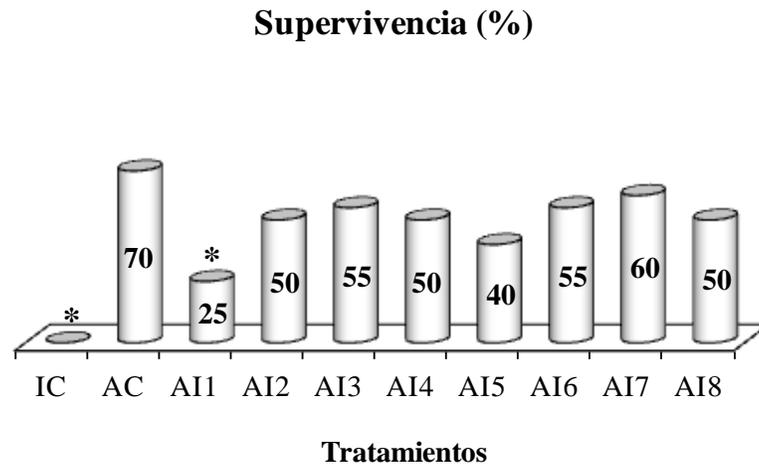


Figura 2.7. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante los periodos de restricción y recuperación. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2. En cada periodo, el asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 2.4.

En el experimento 1, aunque el análisis no paramétrico fue significativo ($H_8= 17,63$; $P= 0,0241$), el número de mudas fue similar ($2,4\pm 0,08$) entre los tratamientos y el control de alimentación, cuando se realizaron los contrastes. Al finalizar el experimento, los juveniles expuestos previamente al tratamiento AI1 presentaron una significativa menor supervivencia en relación a AC ($\chi^2_{9; 0,95}= 28,81$; $P= 0,0007$) (Figura 2.8a).

El experimento 2, el número de mudas fue similar ($2,4\pm 0,12$) entre los tratamientos y el control de alimentación ($H_5= 4,33$; $P= 0,4003$). Al finalizar el experimento, los juveniles expuestos a AC tuvieron baja supervivencia así como los previamente expuestos a IA1, IA3, IA4 y IA5 que no difirieron significativamente del control ($\chi^2_{9; 0,95}= 60,66$; $P< 0,0001$). Sin embargo, los juveniles expuestos a IA2 presentaron una mejor supervivencia en relación a AC (Figura 2.8b).

a) **Empezaron con alimentación**



b) **Empezaron con inanición**

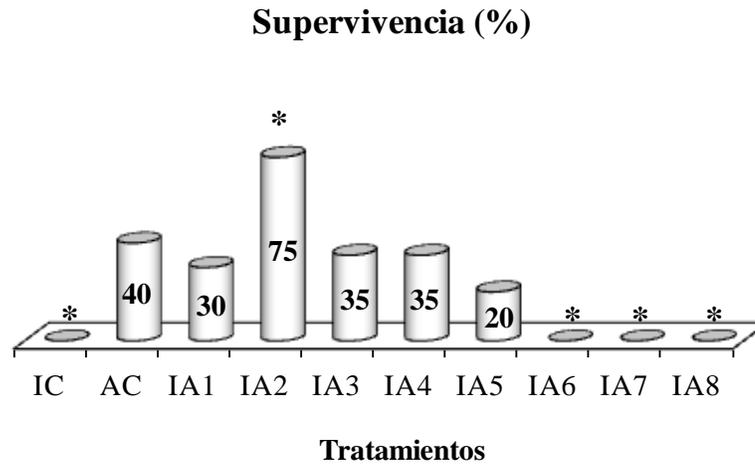


Figura 2.8. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar los experimentos. (a) Experimento 1 y (b) experimento 2. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 2.4.

2.5. Discusión

El presente capítulo constituye el primer trabajo en el que se investigó el efecto de la alimentación intermitente sobre el crecimiento y supervivencia del juvenil de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Se observó que los juveniles recién independizados (estadio III) no logran mudar al siguiente estadio sin alimentación y el tiempo de vida de estos juveniles fue de aproximadamente 12 días. En los dos primeros estadios de vida de *C. quadricarinatus* después de la eclosión (estadio I y II) ocurre un incremento en la tasa de ingestión de proteína del vitelo remanente en el embrión lo que probablemente está relacionado con una alta demanda energética para la diferenciación y crecimiento (García-Guerrero et al. 2003). A razón de eso, la alimentación exógena durante el estadio III es sumamente importante ya que las reservas energéticas provenientes del vitelo (proteínas y lípidos) quedan prácticamente consumidas al finalizar el estadio II.

En el actual trabajo, los juveniles que tuvieron al menos 3 días de alimentación, consecutivos o no (tratamientos AI1, AI2, AI3, AI4, IA1, IA2 e IA3), pudieron mudar exitosamente al siguiente estadio. Por otro lado, fueron pocos los juveniles (< 20%) que pudieron lograr una muda exitosa cuando fueron sometidos inicialmente a más de 4 días de inanición (experimento 2). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Calvo et al. (2009) referidos a la vulnerabilidad nutricional, los cuales muestran que el juvenil III necesita $4,8 \pm 0,6$ días de alimentación consecutiva para acumular suficiente reserva y de este modo mudar, mientras que con $4,3 \pm 0,3$ días de inanición inicial el juvenil III pierde la capacidad de recuperación después del estrés nutricional, incluso después de una alimentación diaria.

Otro efecto notable de haber empezado el estadio III con inanición fue la extensión del periodo de intermuda (estadio III a IV), la cual fue incrementando a partir de los tres días de inicial inanición. Dicha respuesta podría ser una consecuencia de un retraso en la producción de la hormona de la muda como lo observado por Anger (2001) en otras especies de crustáceos decápodos marinos que sufrieron inanición temporal en la fase inicial del desarrollo.

En relación al crecimiento durante el periodo de restricción, los juveniles expuestos al 90% de los tratamientos que empezaron con alimentación (experimento 1) no fueron afectados por dicha restricción. Particularmente, los juveniles de los tratamientos AI2, AI3 y AI4 tuvieron entre 15-30% menos disponibilidad de alimento cuando fueron comparados con el control AC. A su vez, el crecimiento siguió siendo similar al control AC durante el periodo de recuperación, con la inclusión del tratamiento AI1 que previamente había sido menor. Por lo tanto, en el experimento 1 no se detectó crecimiento compensatorio por parte de los juveniles previamente restringidos pero sí una alta tolerancia frente a cortos periodos de escasez de alimento.

En cambio, los juveniles de todos tratamientos que empezaron la restricción con inanición (experimento 2) crecieron menos que el control. Particularmente, los juveniles de los tratamientos IA1, IA2 e IA3 tuvieron 40% menos disponibilidad de alimento cuando fueron comparados con el control AC. Sin embargo, el crecimiento durante el periodo de recuperación en casi todos los tratamientos se equiparó al control AC, con la excepción de los tratamientos IA2 e IA3 que presentaron un mayor crecimiento. Por lo tanto, en el experimento 2 se detectó crecimiento compensatorio por parte de estos juveniles previamente restringidos.

Exponer los juveniles a la inanición al empezar el estadio III (experimento 2) impactó en su supervivencia y esta fue muy baja en practicamente todos los regímenes alimenticios. Sin embargo, en el experimento 1, se observó una menor supervivencia solamente en el tratamiento AI1.

En síntesis, haber **empezado la restricción con alimentación (experimento 1) no afectó la *performance* del juvenil** (similar crecimiento y sobrevida que aquellos sometidos a la alimentación diaria) durante el periodo de restricción y de recuperación. Por otro lado, **haber empezado la restricción con inanición (experimento 2) afectó la *performance* de los juveniles**, como lo indica la menor proporción de mudas exitosas, el mayor tiempo de intermuda, el menor crecimiento inicial durante el periodo de restricción y menor supervivencia en la mayoría de los tratamientos durante el periodo de recuperación. En ambos experimentos, los juveniles que crecieron menos que AC durante el periodo de restricción, se recuperaron y alcanzaron los niveles de crecimiento del control durante el periodo de recuperación. Todos estos resultados llevan **a no rechazar parcialmente la hipótesis de trabajo 2.1**, que predice que los juveniles sometidos a la alimentación intermitente son capaces de compensar tales restricciones, presentando similar crecimiento y sobrevida que aquellos juveniles sometidos a la alimentación diaria, y a **no rechazar la hipótesis de trabajo 2.2**, que predice que los juveniles que empiezan el ciclo de alimentación intermitente con alimentación presentan mejor respuesta en crecimiento y sobrevida que aquellos que empiezan el ciclo de alimentación intermitente con inanición.

Según los trabajos de García-Guerrero (2003) y Luo et al. (2008), las reservas de proteínas y lípidos son utilizadas para la síntesis del tejido, órganos y otros sistemas durante el desarrollo embrionario del *C.quadricarinatus* y debido a esta depleción de los nutrientes es que resulta ser de gran importancia una alimentación inmediatamente después de la

independencia de la madre (estadio III). Además, Gu et al. (1996) observó una reducción del 4% y 8% en el contenido de proteínas totales cuando juveniles de *C. quadricarinatus* (~130 mg) fueron expuestos a la inanición durante 3 y 12 días consecutivos. Entonces se concluye que los juveniles III se mostraron más resistentes a la alimentación intermitente cuando ésta empieza con alimentación.

Alternar días de alimentación con días de inanición ha sido utilizado como protocolo de restricción, aunque la mayoría de los estudios están concentrados en evaluar el crecimiento compensatorio después de periodos de total o parcial privación del alimento. Los trabajos que evaluaron la intermitencia en crustáceos decápodos serán brevemente descritos a seguir: Mazlum et al. (2011) aplicaron en la langosta de agua dulce *A. leptodactylus* (~ 44 mg) la inanición intermitente de 2, 3, ó 4 días durante 90 días, con buenos resultados en crecimiento y supervivencia. De modo similar, también fue lo observado por Li et al. (2009) en el camarón de agua dulce *M. nipponense* (~ 0,60 g) expuesto a la inanición intermitente de 2,4 ó 8 días durante 18 días. Diversos ciclos de inanición y alimentación también fueron aplicados en el camarón marino *F. chinensis* (~ 2 g) durante 32 días por Wu y Dong (2002a) con satisfactorios resultados en el crecimiento y supervivencia. Vale resaltar que en todas estas especies, este tipo de restricción alimenticia fue aplicado en un estadio de desarrollo más avanzado, es decir, con previa alimentación del organismo siendo el presente estudio el primero en aplicar este protocolo en juveniles de temprano desarrollo.

Finalmente, los tratamientos con las mejores respuestas en la *performance* fueron los de alimentación intermitente que empieza con el suministro de alimento. Tomando como base estos resultados se buscará un protocolo de restricción alimenticia con el propósito de inducir al crecimiento compensatorio de la especie.

CAPÍTULO 3

Evaluación de la alimentación intermitente en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*: selección de tratamientos y tiempos de restricción alimenticia para el estudio del crecimiento compensatorio

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Stumpf L., Calvo N.S., Castillo Díaz, F., Valenti, W. C., López Greco, L. S.

*Effect of intermittent feeding on compensatory growth in early juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus*.*

Aquaculture Septiembre 2011; 319 (1-2): 98-104.

3.1. Introducción

Las variaciones en la disponibilidad de alimento son especialmente pronunciadas en ambientes de agua dulce y altas latitudes, y los organismos expuestos a una limitada oferta pueden desarrollar diversas adaptaciones, las cuales permiten explotar exitosamente dicho ambiente y asegurar su supervivencia (Jalihal et al. 1993; Anger et al. 2004; Mezek et al. 2010). Por ejemplo, en ecosistemas de aguas subterráneas, en los cuales no se encuentran productores primarios y ocurre una esporádica entrada de alimento, se desarrollan especies hipogeas que tienen la habilidad de sostener una baja actividad metabólica para soportar tales condiciones adversas (Mezek et al. 2010). Otro ejemplo es lo que ocurre en ecosistemas lóticos de agua dulce en los cuales la producción de mesozooplankton puede ser baja o impredecible y los tiempos de residencia son cortos. Por ello se desarrollan especies que tienen una mayor inversión energética por parte de la madre en la producción de huevos (aumento en las reservas del vitelo) para sobrellevar un posterior estrés nutricional (Anger 2001; Gebauer et al. 2010) o bien como, permitir un desarrollo abreviado (pocas fases larvales) o directo (sin fases larvales) (Jalihal et al. 1993). En este contexto, el conocimiento del umbral de tolerancia a diferentes periodos de baja disponibilidad de alimento durante desarrollo inicial es necesario para buscar un adecuado protocolo de restricción alimenticia sin que el mismo comprometa la supervivencia del organismo.

Algunas especies de crustáceos decápodos ornamentales como el camarón marino *Lysmata* spp. y los cangrejos marinos *Mithraculus forceps* y *Petrolisthes laevigatus* tienen la capacidad de tolerar cortos periodos de inanición (pocos días o horas) (Calado et al. 2008; Figueiredo et al. 2008; Gebauer et al. 2010). Por otro lado, existen especies que toleran prolongados periodos de inanición continua (70 días) como es el caso del cangrejo de río *Eriocheir sinensis* (Wen et al. 2006) mostrando 100% de supervivencia. A su vez, otras especies presentan crecimiento compensatorio después de la restricción alimenticia y la capacidad de recuperarse completamente como los camarones de agua dulce *M. nipponense* y *M. rosenbergii*, y el camarón marino *F. chinensis* (Wu et al. 2000, 2001; Wu y Dong 2002a, 2002b; Singh y Balange 2007; Li et al. 2009). Por consiguiente, la exposición de larvas o juveniles de crustáceos a una temporal y moderada restricción podría ser ocasionalmente utilizada para reducir los costos en sistemas de *hatchery* y *nursery* de un emprendimiento acuícola.

El crecimiento compensatorio es altamente dependiente de la extensión e intensidad de la restricción alimenticia (Oh et al. 2008; Hagen et al. 2009; Palma et al. 2010). En este sentido, la alimentación intermitente como protocolo para obtener una respuesta compensatoria ha sido evaluada en algunos estudios realizados en crustáceos y peces. En la mayoría de los trabajos, la intermitencia se basó en la alternancia de días de inanición con días de alimentación como son los estudios de Mazlum et al. (2011) en la langosta de agua dulce *Astacus leptodactylus* con un tiempo experimental de 90 días; de Li et al. (2009) en el camarón de agua dulce *M. nipponense* por un periodo de 18 días; de Wu y Dong (2002a) en el camarón marino *F. chinensis* durante 32 días; de Zhu et al. (2014) en el camarón marino *L. vannamei* durante 36 días; de Mattila et al. (2009) en el pez marino *Sander lucioperca* durante 59 días; y de Känkänen y Pirhonen (2009) en el pez marino de *Coregonus lavaretus* durante 45 días. A su vez, existe un único trabajo que basó la intermitencia en alternar alimento balanceado con alimento fresco durante 45 días en el camarón marino *L. vannamei* (Zheng et al. 2008).

Con respecto a la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, en el capítulo anterior fue demostrado que los juveniles en estadio III pueden tolerar un periodo de alimentación intermitente a corto plazo (alrededor de 7 días) y crecer como el control de alimentación continua cuando empiezan la restricción con suministro de alimento. Según Anger (2001), cortos periodos de privación de alimento pueden aumentar el apetito y la subsecuente tasa de ingestión, permitiendo una máxima digestión de los nutrientes ingeridos, mientras que largos periodos de baja disponibilidad de alimento inducen a un mecanismo de “ahorro” energético, incluyendo la reducción en la actividad alimenticia y metabólica. Por otra parte, extensas privaciones del alimento afectan procesos esenciales del organismo y éstos son mantenidos a expensas de las reservas endógenas acumuladas, lo cual resulta en una pérdida de masa corporal (Wen et al. 2006). En este sentido, Calvo et al. (2012, 2013) y Sacristán et al. (2015) demostraron que largos plazos de inanición (50 días) disminuyen la concentración de lípidos y glucógeno en la glándula digestiva de los juveniles en estadio avanzado (1 gramo) de *C. quadricarinatus* y como consecuencia de esta reducción energética, la estructura de la glándula digestiva también resulta alterada. La glándula digestiva, más comúnmente conocida como hepatopáncreas, no es solamente el lugar de síntesis y secreción de enzimas digestivas, sino también principal órgano para la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes derivados de la dieta (Verri et al. 2001; Ong y Johnston 2006). Histológicamente, la unidad funcional de esta glándula es un tubo ciego, constituido por un epitelio cilíndrico simple y que contiene 4 diferentes tipos celulares principales: las células E (embrionarias), células F (responsables de la síntesis de las enzimas digestivas), células B (responsables de la absorción de nutrientes y digestión intracelular) y células R (responsables del almacenamiento de lípidos y glucógeno provenientes de la dieta) (Verri et al. 2001). Por lo tanto, el análisis histológico de la glándula digestiva constituye un método muy sensible para detectar tempranamente síntomas de deficiencias nutricionales y es muy práctico para evaluar el valor nutricional de las dietas (Storch et al. 1984; Vogt et al. 1985).

3.2. Objetivo

Con todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este capítulo fue evaluar las respuestas del crecimiento, supervivencia y estado nutricional en los juveniles expuestos a diferentes periodos de alimentación intermitente. Los tratamientos y la extensión de la alimentación intermitente con mejores respuestas serán seleccionados para la búsqueda de un adecuado protocolo de restricción alimenticia que dispare el crecimiento compensatorio en juveniles de la especie.

En el marco de este objetivo se planteó las siguientes hipótesis:

Hipótesis 3.1: La duración del período de restricción alimenticia influye en la capacidad de crecimiento compensatorio de los juveniles de *C. quadricarinatus*.

Hipótesis 3.2: Los juveniles que compensan a la restricción alimenticia presentan similar estructura celular en la glándula digestiva que aquellos juveniles sometidos al régimen de alimentación normal.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados en el presente capítulo fueron obtenidos a partir del plantel de reproductores suministrados por la hacienda acuícola *Las Golondrinas*, ubicada en la provincia de Entre Ríos, Argentina, en el año de 2009. Dichos lotes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de laboratorio descritas en el Capítulo 2 (sección Materiales y métodos). Se utilizaron juveniles recién independizados (estadio III) y juveniles de estadios más avanzados (estadio VI-VII; 45 días post-independencia), dependiendo del experimento a realizar. Los juveniles en estadio más avanzado fueron obtenidos de los mismos planteles de reproductores y mantenidos en grupo desde el estadio JIII y en las mismas condiciones de calidad de agua, alimentación (dieta), temperatura y fotoperiodo descrito para el plantel reproductivo, hasta que su masa corporal fuera la adecuada para el experimento.

3.3.2. Procedimiento experimental

Fueron realizados tres experimentos. Para cada experimento se utilizaron juveniles de al menos 4 hembras ovígeras para garantizar la variabilidad genética. En todos los experimentos, cada juvenil fue previamente secado (ver procedimiento utilizado en el Capítulo 2) y transferido individualmente a un envase plástico (500 cm³) con 350 ml de agua declorada con el agregado de un trozo de red cebollera (5 cm x 5 cm) utilizada como refugio (Figura 3.1). Los envases plásticos fueron limpiados diariamente con renovación del 100% del agua. Semanalmente fueron medidos los siguientes parámetros de calidad de agua en el tanque de abastecimiento para asegurar adecuados niveles en todos los experimentos: oxígeno disuelto (5,4 a 8 mg/L), pH (7,3 a 8,4), dureza (60-100 mg/L de CaCO₃) y temperatura (26 a 29°C). Todos los parámetros estuvieron dentro del rango recomendado para la acuicultura (Jones 1997; Boyd y Tucker 1998). Los experimentos se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura, aireación y fotoperiodo. Para el control de la temperatura, los envases plásticos fueron sumergidos en una cuba plástica (dimensiones de 53 cm x 40 cm x 12 cm) con agua mantenida a 27 ± 1 °C por medio de un calefactor ATMAN de 75 o 100W (Figura 3.1). La unidad experimental (u.e.) fue el juvenil individualizado en un envase plástico. Se realizaron observaciones 2 veces al día (a la mañana y a la tarde) para el registro de mudas y muertes.

La dieta utilizada en todos los experimentos fue el alimento balanceado para el cultivo de trucha (FUNDUS[®]) formulado en Argentina por Fideos Don Antonio SA. La utilización de este alimento tuvo el propósito de evaluar su aplicabilidad utilizando regímenes de restricción alimenticia, además de evaluar su aplicabilidad en el cultivo de la langosta *C. quadricarinatus* en nuestro país. El FUNDUS[®] está compuesto por 41,6% de proteína bruta, 21,3% de lípidos, 6,9% de cenizas y 6,1% de humedad (Sacristán et al. 2015). En los días de alimentación, el alimento fue suministrado *ad libitum* y con frecuencia de 1 vez al día.

El tipo de restricción aplicada (**ALIMENTACIÓN INTERMITENTE**) en todos los experimentos fue considerada moderada ya que intercala pocos días de inanición con días de alimentación, además de los resultados positivos sobre el crecimiento y supervivencia de los juveniles presentados en el experimento 1 del Capítulo 2.

La extensión del *PERIODO DE RESTRICCIÓN* varió de acuerdo con el experimento, así como la presencia de un subsiguiente *PERIODO DE RECUPERACIÓN* (periodo de alimentación diaria).



Figura 3.1. Sistema de control de la temperatura y aireación, además de los envases plásticos (u.e.) utilizados en los tres experimentos.

3.3.2.1. Experimento 1- Efecto de un *Periodo de Restricción* a CORTO PLAZO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados

En el presente experimento, la extensión del periodo de restricción fue hasta que el juvenil en estadio III mudara al estadio IV. Luego de la muda se continuó con un periodo de alimentación diaria (periodo de recuperación) que se extendió hasta el día 45 del experimento (Figura 3.2a). Un total de 216 juveniles recién independizados (JIII, $17,01 \pm 1,24$ mg) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI1 (alimentación por 1 día + inanición por 1 día), AI2 (alimentación por 2 días + inanición por 2 días), AI3 (alimentación por 3 días + inanición por 3 días), AI4 (alimentación por 4 días + inanición por 4 días), AI5 (alimentación por 5 días + inanición por 5 días), AI6 (alimentación por 6 días + inanición por 6 días), AI7 (alimentación por 7 días + inanición por 7 días), AC (alimentación continua) y IC (inanición continua). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 24 juveniles (réplicas). Dichos tratamientos y procedimiento experimental fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia previamente presentados en el Capítulo 2.

3.3.2.2. Experimento 2- Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO en juveniles recién independizados

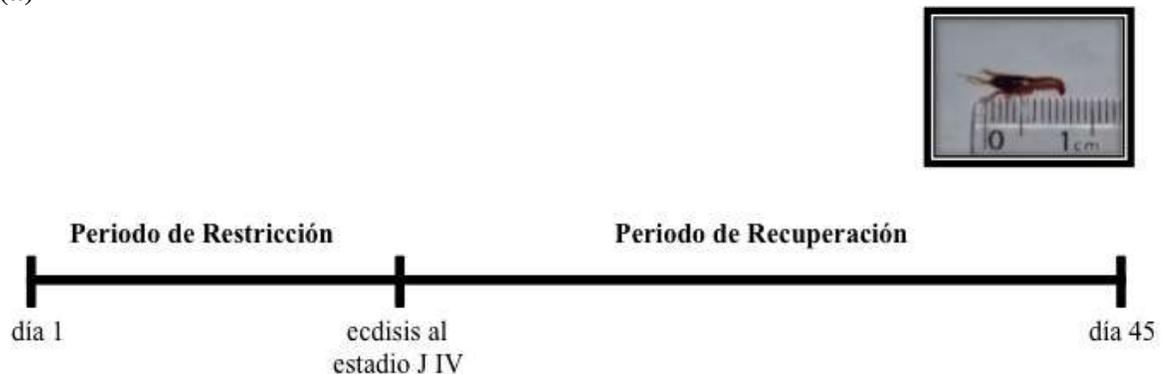
En el presente experimento, la extensión del periodo de restricción fue de 60 días sin un subsiguiente periodo de recuperación (Figura 3.2b). Un total de 160 juveniles recién independizados ($16,78 \pm 1,16$ mg) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los 4 regímenes alimenticios: AI2, AI3, AI4 y AC (ver descripción de los tratamientos en la sección 3.3.2.1). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 40 juveniles (réplicas). Dichos

tratamientos fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia observados en el experimento 1.

3.3.2.3. Experimento 3- Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO en juveniles avanzados

En el presente experimento, la extensión del periodo de restricción fue de 60 días sin un subsiguiente periodo de recuperación (Figura 3.2c). Un total de 96 juveniles ($0,36 \pm 0,05$ g) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los 4 regímenes alimenticios: AI2, AI3, AI4 y AC (ver descripción de los tratamientos en la sección 3.3.2.1). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 24 juveniles (réplicas). Dichos tratamientos fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia observados en el experimento 2.

(a)



(b)



(c)



Figura 3.2. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de *Cherax quadricarinatus*. (a) Restricción alimenticia a corto plazo aplicada en los juveniles III (b) Restricción alimenticia a largo plazo aplicada en los juveniles III y (c) Restricción alimenticia a largo plazo aplicada en los juveniles avanzados.

3.3.3. Variables registradas y cálculos

La frecuencia de individuos que mudaron del estadio III al estadio IV y sobrevivieron (muda exitosa), así como el tiempo de intermuda fueron registrados en el experimento 1. La masa corporal (en base húmeda) fue registrada al final del periodo de restricción y en los días 15, 22, 30, 37 y 45 del experimento 1 (periodo de recuperación). En los experimentos 2 y 3 la masa corporal fue registrada en los días 15, 30, 45 y 60. El número de mudas fue registrado en los tres experimentos, así como la supervivencia al finalizar los experimentos.

Al finalizar cada experimento, los juveniles fueron anestesiados con hielo y posteriormente sacrificados para la remoción de la glándula digestiva y pleon (abdomen). Sus masas fueron registradas (balanza analítica “OHAUS, PioneerTM”; precisión de 0,0001g) para el cálculo de los índices órgano-somáticos correspondientes.

Los cálculos utilizados fueron:

- (1) Frecuencia de individuos que mudaron exitosamente al estadio IV (**FM, %**) = $[\text{número de individuos que mudaron al estadio IV} / \text{número de individuos en estadio III}] * 100$.
- (2) Intermuda III – IV = tiempo en días que cada individuo en estadio III demoró en mudar al estadio IV.
- (3) Tasa de crecimiento específico (**TCE, %/día**) = $[\ln(\text{masa final}) - \ln(\text{masa inicial}) / (\text{tiempo})] * 100$.
- (4) Número de mudas (**NM**) = número de mudas de cada individuo durante el periodo experimental.
- (5) Supervivencia (**S, %**) = $[\text{número de individuos vivos al finalizar el experimento} / \text{número de individuos vivos al iniciar el experimento}] * 100$.
- (6) Índice de la glándula digestiva (**IGD, %**) = $[\text{masa de la glándula digestiva} / \text{masa corporal total}] * 100$.
- (7) Índice relativo del pleon (**IRP, %**) = $[\text{masa de pleon} / \text{masa corporal total}] * 100$.

Para el cálculo de la intermuda, en el experimento 1, no fueron considerados los datos de los juveniles que murieron al mudar durante el periodo de restricción. Lo mismo fue aplicado para el cálculo de los días de alimentación durante este periodo. Con respecto al

número de mudas, en todos los experimentos esta variable fue estimada en muchos juveniles y ésta estimación llevó en consideración la ganancia en masa de estos juveniles en un determinado periodo, siempre utilizando como base los datos de juveniles en los cuales se registraron mudas en este mismo periodo.

Un total de 3 o 4 glándulas digestivas por tratamiento, en todos los experimentos, fueron fijadas inmediatamente después de la disección en la solución acuosa de Bouin para el análisis histológico.

3.3.3.1. Análisis histológico

Las glándulas digestivas previamente fijadas, fueron deshidratadas en una serie de gradaciones crecientes de alcoholes: etanol 70% (10 min.), etanol 90% (10 min.), etanol 96% (10 min) y etanol 100% (10 min.). Posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina líquida (PARAPLAST[®]) y se procedió a orientar de la pieza para la solidificación de la parafina y tallado del bloque. Los bloques de parafina fueron cortados en secciones de 6 µm de espesor por medio de un micrótopo de rotación ARCANO[®] (modelo RMT-20) y dichos cortes fueron montados en porta-objetos, y posteriormente coloreados con la técnica de Hematoxilina-Eosina. De cada ejemplar (glándula digestiva) se realizaron 3 o 4 preparados, conteniendo 4 cortes histológicos de cada uno, que fueron observados bajo microscopio óptico CARL ZEISS[®] (modelo Axio Imager A1). La caracterización de los tipos celulares se basó en las descripciones histológicas de la glándula digestiva de *C. quadricarinatus* realizadas por Calvo et al. (2011; 2012) y Sacristán et al. (2015).

3.3.4. Análisis estadístico

Los valores expresados para cada variable estudiada fueron el promedio de las réplicas con su error estándar, excepto para la FM y S, que son proporciones. Las diferencias entre promedios y proporciones fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$. El programa estadístico utilizado fue el INFOSTAT (Infostat version 2014, Grupo Infostat, FCA-UNC, Argentina).

El diseño experimental fue el completamente aleatorizado (DCA). La prueba paramétrica (Análisis de Varianza – ANOVA) fue aplicada a las variables después del cumplimiento de los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene) de los residuos y cuando fue necesario los datos fueron log-transformados para cumplir con dichos supuestos. En el caso de incumplimiento de los supuestos fue aplicada una prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis). Las comparaciones múltiples entre los tratamientos y el control AC fueron realizadas a través del test de Dunnet (paramétrico) o Mann-Whitney (no paramétrico) (Zar 1999).

En el caso de la variable de crecimiento TCE y masa corporal (en los experimentos 2 y 3), fue aplicado el ANOVA en un diseño de medidas repetidas (DMR) utilizando Modelos Mixtos (Gómez et al. 2012). En dicho análisis, los factores fijos fueron el régimen alimenticio y el tiempo y el factor aleatorio fue la unidad experimental (cada juvenil individualizado en el ensave plástico). Las comparaciones múltiples entre regímenes alimenticios fueron realizadas a través del test de LSD.

Los datos categóricos como frecuencia de muda y supervivencia fueron analizados a través de una tabla de contingencia utilizando la prueba del Chi-cuadrado de Pearson y, las

comparaciones múltiples entre los tratamientos y el control de alimentación continua fueron realizados a través de la prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones (Zar 1999).

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento 1- Efecto de un *Periodo de Restricción* a CORTO PLAZO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados

La ecdisis durante el periodo de restricción fue dependiente de los regímenes alimenticios ($\chi^2_{8;0,95} = 34,12$; $P < 0,0001$) y no se observaron mudas en los juveniles expuestos a la inanición continua (IC) (Figura 3.3). Los juveniles expuestos a los tratamientos AI1 y AI4 tuvieron una menor proporción de mudas exitosas en relación a los juveniles expuestos a la alimentación continua (AC). Debido al 100% de mortalidad en los juveniles expuestos a IC, el mismo fue excluido de los análisis posteriores.

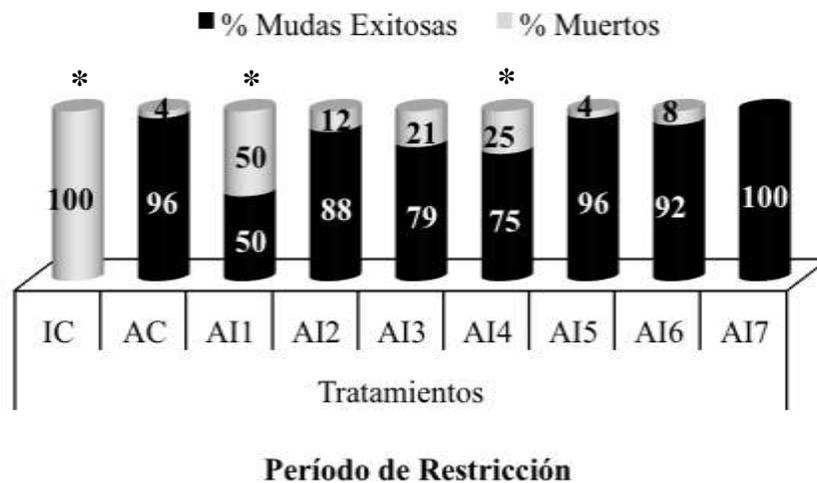


Figura 3.3. Frecuencia de juveniles III de *C. quadricarinatus* que mudaron exitosamente del estadio III al estadio IV durante el periodo de restricción. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). AI1: alimentación por 1 día + inanición por 1 día, AI2: alimentación por 2 días + inanición por 2 días, AI3: alimentación por 3 días + inanición por 3 días, AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días, AI5: alimentación por 5 días + inanición por 5 días, AI6: alimentación por 6 días + inanición por 6 días, AI7: alimentación por 7 días + inanición por 7 días, IC: inanición continua y AC: alimentación continua.

El tiempo de intermuda durante el periodo de restricción difirió significativamente entre los regímenes alimenticios ($H_7 = 15,87$; $P = 0,0188$) y se observó una mayor duración del estadio III en juveniles expuestos a los tratamientos AI3 y AI7 en relación a AC (Figura 3.4).

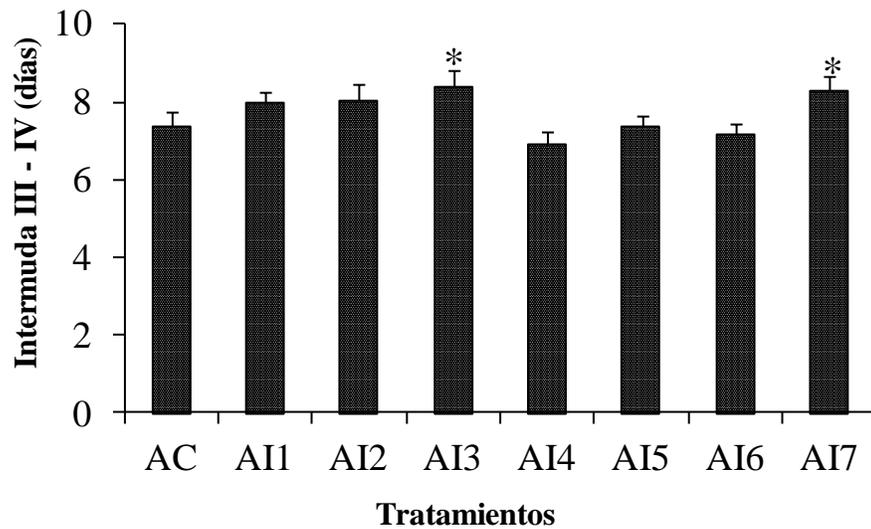


Figura 3.4. Tiempo de intermuda del estadio III al estadio IV de *C. quadricarinatus* durante el periodo de restricción. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.3.

Durante el periodo de restricción, los juveniles expuestos a todos los tratamientos de alimentación intermitente recibieron significativamente menos alimento ($H_7 = 115,68$; $P < 0,0001$) en relación al control AC (Figura 3.5).

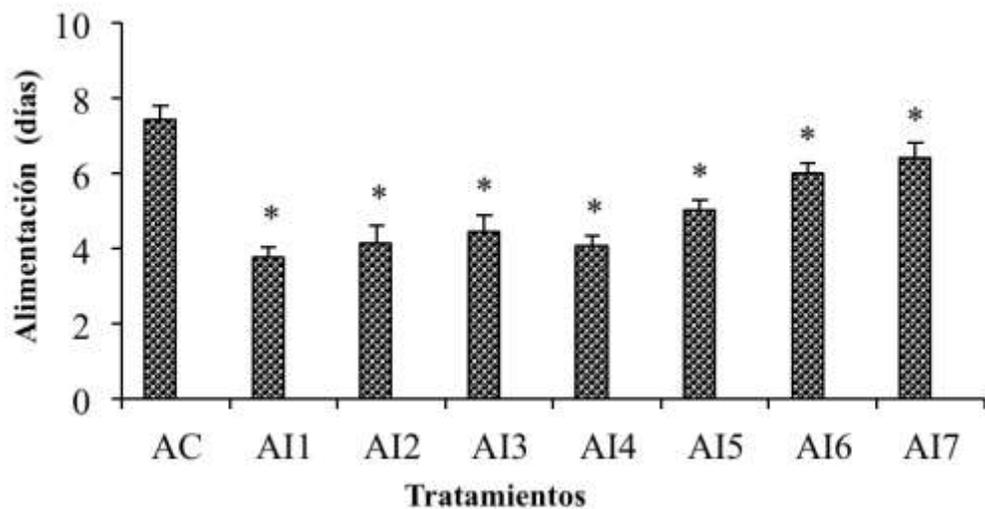
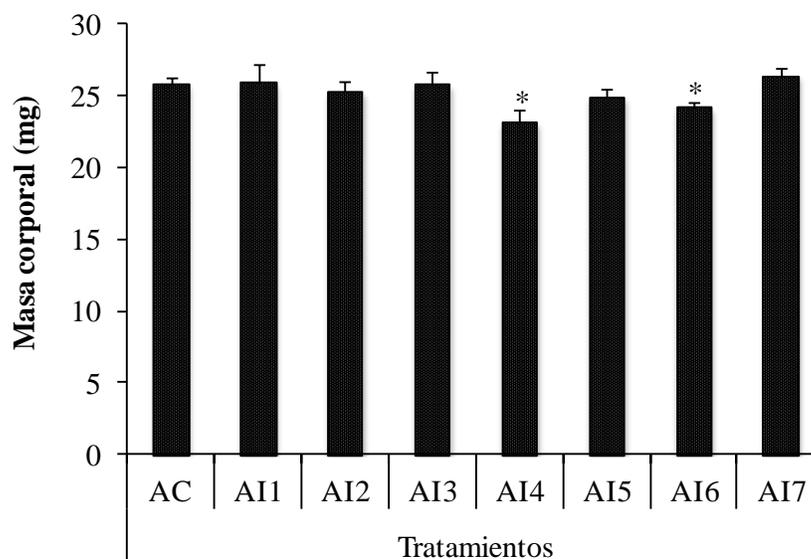


Figura 3.5. Días de alimentación durante el periodo de restricción en juveniles de *C. quadricarinatus*. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.3.

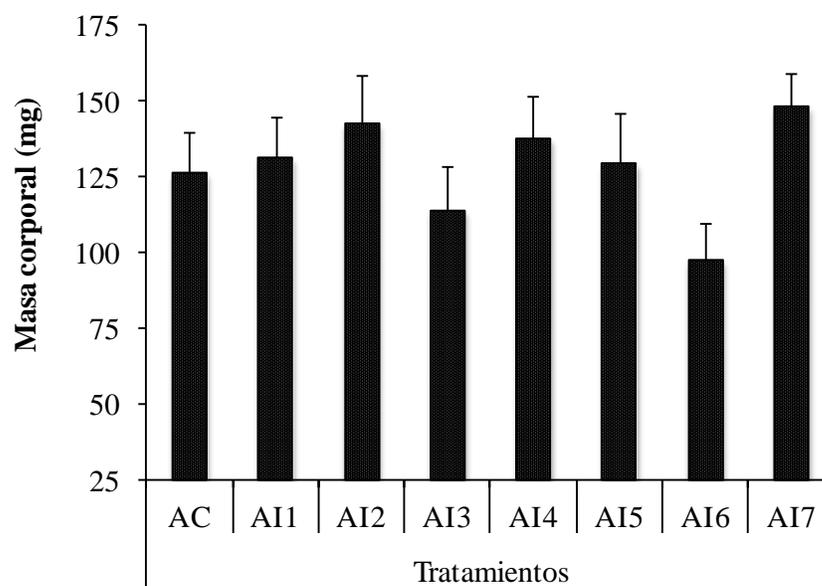
Al finalizar el periodo de restricción, los juveniles expuestos a los tratamientos AI4 y AI6 crecieron significativamente menos ($H_7 = 27,24$; $P = 0,0003$) que los juveniles expuestos a AC (Figura 3.6a) mientras que los juveniles expuestos a los demás tratamientos presentaron la misma masa corporal que el control. Al finalizar el periodo de recuperación, los juveniles de todos los tratamientos presentaron la misma masa corporal que AC ($F_{7, 81} = 1,55$; $P = 0,1639$) (Figura 3.6b).

(a)



Periodo de Restricción

(b)



Periodo de Recuperación

Figura 3.6. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus*. (a) Al finalizar el periodo de restricción y (b) al finalizar el periodo de recuperación. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descriptos en el epígrafe de la figura 3.3.

Durante el periodo de recuperación, se observó interacción significativa entre tratamiento y tiempo ($F_{28,328} = 1,68$; $P = 0,0192$) en la tasa de crecimiento específico de los juveniles (Figura 3.7). Los juveniles del tratamiento AI4 presentaron una mayor tasa de crecimiento que AC en la primera semana de restitución de la alimentación diaria, mientras que en los juveniles de los tratamientos AI2 y AI5 esta tasa fue mayor en la última semana.

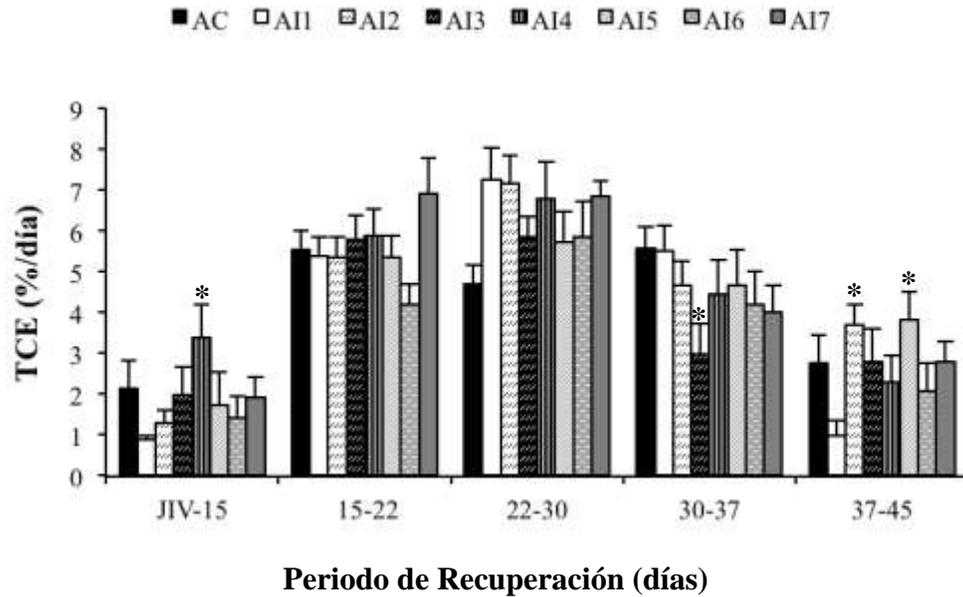


Figura 3.7. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo de recuperación. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descriptos en el epígrafe de la figura 3.3.

Al finalizar el experimento, no se observaron diferencias significativas en el índice de la glándula digestiva entre los regímenes alimenticios ($F_{7,78} = 1,66$; $P = 0,1304$), mientras que en el índice relativo del pleon se detectaron diferencias entre AI5, AI6 y AI7 en relación al control AC ($H_7 = 23,52$; $P = 0,0014$) (Figura 3.8). Estos juveniles presentaron mayor masa relativa del pleon que aquellos juveniles del control.

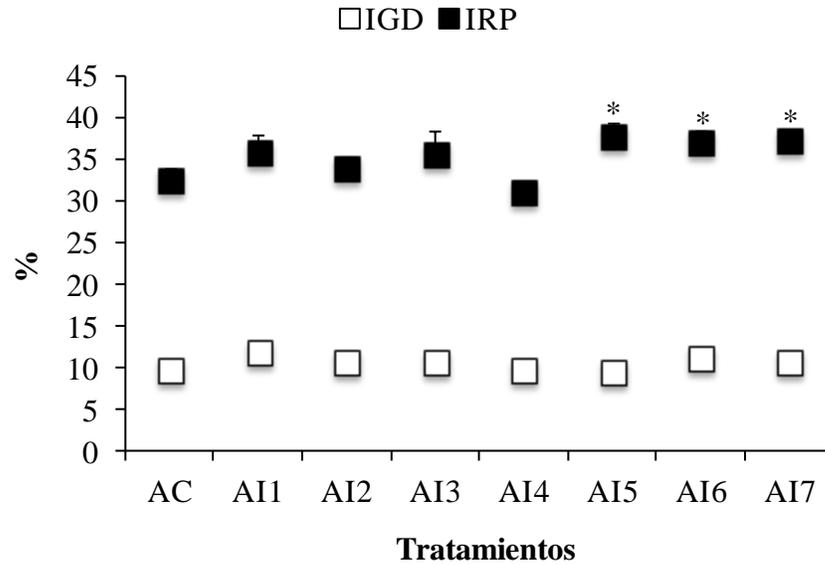


Figura 3.8. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el experimento 1. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre cada régimen alimenticio y el control de alimentación continua (AC). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.3.

El número de mudas estimadas durante todo el experimento fue similar ($H_7 = 3,49$; $P = 0,7189$) entre tratamientos de alimentación intermitente y control de alimentación ($4,6 \pm 0,06$ mudas). Al finalizar el experimento, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los juveniles expuestos a los distintos regímenes ($\chi^2_{7, 0,95} = 11,29$; $P = 0,1263$) (Figura 3.9).

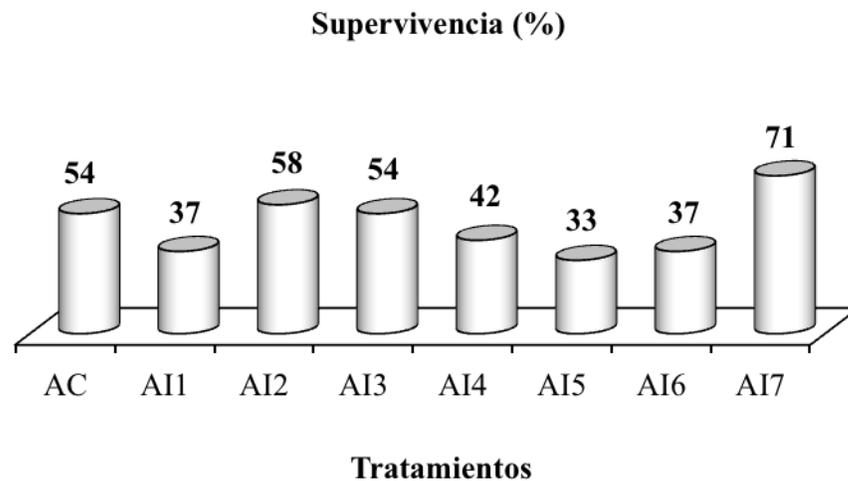


Figura 3.9. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el experimento 1. Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.3.

Cuando fueron analizadas las glándulas digestivas de los juveniles bajo intermitencia (fueron considerados los tratamientos que recibieron la mitad del alimento en relación al control, es decir, AI1, AI2, AI3 y AI4), no se observaron alteraciones

estructurales diferentes a las presentadas por el control de alimentación, excepto en los juveniles del tratamiento AI1 que mostraron pérdida parcial de la estructura tubular y una mayor desorganización de los túbulos (Figura 3.10c).

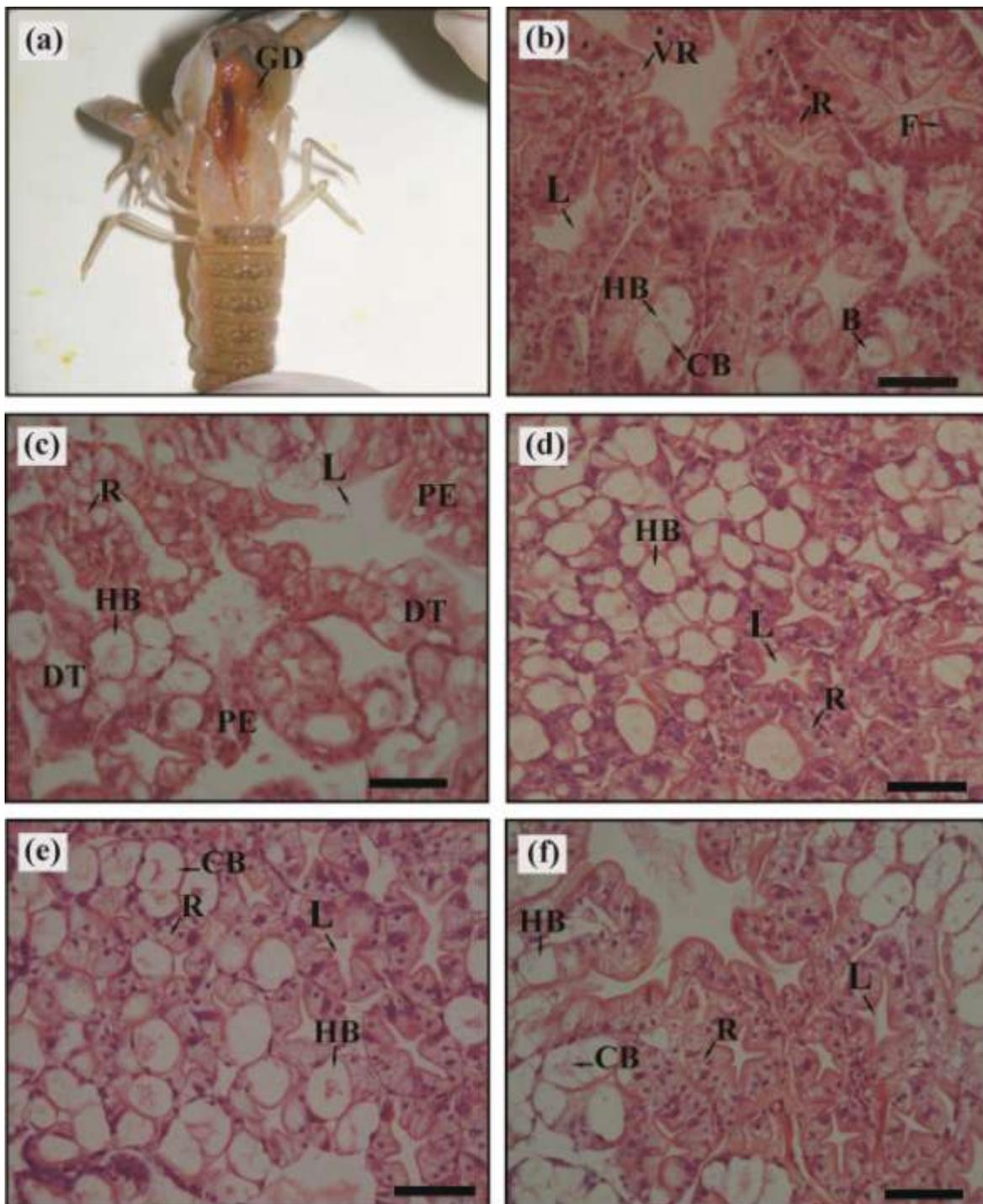


Figura 3.10. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles *C. quadricarinatus* al final del experimento 1. (a) Vista general de la glándula digestiva en fresco (b) control de alimentación continua (AC), (c) alimentación por 1 día + inanición por 1 día (AI1), (d)

alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (e) alimentación por 3 días + inanición por 3 días (AI3) y (f) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4). B: célula B; CB: coalescencia de las células B; HB: hipertrofia de la célula B; DT: desorganización del túbulo; F: célula F; L: lumen del túbulo; PE: pérdida de estructura; R: células R, VR: grande vacuola de la célula R. Barra de escala = 100 μm .

De acuerdo con los resultados del presente experimento, los tratamientos que tuvieron una menor proporción de mudas exitosas al finalizar la restricción, numéricamente menos individuos vivos al finalizar el experimento y alimentación superior a 4 días durante el periodo de restricción (AI1, AI5, AI6 y AI7), fueron excluidos del próximo experimento.

3.4.2. Experimento 2- Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO en juveniles recién independizados

Los juveniles expuestos a los tratamientos AI2 y AI3 tuvieron en total 30 días de alimentación y los juveniles expuestos al tratamiento AI4 tuvieron 32 días. Esta cantidad representa 50 % del obtenido para los juveniles de AC.

La interacción entre régimen de alimentación y la extensión de la restricción afectó el crecimiento de los juveniles ($F_{9,309} = 7,73$; $P < 0,0001$). Transcurridos 15 días de restricción, los juveniles expuestos a todos los tratamientos de alimentación intermitente presentaron un nivel 26% menor de masa corporal en relación al control. En la semana siguiente (día 30) los juveniles expuestos a los tratamientos AI2 y AI3 aumentaron esta diferencia a un 38%, mientras que los juveniles expuestos al tratamiento AI4 aumentaron a un 46%. Treinta días después (día 60) esta diferencia fue del 50% y 58% respectivamente, en relación al control (Figura 3.11).

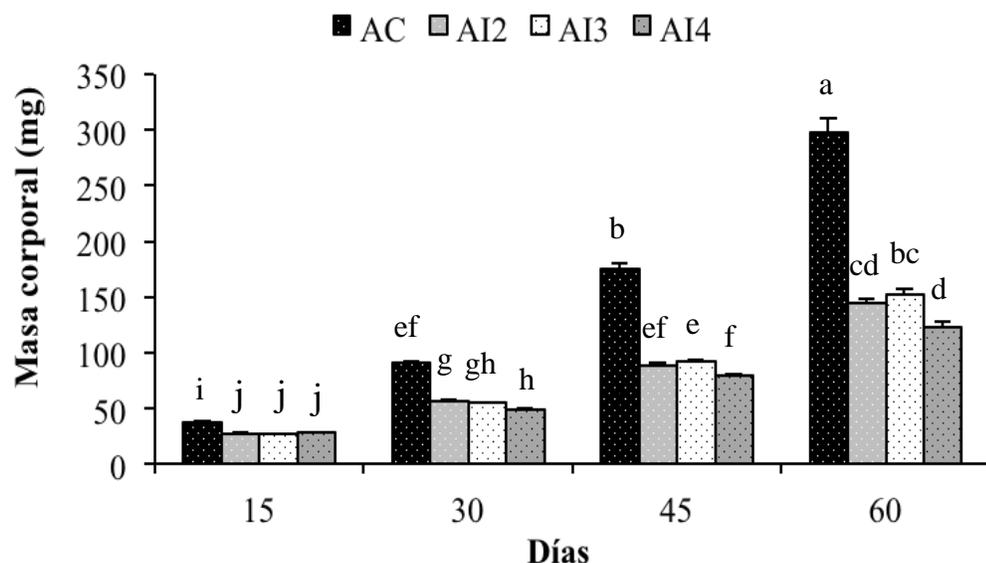


Figura 3.11. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 2. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen alimenticio y tiempo (efecto de la interacción). AI2: alimentación por 2 días + inanición por 2 días, AI3: alimentación por 3 días + inanición por 3 días, AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días y AC: alimentación continua.

Durante el experimento, se observó una significativa interacción entre el régimen alimenticio y el tiempo ($F_{9,309} = 2,66$; $P = 0,0056$) sobre la tasa de crecimiento específico de los juveniles (Figura 3.12). Los juveniles bajo alimentación intermitente presentaron una menor tasa de crecimiento en las 3 primeras quincenas, cuando fueron comparados con la tasa de crecimiento del control AC, mientras que en la última quincena presentaron tasas similares.

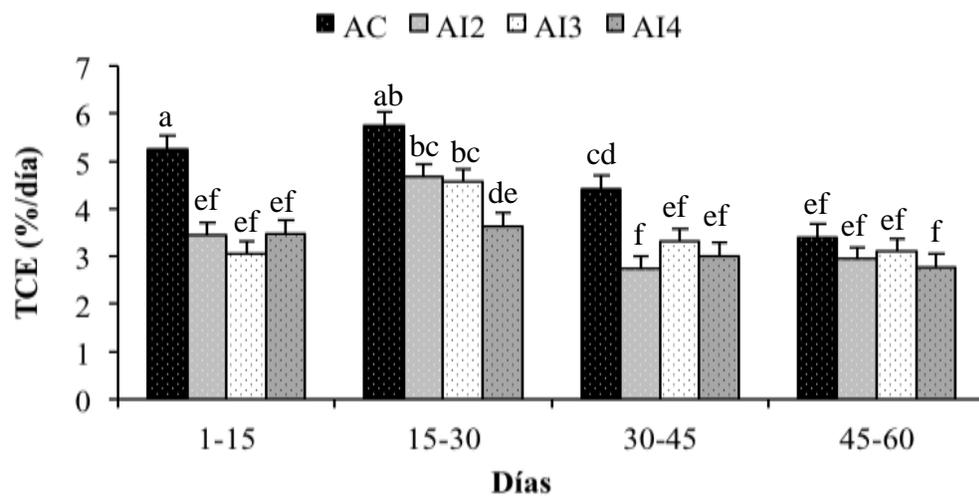


Figura 3.12. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 2. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen alimenticio y tiempo (efecto de la interacción). Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.11.

Al finalizar el experimento, no se observaron diferencias significativas en el índice de la glándula digestiva ($H_3 = 7,78$; $P = 0,0507$), mientras que en el índice relativo del pleon se observaron diferencias significativas entre los tratamientos AI2 y AI4 (valores menores) respecto de AC ($F_{3,103} = 4,45$; $P = 0,0055$) (Figura 3.13).

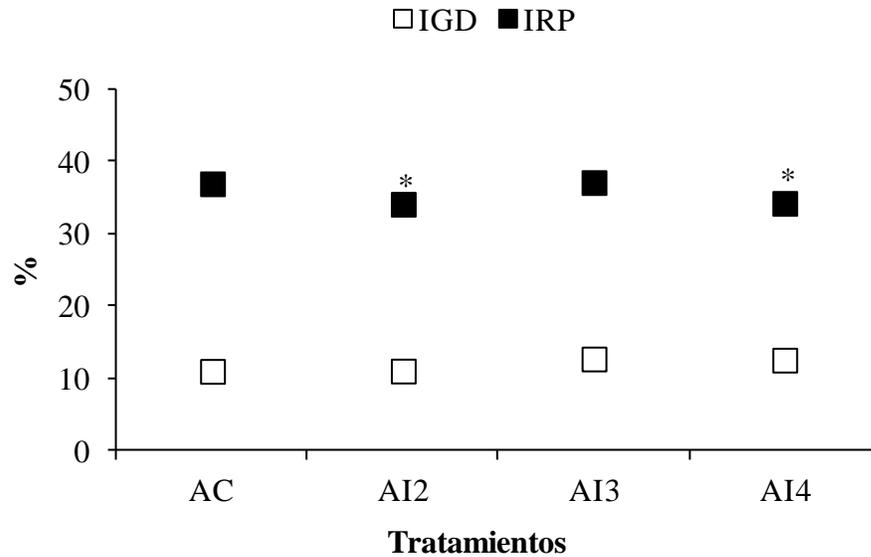


Figura 3.13. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el experimento 2. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.11.

El número de mudas estimadas durante todo el experimento fue significativamente menor ($H_3 = 26,77$; $P < 0,0001$) en los tratamientos de alimentación intermitente ($4,8 \pm 0,2$) en relación al control de alimentación continua ($6,0 \pm 0,1$). Al finalizar el experimento, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los juveniles expuestos a los distintos regímenes alimenticios ($\chi^2_{3; 0,95} = 4,82$; $P = 0,1851$) (Figura 3.14).

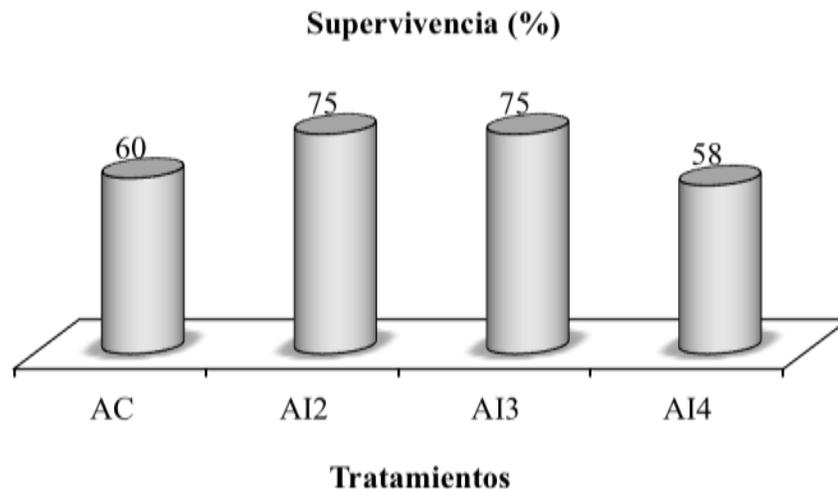


Figura 3.14. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el experimento 2. Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.11.

Las glándulas digestivas de los juveniles bajo intermitencia, no presentaron alteraciones estructurales diferentes al control de alimentación (Figura 3.15b, c y d).

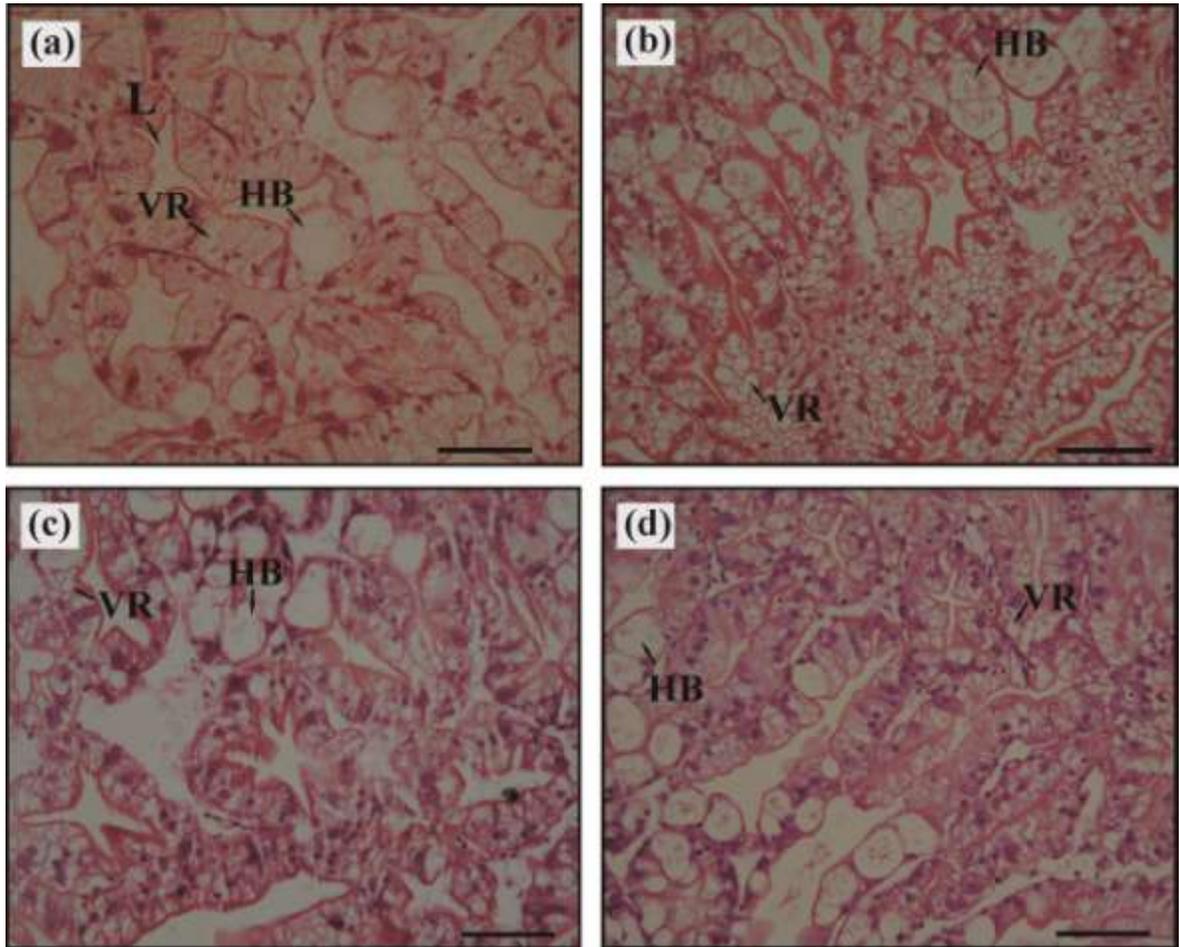


Figura 3.15. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles *C. quadricarinatus* al final del experimento 2. (a) Control de alimentación continua (AC), (b) alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (c) alimentación por 3 días + inanición por 3 días (AI3) y (d) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4). HB: hipertrofia de la célula B; L: lumen del túbulo; VR: grande vacuola de la célula R. Barra de escala = 100 μ m.

De acuerdo con los resultados del presente experimento, los tratamientos AI2, AI3 y AI4 serán ensayados en juveniles de mayor talla (con previa alimentación antes de la restricción) para comparar las respuestas frente a este tipo de restricción.

3.4.3. Experimento 3- Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO en juveniles avanzados

Los juveniles expuestos a los tratamientos AI2, AI3 y AI4 obtuvieron el 50 % de la alimentación cuando comparado con los juveniles de AC.

Los juveniles, independientemente de los tratamientos, crecieron a medida que avanzó el experimento ($F_{3,264} = 489,99$; $P < 0,0001$). El régimen de alimentación intermitente no tuvo un efecto diferente al control en el crecimiento de los juveniles avanzados ($F_{3,88} = 1,31$; $P = 0,2775$) (Figura 3.16).

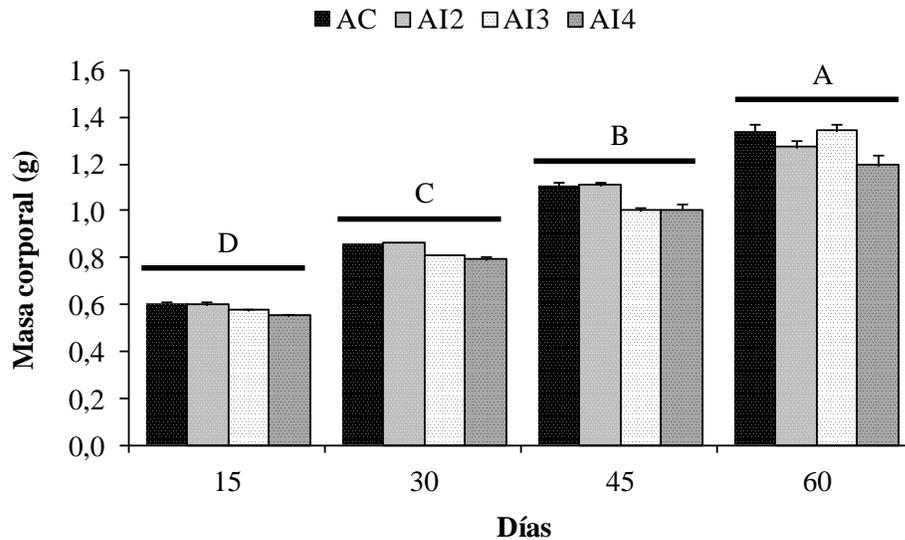


Figura 3.16. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 3. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. AI2: alimentación por 2 días + inanición por 2 días, AI3: alimentación por 3 días + inanición por 3 días, AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días y AC: alimentación continua.

Así como fue observado en la masa corporal, el único factor que tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento específico de los juveniles fue el tiempo ($F_{3,264} = 99,13$; $P < 0,0001$) (Figura 3.17).

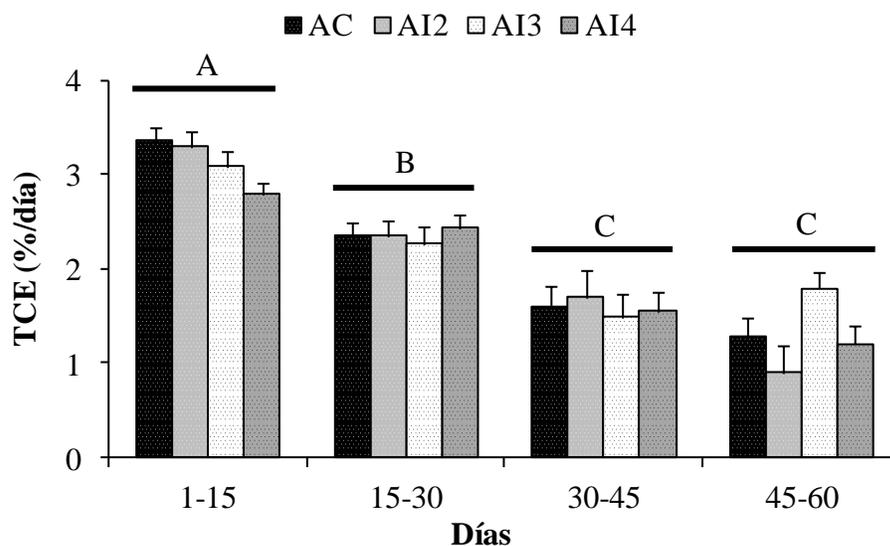


Figura 3.17. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 3. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. Los regímenes alimenticios están descriptos en el epígrafe de la figura 3.16.

Al finalizar el experimento, no se observaron diferencias significativas en el índice de la glándula digestiva ($F_{3,89} = 0,53$; $P = 0,6621$) ni en el índice relativo del pleon ($F_{3,89} = 1,00$; $P = 0,3977$) en relación al control AC (Figura 3.18).

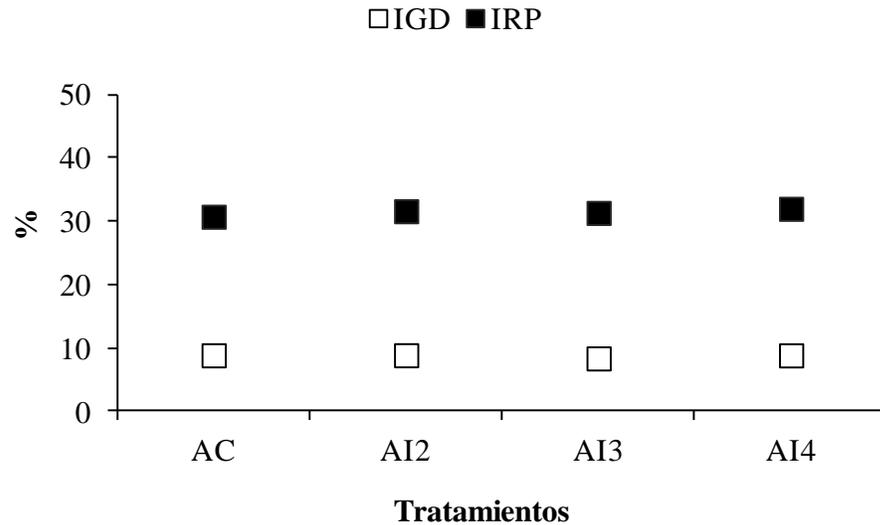


Figura 3.18. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el experimento 3. Los regímenes alimenticios están descriptos en el epígrafe de la figura 3.16.

El número de mudas estimadas fue similar ($H_3 = 3,45$; $P = 0,0939$) entre tratamientos y el control de alimentación ($3,0 \pm 0,1$). Al finalizar el experimento, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los juveniles expuestos a los distintos regímenes ($\chi^2_{3; 0,95} = 3,78$; $P = 0,2856$) (Figura 3.19).

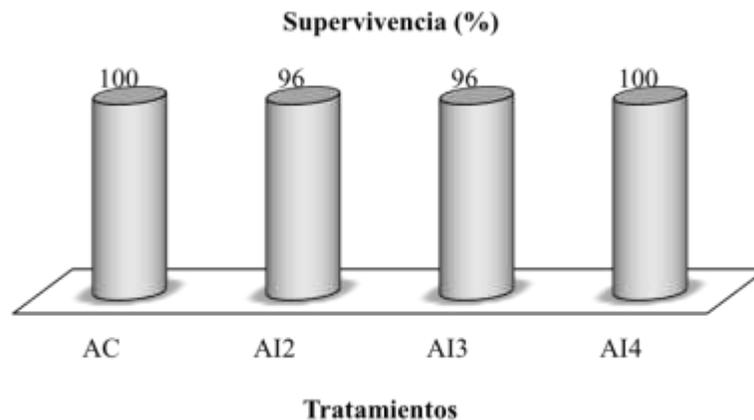


Figura 3.19. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar el experimento 3. Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 3.16.

En los tratamientos bajo intermitencia no se observaron alteraciones estructurales diferentes la del presentada por el control de alimentación (Figura 3.20a, b,c y d).

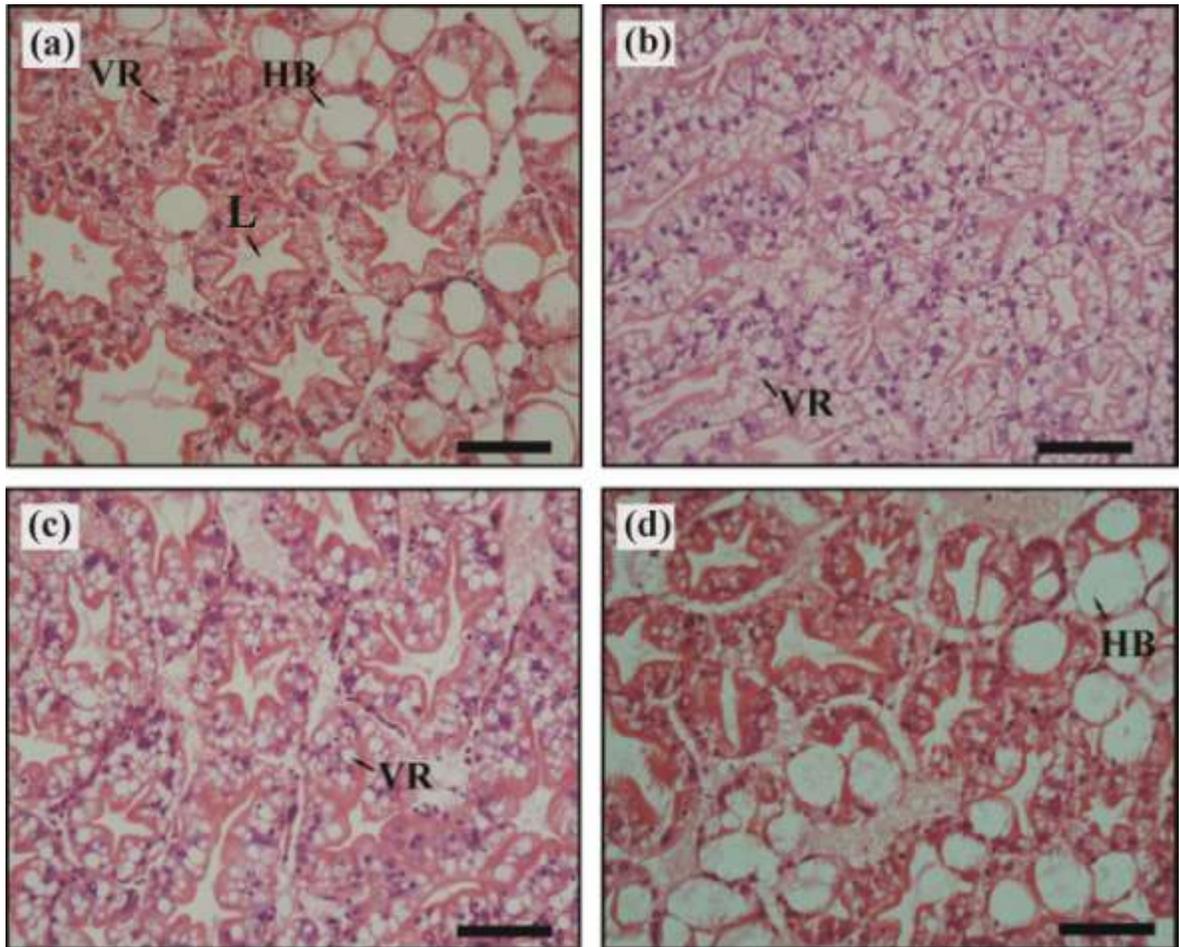


Figura 3.20. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles *C. quadricarinatus* al final del experimento 3. (a) Control de alimentación continua (AC), (b) alimentación por 2 días + inanición por 2 días (AI2), (c) alimentación por 3 días + inanición por 3 días (AI3) y (d) alimentación por 4 días + inanición por 4 días (AI4). HB: hipertrofia de la célula B; L: lumen del túbulo; VR: grande vacuola de la célula R. Barra de escala = 100 μ m.

3.5. Discusión

El presente capítulo constituye el primer trabajo en el que se investigó el efecto de la alimentación intermitente sobre la condición nutricional del juvenil de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, a través del análisis histológico de la glándula digestiva.

Conjuntamente con los demás resultados obtenidos se pudo **acotar el número de tratamientos a ensayar e identificar una adecuada extensión del periodo de restricción alimenticia sin comprometer la supervivencia de los juveniles.**

Se corroboró a través del experimento 1, que los juveniles expuestos a solamente 4 días de alimentación (intermitente o no) durante 1 semana son tolerantes a este tipo de restricción, la cual puede ser considerada moderada. También se verificó que los juveniles que tuvieron un menor crecimiento inicial, pudieron recuperarlo a través del crecimiento compensatorio durante la restitución de alimentación diaria. Hay escasos trabajos disponibles sobre crecimiento compensatorio en langostas y en dichos trabajos no se logró la completa recuperación del organismo (Gu et al. 2006; Powell y Watts 2010).

Con respecto al experimento 2, los juveniles mostraron ser altamente tolerantes a la prolongada alimentación intermitente, condición confirmada por la alta supervivencia. Sin embargo, estos juveniles regularon su crecimiento a través de un menor número de mudas. Esta respuesta está de acuerdo con la observada por Mazlum et al. (2011) cuando alimentaron a los juveniles de la langosta *Astacus leptodactylus* cada 3 o 4 días y el crecimiento fue afectado principalmente por una menor frecuencia de mudas. Por otra parte, los juveniles III de *C. quadricarinatus* son particularmente vulnerables a una deficiencia nutricional ya que alcanzan dicho estadio con pocas reservas energéticas (García-Guerreo et al. 2003; Luo et al. 2008) y por lo tanto es posible que una menor frecuencia de mudas sea la “estrategia” utilizada para ahorrar energía y enfrentar un periodo de deficiente alimentación.

Por otro lado, en el experimento 3 se observó que los juveniles con una adecuada condición nutricional (previamente alimentados) pudieron mantener un alto crecimiento (similar al control) durante una menor disponibilidad de alimento. Una alimentación previa puede ser crucial para reducir los efectos de una severa inanición y animales más desarrollados (mayor talla) pueden necesitar largos periodos de privación del alimento antes que el estrés nutricional sea lo suficientemente severo para inducir al crecimiento compensatorio (Jobling et al. 1994; Anger 2001).

En este sentido, el presente estudio demostró que el estadio juvenil puede tolerar largos periodos de baja disponibilidad de alimento, sin embargo, la utilización de la alimentación intermitente *per se* no dispara la respuesta compensatoria en estos juveniles. Estos resultados llevan **a rechazar la hipótesis de trabajo 3.1**, que predice que la duración del período de restricción alimenticia influye en la capacidad de crecimiento compensatorio de los juveniles de *C. quadricarinatus*. De hecho, el crecimiento compensatorio solamente ocurrió después de la inclusión de un periodo de alimentación diaria post-restricción.

La tolerancia frente a largos periodos de restricción es considerada un atributo favorable para el cultivo de esta especie y estos experimentos permitieron seleccionar una extensión del periodo de alimentación intermitente que sea adecuada para buscar el crecimiento compensatorio en la especie. Algunos autores indican que el crecimiento compensatorio es más efectivo cuando la duración y la severidad de la restricción son cortas (Bull y Metcalfe 1997; Boujard et al. 2000; Tian y Qin 2004; Eroldogan et al. 2006; Bavcević et al. 2010), mientras que otros autores no verificaron esta relación cuando aplicaron cortos periodos de restricción con subsiguiente (y largo) periodo de alimentación (Blanquet y Oliva-Teles 2010; Peres et al. 2011).

Cuando comparamos algunos resultados de supervivencia, duración del estadio III y masa corporal en algunos tratamientos de restricción del presente trabajo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior (Capítulo 2), se observaron pequeñas diferencias entre

ellos y que pueden estar relacionadas con las distintas dietas utilizadas. En el presente capítulo la dieta utilizada fue altamente lipídica (21%) y es más digestible en comparación con la dieta utilizada en el capítulo anterior (6% de lípidos) (Sacristán et al. 2015). La digestibilidad y el valor nutricional de la dieta dependen altamente de la composición de sus aminoácidos y componentes que acompañan la dieta y dietas altamente digestibles permiten una alta supervivencia de los organismos. A su vez, los lípidos dietarios tienen un importante papel como fuente de energía y de ácidos grasos esenciales, esteroides, fosfolípidos, vitaminas liposolubles, además de actuar en la estructura de la membrana celular y ser componentes de las hormonas (Hernández et al. 2002). Las dietas eficientes contienen suficientes recursos energéticos no proteicos (lípidos y carbohidratos) que son metabolizados para los requerimientos energéticos generales, permitiendo al organismo utilizar al máximo la proteína dietaria para el crecimiento (Johnston et al. 2003). Por otro lado, estudios realizados por Hernández et al. (2002), y Cortés-Jacinto et al. (2005) mostraron que el nivel óptimo de lípidos en la dieta suministrada a un cultivo de *C. quadricarinatus* hecho en aguas claras, es decir, sin la producción natural, fue de 8% aunque con 12% también se reportó un buen crecimiento. A razón de eso y de acuerdo con nuestros resultados, es posible que la dieta altamente lipídica haya contribuido al mantenimiento de la alta tasa de crecimiento de los juveniles avanzados y bajo intermitencia (experimento 3).

Para prevenir daño celular o muerte, los animales expuestos a la privación de alimento presentan diferentes estrategias como la hibernación, reducción en la actividad metabólica y/o incremento en la movilización de reservas energéticas (Sánchez-Paz et al. 2007). En este sentido, los índices de la glándula digestiva y el relativo del pleon proveen una estimación indirecta del estado energético del organismo y cuando es expuesto a un periodo de inanición, provee información de cuales nutrientes en estos tejidos pueden ser movilizados para cubrir la demanda energética (Chellapa et al. 1995; Jussila y Mannonen 1997; Sureshkumar y Kurup 1999; Comoglio et al. 2005). Además, cuando un organismo está expuesto a una prolongada privación del alimento y ocurre movilización energética, ésta provoca cambios en la estructura de la glándula digestiva siendo las alteraciones más comunes la desorganización de los túbulos y la pérdida de la luz estrellada del túbulo. A nivel celular, las células B pueden hipertrofiarse y coalescer para finalmente ocurrir la muerte celular y las células R pueden reducir su tamaño y número (Vogt et al. 1985; Calvo et al. 2012). En el presente trabajo, los similares valores encontrados entre los índices de la glándula digestiva de los tratamientos bajo alimentación intermitente y del control de alimentación continua, indicarían que no ocurrió movilización de las reservas endógenas desde este órgano. Otra herramienta utilizada en este estudio fue el análisis histológico que también indicó que los juveniles bajo previa o extensa alimentación intermitente presentaron una condición nutricional similar al del control. Estos resultados llevan **a no rechazar la hipótesis de trabajo 3.2**, que predice que los juveniles que compensan a la restricción alimenticia, presentan similar estructura celular en la glándula digestiva que aquellos juveniles sometidos al régimen de alimentación normal.

En síntesis, **la capacidad del juvenil de *C. quadricarinatus* de soportar la alimentación intermitente puede ser explotada para lograr un crecimiento compensatorio** de la siguiente manera: cuando es aplicada en juveniles III, puede ser por un periodo moderado (mayor a 15 días) ya que a partir de allí se observa un efecto en el crecimiento y cuando es aplicado en juveniles avanzados, puede ser más extensa. Después

del periodo de restricción es imprescindible incluir un periodo de alimentación diaria para promover el crecimiento compensatorio.

Vale resaltar que hubo una reducción de aproximadamente 50 % en la cantidad de alimento suministrado dentro de los 2 meses de estudio en los experimentos 2 y 3 y en este sentido el protocolo de alimentación intermitente podría ser una interesante herramienta para reducir los costos de producción.

Tomando como base esta información, se buscará inducir al crecimiento compensatorio a los juveniles de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* después de un moderado y largo periodo de alimentación intermitente seguido de un periodo de alimentación diaria.

CAPÍTULO 4

Inducción del crecimiento compensatorio en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*: factores moduladores y efecto de la restricción alimenticia en la calidad de agua

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Stumpf, L., Díaz, F.C., Viau, V.E., Valenti, W.C., López Greco, L.S.

Effect of Food Shortage on Growth, Energetic Reserves Mobilization, and Water Quality in Juveniles of the Redclaw Crayfish, Cherax Quadricarinatus Reared in Groups

Journal of Crustacean Biology 2014; 34 (5): 639–646.

Stumpf, L., Tropea, C., López Greco, L.S.

Recovery growth of Cherax quadricarinatus juveniles fed on two high-protein diets: Effect of daily feeding following a cyclic feeding period on growth, biochemical composition and activity of digestive enzymes.

Aquaculture Septiembre 2014; 433: 404-410.

4.1. Introducción

Los estudios realizados en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* han sido focalizados hacia la optimización del crecimiento de los juveniles y a la reducción en los costos de producción (Saoud et al. 2013). En este contexto, la explotación del crecimiento compensatorio, buscando una recuperación completa del crecimiento, puede ser una herramienta interesante a ser utilizada. De hecho, en varios estudios en los que se evalúa el crecimiento compensatorio en especies cultivadas se observan como ventajas el incremento en el crecimiento y en la eficiencia alimenticia, una reducción en los costos y una mejora en la calidad de agua (Turano et al. 2008; Cho y Heo 2011; Sevgili et al. 2012).

En los Capítulos 2 y 3 de la presente tesis fue demostrado que la respuesta compensatoria sólo fue observada en ejemplares juveniles cuando se aplicó un periodo de alimentación diaria después del periodo de restricción. Vale resaltar que los juveniles estuvieron siempre individualizados y sin ningún tipo de competencia social, sea por el alimento o por el espacio.

Con respecto a los factores que pueden afectar el crecimiento compensatorio y principalmente el grado de recuperación del crecimiento cuando se restituye la alimentación, se puede citar la calidad del alimento (principalmente la cantidad de la proteína dietaria) antes y después de la restricción, el tamaño del organismo al aplicarse una restricción alimenticia, los regímenes de restricción (severidad y extensión) y el comportamiento social (animales en grupos disputando espacio y alimento) (Quinton y Blake 1990; Hayward et al. 2000; Wang et al. 2000; Cui et al. 2006; Cho y Heo 2011; Sevgili et al. 2012; entre otros). Por ejemplo, Cui et al. (2006) y Qian et al. (2000) observaron en la carpa dorada *Carassius auratus* (2-3 g) diferencias en la recuperación del crecimiento post-restricción debido al efecto del comportamiento social. Es decir, cuando los peces estuvieron expuestos a inanición diaria con un subsiguiente periodo de alimentación, en condiciones individuales se verificó que el crecimiento compensatorio condujo a una recuperación completa, mientras que en los peces expuestos a prácticamente el mismo protocolo pero en condiciones grupales, el crecimiento compensatorio condujo a una recuperación parcial.

Acerca del tipo de restricción utilizado, Zhu et al. (2004, 2005) observaron diferencias en la recuperación del crecimiento debido a la severidad de la restricción en el pez gato *Leiocassis longirostris* (13 g y en condiciones individuales de cultivo). Es decir, fue lograda una recuperación completa del crecimiento a través del crecimiento compensatorio cuando dichos peces estuvieron expuestos a un simple y corto periodo de inanición (1 o 2 semanas) con un subsiguiente periodo de alimentación (4 semanas), mientras que fue observada una recuperación parcial cuando los peces fueron expuestos a una alimentación cíclica (4 ciclos de 1 semana de inanición + 2 semanas de alimentación). La misma diferencia en los resultados fue observada en la carpa dorada *Carassius auratus* (6-10 g, en condiciones individuales) por Xie et al. (2001) y Zhu et al. (2004), cuando se aplicó un periodo de inanición con un subsiguiente periodo de realimentación y una alimentación cíclica.

Con respecto a la influencia de la dieta en las respuestas de recuperación mediante la compensación, en el estudio de Gaylord y Gatlin (2001) no se observó una influencia de las 2 dietas (32 y 37% de proteína cruda) ensayadas en la recuperación de los juveniles del pez

gato *Ictalurus punctatus* (17g), después de exponerlos a una alimentación cíclica por 6 semanas. En contrapartida, Cho y Heo (2011) observaron que una dieta altamente proteica y lipídica (55% proteína bruta y 14% lípidos) para los juveniles del lenguado *Paralichthys olivaceus*, ocasionó una “super” recuperación del crecimiento después de la exposición a un protocolo de restricción-alimentación. El control utilizado en este estudio fueron los juveniles expuestos a una situación de alimentación continua con una dieta de 50% proteína y 10% de lípidos.

Los mecanismos asociados a estas respuestas compensatorias pueden ser un aumento en la cantidad de alimento ingerido (hiperfagia), una mayor eficiencia en la conversión alimenticia y/o una mayor capacidad de digestión y retención de nutrientes durante la fase de recuperación (Bélanger et al. 2002; Álvarez y Nicieza 2005; Sevgili et al. 2012). En este sentido, los cambios en las células de la glándula digestiva así como su estructura son importantes para ser analizados ya que están relacionadas con alteraciones en el almacenamiento de nutrientes, mecanismos de absorción y síntesis de proteína, resultantes de los eventos de inanición, restricción alimenticia o dietas nutricionalmente pobres (Berillis et al. 2013). La digestión y absorción de nutrientes están correlacionadas con la actividad de las enzimas digestivas y el análisis de las principales enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas) es una herramienta importante para determinar cómo los periodos de restricción y posterior alimentación pueden dirigir la utilización de los nutrientes en estas etapas (Secor et al. 2000; Gao et al. 2006; Furné et al. 2008). Por lo tanto, cambios en estos parámetros pueden reflejar una respuesta fisiológica para hacer frente a las diferentes condiciones nutricionales (Le Moullac et al. 1997; Sánchez-Paz et al. 2007).

Por otra parte, el uso de la restricción alimenticia puede generar una importante reducción en la cantidad de alimento suministrada y esto puede ser benéfico para la calidad de agua en los estanques de cultivo, particularmente si ocurre un incremento en eficiencia alimenticia, resultante de una mayor retención de los nutrientes por parte del organismo restringido (Turano et al. 2007, 2008).

4.2. Objetivo

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo de este capítulo fue evaluar si los juveniles de *C. quadricarinatus* pueden presentar el crecimiento compensatorio en estadios de desarrollo diferentes y alimentados con dietas diferentes. Además, se evaluó el efecto de la alimentación intermitente en la composición bioquímica de los juveniles y su impacto en la calidad de agua.

En el marco de este objetivo se plantearon la siguiente hipótesis:

Hipótesis 4.1: La capacidad de respuesta compensatoria de los juveniles de *C. quadricarinatus* a la restricción alimenticia depende del estadio de desarrollo.

Hipótesis 4.2: El tipo de alimento (composición de la dieta) influye en el crecimiento compensatorio de los juveniles de *C. quadricarinatus*.

Hipótesis 4.3: Los juveniles de *C. quadricarinatus* que compensan el crecimiento después de la restricción alimenticia, presentan similar composición bioquímica en la glándula digestiva que aquellos juveniles sometidos al régimen de alimentación normal.

Hipótesis 4.4: Los índices de calidad de agua como los nitratos, nitritos y amonio son menores en los acuarios con los juveniles de *C. quadricarinatus* sometidos a restricción alimentaria que en los acuarios de los juveniles sometidos a régimen de alimentación diaria.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados en el presente capítulo (utilizados en los experimentos 1, 2, 3, 4 y 5) fueron obtenidos a partir del plantel de reproductores suministrados por la hacienda acuícola *Pinzas Rojas*, ubicada en la provincia de Tucumán, Argentina, en el año de 2010. Para los experimentos 6 y 7, los juveniles utilizados fueron obtenidos a partir del plantel de reproductores suministrados por el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), ubicado en la provincia de Corrientes, Argentina, en el año de 2012.

Dichos lotes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas en el Capítulo 3 (sección Materiales y métodos). Se utilizaron juveniles recién independizados (estadio III) y juveniles de 1 gramo, dependiendo del experimento. Los juveniles de 1 gramo fueron obtenidos de los mismos planteles de reproductores y mantenidos en grupo desde el estadio III y en las mismas condiciones de calidad de agua, alimentación (dieta), temperatura y fotoperiodo descripto para el plantel reproductivo, hasta que su masa corporal fuera la adecuada para el experimento (ver Capítulo 3).

4.3.2. Procedimiento experimental

Fueron realizados 7 experimentos. Para cada experimento se utilizaron juveniles de al menos 4 hembras ovígeras para garantizar la variabilidad genética. El procedimiento utilizado para la obtención de la masa corporal inicial está descripto en el Capítulo 2. En los experimentos 1 y 2, los juveniles fueron transferidos individualmente a un envase plástico (500 cm³) con 350 ml de agua de clorada con el agregado de un trozo de red cebollera (5 cm x 5 cm) utilizada como refugio (Figura 4.1). Para el control de la temperatura, el procedimiento utilizado está descripto en el Capítulo 3 (sección: Procedimiento experimental). La unidad experimental (u.e.) fue el juvenil individualizado en un envase plástico.



Figura 4.1. Envases plásticos (u.e.) utilizados en los experimentos 1 y 2.

En los experimentos 3, 4 y 5, los juveniles fueron transferidos a acuarios de plástico (dimensiones de 33,5 cm x 25 cm x 19 cm) conteniendo 8L de agua de clorada con el agregado de 2 trozos de red cebollera (30 cm x 23 cm) y tubos de PVC utilizados como refugio (Figura 4.2). La unidad experimental (u.e.) en el experimento 3 fue el acuario plástico conteniendo 15 juveniles agrupados (densidad de 179 juveniles/ m²) y en los experimentos 4 y 5 fue al acuario plástico conteniendo 4 juveniles agrupados (densidad de 48 juveniles/ m²).



Figura 4.2. Acuarios plásticos (u.e.) utilizados en los experimentos 3, 4 y 5.

En los experimentos 6 y 7 los juveniles fueron transferidos a acuarios de vidrio (dimensiones de 60 cm x 40 cm x 30 cm) conteniendo 40L de agua de clorada con el agregado de 3 trozos de red cebollera (60 cm x 34 cm) y 10 tubos de PVC (2 cm de diámetro x 10 cm de longitud) utilizados como refugio (Figura 4.3). La unidad experimental (u.e.) fue el acuario de vidrio conteniendo 5 juveniles agrupados (densidad de 21 juveniles/m²).



Figura 4.3. Acuarios de vidrio (u.e.) utilizados en los experimentos 6 y 7.

En los experimentos 1, 2 y 3 los envases y acuarios plásticos fueron limpiados cada 4 días con renovación del 100% del agua. En los experimentos 4 y 5 fueron limpiados 1 vez a la semana con renovación del 100% del agua. En los experimentos 6 y 7, los acuarios fueron limpiados a cada 4 días durante los primeros 45 días (etapa de la restricción alimenticia), con renovación del 50% del agua para asegurar la remoción del alimento no consumido. A partir del día 45, los acuarios fueron limpiados cada 7 días con renovación del 50% del agua. Las condiciones controladas de temperatura, aireación y fotoperiodo fueron las mismas descriptas en el Capítulo 3.

Las dietas utilizadas en los experimentos 1 y 2 fueron el alimento balanceado FUNDUS[®] (utilizado en los experimentos del Capítulo 3) y el alimento balanceado TETRA[®] (utilizado en los experimentos del Capítulo 2). El FUNDUS[®] está compuesto por 41,6% de proteína bruta, 21,3% de lípidos, 6,9% de cenizas y 6,1% de humedad y el

TETRA[®] está compuesto por 49,5% de proteína bruta, 4,6% de lípidos, 8,7 de cenizas y 6,4 % de humedad (Sacristán et al. 2015).

Las dietas utilizadas en el experimento 3 fueron el alimento balanceado para el cultivo de langosta de agua dulce llamada de DIETA REFERENCIA y formulado por Gutiérrez y Rodríguez (2010) y el alimento balanceado TETRA[®]. La DIETA REFERENCIA está compuesta por 37,9% de proteína bruta, 6,0% de lípidos, 16,0% de cenizas y 4,0% de humedad (Sacristán et al. 2015). Su formulación utiliza ingredientes locales de bajo precio tal como la harina de soja, con el propósito de reducir costos y de aprovechar la significativa producción sojera de Argentina. Esta dieta ha sido utilizada en investigaciones previas por Chaulet et al. (2012).

La dieta utilizada en los experimentos 4 y 5 fue el alimento balanceado TETRA[®].

Las dietas utilizadas en el experimento 6 fue el alimento balanceado TETRA[®] y la dieta utilizada en el experimento 7 fue el alimento balanceado llamado de DIETA REFERENCIA.

El tipo de restricción aplicada en todos los experimentos fue la **ALIMENTACIÓN INTERMITENTE** de acuerdo con los resultados del Capítulo 3. La extensión del *PERIODO DE RESTRICCIÓN* varió de acuerdo con el experimento, así como la presencia de un subsiguiente *PERIODO DE RECUPERACIÓN* (periodo de alimentación diaria).

4.3.2.1. Experimento 1- Efecto de un *Periodo de Restricción* MODERADO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados alimentados con la dieta FUNDUS[®]

En el presente experimento, la extensión del periodo de restricción fue hasta el día 22 y a partir de este día empezó el periodo de recuperación con extensión hasta el día 44 (Figura 4.4).

Un total de 200 juveniles recién independizados ($16,64 \pm 0,04$ mg) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI2, AI3, AI4 y AC (ver descripción de los tratamientos en el Capítulo 3). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 50 juveniles (réplicas). Dichos tratamientos y procedimiento experimental fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia previamente presentados en el Capítulo 3.

4.3.2.2. Experimento 2- Efecto de un *Periodo de Restricción* MODERADO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados alimentados con la dieta TETRA[®]

En el presente experimento, la extensión del periodo de restricción fue hasta el día 22 y a partir de este día empezó el periodo de recuperación con extensión hasta el día 44 (Figura 4.4).

Un total de 96 juveniles recién independizados ($16,84 \pm 0,25$ mg) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI2, AI3, AI4 y AC (ver descripción de los tratamientos en el Capítulo 3). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 24 juveniles (réplicas). Dichos tratamientos y procedimiento experimental

fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia previamente presentados en el Capítulo 3.

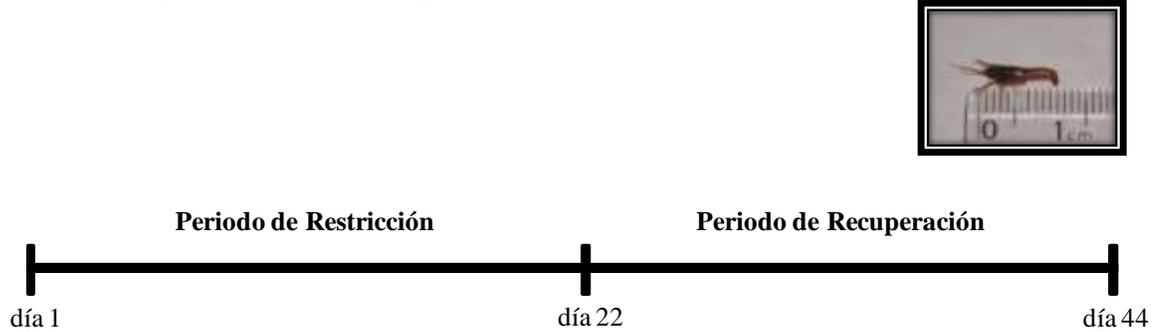


Figura 4.4. Protocolo experimental utilizado en los juveniles III de *Cherax quadricarinatus* en los experimentos 1 y 2.

4.3.2.3. Experimento 3- Efecto de un *Periodo de Restricción* MODERADO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados bajo condiciones grupales y alimentados con dos diferentes dietas

En el presente experimento, la extensión del periodo de restricción fue hasta el día 30 y a partir de este día empezó el periodo de recuperación con extensión hasta el día 60 (Figura 4.5).

Un total de 180 juveniles recién independizados ($15,02 \pm 1,07$ mg) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI4-DR (alimentación por 4 días + inanición por 4 días, utilizando la DIETA REFERENCIA), AI4-DT (alimentación por 4 días + inanición por 4 días, utilizando la DIETA TETRA[®]), AC-DR (alimentación continua, utilizando la DIETA REFERENCIA) y AC-DT (alimentación continua, utilizando la DIETA TETRA[®]). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 3 réplicas (15 individuos en cada réplica). Dichos regímenes alimenticios y procedimiento experimental fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia previamente presentados en el experimento 2 del presente capítulo.

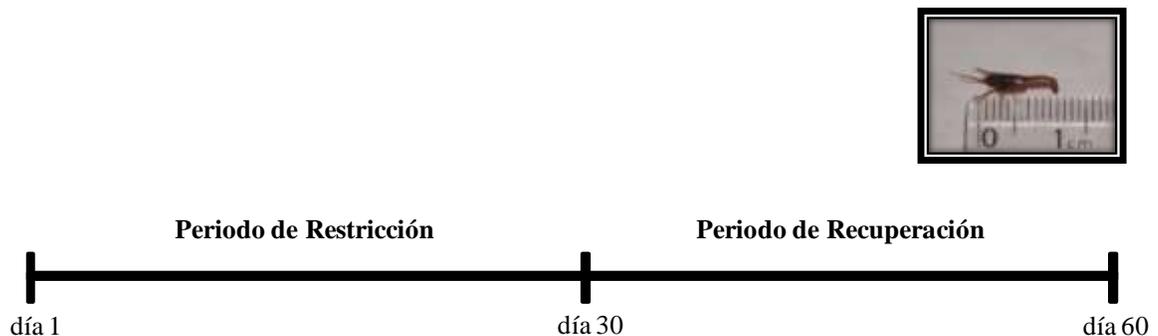


Figura 4.5. Protocolo experimental utilizado en los juveniles III de *C. quadricarinatus* en el experimento 3.

4.3.2.4. Experimentos 4 y 5 - Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO sin un *Periodo de Recuperación* en juveniles de 1 gramo bajo condiciones grupales

En los presentes experimentos, la extensión del periodo de restricción fue de 45 días sin un periodo de recuperación post-restricción (Figura 4.6).

En los experimento 4 y 5, se utilizaron en cada experimento un total de 40 juveniles ($1,03 \pm 0,04$ g) y que fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI2 y AC (experimento 4) y AI4 y AC (experimento 5) (ver descripción de los tratamientos en el Capítulo 3). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 5 réplicas (4 individuos en cada réplica). Dichos regímenes alimenticios y procedimiento experimental fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia previamente presentados en el experimento 3 del Capítulo 3.

Vale resaltar que ambos experimentos fueron realizados separadamente por la falta de espacio en el momento de los ensayos.

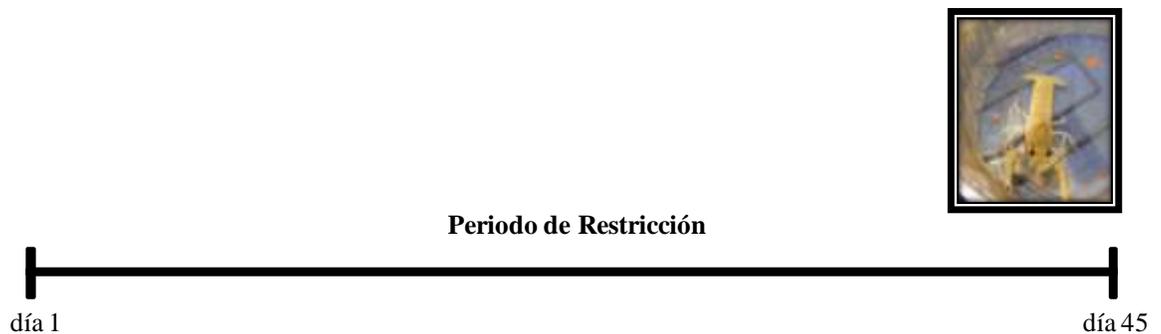


Figura 4.6. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de 1 gramo de *C. quadricarinatus* en los experimentos 4 y 5.

En ambos experimentos, los juveniles cuando alimentados recibieron una cantidad de alimento correspondiente al 4% de la masa corporal.

4.3.2.5. Experimento 6 - Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles de 1 gramo bajo condiciones grupales y alimentados con la dieta TETRA®

Un total de 60 juveniles ($0,91 \pm 0,15$ g) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI4 (alimentación por 4 días + inanición por 4 días) y AC (alimentación continua). Cada régimen alimenticio fue aplicado a 6 réplicas (5 individuos en cada réplica). Dichos regímenes alimenticios y procedimiento experimental fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento, supervivencia y composición bioquímica, previamente presentados en el experimento 5 del presente capítulo.

4.3.2.6. Experimento 7 - Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles de 1 gramo bajo condiciones grupales y alimentados con la dieta REFERENCIA

Un total de 60 juveniles ($0,91 \pm 0,12$ g) fueron aleatoriamente asignados a cada uno de los regímenes alimenticios: AI4 y AC. Cada régimen alimenticio fue aplicado a 6 réplicas (5 individuos en cada réplica). Dichos regímenes alimenticios y procedimiento experimental fueron seleccionados en base a los mejores resultados de crecimiento y supervivencia previamente presentados en el experimento 5 del presente capítulo.



Figura 4.7. Protocolo experimental utilizado en los juveniles de 1 gramo de *C. quadricarinatus* en los experimentos 6 y 7.

En los experimentos 6 y 7, la extensión del *PERIODO DE RESTRICCIÓN* (**alimentación intermitente**) fue hasta el día 45 y a partir de este día empezó el *PERIODO DE RECUPERACIÓN* (**alimentación diaria**) con extensión hasta el día 120 (Figura 4.7). En ambos experimentos, durante los primeros 75 días del periodo experimental los juveniles, cuando fueron alimentados, recibieron una cantidad de alimento correspondiente al 4% de la masa corporal. A partir de esta fecha y hasta el final del experimento (día 120) la alimentación fue ajustada al 2% de la masa corporal de los juveniles.

4.3.3. Variables registradas y cálculos

En los experimentos 1 y 2, la masa corporal (en base húmeda) fue registrada en los días 8, 15, 22, 30, 37 y 44 del experimento; en el experimento 3, la masa corporal (en base húmeda) fue registrada en los días 8, 15, 22, 30, 37, 44, 52, 60 del experimento; y en los experimentos 4 y 5, la masa corporal (en base húmeda) fue registrada en los días 15, 30 y 45 del experimento. La supervivencia fue analizada al finalizar los experimentos. En los experimentos 6 y 7 la masa corporal (en base húmeda) y supervivencia fueron registradas los días 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 del experimento.

Al finalizar los experimentos 4 y 5, los juveniles fueron anestesiados con hielo y posteriormente sacrificados para la remoción de la glándula digestiva y pleon (abdomen). En los experimento 6 y 7, al finalizar el periodo de restricción (día 45) fueron seleccionadas aleatoriamente 3 réplicas de cada régimen alimenticio y los juveniles correspondientes a

estas réplicas fueron anestesiados con hielo y posteriormente sacrificados para la remoción de la glándula digestiva y pleon (abdomen). Este procedimiento fue repetido con las réplicas restantes en ambos experimentos al finalizar el periodo de recuperación.

Las masas de la glándula digestiva y pleon fueron registradas (balanza analítica “OHAUS, PioneerTM”; precisión de 0,0001g) para el cálculo de los índices órgano-somáticos correspondientes y separadas para los análisis histológicos y bioquímicos. Las glándulas digestivas utilizadas para análisis histológico fueron fijadas, inmediatamente después de la disección, en la solución acuosa de Bouin. Las glándulas digestivas y músculos abdominales utilizados para análisis bioquímico y enzimático fueron inmediatamente almacenados en un freezer a -70°C después de la disección.

Los cálculos utilizados fueron:

- (1) Tasa de crecimiento específico (**TCE, %/día**) = $[\ln(\text{masa final}) - \ln(\text{masa inicial}) / (\text{tiempo})] * 100$.
- (2) Tasa de crecimiento específico de la biomasa (**TCE, %/día**) = $[\ln(\text{biomasa final}) - \ln(\text{biomasa inicial}) / (\text{tiempo})] * 100$.
- (3) Supervivencia (**S, %**) = $[\text{número de individuos vivos al finalizar cada tiempo experimental} / \text{número de individuos vivos al iniciar cada periodo experimento}] * 100$.
- (4) Índice de la glándula digestiva (**IGD, %**) = $[\text{masa de la glándula digestiva} / \text{masa corporal total}] * 100$.
- (5) Índice de la glándula digestiva seca (**IGD s, %**) = $[\text{masa de la glándula digestiva seca} / \text{masa corporal total}] * 100$.
- (6) Índice relativo del pleon (**IRP, %**) = $[\text{masa de pleon} / \text{masa corporal total}] * 100$.
- (7) Coeficiente de variación (**CV, %**) = $[\text{desvío estándar de la masa corporal} / \text{promedio de la masa corporal}] * 100$.
- (8) Conversión alimenticia aparente (**CA apar**) = $[\text{total del alimento suministrado} / \text{ganancia absoluta en masa}]$.
- (9) Eficiencia proteica aparente (**EP apar**) = $[\text{ganancia absoluta en masa} / \text{total de proteína dietaria suministrado}]$.
- (10) Biomasa (**B, gramos/m²**) = $[\text{masa corporal total en el acuario} / \text{área del acuario}]$.

En los experimentos 4 y 5, un total de 2 glándulas digestivas por réplica (N=10 para cada régimen alimenticio en ambos experimentos) fueron utilizadas para análisis histológico (descrito en detalle en el Capítulo 3) y un total de 2 glándulas digestivas (N=10 para cada régimen alimenticio en cada experimento) y 2 o 3 músculos abdominales (N=10 o 15 para cada régimen alimenticio en cada experimento) fueron utilizados para el análisis bioquímico (reservas energéticas).

En los experimentos 6 y 7, al final de cada periodo experimental se utilizaron para el cálculo del IGD en base seca entre 3 y 5 piezas de glándulas digestivas (cada pieza correspondió a una glándula digestiva) por réplica (N= 9 a 15 por cada régimen alimenticio) y éstas fueron secadas en una estufa a 60°C hasta alcanzar una masa constante con el propósito de determinar el contenido de humedad y consecuentemente la masa en base seca de la glándula digestiva. Al final de cada periodo experimental un total de 2 glándulas digestivas por réplica (N= 6 para cada régimen alimenticio) fueron utilizadas para análisis histológico; un total de 3 a 5 glándulas digestivas (N=9 a 15 para cada régimen alimenticio) fueron utilizadas para el análisis bioquímico (reservas energéticas) y enzimático; y un total de 3 a 5 músculos abdominales (N=9 a 15 para cada régimen

alimenticio en ambos experimentos) fueron utilizados para el análisis bioquímico (reservas energéticas).

4.3.3.1. Análisis bioquímico

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (3 submuestras para cada réplica) utilizando métodos espectrofotométricos (espectrofotómetro JASCO-UV/VIS, modelo 7850).

En los experimentos 4 y 5, las determinaciones de proteínas totales fueron realizadas utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Lowry et al. 1951), que consta de la ebullición de las muestras con KOH al 30% por 1 h., usando la albumina bovina (Fracc.V, STANDARD[®]) como patrón y medido a una longitud de onda de 650 nm. En los experimentos 6 y 7, las determinaciones de proteínas totales fueron realizadas utilizando el método de Comassie Blue (Bradford et al. 1976) que consta de la homogeneización de las muestras en un *buffer* Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y luego centrifugadas en frío a 10.000 rpm por 30 min. La albumina bovina (Fracc.V, STANDARD[®]) fue usada como patrón y las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 595 nm.

En los experimentos 4, 5, 6 y 7 fueron realizadas determinaciones de lípidos totales por el método usado por Folch et al. (1957), modificado por Frings y Dunn (1972) y determinaciones de glucógeno por el método de Van Handel (1965) modificado por Geary et al. (1981).

Para la determinación de lípidos totales, las muestras fueron homogeneizadas con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1,v/v) para la extracción de los lípidos. Luego, las muestras fueron filtradas, mezcladas con NaCl al 0,9% y posteriormente centrifugadas para la separación de la fase lipídica y acuosa. Los lípidos fueron cuantificados por el método de sulfofosfovainillina, usando aceite de oliva (INDALO CLÁSICO[®]), diluido con alcohol absoluto, como patrón y medido a una longitud de onda de 530 nm.

Para la determinación del glucógeno, las muestras fueron colocadas a ebullición con KOH al 30% por 1 h. Luego, el glucógeno fue precipitado con la adición de Na₂SO₄ saturado y alcohol etílico al 96%, y centrifugado a 3.500 rpm por 10 min. Después este precipitado fue disuelto en 250 µL de agua destilada. El glucógeno fue cuantificado por el método de la glucosa-oxidase (utilizando un kit comercial de glicemia WIENER-LAB AA[®]) y usando el hígado de conejo (FLUKA[®]) como patrón y medido a una longitud de onda de 505 nm.

4.3.3.2. Análisis enzimático

En los experimentos 6 y 7, la actividad de las enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas) fue determinada a partir del sobrenadante procedente de la extracción de las proteínas solubles (descrito anteriormente). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado (3 submuestras para cada réplica) utilizando métodos espectrofotométricos (espectrofotómetro JASCO-UV/VIS, modelo 7850).

La actividad de las proteasas fue determinada por el método descrito por García-Careño (1992), utilizando 0,5% de azocaseína disuelto en un *buffer* Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 como sustrato. Las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 440 nm.

La actividad de las lipasas fue determinada por el método descrito por Versaw et al. (1989), utilizando 10 µL de β-naphtyl caprylate disuelto en dimethyl sulfoxide (DMSO)

100 mM como sustrato, con incubación por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 540 nm.

La actividad de las amilasas fue determinada por el método descrito por Vega-Villasante et al. (1993), utilizando 500 μ L de almidón al 1% disuelto en un *buffer* Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 como sustrato, con incubación por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 550 nm.

4.3.3.3. Análisis de calidad de agua

En los experimentos 4 y 5, fueron evaluados los efectos de la alimentación cíclica sobre la calidad de agua. Una vez a la semana y anterior a la completa limpieza del acuario fueron medidos los siguientes parámetros: oxígeno disuelto (OD, mg/L) utilizando un oxímetro (LAMOTTE[®]), pH utilizando un peachímetro (LAMOTTE[®]) y amonio total (mg/L de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) y dureza total (mg/L CaCO_3) a través de métodos colorimétricos utilizando kits comerciales ACUANALÍTICA[®].

4.3.4. Análisis estadístico

Los valores expresados para cada variable fueron los promedios de las réplicas con su error estándar, excepto para la variable supervivencia en los experimentos 1 y 2 ya que los datos son proporciones. Las diferencias entre promedios y proporciones fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$. El programa estadístico utilizado fue el INFOSTAT (Infostat version 2014, Grupo Infostat, FCA-UNC, Argentina).

Los datos categóricos fueron analizados a través de una tabla de contingencia utilizando la prueba del Chi-cuadrado de Pearson y las comparaciones múltiples entre los tratamientos y el control de alimentación continua fueron realizadas a través de la prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones (Zar 1999).

El diseño experimental fue el completamente aleatorizado (DCA). Fueron aplicadas las pruebas paramétricas Análisis de Varianza–ANOVA o el Test T de Student (dependiendo del experimento) después del cumplimiento de los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene) de los residuos. Cuando fue necesario los datos fueron log-transformados para cumplir con dichos supuestos. En el caso de incumplimiento de los supuestos fue aplicada la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney (dependiendo del experimento) cuando se evaluó un solo factor. Cuando fueron evaluados más factores, la prueba no paramétrica utilizada fue la de Kruskal-Wallis modificada por Scheirer et al. (1976). Las comparaciones múltiples entre los tratamientos fueron realizadas a través del test de LSD o Mann-Whitney (dependiendo de la prueba utilizada) (Zar 1999).

Para las variables con medidas en el tiempo como masa corporal (experimentos 4,5,6 y 7), biomasa y supervivencia (experimentos 6 y 7) fue aplicado el ANOVA en un diseño de medidas repetidas (DMR) utilizando Modelos Mixtos (Gómez et al. 2012). En dicho análisis, los factores fijos fueron el régimen alimenticio y el tiempo y el factor aleatorio fue la unidad experimental (los juveniles agrupados en cada acuario). Las comparaciones múltiples entre regímenes alimenticios fueron realizadas a través del test de LSD.

4.4. Resultados

4.4.1. Experimento 1- Efecto de un *Periodo de Restricción MODERADA* seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados alimentados con la dieta **FUNDUS®**

Los juveniles expuestos a los tratamientos AI2, AI3 y AI4 tuvieron en total 34 días de alimentación, en comparación con los 44 días de alimentación que tuvieron los juveniles de AC. Debido a la alta mortalidad en los juveniles expuestos a todos los regímenes alimenticios a partir del día 30 del experimento (Figura 4.8), no se realizó análisis estadístico para la supervivencia (el gráfico será presentado a modo informativo). A razón de la alta mortalidad no se presentará los resultados de la masa corporal y TCE debido a la poca representatividad de los datos. Es probable que la progenie utilizada haya sido de mala calidad y estos resultados fueron potenciados por los tratamientos de restricción.

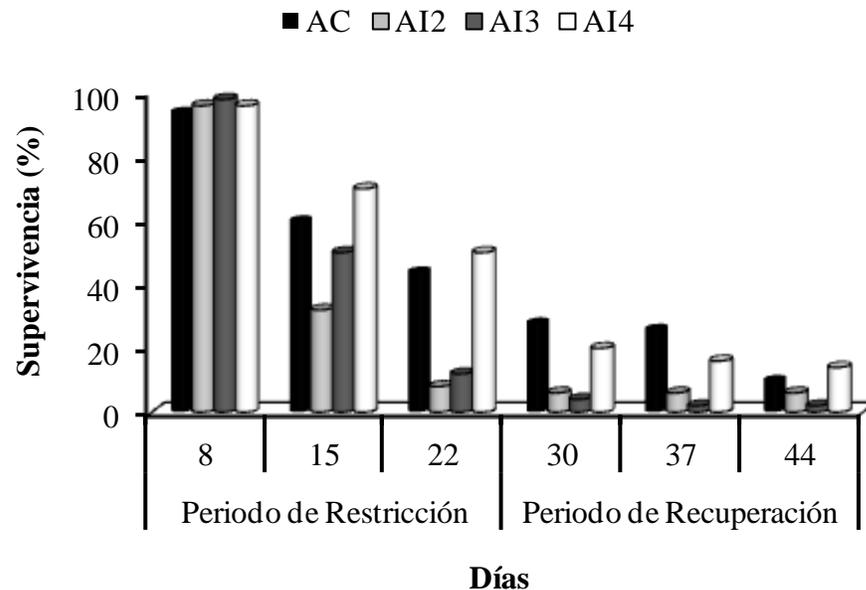


Figura 4.8. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 1. AI2: alimentación por 2 días + inanición por 2 días, AI3: alimentación por 3 días + inanición por 3 días, AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días y AC: alimentación continua.

4.4.2. Experimento 2- Efecto de un *Periodo de Restricción MODERADA* seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados alimentados con la dieta **TETRA®**

Los juveniles expuestos a los tratamientos AI2, AI3 y AI4 tuvieron en total 34 días de alimentación, en comparación con los 44 días de alimentación que tuvieron los juveniles de AC. Al finalizar el experimento no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los juveniles expuestos a los distintos regímenes alimenticios ($\chi^2_{3; 0,95} = 3,03; P = 0,3884$) (Figura 4.9).

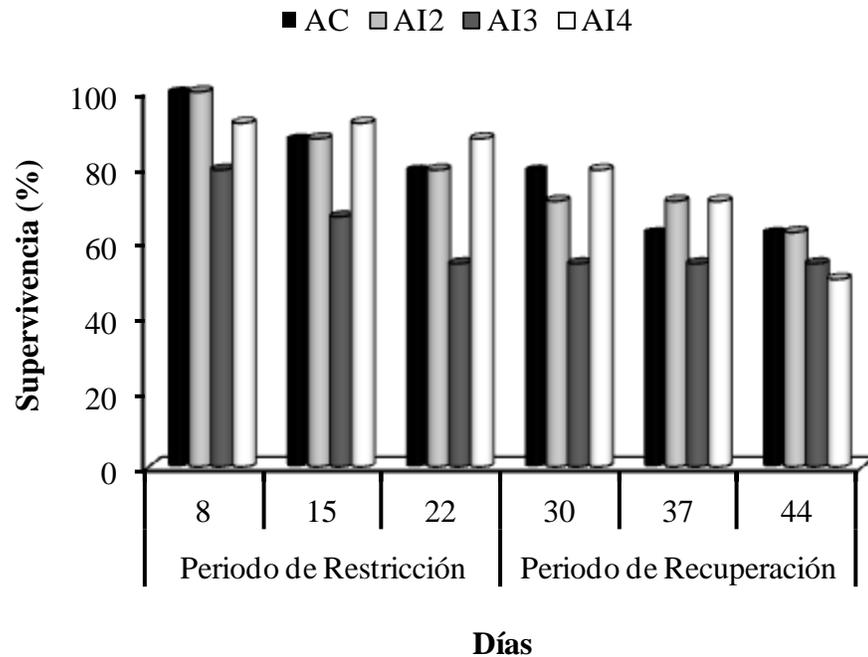


Figura 4.9. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 2. Los regímenes alimenticios están descritos en el epígrafe de la figura 4.8.

Al final del periodo de restricción, el régimen de alimentación afectó significativamente el crecimiento de los juveniles ($H_3 = 16,63$; $P = 0,0008$). Transcurridos 22 días de restricción, los juveniles expuestos a todos los tratamientos de alimentación intermitente presentaron un nivel 60% menor de masa corporal en relación al control (Figura 4.10).

Durante el periodo de recuperación, el tiempo ($F_{2,96} = 82,13$; $P < 0,0001$) y el régimen de alimentación ($F_{3,48} = 16,76$; $P < 0,0001$) tuvieron un efecto independiente en el crecimiento de los juveniles. En la semana siguiente de la post-restricción (día 30), los juveniles expuestos a los tratamientos bajo intermitencia redujeron la diferencia en relación al control a un 50%. Catorce días después (día 44) esta diferencia fue del 40% (Figura 4.10).

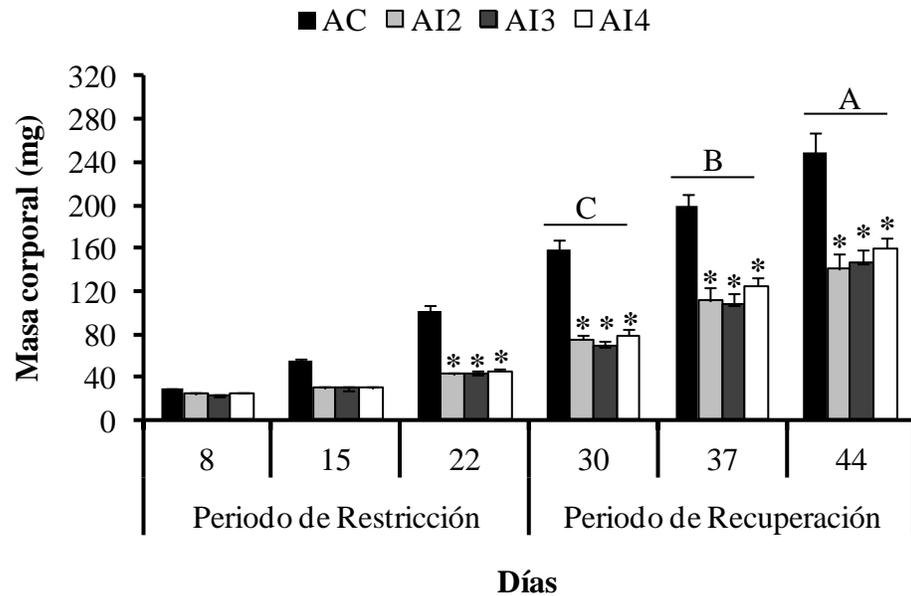


Figura 4.10. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 2. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. Los regímenes alimenticios están descriptos en el epígrafe de la figura 4.8.

Durante el periodo de recuperación, el tiempo ($F_{2,96} = 14,86$; $P < 0,0001$) y el régimen de alimentación ($F_{3,48} = 4,14$; $P < 0,0109$) tuvieron un efecto independiente en la tasa de crecimiento de los juveniles. Los juveniles expuestos a los tratamientos AI4 crecieron a una tasa más alta que del control (Figura 4.11).

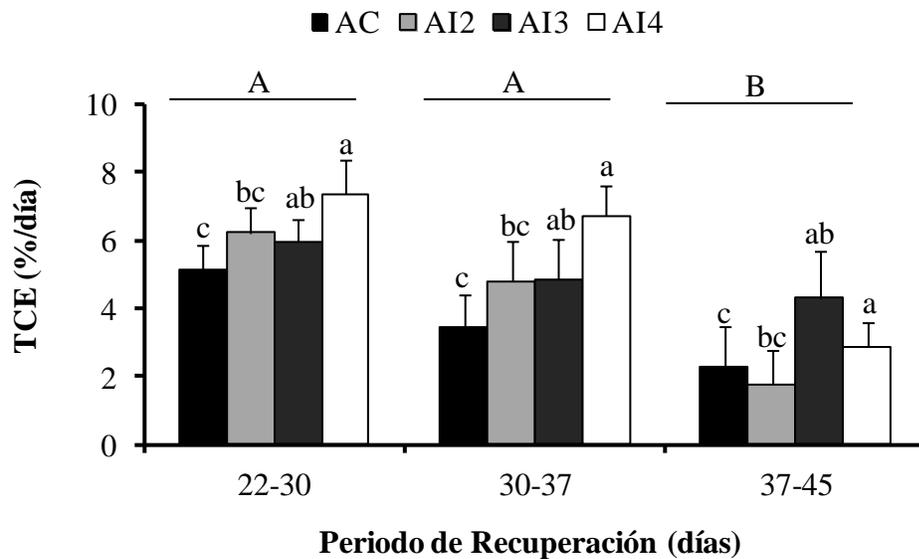


Figura 4.11. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 2. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre

regímenes alimenticios (efecto independiente del tiempo). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. Los regímenes alimenticios están descriptos en el epígrafe de la figura 4.8.

4.4.3. Experimento 3- Efecto de un *Periodo de Restricción MODERADO* seguido por un *Periodo de Recuperación* en juveniles recién independizados bajo condiciones grupales y alimentados con dos dietas diferentes

Los juveniles expuestos a los tratamientos AI4-DR y AI4-DT tuvieron en total 46 días de alimentación, en comparación con los 60 días de alimentación que tuvieron los juveniles de AC. Al final del experimento los juveniles expuestos al régimen alimenticio AC presentaron mayor supervivencia que los juveniles expuestos al régimen alimenticio AI4 ($F_{1,8} = 11,75$; $P = 0,0089$), mientras que los juveniles alimentados con la DIETA TETRA[®] presentaron una significativa mayor supervivencia que los juveniles alimentados con la DIETA REFERENCIA ($F_{1,8} = 13,88$; $P = 0,0058$) (Figura 4.12). Vale resaltar que fue registrada una alta mortalidad (>70%) en la mayoría de los tratamientos, y la reducción de la supervivencia ocurrió a partir del día 30 (Figura 4.12).

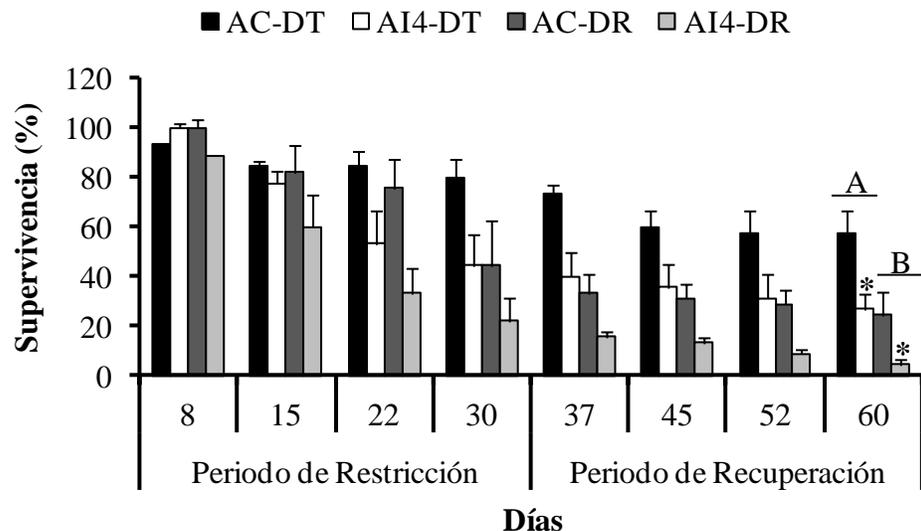


Figura 4.12. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 3. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre dietas. AI4-DR: alimentación por 4 días + inanición por 4 días, utilizando la dieta REFERENCIA, AI4-DT: alimentación por 4 días + inanición por 4 días, utilizando la dieta TETRA[®], AC-DR: alimentación continua, utilizando la dieta REFERENCIA y AC-DT: alimentación continua, utilizando la dieta TETRA[®].

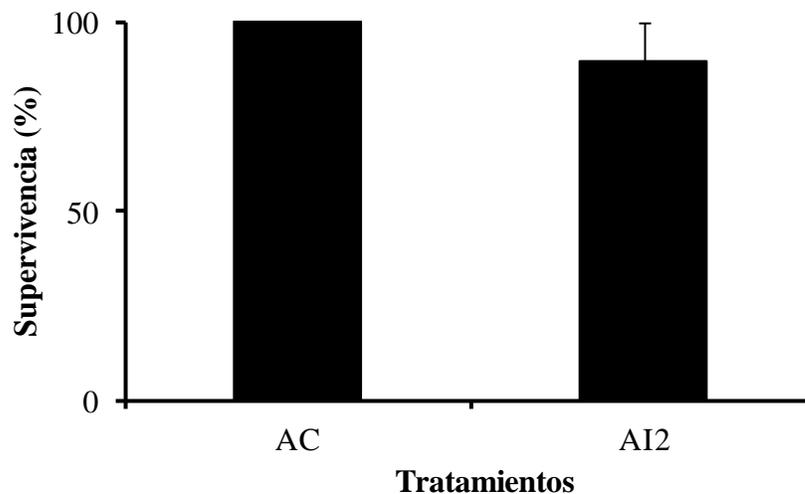
Debido a esta alta mortalidad no se realizó el análisis estadístico de las variables del crecimiento y debido a la poca representatividad de los datos es que no se presentarán

gráficos. Es probable que la progenie utilizada haya sido de mala calidad y estos resultados fueron potenciados por los tratamientos de restricción.

4.4.4. Experimentos 4 y 5 - Efecto de un *Periodo de Restricción* a LARGO PLAZO sin un Periodo de Recuperación en juveniles de 1 gramo bajo condiciones grupales

Los juveniles expuestos a los regímenes alimenticios AI2 y AI4 tuvieron en total 22 y 24 días de alimentación, respectivamente. En total, cada réplica (acuario) de AI2 y AI4 recibió 6,65 g y 5,63 g de alimento, respectivamente, mientras que cada acuario de AC recibió 12,36 y 11,44 g de alimento, respectivamente. Esta cantidad representa el 54% y 51% del suministrado para los juveniles de AC del experimento 4 y AC del experimento 5, respectivamente. En los experimentos 4 y 5 no se detectaron diferencias significativas en la supervivencia final entre AC y AI2 ($U= 10$; $P= 0,6904$) y entre AC y AI4 ($U= 12,5$; $P> 0,9999$), respectivamente (Figura 4.13).

(a)



(b)

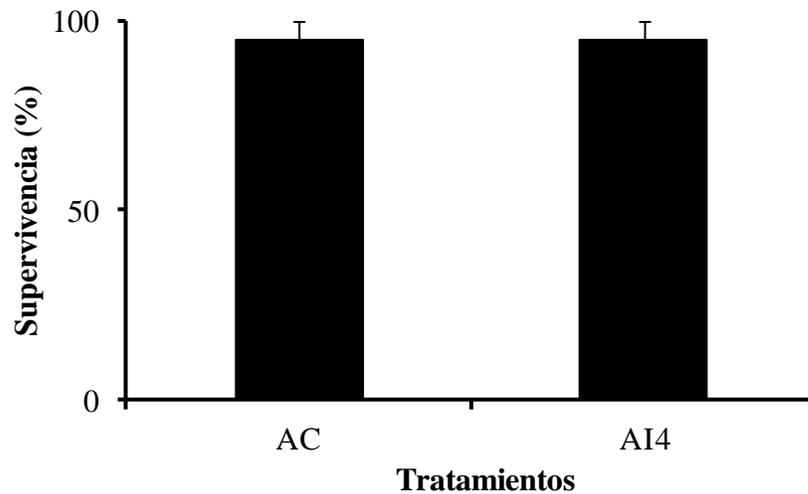
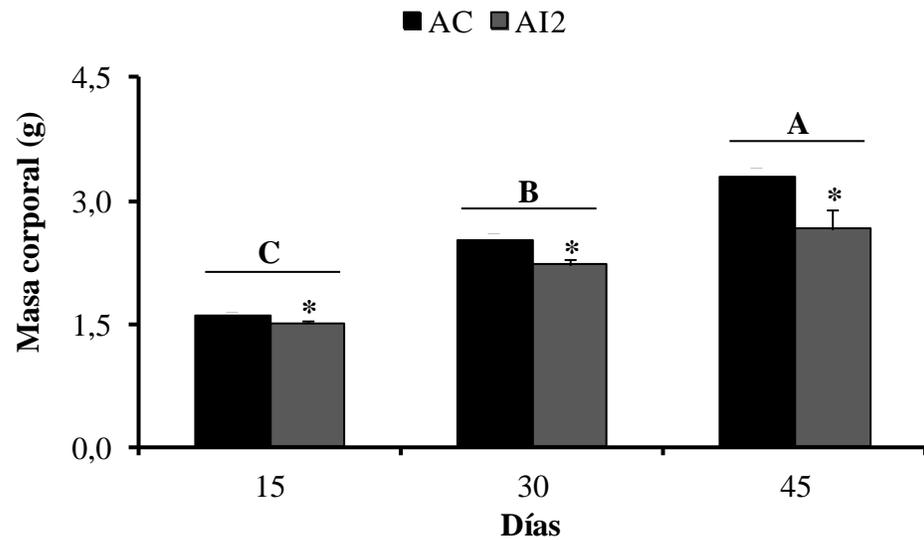


Figura 4.13. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus*. (a) Al final del experimento 4 y (b) al final del experimento 5. AI2: alimentación por 2 días + inanición por 2 días, AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días y AC alimentación continua.

Durante el experimento 4 se detectaron diferencias significativas en la masa corporal entre regímenes alimenticios ($F_{1,8} = 9,20$; $P = 0,0162$) y entre tiempos ($F_{2,16} = 77,36$; $P < 0,0001$). Los juveniles expuestos al tratamiento AI2 presentaron un nivel 13% menor de masa corporal en relación al control (Figura 4.14a). Al mismo tiempo fue observada una menor biomasa en el tratamiento AI2 al finalizar el experimento ($U = 2$; $P = 0,0317$) (Figura 4.14b). En relación al TCE de la masa corporal, los juveniles expuestos a AC crecieron un $2,60 \pm 0,32$ %/día durante los 45 días, mientras que los juveniles expuestos a AI2 crecieron un $2,14 \pm 0,36$ %/día, aunque diferencias significativas no fueron detectadas ($F_{1,8} = 4,61$; $P = 0,0640$).

(a)



(b)

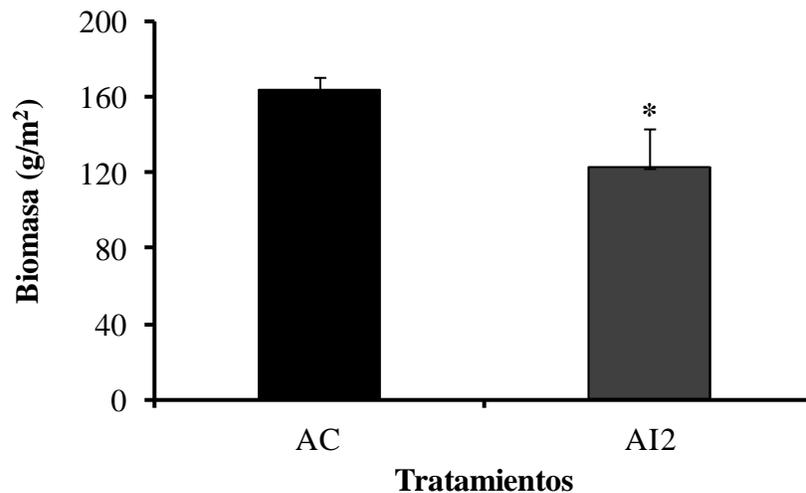
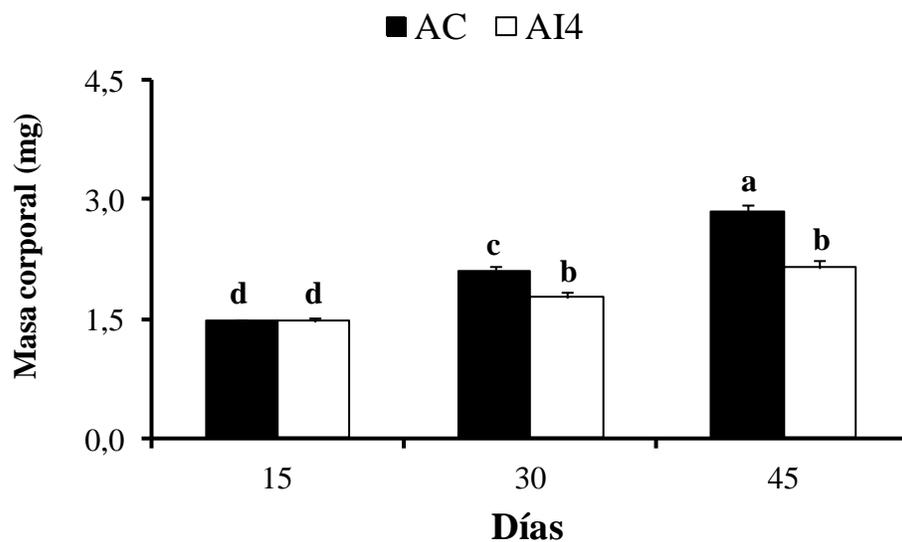


Figura 4.14. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 4. (a) Masa corporal durante el experimento y (b) biomasa al final del experimento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

Durante el experimento 5, se detectaron efectos significativos de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo ($F_{2,16} = 9,68$; $P = 0,0018$) sobre la masa corporal. Transcurridos los primeros 30 días, los juveniles expuestos al tratamiento AI4 presentaron un nivel 16% menor de masa corporal en relación al control. Quince días después (día 45) esta diferencia fue del 25% (Figura 4.15). Sin embargo, el test no paramétrico de Mann-

Whitney no detectó diferencias significativas entre los regímenes alimenticios ($U= 7$; $P= 0,3095$) para la biomasa final (Figura 4.15b). En relación al TCE de la masa corporal, los juveniles expuestos a AC crecieron un $2,14\pm 0,14$ %/día durante los 45 días, mientras que los juveniles expuestos a AI4 crecieron un $1,55\pm 0,22$ %/día ($F_{1,8}= 9,61$; $P= 0,0192$).

(a)



(b)

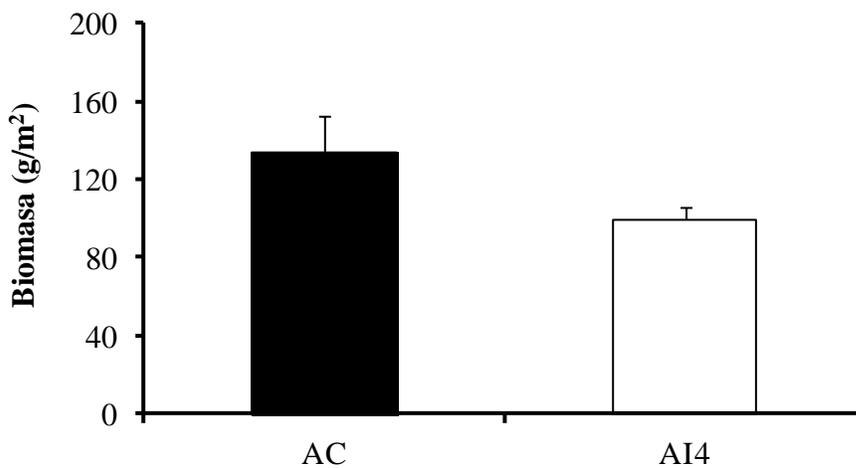


Figura 4.15. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 5. (a) Masa corporal durante el experimento y (b) biomasa al final del experimento. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen alimenticio y tiempo (efecto de

la interacción). La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

En relación a la variación de las masas corporales, ésta fue similar entre los juveniles bajo intermitencia y sus respectivos controles, al finalizar ambos experimentos ($t = 0,85$; $P = 0,4211$ en el experimento 4 y $U = 11$; $P = 0,8412$ en el experimento 5) (Tabla 4.1). Los juveniles expuestos a la intermitencia de AI2 presentaron una significativa mayor conversión alimenticia y mayor eficiencia proteica ($t = 3$; $P = 0,0170$ y $t = 3,15$; $P = 0,0135$, respectivamente) que los juveniles alimentados continuamente (Tabla 4.1). Sin embargo, la conversión alimenticia y eficiencia proteica de los juveniles expuestos a AI4 fue similar a la de los juveniles de a AC ($U = 9$; $P = 0,5476$ y $U = 6$; $P = 0,2222$, respectivamente), aunque se observó una tendencia hacia un mayor conversión alimenticia y mayor eficiencia proteica en los juveniles bajo intermitencia (Tabla 4.1).

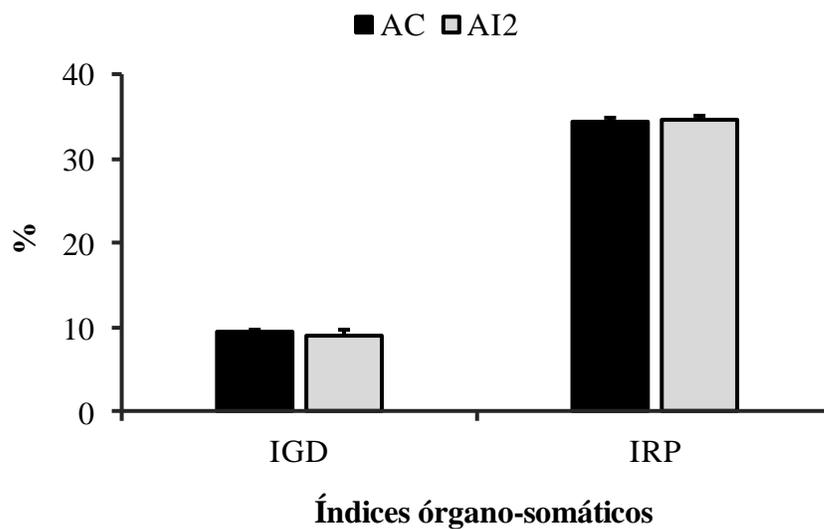
Tabla 4.1. Coeficiente de variación (CV), conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de *C. quadricarinatus* al finalizar los experimentos 4 y 5.

	CV (%)	CA apar	EP apar
<i>Experimento 4</i>			
AC	31,09 ± 6,58	1,51 ± 0,08	1,41 ± 0,08
AI2	23,98 ± 5,22	1,06 ± 0,13 *	2,07 ± 0,19 *
<i>Experimento 5</i>			
AC	30,30 ± 2,77	1,90 ± 0,26	1,19 ± 0,15
AI4	30,40 ± 8,62	1,49 ± 0,09	1,43 ± 0,09

En cada columna y para cada experimento, el asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

Al finalizar los experimentos 4 y 5, no se observaron diferencias significativas entre los regímenes alimenticios para el índice de la glándula digestiva ($t = 0,93$; $P = 0,3747$ y $t = 0,43$; $P = 0,6776$, respectivamente), y para el índice relativo del pleon ($t = 0,11$; $P = 0,9117$ y $t = 0,18$; $P = 0,8606$, respectivamente) (Figura 4.16).

(a)



(b)

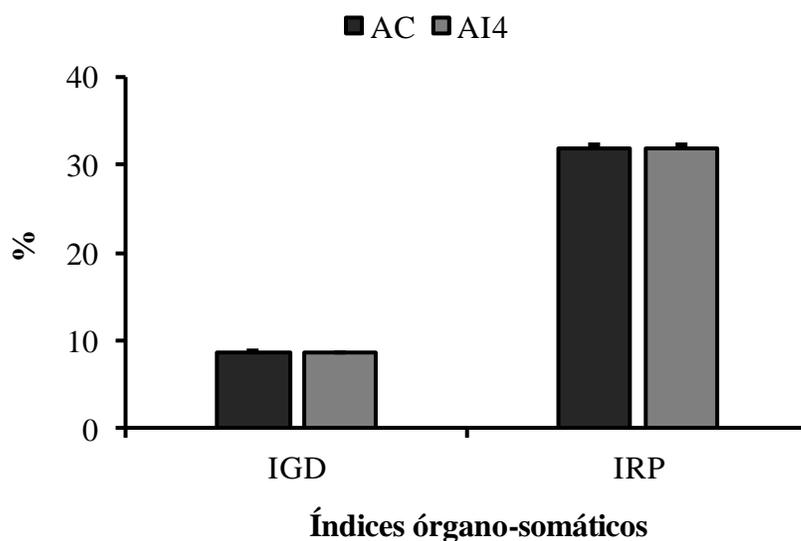


Figura 4.16. Índices de la glándula digestiva (IGD) y relativo del pleon (IRP) de los juveniles de *C. quadricarinatus*. (a) Al finalizar el experimento 4 y (b) al finalizar el experimento 5. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

La caracterización histológica de la glándula digestiva se basó en las descripciones realizadas por Calvo et al. (2011, 2012). Después de 45 días de restricción alimenticia no se

observaron diferencias estructurales entre tratamientos bajo intermitencia y sus controles (Figura 4.17).

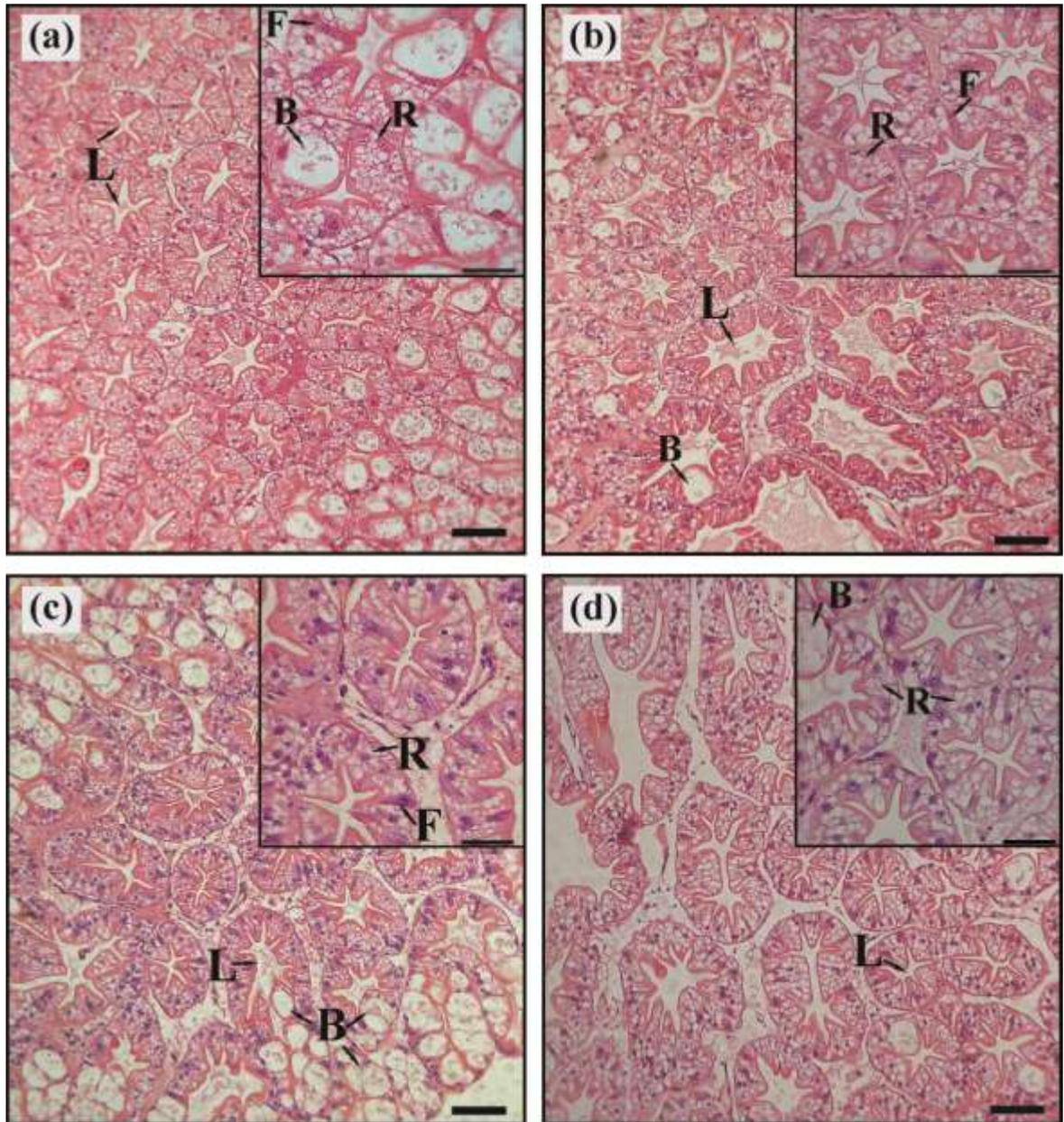


Figura 4.17. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles *C. quadricarinatus* al final de los experimentos 4 y 5. (a) AC correspondiente al experimento 4, (b) AI2, (d) AC correspondiente al experimento 5 y (e) AI4. B: célula B; F: célula F; L: lumen del túbulo; R: células R. Barras de escala: a, b, c y d = 100 μm (figura central) y a, b, c y d = 50 μm (figura en el lado derecho superior). La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

Al final del experimento 4, los juveniles del tratamiento AI2 presentaron una menor concentración de glucógeno en la glándula digestiva ($U= 2,61$; $P= 0,0079$) y una mayor

concentración de proteínas en el músculo abdominal ($t= 3,04$; $P= 0,0159$) respecto de su control (Tabla 4.2, experimento 4). Similares concentraciones de lípidos y proteínas totales en la glándula digestiva fueron observadas entre AI2 y AC ($t= 0,83$; $P= 0,4276$ y $t= 1,32$; $P= 0,2237$, respectivamente) y también para lípidos totales y glucógeno en el músculo abdominal ($t= 0,01$; $P= 0,9932$ y $U= 10$; $P= 0,6904$, respectivamente).

Al final del experimento 5, los juveniles del tratamiento AI4 presentaron una mayor concentración de proteínas totales en el músculo abdominal ($t= 2,67$; $P= 0,0258$) respecto de su control (Tabla 4.2, experimento 5). Similares concentraciones de lípidos totales, proteínas totales y glucógeno entre AI4 y AC fueron observadas en la glándula digestiva ($t= 1,94$; $P= 0,0886$, $t= 1,11$; $P= 0,2913$ y $t= 1,55$; $P= 0,1599$, respectivamente) y para lípidos totales y glucógeno en el músculo abdominal ($t= 0,71$; $P= 0,4966$ y $t= 0,59$; $P= 0,5701$, respectivamente).

Tabla 4.2. Reservas energéticas en la glándula digestiva y músculo abdominal (base húmeda) de los juveniles de *C. quadricarinatus* después de un periodo de restricción de 45 días.

		Proteínas (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Glucógeno (mg/g)
Glándula digestiva	<u>Experimento 4</u>			
	AC	$29,38 \pm 0,86$	$85,66 \pm 9,48$	$26,74 \pm 6,63$
	AI2	$29,30 \pm 1,32$	$72,48 \pm 12,47$	$5,18 \pm 0,91$ *
	<u>Experimento 5</u>			
	AC	$16,20 \pm 0,69$	$100,40 \pm 11,57$	$22,31 \pm 6,35$
	AI4	$17,25 \pm 0,62$	$133,68 \pm 12,70$	$40,07 \pm 9,54$
		Proteínas (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Glucógeno (mg/g)
Músculo abdominal	<u>Experimento 4</u>			
	AC	$45,21 \pm 1,58$	$3,01 \pm 0,98$	$30,28 \pm 11,17$
	AI2	$53,26 \pm 2,12$ *	$3,02 \pm 0,75$	$54,24 \pm 21,64$
	<u>Experimento 5</u>			
	AC	$29,97 \pm 1,02$	$13,16 \pm 2,28$	$90,45 \pm 18,04$
	AI4	$35,29 \pm 1,71$ *	$16,37 \pm 3,89$	$72,04 \pm 25,34$

En cada columna y para cada experimento, el asterisco (*) indica diferencias significativas entre regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

En relación a los índices de calidad de agua medidos durante todo el experimento 4, la temperatura ($26,20 \pm 0,07$ °C), el oxígeno disuelto ($7,03 \pm 0,10$ mg/L) y la dureza del agua ($82,58 \pm 1,36$ mg/L de CaCO_3) fueron similares entre los regímenes alimenticios ($U= 11$; $P= 0,8441$, $t= 0,23$; $P= 0,8262$ y $t= 1,19$; $P= 0,2669$, respectivamente). No se detectaron diferencias significativas entre los regímenes alimenticios ($t= 2,07$; $P= 0,0720$) para los valores de nitritos (Tabla 4.3, experimento 4). Sin embargo, el valor del pH fue significativamente mayor en el tratamiento AI2 ($t= 2,41$; $P= 0,0426$) y los valores de amonio total y nitratos fueron significativamente menores en el tratamiento AI2 ($U= 0$; $P= 0,0079$ y $t= 5,31$; $P= 0,0007$, respectivamente) (Tabla 4.3, experimento 4).

En relación a los índices de calidad de agua medidos durante todo el experimento 5, la temperatura ($26,50 \pm 0,10$ °C), el oxígeno disuelto ($7,19 \pm 0,10$ mg/L) y la dureza del agua ($124,17 \pm 1,34$ mg/L de CaCO_3) fueron similares entre los regímenes alimenticios ($t= 0,80$; $P= 0,4478$, $t= 0,49$; $P= 0,2327$ y $t= 1,29$; $P= 0,6335$, respectivamente). Sin embargo, el valor del pH fue significativamente mayor en el tratamiento AI4 ($t= 4,73$; $P= 0,0014$) y los valores de amonio total, nitritos y nitratos fueron significativamente menores en el tratamiento AI4 ($t= 3,02$; $P= 0,0166$, $t= 6,65$; $P= 0,0001$ y $t= 4,55$; $P= 0,0018$, respectivamente) (Tabla 4.3, experimento 5).

Tabla 4.3. Índices de calidad de agua de los juveniles *C. quadricarinatus* después de un periodo de 45 días. $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$: amonio total, NO_2 : nitritos, y NO_3 : nitratos.

	pH	$\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ (mg/L)	NO_2 (mg/L)	NO_3 (mg/L)
<i>Experimento 4</i>				
AC	$6,98 \pm 0,10$	$1,07 \pm 0,11$	$0,15 \pm 0,02$	$36,00 \pm 1,90$
AI2	$7,35 \pm 0,13$ *	$0,41 \pm 0,03$ *	$0,12 \pm 0,02$	$29,73 \pm 1,83$ *
<i>Experimento 5</i>				
AC	$7,34 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,01$	$31,25 \pm 4,50$
AI4	$7,62 \pm 0,04$ *	$0,20 \pm 0,02$ *	$0,11 \pm 0,02$ *	$19,16 \pm 3,87$ *

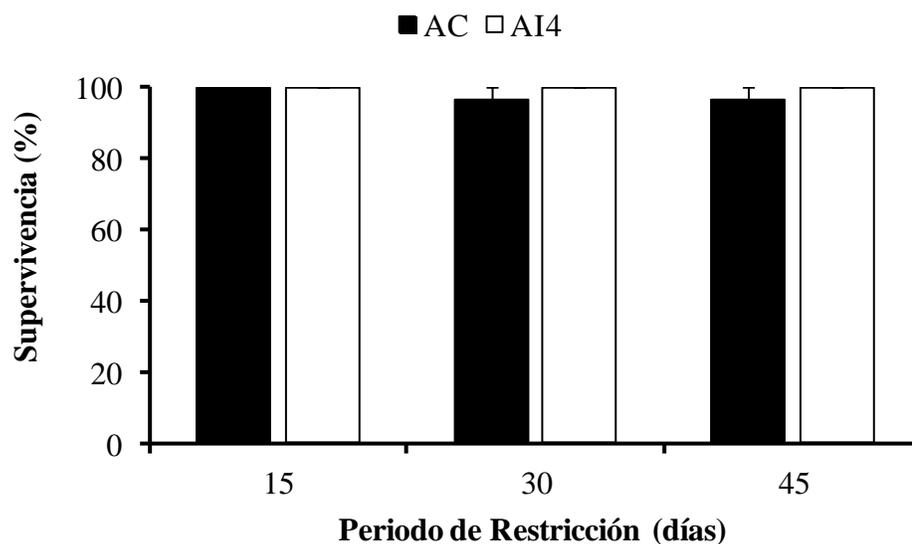
En cada columna y para cada experimento, el asterisco (*) indica diferencias significativas entre regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.13.

4.4.5. Experimento 6 - Efecto de un *Periodo de Restricción* de LARGO PLAZO seguido por un *Periodo de Recuperación* PROLONGADO en juveniles de 1 gramo bajo condiciones grupales y alimentados con la dieta TETRA®

Los juveniles expuestos al tratamiento AI4 tuvieron en total 99 días de alimentación, en comparación con los 120 días de alimentación que tuvieron los juveniles de AC. En total, cada réplica (acuario) de AI4 recibió en promedio 65 gramos de alimento, mientras que cada acuario de AC recibió en promedio 102 gramos de alimento. Esta cantidad representa el 64% del suministrado para los juveniles de AC.

La supervivencia fue similar entre los regímenes alimenticios durante todo el periodo de restricción ($F_{1,10} = 0,80$; $P = 0,3916$) (Figura 4.18a) y durante todo el periodo de recuperación ($F_{1,4} = 0,00$; $P > 0,9999$) (Figura 4.18b). Vale resaltar que la supervivencia fue calculada sobre las 6 réplicas para cada régimen alimenticio durante el periodo de restricción y a partir del periodo de recuperación fue calculada sobre las 3 réplicas restantes después del sacrificio para obtención de muestras como descrito en la sección 4.3.3 del presente capítulo.

(a)



(b)

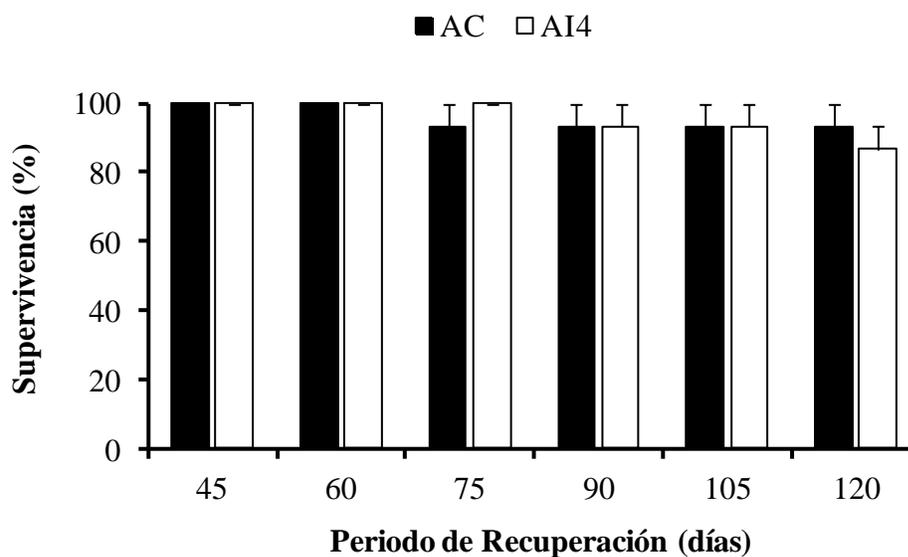
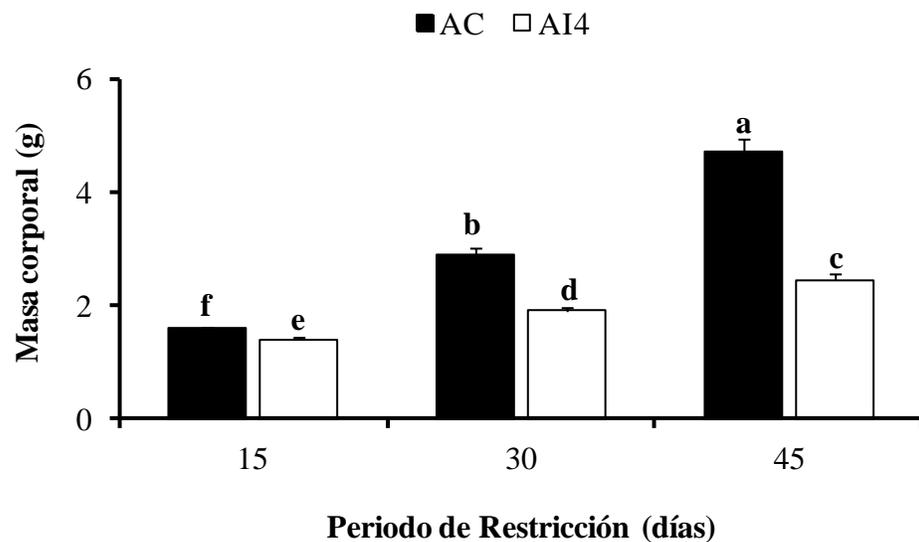


Figura 4.18. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* en el experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA[®]). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación. AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días y AC: alimentación continua.

Durante el **periodo de restricción**, se observó un efecto de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo sobre la masa corporal del juvenil ($F_{2,20} = 91,24$; $P < 0,0001$). Transcurrida la primera quincena, los juveniles expuestos al tratamiento AI4 presentaron un nivel 11% menor de masa corporal en relación al control. Quince días después, esta diferencia fue de 34% y al final de la restricción fue de 48% en relación al control (Figura 4.19a).

Durante el **periodo de recuperación**, el régimen alimenticio ($F_{1,4} = 12,81$; $P = 0,0232$) y el tiempo ($F_{5,20} = 37,27$; $P < 0,0001$) afectaron independientemente la masa corporal del juvenil. Los juveniles expuestos al tratamiento AI4 presentaron una menor masa corporal en relación al control durante todo el periodo y, aunque esta diferencia se redujo del 48% (día 45) al 11% (día 120), los 75 días de alimentación diaria no fueron suficientes para lograr una recuperación completa del crecimiento (Figura 4.19b).

(a)



(b)

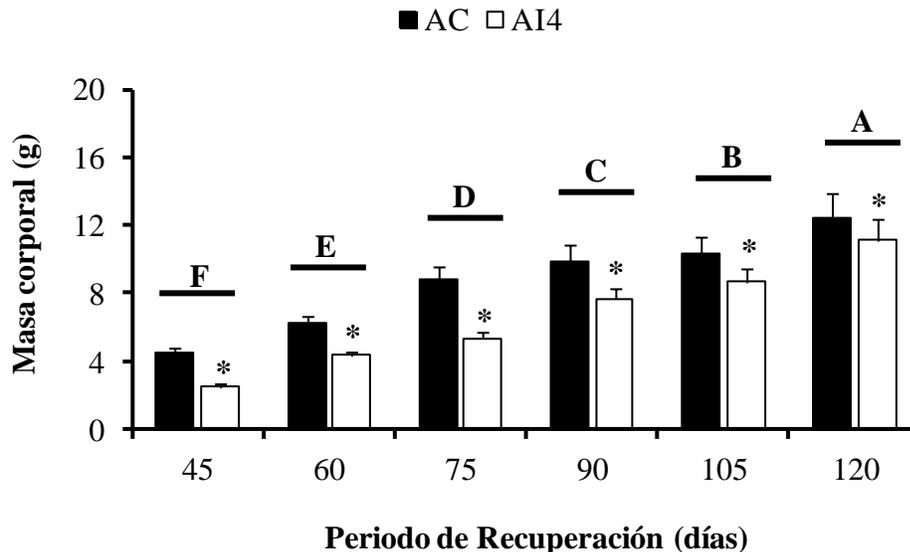


Figura 4.19. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* en el experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA[®]). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen de alimentación y tiempo (efecto de la interacción). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Un efecto similar del régimen alimenticio ($F_{1,4} = 23,47$; $P = 0,0084$) y del tiempo ($F_{5,20} = 46,12$; $P < 0,0001$) fue observado para la biomasa durante el periodo de recuperación (Figura 4.20).

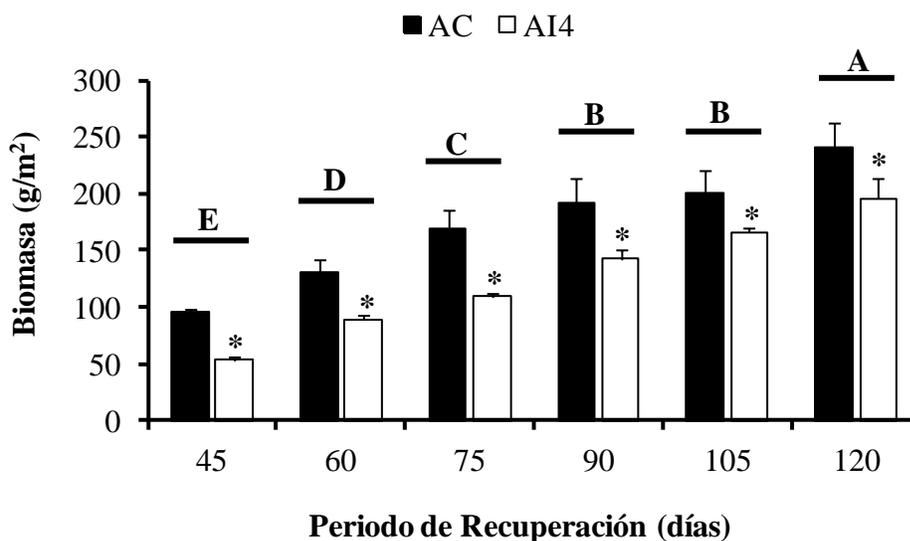
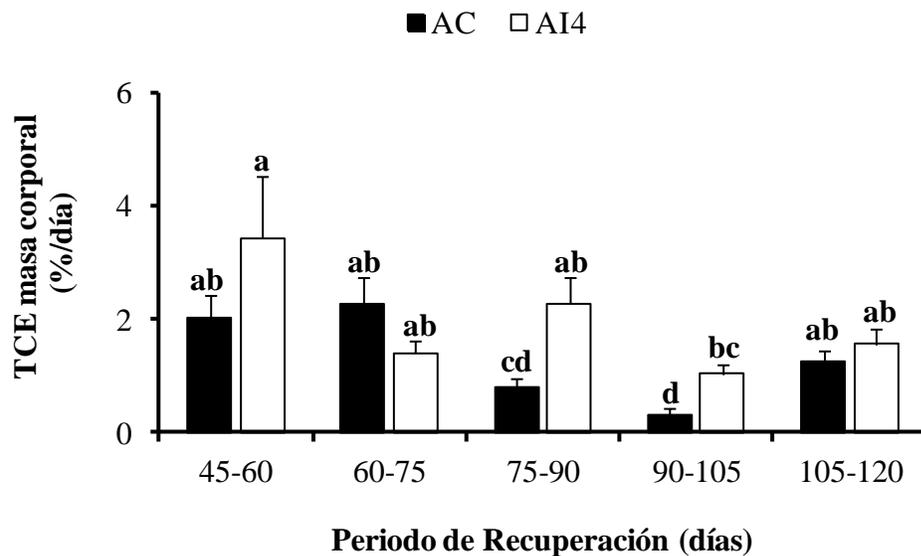


Figura 4.20. Biomasa de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo de recuperación en el experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA®). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Aunque los juveniles expuestos al tratamiento AI4 no alcanzaron la trayectoria de crecimiento del control, tuvieron la capacidad al presentar crecimiento compensatorio (elevado TCE) después de los 30 días de haber sido restituida la alimentación diaria (efecto de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo; $F_{4,16} = 15,33$; $P < 0,0001$) (Figura 4.21a). En relación al TCE de la biomasa, también se observó un mayor valor en los juveniles restringidos al finalizar el periodo de recuperación ($t = 2,89$; $P = 0,0445$) (Figura 4.21b).

(a)



(b)

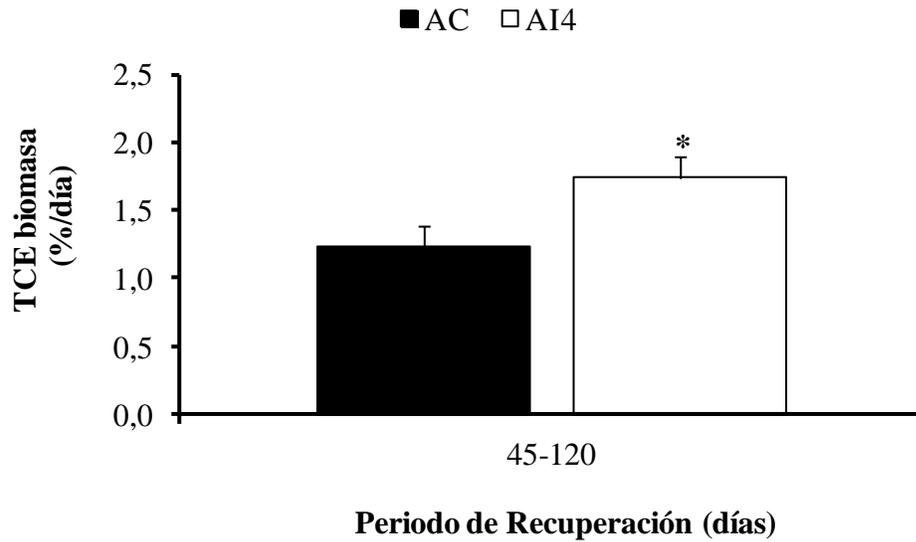


Figura 4.21. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo de recuperación del experimento 6 (alimentados con la dieta TETRA[®]). (a) TCE de la masa corporal y (b) TCE de la biomasa. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre el régimen de alimentación y el tiempo (efecto de la interacción). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

En relación a la variación de la masa corporal, ésta fue similar entre los juveniles bajo intermitencia y el control ($t= 1,31$; $P= 0,2206$) al término del periodo de restricción (día 45) y al término del periodo de recuperación (día 120) ($t= 0,19$; $P= 0,8562$) (Tabla 4.4). La conversión alimenticia y eficiencia proteica fue similar entre juveniles restringidos y no restringidos ($t= 0,04$; $P= 0,9698$ y $t= 0,22$; $P= 0,8293$, respectivamente) al finalizar el periodo de restricción (día 45) (Tabla 4.4). Al finalizar el periodo de recuperación (día 120) se observó mayor conversión alimenticia ($t= 1,68$; $P= 0,0352$) y una tendencia hacia una mayor eficiencia proteica ($t= 1,23$; $P= 0,0701$) en los juveniles que fueron previamente restringidos (~ 45% mayor que el valor de AC; Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Coeficiente de variación (CV), conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

		CV (%)	CA apar	EP apar (%)
45	AC	29,07 ± 3,15	0,89 ± 0,01	2,28 ± 0,02
	AI4	23,19 ± 3,22	0,89 ± 0,04	2,30 ± 0,10
120	AC	40,11 ± 4,69	2,53 ± 0,21	0,85 ± 0,06
	AI4	43,02 ± 14,34	1,68 ± 0,17 *	1,23 ± 0,14

En cada columna y para cada día, el asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Al finalizar los periodos de restricción y de recuperación, se observó una diferencia significativa entre los regímenes de alimentación para el índice de la glándula digestiva en base húmeda ($F_{1,8} = 7,19$; $P = 0,0277$), el cual fue mayor en los juveniles bajo intermitencia (Tabla 4.5). Sin embargo, al analizar esta variable en base seca se verificó que los valores fueron similares entre los regímenes en ambos periodos ($F_{1,8} = 0,91$; $P = 0,3680$) (Tabla 4.5). En relación al índice relativo del pleon, se detectaron diferencias significativas de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo ($F_{1,8} = 5,74$; $P = 0,0434$) y se verificó que los juveniles bajo intermitencia presentaron una pequeña superioridad en relación al control de alimentación (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Índices de la glándula digestiva en base húmeda (IGD h) y base seca (IGD s) e relativo del pleon en base húmeda (IRP h) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

		IGD h (%)	IGD s (%)	IRP h (%)
45	AC	7,47 ± 0,10	2,39 ± 0,15	32,21 ± 0,49 ab
	AI4	7,73 ± 0,11 *	2,42 ± 0,21	31,86 ± 0,41 b
120	AC	7,30 ± 0,16	2,24 ± 0,09	30,74 ± 0,45 b
	AI4	7,95 ± 0,26 *	2,55 ± 0,23	32,37 ± 0,49 a

En cada columna, las letras minúsculas indican diferencias significativas entre el régimen de alimentación y el tiempo (efecto de la interacción). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

La caracterización histológica de la glándula digestiva fue basada en las descripciones de Calvo et al. (2011, 2012) y Sacristán et al. (2015). Al finalizar los periodos de restricción y recuperación no se observaron diferencias estructurales entre el tratamiento bajo intermitencia y el control. Debido a este resultado no se presentarán las fotos correspondientes al análisis histológico.

Fueron observadas concentraciones similares entre AI4 y AC para las proteínas totales, lípidos totales, y glucógeno en la glándula digestiva y en el músculo abdominal al finalizar los periodos de restricción y recuperación (Tabla 4.6). Se detectó un efecto del tiempo en la concentración de lípidos totales en la glándula digestiva y en la concentración de glucógeno del músculo abdominal ($H_1= 8,31$; $P= 0,0008$ y $F_{1,8}= 22,20$; $P= 0,0015$, respectivamente). En ambos casos, la concentración del nutriente se incrementó con el avance del tiempo.

Tabla 4.6. Reservas energéticas en la glándula digestiva y en el músculo abdominal (base húmeda) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

			Proteínas totales (mg/g)	Lípidos totales (mg/g)	Glucógeno (mg/g)
Glándula digestiva	45	AC	35,90 ± 1,30	83,80 ± 24,15 B	2,05 ± 0,32
		AI4	31,33 ± 3,08	79,68 ± 4,75 B	1,46 ± 0,39
	120	AC	41,60 ± 9,45	214,86 ± 6,56 A	2,22 ± 0,19
		AI4	42,83 ± 9,47	206,24 ± 56,53 A	2,80 ± 1,12
Músculo abdominal	45	AC	58,46 ± 6,52	3,93 ± 0,35	1,21 ± 0,26 B
		AI4	62,07 ± 1,23	4,33 ± 0,95	2,21 ± 0,43 B
	120	AC	67,44 ± 9,87	5,85 ± 0,95	6,60 ± 1,92 A
		AI4	81,10 ± 5,79	4,89 ± 0,36	4,55 ± 0,74 A

En cada columna, las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Fueron observadas actividades similares entre AI4 y AC para las proteasas y amilasas al finalizar los periodos de restricción y recuperación (Tabla 4.7). Aunque estadísticamente no fue significativo el efecto del régimen alimenticio ($F_{1,8}= 0,99$; $P= 0,3476$), se observó una tendencia de una mayor actividad de las proteasas en los juveniles de AI4 al finalizar el periodo de recuperación. Por otro lado, se detectó un efecto de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo ($F_{1,8}= 5,49$; $P= 0,0471$) en la actividad de las lipasas y los juveniles de AI4 presentaron una mayor actividad en relación al control, al finalizar cada periodo experimental (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Actividad de las enzimas digestivas (U/mg de proteína * min) en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 6 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

		Proteasas (U/mg*min)	Lipasas (U/mg*min)	Amilasas (U/mg*min)
45	AC	0,64 ± 0,10	147,27 ± 7,16 bc	11,94 ± 1,39 A
	AI4	0,56 ± 0,11	174,64 ± 4,56 ab	8,04 ± 1,17 A
120	AC	0,50 ± 0,14	115,40 ± 4,56 c	3,29 ± 0,43 B
	AI4	0,78 ± 0,06	231,49 ± 42,43 a	3,48 ± 0,38 B

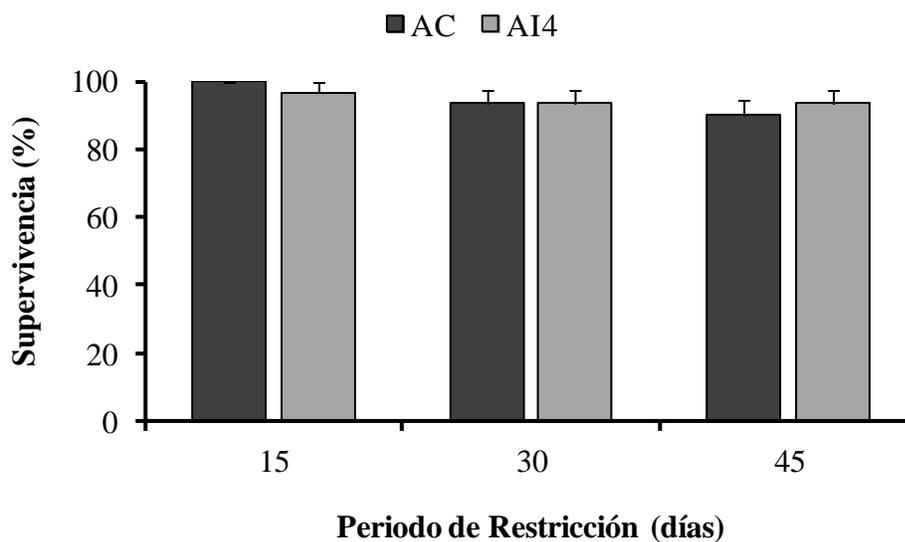
En cada columna, las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen de alimentación y tiempo (efecto de la interacción). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

4.4.6. Experimento 7- Efecto de un *Periodo de Restricción* de LARGO PLAZO seguido por un *Periodo de Recuperación* PROLONGADO en juveniles de 1 gramo bajo condiciones grupales y alimentados con la dieta REFERENCIA

Los juveniles expuestos al tratamiento AI4 tuvieron en total 99 días de alimentación, en comparación con los 120 días de alimentación que tuvieron los juveniles de AC. En total, cada réplica (acuario) de AI4 recibió en promedio 57 gramos de alimento, mientras que cada acuario de AC recibió en promedio 86 gramos de alimento. Esta cantidad representa el 66% del suministrado para los juveniles de AC.

La supervivencia fue similar entre los regímenes alimenticios durante todo el periodo de restricción ($F_{1,10} = 0,00$; $P > 0,9999$) (Figura 4.22a) y durante todo el periodo de recuperación ($F_{1,4} = 0,01$; $P = 0,9397$) (Figura 4.22). Por otra parte, el tiempo tuvo un efecto en la supervivencia de los juveniles durante el periodo de recuperación ($F_{5,20} = 4,42$; $P = 0,0071$) (Figura 4.22), la cual bajó del 100% (día 45) al 66% (día 120). Vale resaltar que la supervivencia fue calculada sobre las 6 réplicas para cada régimen alimenticio durante el periodo de restricción y a partir del periodo de recuperación fue calculada sobre las 3 réplicas restantes, como ya fue explicado en el experimento 6.

(a)



(b)

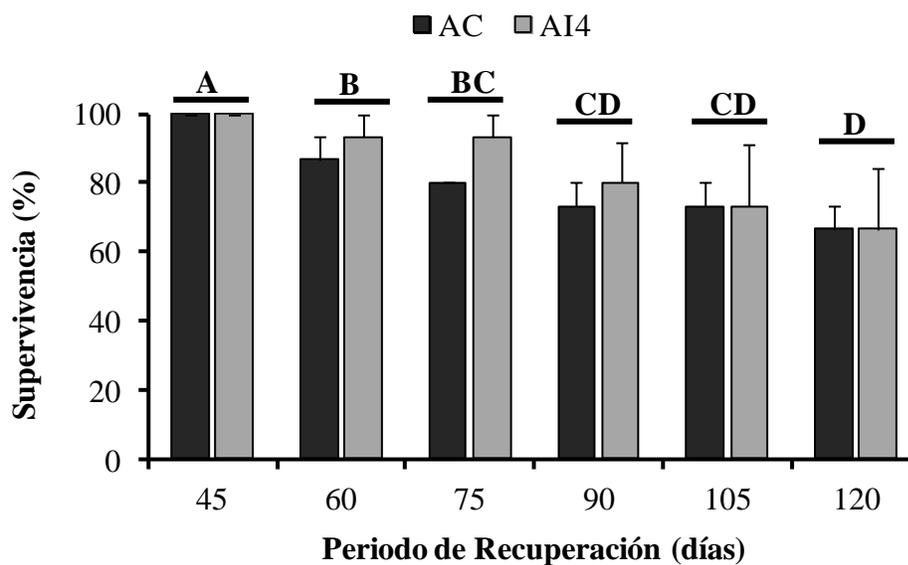
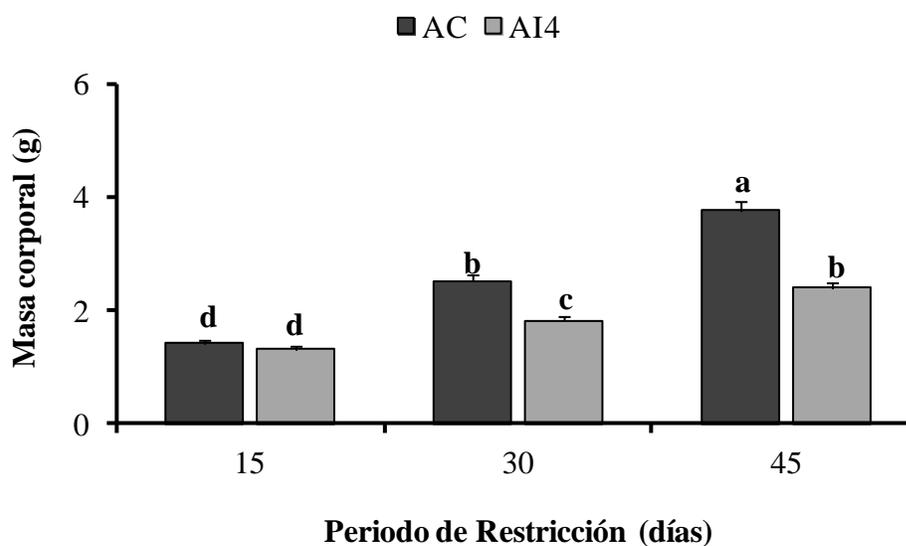


Figura 4.22. Supervivencia de los juveniles de *C. quadricarinatus* en el experimento 7 (alimentados con la dieta REFERENCIA). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Durante el **periodo de restricción**, la interacción entre régimen alimenticio y tiempo tuvo un efecto en la masa corporal del juvenil ($F_{2,20} = 22,25$; $P < 0,0001$). Transcurrida la primera quincena, los juveniles expuestos al tratamiento AI4 presentaron un nivel 8% menor de masa corporal en relación al control. Quince días después, la diferencia fue de 28% y al final de la restricción fue de 36% (Figura 4.23a).

Durante el **periodo de recuperación**, la masa corporal del juvenil continuó siendo afectada por la interacción entre régimen alimenticio y tiempo ($F_{4,16} = 3,50$; $P = 0,0310$) y los juveniles expuestos al tratamiento AI4 presentaron una menor masa corporal en relación al control hasta el día 105. Sin embargo, en los posteriores quince días de alimentación (día 120) estos juveniles lograron la completa recuperación del crecimiento (Figura 4.23b).

(a)



(b)

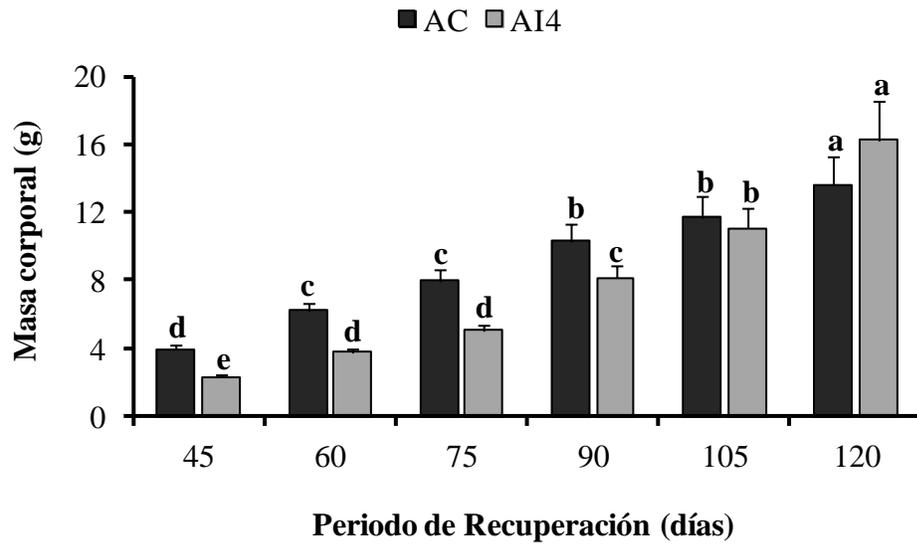


Figura 4.23. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* en el experimento 7 (alimentados con la dieta REFERENCIA). (a) Durante el periodo de restricción y (b) durante el periodo de recuperación. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen de alimentación y tiempo (efecto de la interacción). La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Al analizar el crecimiento en biomasa durante el periodo de recuperación, se verificó un efecto del régimen alimenticio ($F_{1,4} = 58,55$; $P = 0,0016$) independiente del efecto del tiempo ($F_{5,20} = 0,28$; $P < 0,0001$). El análisis detectó que la biomasa fue menor en aquellos juveniles previamente restringidos, sin embargo, se observa que en los últimos 15 días del experimento la biomasa de los regímenes alimenticios fue numéricamente similar (Figura 4.24).

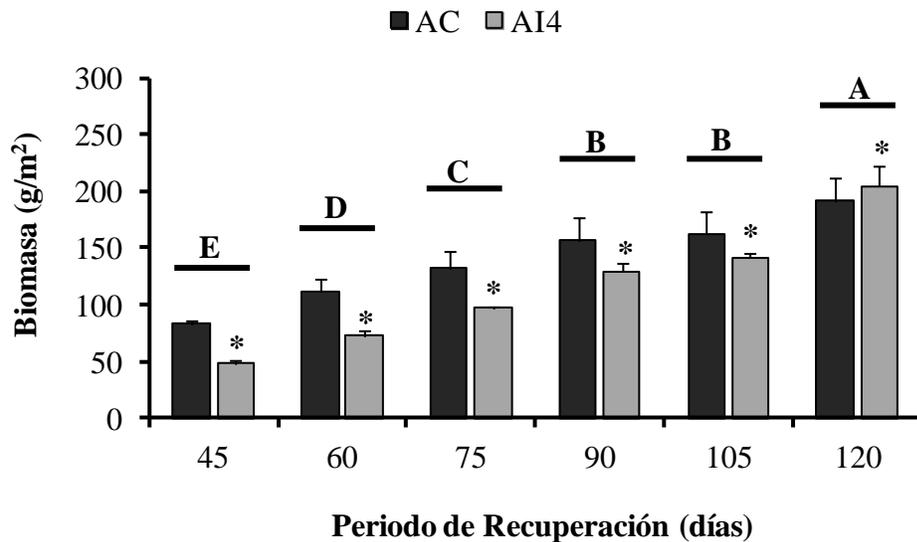
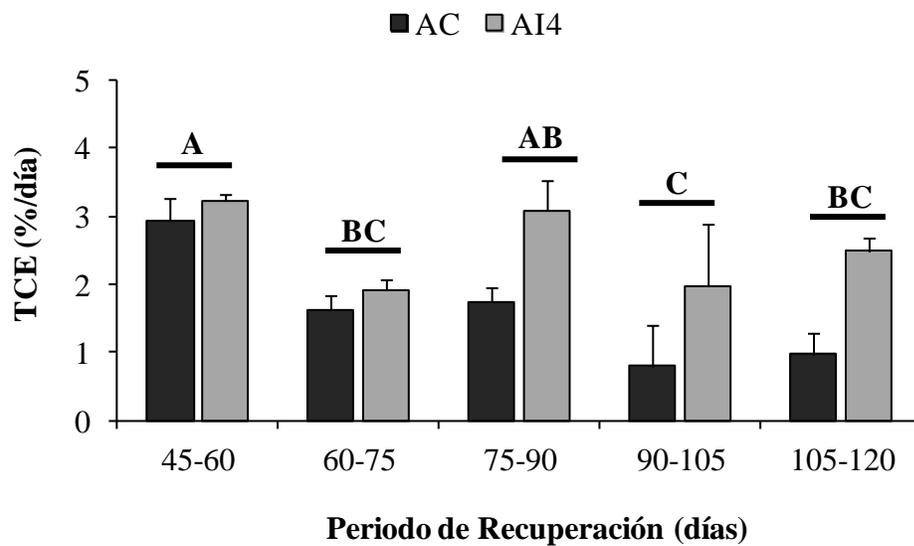


Figura 4.24. Biomasa de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo de recuperación en el experimento 6 (alimentados con la dieta REFERENCIA). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Se observó un efecto del tiempo ($F_{4,16} = 6,78$; $P = 0,0022$) en la TCE de los juveniles pero el crecimiento compensatorio no fue detectado estadísticamente ($F_{1,4} = 7,56$; $P = 0,0514$) en los juveniles expuestos al tratamiento AI4 durante el periodo de recuperación. Sin embargo, se observó, a partir de los 30 días después de restituida la alimentación diaria, una importante tendencia a un mayor valor en la tasa de crecimiento específico cuando fue comparado con el valor de los juveniles del control AC (Figura 4.25a). En relación al TCE de la biomasa, los alimentados intermitentemente crecieron un 80% más ($t = 2,85$; $P = 0,0462$) que los juveniles alimentados continuamente (Figura 4.25b).

(a)



(b)

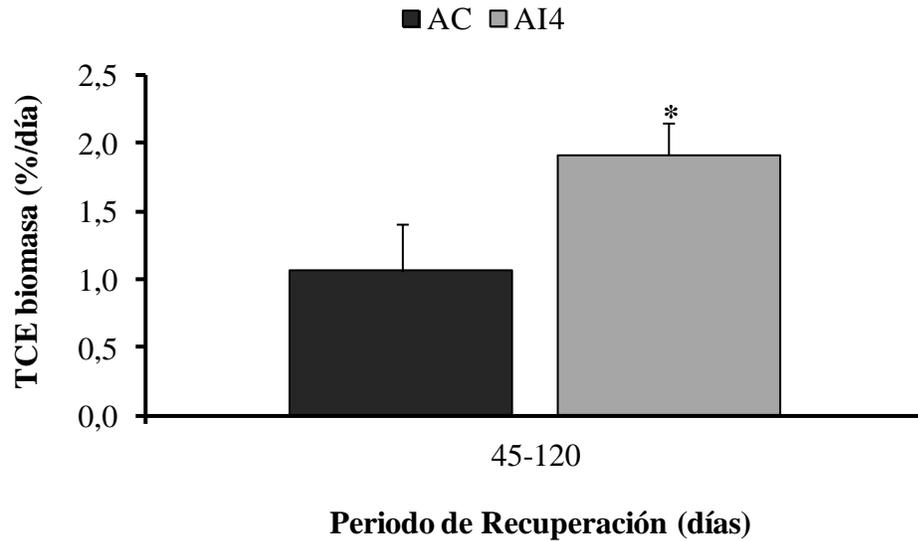


Figura 4.25. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo de recuperación del experimento 7 (alimentados con la dieta REFERENCIA). (a) TCE de la masa corporal y (b) TCE de la biomasa. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

En relación a la variación de la masa corporal, ésta fue similar entre los juveniles bajo intermitencia y el control al finalizar los periodos de restricción y de recuperación ($t=0,73$; $P=0,7355$ y $t=1,51$; $P=0,2000$, respectivamente) (Tabla 4.8). La conversión alimenticia fue mayor ($U=2$; $P=0,0104$) en los juveniles restringidos al día 45 y con una tendencia también hacia una mayor conversión alimenticia al día 120 ($t=2,42$; $P=0,0730$) (Tabla 4.8). En cuanto a la eficiencia proteica, los juveniles del tratamiento AI4 fueron menos eficientes en ganar masa corporal a expensas de la cantidad de proteína suministrada al finalizar el periodo de restricción ($t=5,07$; $P=0,0004$), sin embargo, esta condición se revirtió cuando fue restituida la alimentación diaria y los juveniles previamente restringidos presentaron mayores valores de eficiencia proteica que aquellos de AC al finalizar el periodo de recuperación ($t=2,74$; $P=0,0051$) (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Coeficiente de variación (CV), conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

		CV (%)	CA apar	EP apar (%)
45	AC	30,40 ± 3,17	1,16 ± 0,08	2,55 ± 0,12
	AI4	28,72 ± 3,64	0,93 ± 0,03 *	1,89 ± 0,05 *
120	AC	47,17 ± 7,95	2,52 ± 0,67	1,28 ± 0,31
	AI4	65,02 ± 8,52	1,28 ± 0,09	2,49 ± 0,40 *

En cada columna y para cada día, el asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

En relación al índice de la glándula digestiva en base húmeda, no se observaron diferencias significativas entre regímenes alimenticios ($F_{1,8} = 1,53$; $P = 0,2509$) al finalizar los periodos de restricción y de recuperación. Sin embargo, al analizar esta variable en base seca se verificó que los valores fueron menores en los juveniles del tratamiento AI4 ($F_{1,8} = 5,70$; $P = 0,0439$) (Tabla 4.9). En relación al índice relativo del pleon, no se detectaron diferencias significativas entre los regímenes alimenticios ($F_{1,8} = 0,02$; $P = 0,8793$) y tampoco entre tiempos ($F_{1,8} = 0,14$; $P = 0,3266$) (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Índices de la glándula digestiva en base húmeda (IGD h) y base seca (IGD s) e relativo del pleon en base húmeda (IRP h) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

		IGD h (%)	IGD s (%)	IRP h (%)
45	AC	8,63 ± 0,30	3,17 ± 0,38 B	31,95 ± 0,50
	AI4	8,39 ± 0,54	2,70 ± 0,38 B*	32,17 ± 0,70
120	AC	8,97 ± 0,67	4,56 ± 0,33 A	33,45 ± 0,67
	AI4	8,03 ± 0,28	3,52 ± 0,33 A*	32,84 ± 0,28

En cada columna, las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Al finalizar los periodos de restricción y recuperación no se observaron diferencias estructurales entre los regímenes alimenticios en la caracterización histológica de la glándula digestiva. La dieta REFERENCIA tampoco provocó alteraciones cuando fue comparada con la dieta TETRA[®]. Debido a este resultado no se presentarán las fotos correspondientes al análisis histológico.

Fueron observadas concentraciones similares entre AI4 y AC para proteínas totales, lípidos totales, y glucógeno en la glándula digestiva y en el músculo abdominal al finalizar los

periodos de restricción y recuperación (Tabla 4.10). Se detectó un efecto del tiempo en la concentración de lípidos totales y de glucógeno en la glándula digestiva ($F_{1,8}= 6,92$; $P= 0,0301$ y $F_{1,8}= 6,85$; $P= 0,0210$, respectivamente), y en la concentración de proteínas y lípidos totales en el músculo abdominal ($F_{1,8}= 8,17$; $P= 0,0211$ y $F_{1,8}= 0,02$; $P= 0,0033$, respectivamente). En la mayoría de los casos, la concentración del nutriente se incrementó con el avance del tiempo, con la excepción del glucógeno en la glándula digestiva, el cual se redujo al día 120 (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Reservas energéticas en la glándula digestiva y músculo abdominal (base húmeda) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimento 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

			Proteínas totales (mg/g)	Lípidos totales (mg/g)	Glucógeno (mg/g)
Glándula digestiva	45	AC	44,85 ± 1,05	127,98 ± 33,47 B	2,37 ± 0,66 A
		AI4	45,92 ± 3,95	175,22 ± 61,64 B	2,72 ± 0,49 A
	120	AC	44,01 ± 5,81	308,39 ± 48,84 A	1,14 ± 0,60 B
		AI4	33,47 ± 2,34	224,40 ± 17,77 A	0,93 ± 0,27 B
Músculo abdominal	45	AC	41,69 ± 7,95 B	1,14 ± 0,43 B	17,22 ± 4,59
		AI4	60,89 ± 6,57 B	1,65 ± 0,27 B	10,78 ± 1,87
	120	AC	70,49 ± 4,32 A	2,69 ± 0,27 A	9,75 ± 4,15
		AI4	64,06 ± 0,04 A	3,10 ± 0,13 A	6,03 ± 1,41

En cada columna y para cada órgano, las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

Fueron observadas actividades similares de las proteasas, lipasas y amilasas entre AI4 y AC al finalizar los periodos de restricción y recuperación (Tabla 4.11). Aunque estadísticamente no significativo ($F_{1,8}= 0,01$; $P= 0,9278$), se observó una tendencia hacia una mayor actividad de las proteasas en los juveniles de AI4 al finalizar el periodo de recuperación (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Actividad de las enzimas digestivas (U/mg de proteína * min) en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el experimentos 7 (día 45 corresponde al final del periodo de restricción y día 120 corresponde al final del periodo de recuperación).

		Proteasas (U/mg*min)	Lipasas (U/mg*min)	Amilasas (U/mg*min)
45	AC	0,48 ± 0,03	145,76 ± 46,35	6,16 ± 0,79
	AI4	0,32 ± 0,14	209,58 ± 25,81	4,05 ± 0,68
120	AC	0,38 ± 0,07	170,86 ± 54,01	5,82 ± 1,13
	AI4	0,52 ± 0,06	179,01 ± 30,46	5,12 ± 0,88

En cada columna, las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen de alimentación y tiempo (efecto de la interacción). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los tratamientos se encuentra en el epígrafe de la figura 4.18.

4.5. Discusión

En el el presente capítulo se logró **encontrar un protocolo de restricción alimenticia (adecuada severidad y extensión de restricción) para inducir el crecimiento compensatorio (con la presencia de un periodo de recuperación)** en los juveniles de *C. quadricarinatus*.

Se verificó a través de los experimentos 1 a 3 que la aplicación de un periodo de restricción alimenticia en juveniles de una progenie de mala calidad, ocasiona altas mortalidades. Una mala calidad de la progenie se refiere a que los juveniles o larvas de crustáceos tengan una mala condición fisiológica, una baja performance durante el cultivo (supervivencia y crecimiento) y una baja resistencia al estrés (cambios ambientales y resistencia a patógenos por ejemplo); y tal condición es, entre otras, dependiente de la condición nutricional del plantel reproductivo (Palacios et al. 1999; Raccotta et al. 2003; Rodríguez-González et al. 2014). En este sentido, durante el año de desarrollo de estos ensayos, tuvimos una alta mortalidad en varios estudios desarrollados en nuestro laboratorio lo que nos llevó a concluir que el plantel reproductivo no fue el más adecuado.

A propósito de los resultados sobre crecimiento compensatorio del presente capítulo (experimentos 2, 6 y 7) se corroboró que la inclusión de un periodo de alimentación diaria después de la restricción fue un factor importante e imprescindible para promover dicha respuesta en los juveniles de *C. quadricarinatus*, ya sea en el estadio de recién independizados (JIII) como en el estadio de 1g, es decir, que el crecimiento compensatorio ocurrió independientemente de la talla. Estos resultados llevan a **rechazar la hipótesis de trabajo 4.1**, la cual predice que la capacidad de respuesta compensatoria de los juveniles de *C. quadricarinatus* a la restricción alimenticia depende del estadio de desarrollo. En este sentido, Eroldogan et al. (2006, 2008) observaron en diferentes tallas de la dorada *Sparus aurata* (6 y 35 g) al aplicar el mismo protocolo de restricción-realimentación, que las respuestas fueron más drásticas en aquellos peces más pequeños. Así, **la talla estaría**

influyendo en la severidad de la respuesta de un periodo de privación y consecuentemente en el tiempo de recuperación del crecimiento.

Acerca de los experimentos evaluando el efecto de la dieta en la respuesta compensatoria (experimentos 6 y 7), vale resaltar que no se agruparon ambos experimentos en un solo análisis estadístico, considerando la dieta como un factor, porque que los datos de supervivencia entre experimentos fueron diferentes, y el crecimiento de los juveniles es fuertemente afectado por el espacio disponible en una situación de cultivo grupal (Pinto y Rouse 1996; Naranjo-Párramo et al. 2004).

Los juveniles de *C. quadricarinatus* del tratamiento AI4 y alimentados con ambas dietas presentaron crecimiento compensatorio después de la restricción alimenticia. Conviene destacar que, aunque el TCE de la masa corporal de los juveniles AI4 alimentados con dieta REFERENCIA hayan sido *estadísticamente* similar al control, numéricamente fueron muy superiores (80% y > 100% en algunos casos). Así pues, estos resultados llevan a **rechazar la hipótesis de trabajo 4.2**, la cual predice que el tipo de alimento (composición de la dieta) influye en el crecimiento compensatorio de los juveniles de *C. quadricarinatus* (al menos no influye utilizando estas dos dietas). Nuestros resultados están de acuerdo con lo observado por Gaylord y Gatlin (2001) en el pez gato *I. punctatus*, el cual presentó crecimiento compensatorio con las dos dietas evaluadas (32 y 37% de proteína cruda). A su vez, Cho y Heo (2011) observaron que dietas conteniendo 59 y 50% de proteína cruda no influenciaron el crecimiento compensatorio del lenguado *P. olivaceus*, en cambio, el grado de recuperación si fue afectado. Young et al. (2005) observaron lo mismo en el salmón del Atlántico *Salmo salar* al exponerlos a un protocolo de restricción-realimentación con dietas de 38 y 41% de proteína cruda.

A pesar de no haber logrado una recuperación completa del crecimiento con la dieta TETRA[®], la pequeña diferencia entre las masas corporales y entre biomásas en los juveniles de AI4 y AC al finalizar el experimento 6, nos lleva a sugerir que dicha respuesta podría ocurrir con un periodo de alimentación más extenso. Por otro lado, una recuperación completa del crecimiento en aquellos juveniles de AI4 alimentados con la dieta REFERENCIA pudo haber sido afectada por la menor densidad observada durante el periodo de recuperación (debido a una mayor mortalidad que la de la dieta TETRA[®]), cuando lo comparamos con el experimento 6. En este sentido y de acuerdo con los experimentos 2, 6 y 7, **la recuperación del crecimiento hacia la trayectoria de crecimiento del control a través del crecimiento compensatorio, estaría dependiendo de la extensión del periodo de recuperación.** Por lo general, un periodo de alimentación diaria después de una restricción alimenticia es lo habitualmente utilizado en estudios de crecimiento compensatorio y lograr la recuperación completa es particularmente dependiente de la especie, del grado de supresión del crecimiento y del estado catabólico del organismo después de la restricción, y de la condición de cultivo (Wang et al. 2000; Tian y Qin 2003; Wang et al. 2005; Eroldogan et al. 2006; Picha et al. 2006; entre otros). Por otro lado, **la condición de cultivo en grupo también podría estar interfiriendo en el tiempo de recuperación** (experimento 6 y 7), para que este sea completo en los juveniles de *C. quadricarinatus*. Por lo tanto, bajo esta condición se puede sugerir un periodo de recuperación más extenso que 75 días y otra opción sería reducir el tiempo de intermitencia a 30 días para que el impacto en la masa corporal sea menor. En este sentido, deben ser realizados estudios con el propósito de buscar un mejor ajuste en los tiempos de restricción y recuperación para lograr una recuperación completa, a través del crecimiento compensatorio.

Vale resaltar que aunque el factor “condición de cultivo” no fue una hipótesis planteada *a priori*, se observó que **los juveniles de esta especie pueden presentar crecimiento compensatorio en condiciones individuales y grupales.**

En relación a las dietas altamente proteicas utilizadas en los ensayos, su uso se justifica porque en la etapa del desarrollo inicial de los juveniles ocurre una alta tasa de crecimiento (presentan alta frecuencia de muda) y por lo tanto necesitan una dieta con un mínimo de 35% de proteína cruda para obtener un adecuado crecimiento cuando son cultivados en un sistema de recirculación cerrado (Saoud et al. 2012). De acuerdo con Anger (2001), los requerimientos de la proteína dietaria son particularmente altos en el estadio temprano de desarrollo debido a la alta tasa de crecimiento en esta etapa y una dieta con este perfil provee nutrientes para una rápida síntesis del tejido. Además, la utilización de la “superioridad química” del alimento puede compensar la baja disponibilidad del alimento (Anger 2001).

Otros resultados interesantes fueron las respuestas obtenidas con la alimentación intermitente en juveniles bajo condiciones grupales (experimento 4,5, 6 y 7), abriendo la posibilidad de aplicación de este tipo de restricción en los sistemas de cultivo. Los resultados de los ensayos realizados en condiciones controladas de laboratorio pueden proveer buenos conocimientos pero, extrapolarlos hacia condiciones reales de cultivo exige prudencia y más investigaciones en un similar contexto de una producción acuícola (estanques externos, con productividad primaria y secundaria). Aún así, nuestros experimentos proporcionaron buenos indicadores para una posible aplicación de la alimentación intermitente sin comprometer la supervivencia y promover el crecimiento compensatorio.

Cuando los organismos están en condiciones grupales y bajo restricción alimenticia puede ocurrir una alta variabilidad en la ingesta de alimento entre los individuos y ésta puede ser potenciada por la dominancia jerárquica. Este tipo de situación puede ocasionar un crecimiento heterogéneo entre los animales (Jobling y Koskela 1996). Sin embargo, en el presente capítulo, la similitud del coeficiente de variación de la masa corporal entre los tratamientos (en los experimentos bajo condición grupal) mostró que los juveniles bajo intermitencia no monopolizaron más el alimento que los juveniles del control. Estos resultados concuerdan con los presentados por Känkänen y Pirhonen (2009), Matilla et al. (2009) y Turano et al. (2007) que observaron similar coeficiente de variación de la masa corporal cuando los peces, *Coregonus lavaretus* (larcvareto), *Sander lucioperca* (lucioperca) y *Morone chrysops* x *Morone saxatilis* (róbalo), estuvieron expuestos a la alimentación cíclica, en comparación con sus respectivos controles de alimentación continua. No hay registros de esta variable en un cultivo de crustáceos bajo restricción.

Con respecto a la reducción en la cantidad de alimento suministrado, ésta fue importante, y una vez más los juveniles mostraron ser tolerantes frente a este tipo de estrés, lo que se destaca por la alta supervivencia. Según McCue (2010), los animales deben tener estrategias exitosas frente a la inanición para mantener los procesos básicos de la vida y de esta manera prolongar la supervivencia. Por esta razón la movilización de las reservas energéticas puede ser necesaria para cubrir las demandas energéticas. Con respecto a los resultados de este capítulo, se verificó que no ocurre movilización de los nutrientes de la glándula digestiva y del músculo abdominal durante el periodo de alimentación intermitente para cubrir cualquier déficit energético, mostrándonos la capacidad de adaptación de estos juveniles. En la etapa de recuperación del crecimiento tampoco se observó retención o movilización de las reservas y estos resultados llevan a **no rechazar la**

hipótesis de trabajo 4.3, la cual predice que los juveniles de *C. quadricarinatus* que compensan el crecimiento después de la restricción alimenticia, presentan similar composición bioquímica en la glándula digestiva que aquellos juveniles sometidos al régimen de alimentación normal. Varios estudios muestran que el crecimiento compensatorio no siempre está acompañado por un cambio en la composición bioquímica corporal cuando el protocolo utilizado es la alimentación cíclica (Gaylord y Gatlin 2001; Mazlum et al. 2010; Zhu et al. 2014). De acuerdo con los resultados de las reservas energéticas de los experimentos 5, 6 y 7, el mantenimiento de la composición bioquímica en los principales órganos a niveles del control en detrimento de la masa corporal puede ser prioritario y estratégico para que el juvenil de *C. quadricarinatus* extienda la supervivencia durante este tipo de restricción o bien podría estar ocurriendo alguna movilización energética desde otra fuente. En este sentido, Powell y Watts (2010) observaron que en las langostas de agua dulce *Procambarus clarkii* y *P. zonangulus*, la energía provista para enfrentar una inanición de 5 meses fue movilizado mayormente desde esqueleto, branquias, corazón, etc., en comparación con la glándula digestiva y músculo abdominal y en este caso, la proteína fue la mayor fuente de energía movilizada.

Acerca de los mecanismos fisiológicos que pueden estar asociados al crecimiento compensatorio, un mayor consumo de alimento, es decir, hiperfagia y una mayor conversión alimenticia han sido propuestos como los principales mecanismos (Bélanger et al. 2002; Ali et al. 2003; Jiwyam 2010, Sevgili et al. 2012, Xiao et al. 2013, Yengkokpam et al. 2014). En el presente capítulo, el crecimiento compensatorio puede ser parcialmente explicado por una mayor conversión alimenticia y eficiencia proteica en los juveniles previamente restringidos dado que el consumo de alimento no fue medido. Por esta razón, en el capítulo siguiente se evaluará la ocurrencia o no de la hiperfagia durante el periodo de recuperación. Por otro lado, distintos autores como Anger (2001), Furné et al. (2008) y Gaylord y Gatlin (2001) asocian una mayor eficiencia en la conversión alimenticia a una reducción en la demanda energética, a una mayor retención de los nutrientes dietarios y/o a un aumento en la actividad de las enzimas digestivas.

En cuanto a la actividad de las enzimas digestivas, los juveniles de *C. quadricarinatus* del régimen AI4 fueron igual de eficientes en la digestión y absorción de los nutrientes dietarios que los juveniles de AC. Además, el incremento en la actividad de las proteasas durante la etapa en que ocurrió el crecimiento compensatorio (~ 56 y 36 % en aquellos juveniles alimentados con las dietas TETRA[®] y REFERENCIA, respectivamente) nos sugiere que una alta tasa de crecimiento puede estar asociada a una mayor capacidad de digestión de las proteínas dietarias, requerida para una mayor síntesis de tejido durante la recuperación del crecimiento. Un incremento en la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de proteínas fue observado en estudios de crecimiento compensatorio como por ejemplo en el bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (Bélanger et al. 2002), en el pez gato *Silurus meridionalis* (Zeng et al. 2012), en el rutilo *Rutilus rutilus caspicus* (Abolfathi et al. 2012) y en la carpa *Labeo rohita* (Yengkokpam et al. 2013). Por lo general, una reducción en la actividad de las enzimas refleja un marcada regulación de la función digestiva, a través de la falta de estímulos del tracto digestivo, de una reducción de los órganos sensoriales y alteraciones en la estructura histología y morfológica, que ocurre como consecuencia de la inanición (Wang et al. 2006; Li et al. 2007; Gisbert et al. 2011; Sacristán et al. 2014). Sin embargo, en otros estudios se ha verificado un mantenimiento de las enzimas proteolíticas durante periodos de inanición y durante la subsecuente realimentación (Zeng et al. 2012; Calvo et al. 2013; Sacristán et al., 2014). De acuerdo con

Rivera-Pérez et al. (2011), cuando un organismo no tiene disponible el alimento se espera una reducción en las lipasas digestivas y un aumento en las lipasas intracelulares, ya que la lipasa intracelular es la responsable por la movilización de los depósitos de lípidos en la glándula digestiva. Entonces, en el presente capítulo, es coherente que no se hayan reducido las reservas energéticas en la glándula digestiva de juveniles bajo intermitencia ya que éstos mantuvieron la secreción de las enzimas digestivas a niveles del control o a niveles mayores como fue observado en algunas situaciones.

La alimentación cíclica fue positiva para la calidad de agua (experimentos 4 y 5), manteniéndola dentro de los valores recomendados para el cultivo de *C. quadricarinatus* (Masser y Rouse 1997). Una reducción en la concentración de nitrógeno inorgánico fue detectada ya que una menor cantidad de heces y excretas fueron producidas por los juveniles que recibieron menos alimento. Por ello también fueron observadas una menor concentración de amonio total y nitrato en los tratamientos AI2 y AI4. El pH fue también menor en estos tratamientos ya que hubo menor materia orgánica en el sistema para su descomposición y consecuentemente ocurrió una menor liberación de CO₂. **La aplicación de la alimentación intermitente corrobora la posibilidad de reducir el impacto en los efluentes acuícolas** y estos resultados llevan **a no rechazar la hipótesis de trabajo 4.4**, la cual predice que los índices de calidad de agua como los nitratos, nitritos y amonio son menores en los acuarios con los juveniles de *C. quadricarinatus* sometidos a restricción alimentaria que en los acuarios de los juveniles sometidos a régimen de alimentación diaria.

CAPÍTULO 5

Efecto de la temperatura en el crecimiento compensatorio en el crecimiento de los juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Stumpf, L., López Greco, L.S.

*Compensatory growth in juveniles of freshwater redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* reared at three different temperatures: hyperphagia and food efficiency as primary mechanisms.*

Plos One Septiembre 2015; DOI:10.1371/journal.pone.0139372.

5.1. Introducción

La temperatura influye directamente en el metabolismo de los animales poiquiloterms afectando todos los procesos fisiológicos, entre ellos, la habilidad de adquirir y utilizar los nutrientes del ambiente lo que trae consecuencias en la eficiencia nutricional del organismo y compromete el éxito en un estanque de producción, en el caso de organismos cultivables (Brett 1979; Burel et al. 1996; Croll y Watts 2004; Kumar et al. 2012). Son escasos los estudios que han evaluado los efectos de una restricción alimenticia conjuntamente con diferentes temperaturas sobre la respuesta compensatoria en organismos acuáticos, a pesar de las implicaciones biológicas y acuícolas importantes que estos factores tienen sobre el crecimiento de las especies. En particular, solo Wu y Dong (2002b) han evaluado ambos tópicos en la *performance* de un crustáceo decápodo, el camarón marino *F. chinensis*.

La langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* es una especie euriterma y crece adecuadamente entre temperaturas de 22°C y 30 °C pero su óptima *performance* ocurre a una temperatura de 27±1°C (Meade et al. 2002; Tropea et al. 2010). En cuanto a la habilidad de recuperarse de una restricción alimenticia moderada, verificamos en los capítulos anteriores que el crecimiento compensatorio de los juveniles ocurre después de la inclusión de un periodo de alimentación diaria, en condiciones individuales y en condiciones grupales. Asimismo la talla del organismo no influye en dicha respuesta así como el tipo de alimento que utilizamos en nuestros estudios, es decir, con dos dietas altamente proteicas y cuyo nivel de proteína dietaria es mayor que el necesario para un óptimo crecimiento de la especie (31% de proteína cruda según Cortés-Jacinto et al. 2003).

Además, se ha observado una mayor eficiencia alimenticia y proteica en los juveniles recuperados, pero la estimación está basada en la cantidad de alimento ofrecido y no en la cantidad de alimento consumido. Los resultados de la histología de la glándula digestiva, composición bioquímica de los principales órganos y actividad de las principales enzimas digestivas en los juveniles de *C. quadricarinatus* indicaron que la alimentación cíclica AI4 no causa deterioro en la condición nutricional; sin embargo fueron siempre medidos cuando ya había ocurrido la completa recuperación del crecimiento.

5.2. Objetivo

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto modelador de la temperatura sobre el crecimiento compensatorio y recuperación del crecimiento en los juveniles de *C. quadricarinatus*. Además, fueron evaluados el consumo de alimento y la conversión alimenticia durante todo el periodo de recuperación con el propósito de elucidar los mecanismos que promueven dichas respuestas compensatorias. También se analizaron la concentración de las reservas energéticas y actividad de las enzimas digestivas en distintas etapas del periodo de recuperación con el fin de observar cambios fisiológicos durante la ocurrencia del crecimiento compensatorio.

En el marco de este objetivo se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis 5.1: La capacidad de respuesta compensatoria en los juveniles tempranos de *C. quadricarinatus* es modulada por la temperatura.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados en el presente capítulo fueron obtenidos a partir del plantel de reproductores suministrados por el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), ubicado en la provincia de Corrientes, Argentina, en el año de 2012. Dichos lotes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas en los capítulos anteriores. Se utilizaron juveniles avanzados (1 gramo) y estos fueron mantenidos en grupo, desde el estadio JIII y bajo una alta densidad (25 juveniles/m²), en acuarios de vidrio (60cm × 40 cm × 30 cm) denominados *acuarios de crecimiento* y en las mismas condiciones de calidad de agua, alimentación (dieta), temperatura y fotoperiodo descrito para el plantel reproductivo hasta que su masa corporal fuera la adecuada para el experimento. Cada *acuario de crecimiento* abarcó juveniles recién eclosionados de una sola hembra y estos juveniles fueron los correspondientes a la primera puesta de cada hembra.

5.3.2. Procedimiento experimental

Se utilizaron juveniles de al menos 6 hembras ovígeras. Cuando la masa corporal fue apropiada (en un rango entre 0,8 a 1,2 gramos), un pool de juveniles de cada *acuario de crecimiento* fue secado y su masa corporal (base húmeda) registrada utilizando una balanza analítica “OHAUS, Scout™” (precisión de 0,01g). Después del registro de la masa corporal, cada juvenil fue transferido individualmente a un envase plástico (9 cm de diámetro x 7 cm de altura) con un volumen de 500 ml de agua dulce a una temperatura de 27±1 °C y el agregado de un trozo de red cebollera de 5 cm x 5 cm. Posteriormente, los juveniles (individualizados en cada envase plástico) fueron aleatoriamente distribuidos en cubas plásticas (dimensiones de 53 cm x 40 cm x 12 cm) con un volumen de 6,5 L de agua para el control de la temperatura (por medio de un calefactor ATMAN de 100W). Se utilizaron cubas con agua a 23±1 °C, cubas con agua a 27±1 °C y cubas con agua a 31±1 °C. En cada cuba plástica se sumergieron 12 vasos plásticos y dichos juveniles fueron aclimatados a las temperaturas durante 1 semana siendo alimentados una vez al día con la dieta TETRA®. La unidad experimental (u.e.) fue el juvenil individualizado en un envase plástico.

Después de la semana de aclimatación, se registró nuevamente la masa corporal de cada juvenil y se dio inicio al experimento. Los envases plásticos fueron limpiados cada 4 días durante la etapa de la restricción alimenticia y a cada 7 días durante la etapa de recuperación, con renovación del 100% del agua para asegurar la remoción del alimento no consumido. Las condiciones controladas de aireación y fotoperiodo fueron las mismas descriptas en los capítulos anteriores. La dieta utilizada fue el alimento balanceado TETRA® (utilizado en la mayoría de los experimentos de la presente tesis).

La extensión del *PERIODO DE RESTRICCIÓN (ALIMENTACIÓN INTERMITENTE)* fue hasta el día 45 y a partir de este día empezó el *PERIODO DE RECUPERACIÓN (ALIMENTACIÓN DIARIA)* con extensión hasta el día 90 (Figura 6.1).



Figura 5.1 Protocolo experimental utilizado en los juveniles de *C. quadricarinatus*.

Durante los primeros 45 días los juveniles, cuando fueron alimentados, recibieron alimento *ad libitum*. A partir de esta fecha y hasta el final del experimento (día 90) la alimentación fue al 2% de la masa corporal de los juveniles.

En el presente capítulo, 3 temperaturas conjuntamente con 2 regímenes alimenticios fueron ensayadas. Las temperaturas fueron de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y $31 \pm 1^\circ\text{C}$, consideradas respectivamente como temperatura baja, óptima y alta para el crecimiento de la langosta de agua dulce (Tropea et al. 2010). Los regímenes alimenticios fueron el AI4 (alimentación por 4 días + inanición por 4 días, tratamiento utilizado para buscar el crecimiento compensatorio) y AC (control de alimentación continua).

Un total de 300 juveniles en estadio avanzado ($0,99 \pm 0,03$ g) fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los tratamientos: AC- $23 \pm 1^\circ\text{C}$, AI4- $23 \pm 1^\circ\text{C}$, AC- $27 \pm 1^\circ\text{C}$, AI4- $27 \pm 1^\circ\text{C}$, AC- $31 \pm 1^\circ\text{C}$ y AI4- $31 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 6.2). Cada tratamiento fue aplicado a 50 réplicas.

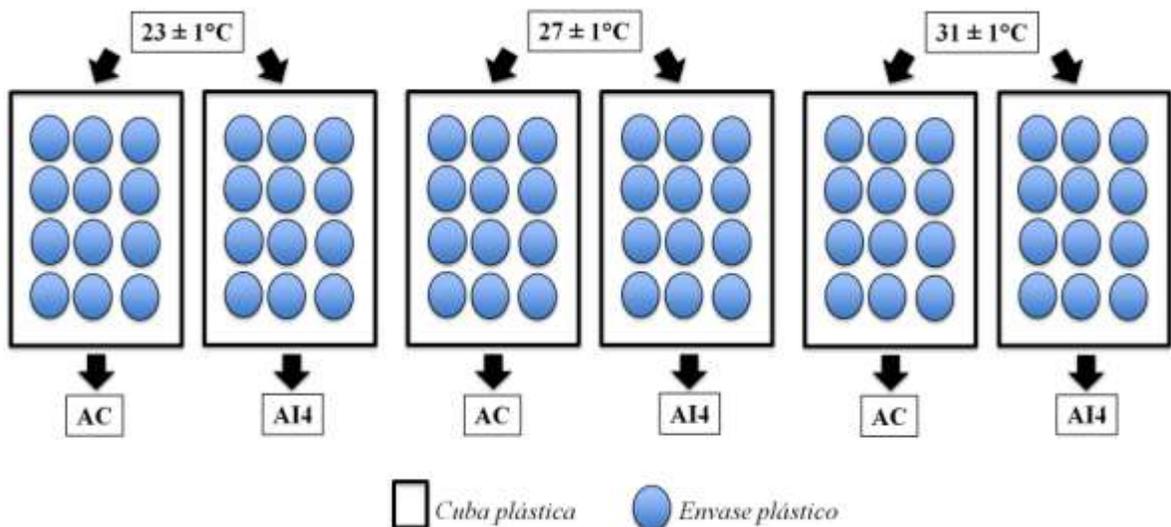


Figura 5.2. Esquema de los tratamientos evaluados en los juveniles de *C. quadricarinatus*.

El procedimiento experimental fue seleccionado en base a los resultados previamente presentados del Capítulo 5.

5.3.3. Variables registradas, cálculos y análisis

La masa corporal (en base húmeda) fue registrada los días 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90. Al finalizar el periodo de restricción y durante el periodo de recuperación varias réplicas de cada tratamiento fueron seleccionados aleatoriamente y los juveniles correspondientes a estas réplicas fueron sacrificados (previamente anestesiados con hielo) para la remoción de la glándula digestiva y pleon (abdomen) (Tabla 5.1). Sus masas fueron registradas para el cálculo de los índices órgano-somáticos. Las glándulas digestivas y músculos abdominales fueron inmediatamente almacenados en un freezer a -70°C después de la disección.

Tabla 5.1. Número de réplicas (cada réplica corresponde a un juvenil de la langosta *C. quadricarinatus*) utilizadas en cada tratamiento para el análisis de los índices órgano-somáticos durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación.

<i>Días</i>		1	45	60	75	90
23 ± 1°C	AC	8	9	9	9	9
	AI4	8	9	9	9	9
27 ± 1°C	AC	8	9	9	8	10
	AI4	8	9	9	9	10
31 ± 1°C	AC	9	9	9	9	9
	AI4	9	9	9	9	9

Para los análisis bioquímicos en la glándula digestiva, las réplicas (juveniles) fueron agrupadas para obtener un mínimo de masa necesaria y por lo tanto el número de réplicas fue menor (Tabla 5.2). A su vez, las réplicas correspondientes a los análisis bioquímicos en el músculo abdominal no fueron agrupadas pero se utilizó un menor número por una cuestión de practicidad a la hora del realizar los análisis (Tabla 5.3).

Tabla 5.2. Número de réplicas utilizadas en cada tratamiento para el análisis bioquímico en la glándula digestiva durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación (varias de las réplicas corresponden al agrupamiento de 2 juveniles de la langosta *C. quadricarinatus*).

Días			1	45	60	75	90
Proteínas totales	23 ± 1°C	AC	3	4	5	5	4
		AI4	3	4	5	5	5
	27 ± 1°C	AC	3	4	5	5	5
		AI4	3	4	5	5	4
	31 ± 1°C	AC	3	4	4	5	5
		AI4	3	4	4	5	4
Lípidos totales	23 ± 1°C	AC	3	4	5	5	5
		AI4	3	4	5	5	5
	27 ± 1°C	AC	3	4	5	5	5
		AI4	3	4	5	5	5
	31 ± 1°C	AC	3	4	5	5	5
		AI4	3	4	4	5	4
Glucógeno	23 ± 1°C	AC	3	4	4	5	4
		AI4	3	4	4	5	5
	27 ± 1°C	AC	3	4	4	5	4
		AI4	3	4	4	5	4
	31 ± 1°C	AC	3	4	4	4	4
		AI4	3	4	3	4	3

Tabla 5.3. Número de réplicas (cada réplica corresponde a un juvenil de la langosta *C. quadricarinatus*) utilizadas en cada tratamiento para el análisis bioquímico en el músculo abdominal durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación.

Días			1	45	60	75	90
Proteínas totales	23 ± 1°C	AC	6	5	5	5	5
		AI4	6	5	5	5	5
	27 ± 1°C	AC	6	5	5	5	5
		AI4	6	5	5	5	5
	31 ± 1°C	AC	6	5	5	5	5
		AI4	6	5	5	5	5
Lípidos totales	23 ± 1°C	AC	3	5	5	3	5
		AI4	3	5	5	3	5
	27 ± 1°C	AC	3	5	5	4	5
		AI4	3	5	4	5	5
	31 ± 1°C	AC	3	4	5	4	3
		AI4	3	5	5	3	4
Glucógeno	23 ± 1°C	AC	3	5	5	5	5
		AI4	3	5	5	4	5
	27 ± 1°C	AC	3	5	5	5	5
		AI4	3	5	5	5	5
	31 ± 1°C	AC	3	5	5	5	4
		AI4	3	5	4	3	4

Para los análisis enzimáticos de la glándula digestiva, se utilizó el sobrenadante de las muestras provenientes de la extracción de proteínas totales de la glándula digestiva.

Teniendo como prioridad la determinación de las proteasas debido a los resultados del capítulo anterior, se utilizó un mayor número de réplicas en cada tratamiento para dicha enzima. Por ello, fueron utilizadas 3 réplicas en la determinación de las lipasas y en varios casos para la determinación de las amilasas el número de réplicas fue menor a 3, por faltante de material (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Número de réplicas utilizadas en cada tratamiento para el análisis enzimático en la glándula digestiva durante el periodo inicial, final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación.

		<i>Días</i>	45	60	75	90
Proteasas	23 ± 1°C	AC	4	5	5	4
		AI4	4	5	5	5
	27 ± 1°C	AC	4	5	5	5
		AI4	4	5	5	4
	31 ± 1°C	AC	4	4	5	5
		AI4	4	4	5	4
Lipasas	23 ± 1°C	AC	3	3	3	3
		AI4	3	3	3	3
	27 ± 1°C	AC	3	3	3	3
		AI4	3	3	3	3
	31 ± 1°C	AC	3	3	3	3
		AI4	3	2	3	3
Amilasas	23 ± 1°C	AC	3	3	3	2
		AI4	2	3	3	3
	27 ± 1°C	AC	3	3	3	2
		AI4	3	3	3	3
	31 ± 1°C	AC	3	2	2	4
		AI4	3	1	3	2

Los cálculos realizados fueron:

- (1) Tasa de crecimiento específico (**TCE, %/día**) = $[\ln(\text{masa final}) - \ln(\text{masa inicial}) / (\text{tiempo})] * 100$.
- (2) Supervivencia (**S, %**) = $[\text{número de individuos vivos al finalizar cada periodo experimental} / \text{número de individuos vivos al iniciar cada periodo experimental}] * 100$.
- (3) Frecuencia de individuos que mudaron durante el periodo de recuperación (**FM, %**) = $[\text{número de individuos que mudaron al siguiente estadio} / \text{número de individuos en el estadio anterior}] * 100$.
- (4) Índice de la glándula digestiva húmeda (**IGD h, %**) = $[\text{masa de la glándula digestiva fresca} / \text{masa corporal total}] * 100$.
- (5) Índice relativo del pleon (**IRP, %**) = $[\text{masa de pleon húmeda} / \text{masa corporal total}] * 100$.
- (6) Conversión alimenticia aparente (**CA apar**) = $[\text{total del alimento consumido} / \text{ganancia absoluta en masa}]$.
- (7) Eficiencia proteica (**EP apar**) = $[\text{ganancia absoluta en masa} / \text{total de proteína dietaria consumida}]$.
- (8) Ingesta de alimento (**IA, % de la masa corporal/ día**) = $[\text{consumo de alimento en base seca} / (\text{masa corporal inicial} + \text{masa corporal final} / 2) * \text{tiempo}] * 100$.

Para cálculos de las variables IA, CA y EP fueron considerados solamente los datos de los juveniles que mudaron durante el periodo de recuperación.

Al empezar la fase de recuperación, 13 o 14 juveniles de cada tratamiento fueron seleccionados aleatoriamente con el propósito de evaluar la ocurrencia de la hiperfagia en esta etapa. Para ello, la cantidad de alimento ofrecida fue diariamente registrada. Después de 1 hora el alimento no consumido fue recolectado, secado en una estufa a 60 °C hasta lograr masa constante y otra vez registrado. La ingesta de alimento fue estimada a través de la diferencia (en base seca) entre la cantidad de alimento suministrada y la cantidad de alimento no consumido.

La supervivencia de los juveniles durante el periodo de restricción fue basada en los 50 juveniles iniciales por cada tratamiento y a partir del periodo de recuperación fue basada en los 13 o 14 juveniles seleccionados (dependiendo del tratamiento) para medir la ingesta de alimento.

Al final del periodo de restricción y durante el periodo de recuperación, un total de 4 glándulas digestivas por cada tratamiento, fueron fijadas en la solución acuosa de Bouin para análisis histológico. Los métodos descriptos para la determinación de proteínas totales y lípidos totales están descriptos en detalle en el Capítulo 4 (sección Análisis bioquímico). El glucógeno fue determinado por el método de Antrona (Van Handel 1965) y las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 620 nm. Los métodos descriptos para la determinación de la actividad de las enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas) están descriptos en detalle en el Capítulo 4 (sección Análisis bioquímico).

5.3.4. Análisis estadístico

Los valores expresados para cada variable fueron los promedios de las réplicas con su error estándar. Las diferencias entre promedios fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$. El programa estadístico utilizado fue el INFOSTAT (Infostat version 2014, Grupo Infostat, FCA-UNC, Argentina).

El diseño experimental fue el completamente aleatorizado (DCA). Fueron aplicadas pruebas paramétricas como el Análisis de Varianza – ANOVA factorial después del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los residuos a las variables: masa corporal, TCE, IGD, IRP, CA apar, EP apar, reservas energéticas (proteínas totales, lípidos totales y glucógeno) y actividad de las enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas). Cuando fue necesario los datos fueron log-transformados para cumplir con dichos supuestos. En el caso de incumplimiento de los supuestos, fue aplicada la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis modificada por Scheirer et al. (1976). Las comparaciones múltiples entre los tratamientos fueron realizadas a través del test de LSD (Zar 1999).

En el caso de la variable IA, fue aplicado el ANOVA factorial en un diseño de medidas repetidas (DMR) utilizando Modelos Mixtos (Gómez et al. 2012). En dicho análisis, los factores fijos fueron el régimen alimenticio, la temperatura y el tiempo y el factor aleatorio fue la unidad experimental (cada juvenil individualizado en el ensave plástico). Las comparaciones múltiples entre regímenes alimenticios fueron realizadas a través del test de LSD.

Los datos categóricos como supervivencia y frecuencia de individuos que mudaron fueron analizados a través de una tabla de contingencia utilizando la prueba del Chi-cuadrado de Pearson (Zar 1999).

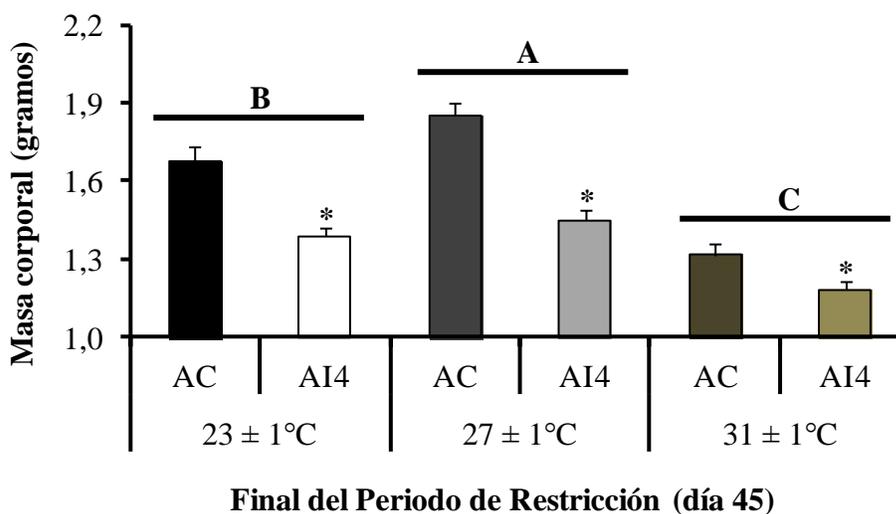
5.4. Resultados

Al final del periodo de restricción la supervivencia fue similar entre los tratamientos ($\chi^2_{5; 0,95} = 7,16; P = 0,2934$), siendo de 100% y 98% para los juveniles expuestos a AC y AI4, respectivamente, a los 23°C, de 92% y 94% para los juveniles expuestos a AC y AI4, respectivamente, a los 27°C y de 98% y 96% para los juveniles expuestos a AC y AI4, respectivamente, a los 31°C. Al final del periodo de recuperación la supervivencia también fue similar entre los tratamientos, siendo de 100% para los juveniles expuestos a AC y AI4 a los 23°C y 27°C, y de 92% para los juveniles expuestos a AC y AI4 a los 31°C ($\chi^2_{5; 0,95} = 9,19; P = 0,0844$).

Al final del periodo de restricción, los juveniles del tratamiento AI4 presentaron menor masa corporal en relación al control AC (efecto del régimen alimenticio; $F_{1,283} = 56,11; P < 0,001$). Por otro lado, los juveniles expuestos a las temperaturas baja y alta fueron menores que los juveniles expuestos a una condición de temperatura óptima (Figura 5.3a).

Al final del periodo de recuperación, los juveniles previamente restringidos recuperaron completamente su masa corporal a niveles del control y solo persistió el efecto de la temperatura ($F_{2,108} = 25,11; P < 0,0001$). Los juveniles expuestos a la temperatura alta tuvieron menor masa corporal que aquellos juveniles expuestos a las temperaturas baja y óptima (Figura 5.3b).

(a)



(b)

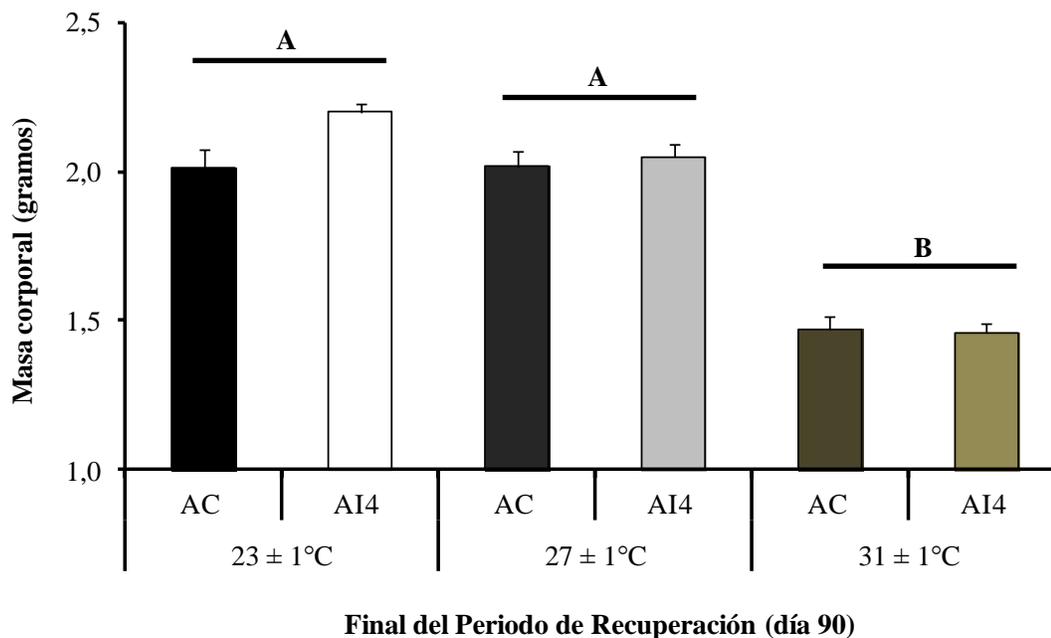


Figura 5.3. Crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus*. (a) Al final del periodo de restricción y (b) al final del periodo de recuperación. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios. AI4: alimentación por 4 días + inanición por 4 días y AC: alimentación continua.

La frecuencia de individuos que mudaron durante el periodo de recuperación no difirió estadísticamente entre los tratamientos ($\chi^2_{5;0,95} = 2,81$; $P = 0,7295$). Sin embargo, el 57% de los juveniles del tratamiento AI4 mudaron en relación al 38% de los juveniles del control en la temperatura de 23°C y la misma tendencia fue observada en la temperatura de 27°C, donde el 43% de los juveniles mudaron en el tratamiento AI4 en relación al 36% de los juveniles del control. Por otro lado, en la temperatura de 31°C la misma cantidad de juveniles mudaron (31%) en ambos regímenes alimenticios. Es importante destacar que cada juvenil que mudó, lo hizo una sola vez durante los 45 días del periodo de recuperación.

La tasa de crecimiento específico en el periodo de recuperación fue afectada por el régimen alimenticio ($F_{1,108} = 9,06$; $P = 0,0032$) y se observó un mayor crecimiento en los juveniles previamente restringidos (Figura 5.4). Por otro lado, la temperatura también tuvo efecto en la TCE ($F_{2,108} = 19,74$; $P < 0,0001$) y se observó un menor valor en los juveniles expuestos a 31°C (Figura 5.4).

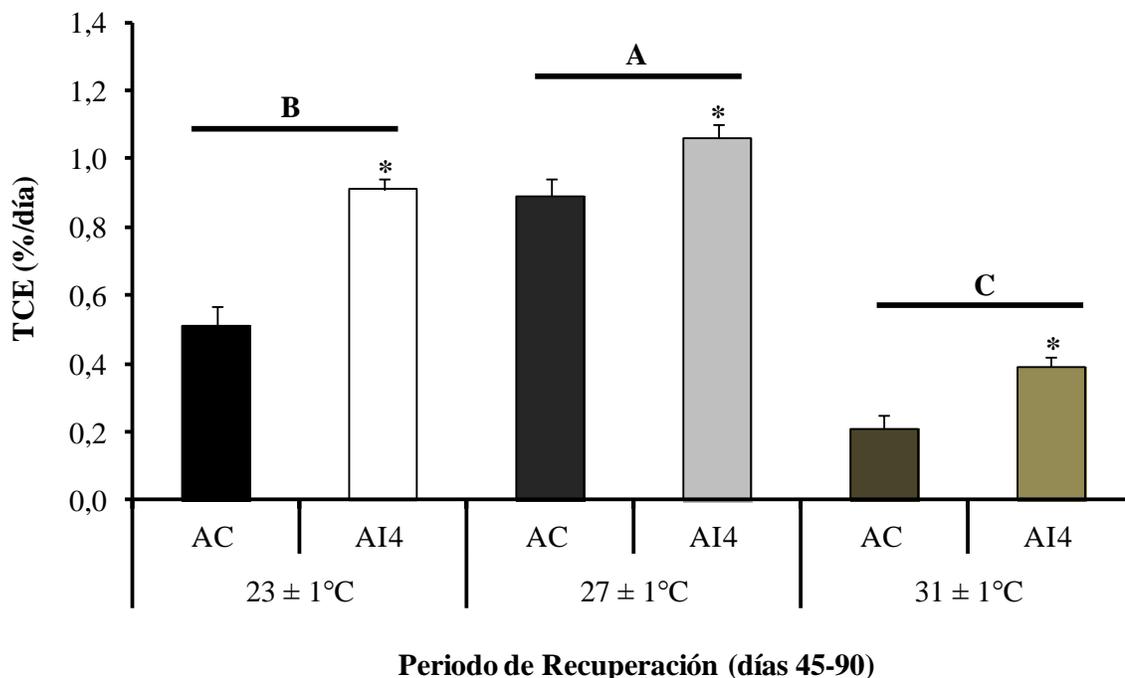


Figura 5.4. Tasa de crecimiento específico (TCE) de los juveniles de *C. quadricarinatus* después de 45 días de alimentación diaria (periodo de recuperación). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los regímenes alimenticios para cada temperatura. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

En relación a la ingesta de alimento durante la fase de recuperación, se observó un efecto de la interacción entre el régimen alimenticio y el tiempo ($F_{2,50} = 4,50$; $P = 0,0159$), además de un efecto de la temperatura ($F_{2,25} = 12,31$; $P = 0,0002$). Por un lado, los juveniles previamente restringidos mostraron comportamiento hiperfágico durante la primera quincena del periodo de recuperación (Figura 5.5). Por otro lado, los juveniles expuestos a 31°C ingirieron más alimento en relación a su masa corporal que los juveniles expuestos a 23°C y 27°C (Figura 5.5).

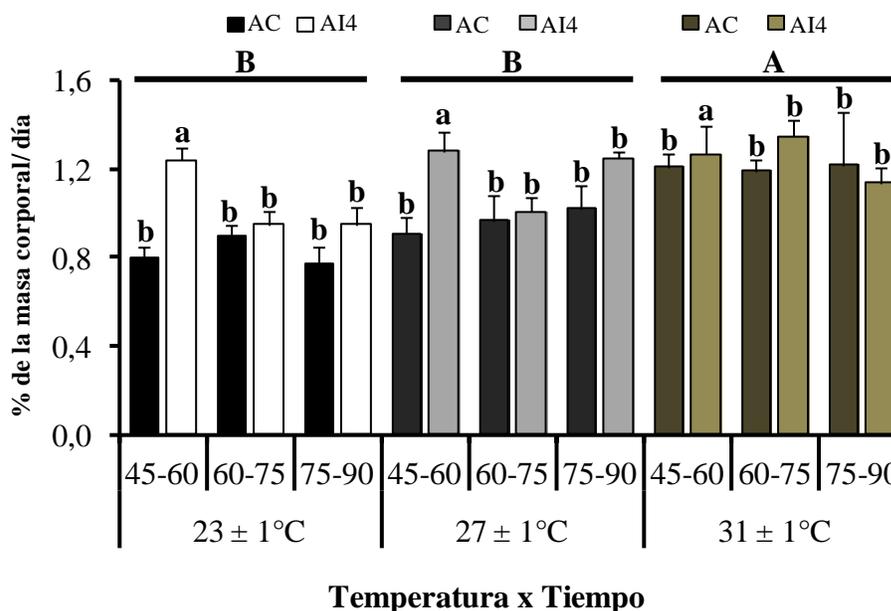


Figura 5.5. Ingesta de alimento de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo de recuperación. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen de alimentación y tiempo (efecto de la interacción). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3. Se observó un efecto del régimen alimenticio ($H_1= 9,60$; $P= 0,002$) y de la temperatura ($H_2= 11,72$; $P= 0,002$) en la conversión alimenticia durante el período de recuperación (Tabla 5.5). Sin embargo, al realizar contrastes, no fueron detectadas diferencias entre los niveles de ambos factores. En cuanto a la eficiencia proteica, esta fue similar entre los regímenes alimenticios ($F_{1,25}= 2,17$; $P= 0,1525$) y temperaturas ($F_{2,25}= 1,99$; $P= 0,1573$).

Tabla 5.5. Conversión alimenticia aparente (CA apar) y eficiencia proteica aparente (EP apar) en los juveniles de *C. quadricarinatus* después de 45 días de alimentación diaria (periodo de recuperación).

		CA apar	EP apar
23 ± 1°C	AC	3,67 ± 2,41	1,37 ± 0,48
	AI4	1,37 ± 0,26	1,83 ± 0,23
27 ± 1°C	AC	1,26 ± 0,06	1,64 ± 0,08
	AI4	1,16 ± 0,07	1,82 ± 0,12
31 ± 1°C	AC	2,47 ± 0,73	0,96 ± 0,22
	AI4	1,96 ± 0,77	1,34 ± 0,39

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

En el índice de la glándula digestiva en base húmeda se observó un efecto de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo ($F_{4,239}= 2,74$; $P= 0,0290$) (Figura 5.6). Al final del periodo de restricción (día 45), el IGD de los juveniles expuestos a AI4 fue menor que el de AC. Transcurrida la primera quincena del periodo de recuperación (día 60) se observó que el IGD en los juveniles previamente restringidos se equiparó al IGD de los juveniles del control, pero, al día 75 dicho valor fue mayor en el tratamiento AI4 y así se mantuvo hasta el final del experimento (aunque estadísticamente no fue significativo).

Por otro lado, el IGD también fue afectado por la interacción entre temperatura y tiempo ($F_{8,239}= 2,72$; $P= 0,0071$) (Figura 5.6). Después del periodo de aclimatación (día 1), los juveniles expuestos a la temperatura de 23 °C presentaron mayor valor que aquellos juveniles expuestos a las temperaturas de 27°C y 31°C, sin embargo, al final del periodo de restricción (día 45), el IGD fue mayor en juveniles expuestos a 27°C. Transcurrida la primera quincena del periodo de recuperación (día 60), el índice en los juveniles expuestos a 23°C se equipararon al índice en los juveniles expuestos a 27 °C y ambos fueron mayores que el IGD de los juveniles expuestos a 31°C hasta finalizar el experimento.

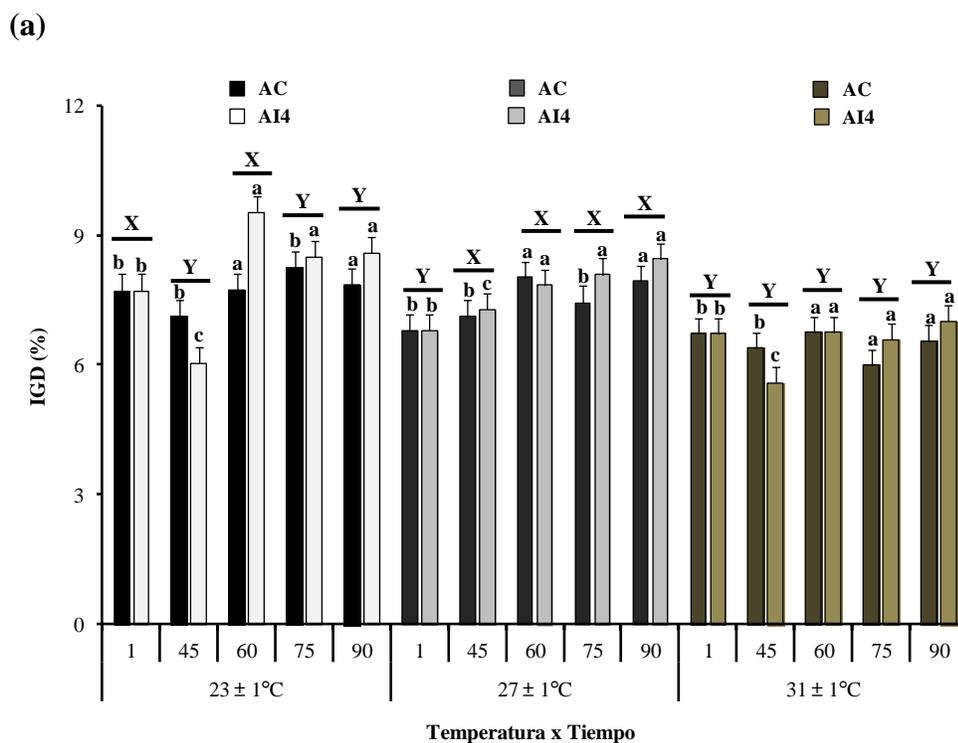


Figura 5.6. Índice de la glándula digestiva (IGD) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. Las letras minúsculas indican el efecto de la interacción entre régimen alimenticio y tiempo. Las letras “X,Y” indican el efecto de la interacción entre temperatura y tiempo. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

El índice relativo del pleon en base húmeda fue afectado independientemente por el tiempo ($F_{4,239}= 6,43$; $P< 0,0001$) y por la temperatura ($F_{2,239}= 4,91$; $P= 0,0081$) (Figura 5.7). En cambio, no se detectó un efecto del régimen alimenticio sobre dicho índice ($F_{1,239}=$

0,21; $P= 0,6462$). Por un lado, el menor valor de IRP fue al inicio del experimento (día 1), pero al día 45 este valor incrementó y se mantuvo estable hasta terminar el experimento (día 90). En cuanto al efecto de la temperatura, en los juveniles a 27°C se registraron valores levemente superiores cuando fueron comparados con los juveniles expuestos a las temperaturas de 23°C y 31°C (Figura 5.7).

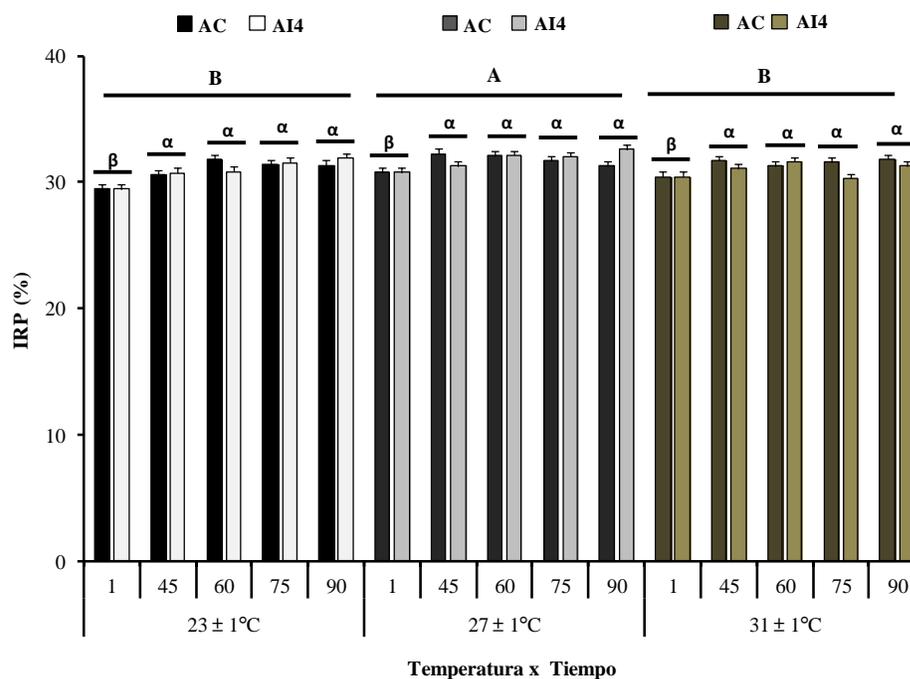


Figura 5.7. Índice relativo del pleon (IRP) de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. Las letras griegas indican diferencias significativas entre tiempos. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

En la caracterización histológica de la glándula digestiva, solamente se observaron alteraciones en los juveniles del tratamiento AI4 expuestos a la temperatura alta y al finalizar el periodo de restricción (Figura 5.8b). Estos juveniles presentaron un mayor espacio intertubular en relación a su control (Figura 6.8a), sin embargo, al finalizar el periodo de recuperación dicha alteración no fue observada (Figura 5.8c, d). En las demás temperaturas no se registraron alteraciones histológicas entre los regímenes alimenticios.

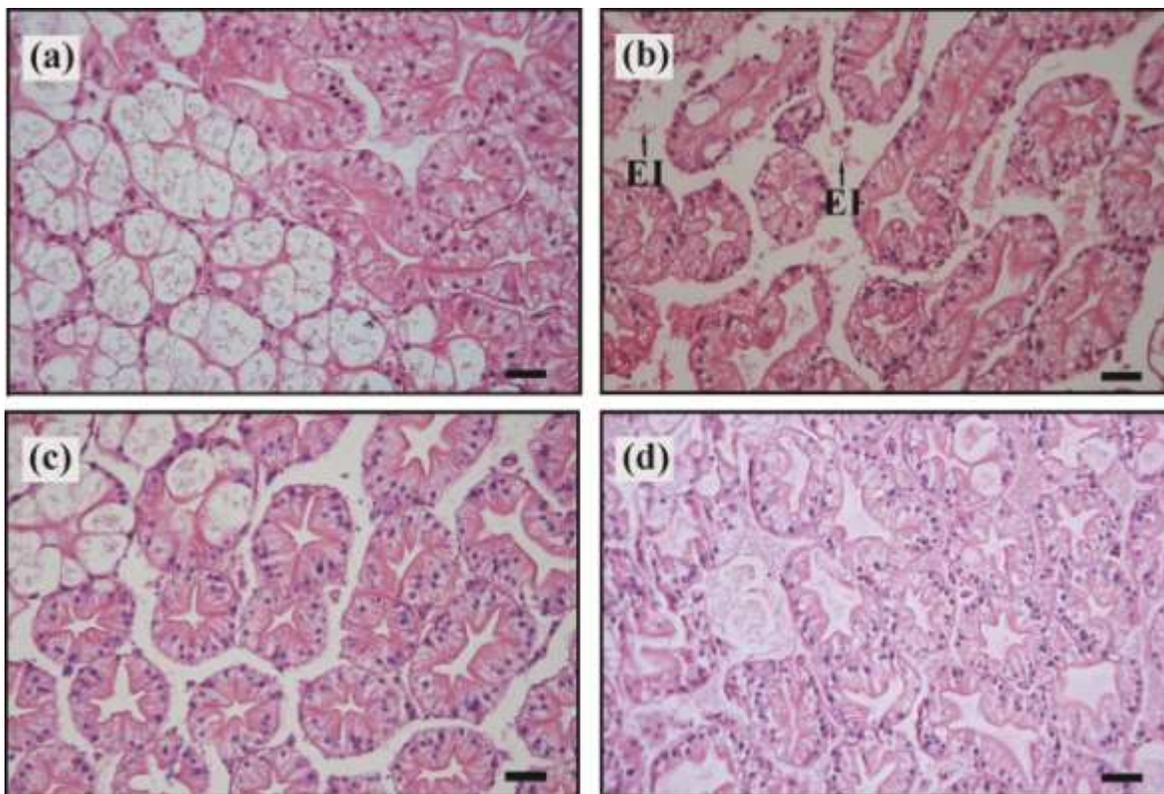


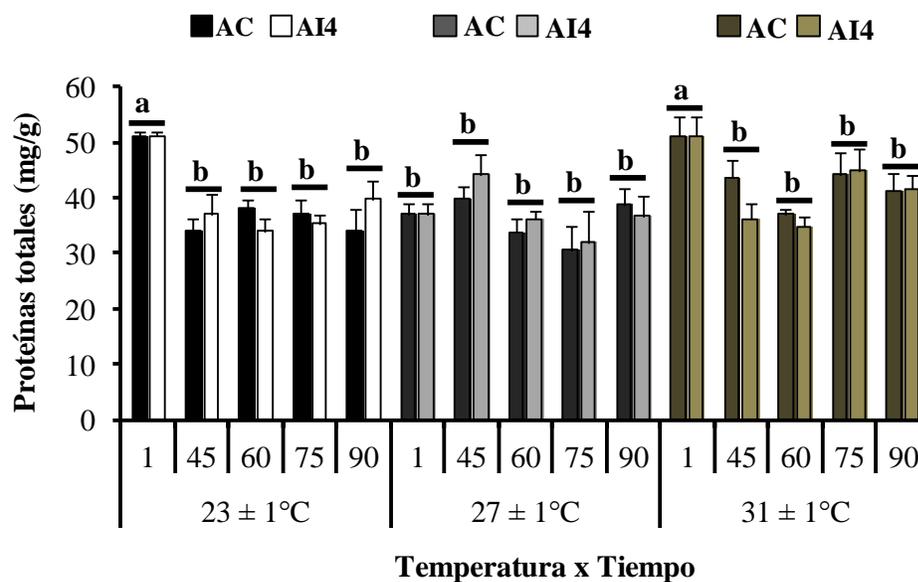
Figura 5.8. Secciones histológicas de la glándula digestiva de juveniles *C. quadricarinatus* expuestos a la temperatura de $31 \pm 1^\circ\text{C}$. (a) AC al finalizar el periodo de restricción, (b) AI4 al finalizar el periodo de restricción, (d) AC al finalizar el periodo de recuperación y (e) AI4 al finalizar el periodo de recuperación. EI: espacio intertubular. Barras de escala = 50 μm . La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

En la glándula digestiva fueron observadas concentraciones similares de proteínas totales entre los regímenes alimenticios ($F_{1,97} = 0,00$; $P > 0,9999$) mientras que la interacción entre temperatura y tiempo ($F_{8,97} = 3,76$; $P = 0,0007$) tuvo un efecto en la concentración de dicho nutriente (Figura 5.9a). Al empezar el experimento (día 1) los juveniles que fueron aclimatados a las temperaturas baja y alta, presentaron una mayor concentración de proteínas en sus glándulas digestivas que aquellos los juveniles aclimatados a la óptima temperatura. Es posible que haya ocurrido un efecto de la aclimatación en dicha variable ya que durante el restante del experimento los valores fueron similares en todas las temperaturas ensayadas.

La concentración de proteínas totales en el músculo abdominal también fue afectada por la interacción entre temperatura y tiempo ($F_{1,97} = 0,00$; $P = 0,0073$) y fue similar entre los regímenes alimenticios ($F_{1,124} = 0,42$; $P = 0,5179$) (Figura 5.9b). Al empezar el experimento (día 1) los juveniles que fueron aclimatados a la temperatura baja, presentaron una mayor concentración de proteínas que aquellos los juveniles aclimatados a las temperaturas óptima y alta pero al día 45 estos valores fueron similares entre las temperaturas. Al día 75, los juveniles expuestos a 31°C presentaron una mayor

concentración de proteínas que aquellos los juveniles expuestos a 23°C y 27°C pero al finalizar el experimento estos valores se equipararon.

(a)



(b)

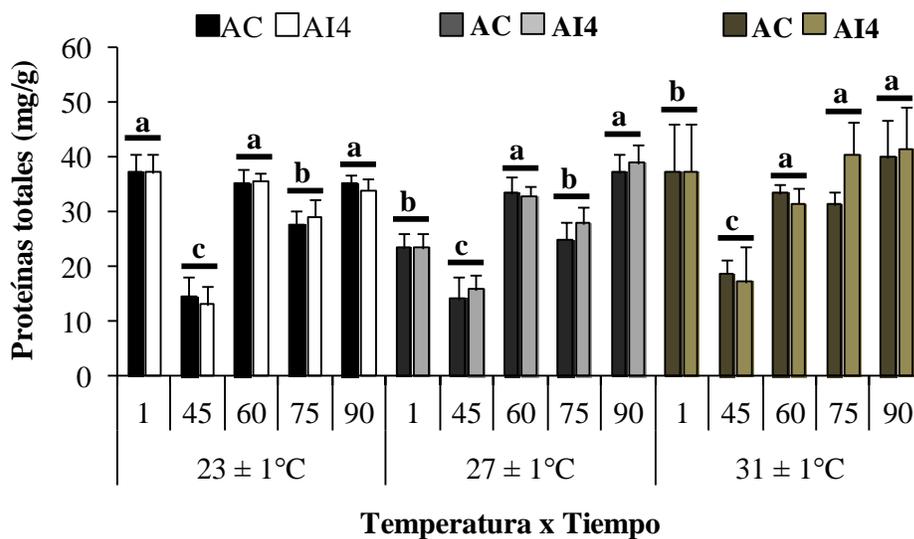


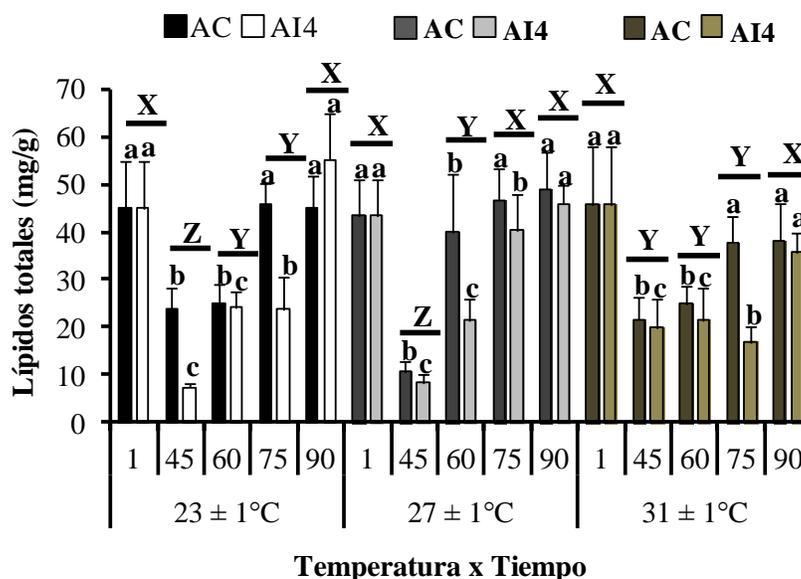
Figura 5.9. Concentración de proteínas totales en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. (a) En la glándula digestiva y (b) en el músculo abdominal. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperatura y

tiempo (efecto de la interacción). La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

La concentración de lípidos totales en la glándula digestiva fue afectada por la interacción entre el régimen alimenticio y el tiempo ($F_{4,99} = 2,76$; $P = 0,0317$) y por la interacción entre temperatura y tiempo ($F_{8,99} = 2,80$; $P = 0,0077$). Por un lado, se observó una menor concentración de este nutriente en los juveniles previamente restringidos, al finalizar el periodo de restricción (día 45) y durante los primeros 30 días del periodo de recuperación (días 60 y 75) (Figura 5.10a). Sin embargo, en los siguientes quince días de alimentación, estos juveniles pudieron recuperarse completamente y alcanzaron la concentración de lípidos del control (Figura 5.10a). Por otro lado, en la interacción entre temperatura y tiempo se observó que en todas las temperaturas ensayadas, que los juveniles empezaron el experimento con una alta concentración de lípidos en la glándula digestiva pero ésta se redujo fuertemente al día 45. Finalmente los juveniles alcanzaron los niveles iniciales de lípidos al día 90.

En cuanto a los lípidos totales en el músculo abdominal, éstos fueron afectados por el tiempo ($F_{4,92} = 27,20$; $P < 0,0001$), donde se observaron mayores concentraciones al empezar el experimento (día 1) y con el tiempo este valor se redujo fuertemente presentando al día 90 un 70% menos que la concentración inicial (Figura 5.10b).

(a)



(b)

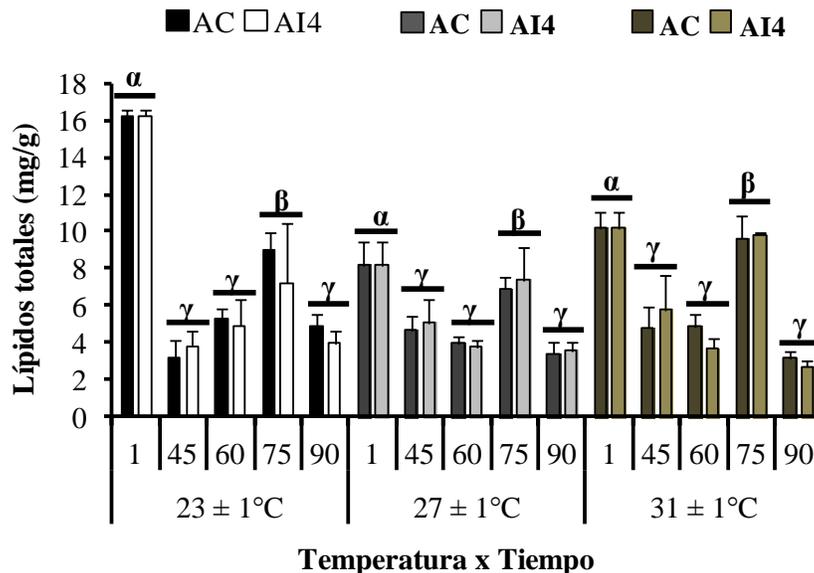
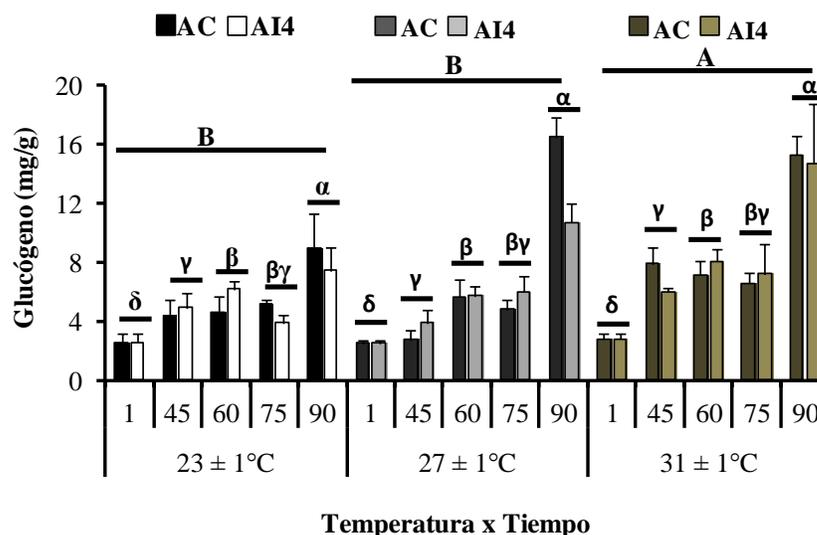


Figura 5.10. Concentración de lípidos totales en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. (a) En la glándula digestiva y (b) en el músculo abdominal. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre régimen alimenticio y temperatura (efecto de la interacción). Las letras “X,Y,Z” indican diferencias significativas entre temperatura y tiempo (efecto de la interacción). Las letras griegas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

La concentración de glucógeno en la glándula digestiva fue afectada por la temperatura ($H_2= 9,20$; $P= 0,0100$) y el tiempo ($H_4= 59,54$; $P< 0,0001$) (Figura 5.11a). Por un lado, se observó que los juveniles expuestos a la temperatura alta presentaron una mayor concentración del nutriente que aquellos juveniles expuestos a las temperaturas baja y óptima. En cuanto al efecto del tiempo, la concentración de glucógeno en la glándula digestiva fue incrementado (Figura 5.11a).

La concentración de glucógeno en el músculo abdominal fue afectada por el tiempo ($H_4= 23,85$; $P< 0,0001$). Se observó menor concentración al empezar el experimento (día 1) que se incrementó con el tiempo (Figura 5.11).

(a)



(b)

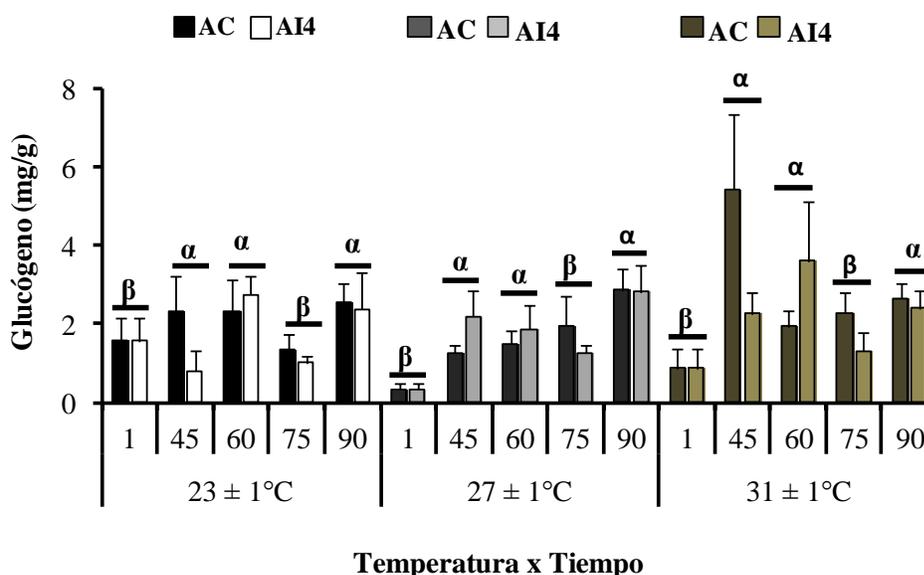
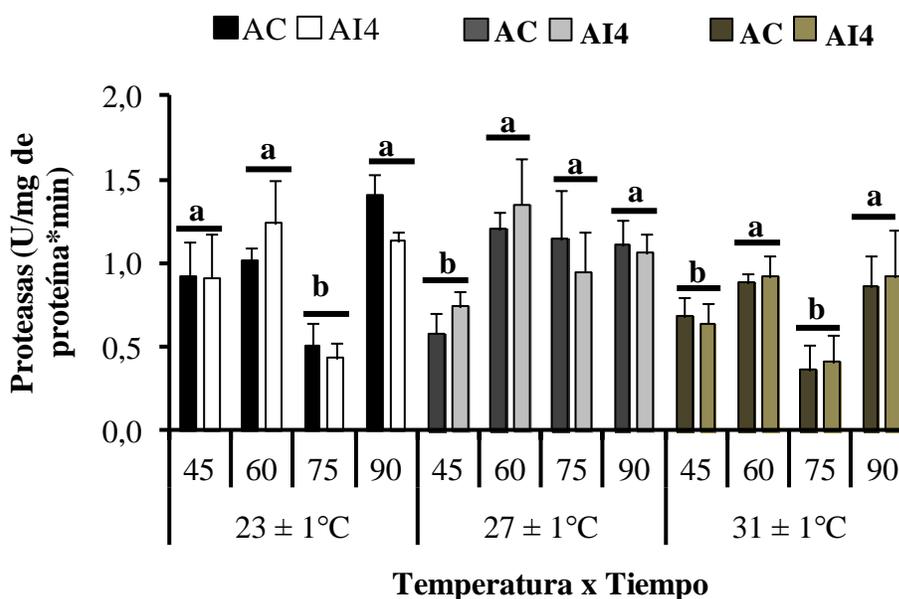


Figura 5.11. Concentración de glucógeno en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. (a) En la glándula digestiva y (b) en el músculo abdominal. Las letras mayúsculas ubicadas por encima de cada barra indican diferencias significativas entre tiempos. Las letras griegas indican diferencias significativas tiempos. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

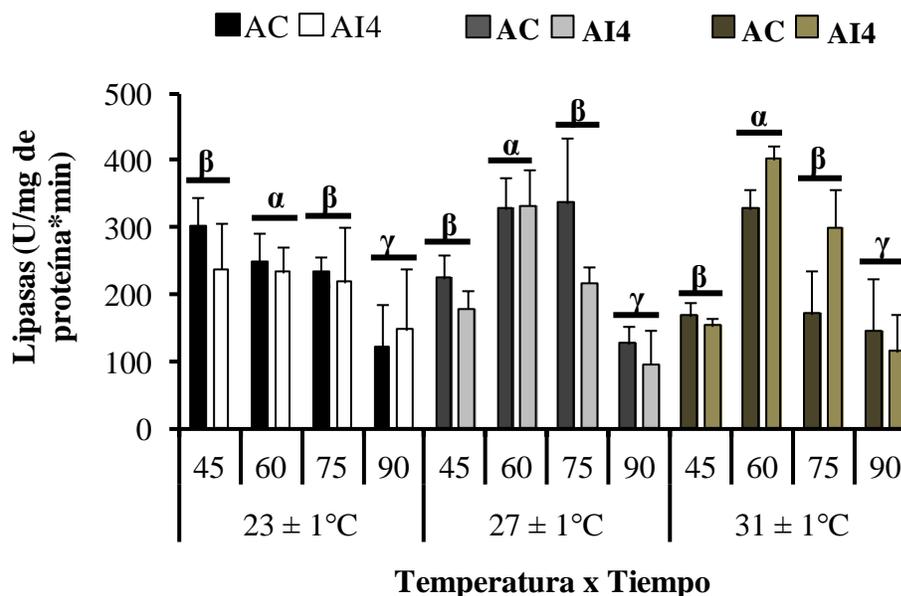
En cuanto a la actividad de las enzimas digestivas, no se observaron diferencias entre los regímenes alimenticios al final del periodo de restricción ni en las etapas siguientes del

periodo de recuperación. Sin embargo, los otros dos factores tuvieron un efecto sobre las enzimas digestivas. Por un lado, la actividad de las proteasas tuvo un efecto de la interacción entre temperatura y tiempo ($F_{6,85} = 2,90$; $P = 0,0127$) con una mayor actividad observada en los juveniles expuestos a la temperatura de 23°C al día 45 y a 27°C al día 75. Sin embargo, los juveniles presentaron una similar actividad en todas las temperaturas ensayadas al finalizar el experimento (Figura 5.12a). La actividad de las lipasas tuvo un efecto del tiempo ($H_4 = 25,31$; $P < 0,0001$), siendo observada una mayor actividad en los juveniles al día 60 y una menor actividad al día 90 (Figura 5.12b). Por otro lado, la actividad de las amilasas fue afectada por la temperatura ($H_2 = 0,17$; $P = 0,0237$) siendo observada una mayor actividad en los juveniles expuestos a 31°C (Figura 5.12.c).

(a)



(b)



(c)

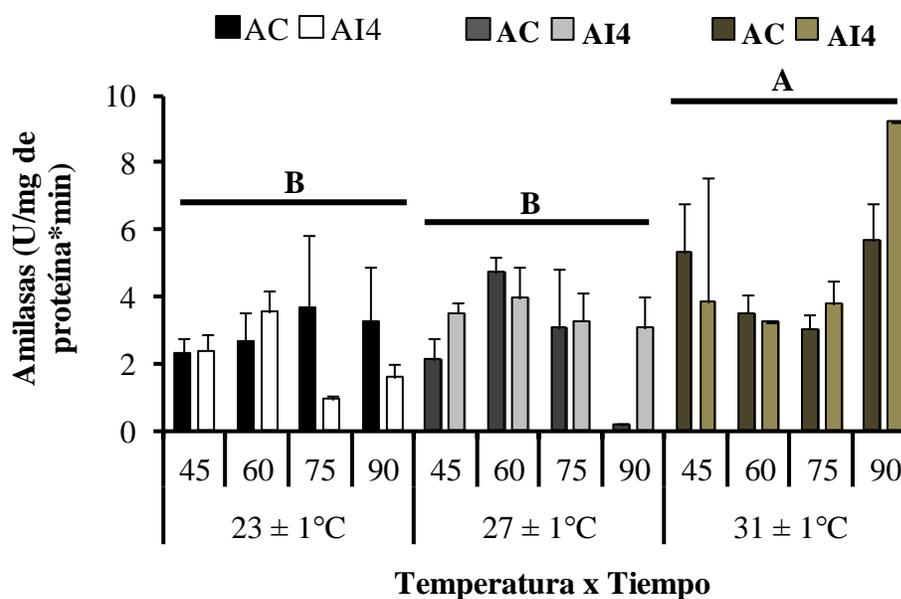


Figura 5.12. Actividad de las enzimas digestivas en los juveniles de *C. quadricarinatus* durante el periodo experimental. (a) Proteasas, (b) lipasas y (c) amilasas. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperatura y tiempo (efecto de la interacción). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas. Las letras griegas indican diferencias significativas entre tiempos. La descripción de los regímenes alimenticios se encuentra en el epígrafe de la figura 5.3.

5.5. Discusión

El presente capítulo constituye el primer trabajo en que los juveniles de *C. quadricarinatus* demostraron **ser capaces de presentar el crecimiento compensatorio expuestos a distintas temperaturas**. Estos resultados llevan a **rechazar la hipótesis de trabajo 6.1**, la cual predice que la capacidad de respuesta compensatoria en los juveniles es modulada por la temperatura. Los mecanismos propuestos como la base fisiológica de la respuesta compensatoria en los peces son: un mayor consumo de alimento y una mayor eficiencia en conversión alimenticia y pueden ocurrir simultáneamente o no (Dobson y Holmes 1984; Ali et al. 2003; Tian y Qin 2004; Heide et al. 2006; Picha et al. 2006; Huang et al. 2008; Jobling 2010; Picha et al. 2014). La hiperfagia permite que un organismo que sufrió episodios de escasez de alimento, pueda ingerir la misma o mayor cantidad de alimento acumulativo que aquél organismo que accedió continuamente al alimento y por consiguiente, pueda alcanzar la misma masa corporal (Ali et al. 2003). En el actual capítulo, los datos de los juveniles que mudaron durante el periodo de recuperación, **mostraron que el comportamiento hiperfágico puede ser un mecanismo que explique esta respuesta compensatoria**. Por otro lado, no fue observada una mayor conversión alimenticia en los juveniles que compensaron, aunque se necesitaría un análisis con más réplicas para corroborar dicha afirmación.

No hay registros de estudios de crecimiento compensatorio en crustáceos de que la hiperfagia y la mayor conversión alimenticia ocurran simultáneamente durante un periodo de recuperación. Por ejemplo, en estudios realizados para estimular la recuperación del crecimiento en el camarón marino *F. chinensis* se ha observado que la respuesta compensatoria con recuperación completa fue alcanzada a través de la hiperfagia pero no fue observada una mayor eficiencia en la conversión alimenticia, proteica y energética (Wu et al. 2000; Wu y Dong 2002a). Por otro lado, la misma respuesta compensatoria fue observada en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* y ésta fue asociada con una mayor eficiencia en la conversión alimenticia y proteica por Zhu et al. (2014) pero en el estudio de Wasielesky et al. (2013) no se observó esta mayor conversión alimenticia. Conviene resaltar que en ambos trabajos no se midió el consumo de alimento para determinar la ocurrencia de la hiperfagia. A su vez, en el camarón gigante de Malasia, *M. rosenbergii*, la respuesta compensatoria condujo a una recuperación parcial y completa y fue asociada a una mayor eficiencia en la conversión pero tampoco fue medida la hiperfagia (Singh y Balange 2007; Marques y Lombardi 2011).

En este sentido, los resultados del capítulo anterior mostraron que los juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* que compensaron, lograron ser más eficientes a la hora de convertir el alimento suministrado en ganancia de masa corporal y quizás en el presente capítulo esta respuesta no fue observada por dos motivos: 1) no todos los juveniles lograron mudar al siguiente estadio durante los 45 días de recuperación y 2) posiblemente la condición individual haya influenciado en este comportamiento ya que los organismos tenían un tamaño relativamente grande en un espacio pequeño.

Los resultados de las reservas energéticas de la glándula digestiva en el presente capítulo indicaron, por primera vez, que la energía provista durante un periodo prolongado de restricción alimenticia (45 días) fue a expensas de los lípidos totales y que la recuperación de tal impacto ocurrió después de los 45 días de alimentación diaria. En este

sentido, Jobling y Johansen (1999) proponen un modelo que relaciona la cantidad de lípidos corporales con la respuesta hiperfágica y concomitante crecimiento compensatorio, llamado *modelo lipostático*. Dicho modelo sugiere que: 1) una reducción en la deposición de los lípidos corporales resulta en una disminución en la relación entre los lípidos y masa corporal magra (conocida como *L/LBM: lipid/lean body mass*) y 2) una vez empezado el periodo de recuperación, esta relación sigue reducida durante el tiempo en que ocurre la hiperfagia y el crecimiento compensatorio hasta que alcance el nivel del control y entonces todas las anteriores respuestas cesan. Es interesante que en el presente experimento los niveles de los lípidos se mantuvieron bajos durante todo el periodo en que ocurrió la hiperfagia y el crecimiento compensatorio en los juveniles, sugiriendo que este tipo de respuesta puede estar regulada de acuerdo con dicho modelo pero futuros estudios deben ser realizados para verificar esta hipótesis. Por último, la utilización de las reservas de lípidos como un combustible metabólico fue verificada en otras especies de crustáceos como en el camarón marino *Penaeus esculentus* y en la langosta marina *Nephrops norvegicus* expuestos a periodos de inanición cortos (Dall 1981; Barclay et al. 1983) y de igual modo en el cangrejo *E. sinensis* y en la propia langosta *C. quadricarinatus* cuando fueron expuestos a un periodo de inanición prolongado (Wen et al. 2006; Calvo et al. 2013).

A propósito de la depleción de los lípidos en la glándula digestiva en juveniles del tratamiento AI4, esta respuesta puede estar relacionada con los mayores valores observados en el índice de la glándula digestiva (IGD) durante el periodo de recuperación, una vez que con el catabolismo y consecuente pérdida de materia seca ocurre una absorción de agua con el fin de mantener el volumen corporal y la turgencia interna del órgano (Stuck et al. 1996; Comoglio 2005; Wen et al. 2006; Watts et al. 2014).

Las temperaturas ensayadas en este capítulo estuvieron dentro del rango (16° a 32°C) que permite el crecimiento y la supervivencia de los juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* (Meade et al. 2002). De hecho, en el subtrópico argentino donde el cultivo de la especie puede ser llevado a cabo, las temperaturas anuales pueden alcanzar un valor promedio de 17,5°C en el invierno y de 30°C en el verano (Wicki et al. 2008). Acerca del efecto de la temperatura en el crecimiento de *C. quadricarinatus*, Tropea et al. (2010) observaron que una temperatura alta (31°C) no afectó el crecimiento de las hembras pero sí redujo el crecimiento en los machos después de un largo plazo de exposición (desde juveniles recién eclosionados hasta el estadio adulto). En el presente capítulo, con respecto al efecto de la temperatura, prácticamente todas las variables fueron afectadas por este factor, excepto los lípidos totales y glucógeno en el músculo abdominal, además de la actividad de las lipasas. En referencia al efecto de la temperatura alta, los juveniles expuestos a 31°C tuvieron el crecimiento reducido durante todo el periodo experimental y esta respuesta puede estar asociada a una menor eficiencia en la conversión alimenticia, ya ingirieron una mayor cantidad de alimento en relación a su masa corporal. Además, el menor índice de la glándula digestiva y las alteraciones en la histología refuerzan el impacto de esta alta temperatura en la condición nutricional de estos juveniles. Temperaturas elevadas también redujeron la utilización de nutrientes como las proteínas y lípidos en la trucha *Salvelinus fontinalis* (Amin et al. 2014). Otros efectos verificados en los juveniles de *C. quadricarinatus* expuestos a temperatura alta, fueron una mayor concentración de glucógeno en la glándula digestiva y una mayor actividad de las amilasas. En este sentido, Croll y Watts (2004) observaron un aumento en la eficiencia de la absorción de los carbohidratos dietarios en las langostas *P. clarkii* y *P. zonangalus*.

expuestas a 32°C y lo asociaron a una mayor necesidad de energía para el mantenimiento, a su vez relacionado con los cambios metabólicos ocasionados por la alta temperatura. Powell (2000) también observó en las mismas langostas, una habilidad mayor en absorber esta fuente de energía “más económica” en detrimento de un mayor metabolismo, consecuente de una temperatura elevada. Entonces, los resultados encontrados en los juveniles de *C. quadricarinatus* son coherentes con el efecto de la temperatura sobre el metabolismo de estos organismos.

Otro resultado interesante del presente capítulo fue que el crecimiento con la menor temperatura (23°C) fue similar al crecimiento con la temperatura considerada óptima para la especie (27°C), además, del mantenimiento de similar actividad de las enzimas digestivas en ambas temperaturas. Estos resultados están en desacuerdo con lo observado por Bowyer et al. (2012), cuyas actividades de las proteasas, lipasas y α -amilasa en el pez *Seriola lalandi* fueron reguladas hacia una menor actividad cuando fueron expuestos a una temperatura subóptima.

Finalmente, los resultados del capítulo sugieren que el protocolo de restricción alimenticia (alimentación-inanición por 4 días) durante un periodo prolongado (45 días) puede ser utilizado para promover crecimiento en condiciones subóptimas de temperatura, sin ocasionar un menor crecimiento y supervivencia de los juveniles.

CAPÍTULO 6

Discusión General

En la naturaleza, factores como la temperatura, cantidad y calidad del alimento tienen un gran efecto sobre el crecimiento de los organismos acuáticos. En los ecosistemas marinos la distribución del plancton es irregular y puede ser escasa durante los meses de invierno. En el caso de los ecosistemas lóticos de agua dulce, la producción de mesozooplankton puede ser baja o impredecible y los tiempos de residencia cortos. Por lo tanto, para hacer frente a estas fluctuaciones de alimento, los organismos acuáticos desarrollaron diferentes estrategias para sobrellevar este tipo de estrés y una de ellas es la capacidad de compensar la escasez de alimento con un alto crecimiento cuando la disponibilidad alimenticia se normaliza (Jobling 1994, Mommsen 1998; Jobling 2010; Nykänen 2006). Sin embargo, la habilidad de compensar también puede traer algunas desventajas al organismo como por ejemplo, un aumento en la susceptibilidad hacia los predadores, un aumento en la agresión por la competencia del alimento ocasionando injurias en los organismos, un aumento en el costo metabólico ocasionando muertes en condiciones hipóxicas, un desarrollo anormal, una reducción en las reservas de lípidos y una reducción en la inmunocompetencia y resistencia a las enfermedades (Ali et al. 2003; Johnsson y Bohlin 2006).

En la presente tesis se abordó por primera vez el estudio del crecimiento compensatorio en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, discutiéndose este proceso fisiológico con los pocos resultados reportados para otros crustáceos (Wu et al. 2000, 2001; Wu y Dong 2001, 2002a,b; Singh y Balange 2007; Wei et al. 2008; Zheng et al. 2008; Li et al. 2009; Marques y Lombardi 2011; Mazlum et al. 2011; Wasielesky et al. 2013; Zhu et al. 2014). En particular, la investigación fue orientada a definir si era posible inducir el crecimiento compensatorio mediante la aplicación de un protocolo de restricción (alimentación intermitente) en los estadios juveniles de esta especie.

Los resultados indicaron que los **juveniles de *C. quadricarinatus* presentan la capacidad de compensar periodos de restricción alimenticia ya sea moderado o prolongado, y que los mecanismos involucrados serían la hiperfagia y la mayor conversión alimenticia. La recuperación del crecimiento es total o parcial en los juveniles que compensan, siendo dependiente de la extensión del periodo de alimentación diaria después de la restricción.** De hecho, la aplicación de un período alimentación diaria post-restricción es una condición *imprescindible* para inducir la capacidad de compensar en esta especie. De acuerdo con los factores analizados y que podrían estar modulando el crecimiento compensatorio, se observó que **las dietas utilizadas** en el ensayo y con la característica de que son **altamente proteicas** para la especie, no afectan dicha capacidad así como las **tres temperaturas ensayadas** (inferior a la óptima, óptima y superior a la óptima) en la especie. **La talla** tampoco afecta la capacidad de compensar de los juveniles, sin embargo, estaría influyendo en la severidad de la respuesta del periodo restricción alimenticia y consecuentemente en el tiempo de recuperación.

La restricción alimenticia utilizada (alimentación intermitente) no causó alteraciones severas en la estructura, composición bioquímica y actividad de las enzimas digestivas de la glándula digestiva, lo que refleja que estos juveniles no quedan nutricionalmente deficientes después de este tipo de estrés. En este sentido, la alta supervivencia observada en los juveniles que compensan es otro indicador de que tanto la restricción alimenticia como la propia compensación no causan daños en el organismo.

Acerca de la búsqueda de un adecuado protocolo de restricción alimenticia para la inducción del crecimiento compensatorio en la etapa de desarrollo inicial de la langosta de

agua dulce *C. quadricarinatus*, los resultados del **Capítulo 2** mostraron que se debe considerar empezar dicha restricción con suministro de alimento dado que los juveniles III (recién independizados de la madre) son más resistentes en términos de crecimiento y supervivencia frente a este tipo de manejo alimenticio. Esta respuesta está asociada a la vulnerabilidad nutricional en la etapa de post-independencia de la madre (estadio III) (Calvo et al. 2009; García-Guerrero et al. 2003; Luo et al. 2008).

En el capítulo 3, se observó que el crecimiento compensatorio es débil, aunque existente, después de un periodo de restricción corto y con la inclusión de un periodo de alimentación diaria. Por otro lado, se observó que la alimentación intermitente, ya sea corta o prolongada, no es suficiente para inducir a la respuesta compensatoria en los juveniles de esta langosta pero aún así ellos muestran una alta tolerancia hacia este tipo de alimentación. A su vez, si los juveniles son previamente alimentados y presentan una condición nutricional adecuada, la alimentación intermitente prolongada no afecta su crecimiento pero esta condición no es suficiente para disparar el crecimiento compensatorio. En este sentido, la habilidad del juvenil de *C. quadricarinatus* de soportar un periodo de alimentación intermitente extenso puede ser explotada para lograr un protocolo que promueva el crecimiento compensatorio del siguiente modo: cuando es aplicada en juveniles III, la restricción alimenticia puede ser por un periodo moderado (mayor que 15 días) y cuando es aplicada en juveniles avanzados, puede ser más extensa (mayor que 30 días). La inclusión de un periodo de alimentación diaria adecuado después de un periodo de restricción es una condición necesaria para inducir al crecimiento compensatorio en esta especie.

Acerca de la inclusión de un periodo de recuperación después del periodo de restricción, se corrobora a través de los experimentos realizados en el **Capítulo 4** que este procedimiento debe ser lo suficientemente extenso para disparar el crecimiento compensatorio y lograr una recuperación completa del crecimiento y que el régimen alimenticio **AI4** resulta ser el manejo alimenticio adecuado para esta respuesta. Estas respuestas están asociadas a algunos de los factores que afectan el crecimiento compensatorio como son la severidad y extensión de la restricción alimenticia, así como la inserción de un periodo de recuperación adecuado (Xie et al. 2001; Zhu et al. 2004, 2005).

Los juveniles de *C. quadricarinatus* que compensaron la restricción alimenticia, lo hicieron independientemente de la dieta suministrada en los ensayos y independientemente de la talla, de acuerdo con los experimentos realizados en el **Capítulo 4**. Sin embargo, ambos factores pueden afectar el tiempo de recuperación del crecimiento previamente deprimido (Eroldogan et al. 2006, 2008; Gaylord y Gatlin 2001). La alimentación cíclica **AI4** no causa deterioro en la condición nutricional, dado que no ocasiona alteraciones en la estructura celular de la glándula digestiva, en la composición bioquímica de los principales órganos y en la actividad de las principales enzimas digestivas de los juveniles de *C. quadricarinatus*. La alta supervivencia de los juveniles expuestos a periodos de restricción alimenticia prolongados fue en detrimento de la masa corporal y el mantenimiento de una apropiada condición nutricional puede ser estratégico para que hacer frente a este tipo de estrés alimenticio (Gaylord y Gatlin 2001; Mazlum et al. 2011; Zhu et al. 2014).

Acerca de los mecanismos que explican el crecimiento compensatorio, los experimentos realizados en los **Capítulos 4 y 5**, mostraron que la hiperfagia, una mayor conversión alimenticia y una mayor eficiencia proteica pueden estar relacionadas a esta respuesta en la langosta de agua dulce (Ali et al. 2003, Bélanger et al. 2002, Jiwyam 2010, Sevgili et al. 2012, Xiao et al. 2013, Yengkokpam et al. 2014).

El protocolo de restricción-alimentación **AI4** aplicado a los juveniles en cultivo individual y grupal, fue un manejo alimenticio adecuado porque promovió el crecimiento compensatorio con la ventaja de utilizar una menor cantidad de alimento y esta reducción no comprometió la *performance* final de *C. quadricarinatus*. La aplicación de dicho protocolo puede ser realizada a una temperatura considerada baja (22-24°C) para el crecimiento de la especie, sin que genere inconvenientes.

Concluyendo, la presente tesis cumplió con los 3 objetivos propuestos: evaluó el crecimiento compensatorio en *C. quadricarinatus* y buscó un protocolo adecuado para su inducción (régimen alimenticio, extensión del periodo de restricción, inclusión o no de un periodo de recuperación) de acuerdo a la evaluación de algunos factores moduladores de esta respuesta como, severidad y extensión de la restricción, talla, condición nutricional, dieta, temperatura y condiciones de cultivo; y evaluó el impacto de la restricción en la calidad de agua.

En este sentido, el principal aporte de la presente tesis fue el desarrollo de un protocolo alimenticio para inducir la capacidad de crecimiento compensatorio de los juveniles de la langosta de agua dulce, utilizando menos cantidad de alimento y produciendo organismos de óptima calidad en un ambiente ecológicamente más saludable.

En función de todos los resultados se propone un protocolo de inducción al crecimiento compensatorio para aplicar en los juveniles de langosta de agua dulce con una masa inicial de 1g (inicio de la fase de *nursery*) cultivados bajo una alta densidad (21/m²): aplicación del régimen alimenticio **AI4**, es decir, intercalando 4 días de alimentación con 4 días de inanición, durante 45 días. Después de este periodo, se debe incluir un periodo de alimentación diaria de al menos 75 días, para lograr una recuperación completa del crecimiento. Con la aplicación de este protocolo se pudo ahorrar un 35% del alimento suministrado (en un tiempo total de 120 días).

Bibliografia

- Abolfathi, M., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Zamani, A. 2012. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in juvenile roach, *Rutilus rutilus caspicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*: 161,166–173.
- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4: 147–190.
- Álvarez, D., Nicieza, A.G. 2005. Compensatory response 'defends' energy levels but not growth trajectories in brown trout, *Salmo trutta* L. *Proceedings of the Royal Society B*, 272: 601-607.
- Amin, M.N., Katersky Barnes, R., Adams, L.R. 2014. Effect of temperature and varying level of carbohydrate and lipid on growth, feed efficiency and nutrient digestibility of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814). *Animal Feed Science and Technology*, 193: 111–123.
- Anger, K. 2001. *The biology of decapod crustacean larvae: Crustacean Issues*, Balkema, Lisse, The Netherlands.
- Anger, K., Lovrich, G., Thatje, S., Calcagno, J. 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 206: 217–230.
- Barclay, M.C., Dall, W., Smith, S.M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 68: 229–294.
- Bavčević, L., Klanjšček, T., Karamarko, V., Aničić, I., Legović, T. 2010. Compensatory growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) compensates weight, but not length. *Aquaculture*, 301: 57–63.
- Bélanger, F., Blier, P.U., Dutil, J.D. 2002. Digestive capacity and compensatory growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 121–128.
- Berillis, P., Simon, C., Sofos, F., Karapanagiotidis, I.T. 2013. A novel image processing method to determine the nutritional condition of lobsters. *Micron*, 45:140–144.
- Blanquet, I., Oliva-Teles, A. 2010. Effect of feed restriction on the growth performance of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles under commercial rearing conditions. *Aquaculture Research*, 41: 1255–1260.
- Boujard, T., Burel, C., Medale, F., Haylor, G., Moisan, A. 2000. Effect of past nutritional history and fasting on feed intake and growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Living Resources*, 13: 129–137.

Boyd, C.E., Tucker, C.S. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers Group, Norwell, Massachusetts.

Bowyer, J.N., Qin, J.G., Adams, L. R., Thomson, M.J.S., Stone, D.A.J. 2012. The response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. *Aquaculture*, 368-369: 19–28.

Bradford, M.M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.

Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. Pp 599–667 en Hoar, W.S., Randall, D.J. y Brett, J.R. (eds). *Fish Physiology, Bioenergetics and Growth*. Academic Press, Inc.

Bull, C.D., Metcalfe, N.B. 1997. Regulation of hyperphagia in response to varying energy deficits in overwintering juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 50: 498–510.

Calado, R., Dionisio, G., Bartilotti, C., Nunes, C., Santos, A., Dinis, M.T. 2008. Importance of light and larval morphology in starvation resistance and feeding ability of newly hatched marine ornamental shrimps *Lysmata* spp. (Decapoda: Hippolytidae). *Aquaculture*, 283: 56–63.

Calvo, N.S., Stumpf, L., López Greco, L.S. 2009. Effect of different feeding protocols in juveniles of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *World Aquaculture*, Mexico – 2009.

Calvo, N.S., Stumpf, L., Pietrokovsky, S., López Greco, L.S. 2011. Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 319: 355–362.

Calvo, N. S., Tropea, C., Anger, K., López Greco, L. S. 2012. Starvation resistance in juvenile freshwater crayfish. *Aquatic Biology*, 16: 287–297.

Calvo, N., Stumpf, L., Sacristán, H.J., López Greco, L. 2013. Energetic reserves and digestive enzyme activities in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* nearby the point-of-no return. *Aquaculture*, 416–417: 85–91.

Campaña-Torres, A., Martínez-Cordova, L. R., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R. 2005. In vivo dry matter and protein digestibility of three plant-derived and four animal-derived feedstuffs and diets for juvenile Australian redclaw, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 250(3): 748–754.

Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L.R., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R. 2006. Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*, 12(2): 103–109.

Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L.R., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R. 2008. Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for the pre-adult redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Research*, 39: 1115–1121.

Chaulet, A, Medesani, D., Freitas, J., Cervino, A., Cervino, N., Rodríguez, E. M. 2012. Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), by ecdysone and insulin growth factor. *Aquaculture*, 370: 1–6.

Cho, S. H. 2005. Compensatory Growth of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* L. and changes in biochemical composition and body condition indices during starvation and after refeeding in winter season. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36: 508–514.

Cho, S.H., Heo, T.Y. 2011. Effect of dietary nutrient composition on compensatory growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* using different feeding regimes. *Aquaculture Nutritional*, 17: 90–97.

Comoglio, L., Smolko y L., Amin, O. 2005. Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 140: 411–416.

Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., Martínez-Córdova, L. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture Nutritional*, 9: 207–213.

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

Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., Cruz-Suárez, L. E. 2004b. Studies on the nutrition of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens): effect of the dietary protein level on growth of juveniles and preadults. *Freshwater Crayfish*, 14: 70–80.

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

Croll, S., Watts, S. 2004. The effect of temperature on feed consumption and nutrient absorption in *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35: 478–488.

Cui, Z.H., Wang, Y., Qin, J.G. 2006. Compensatory growth of group-held gibel carp, *Carassius auratus*, following feed deprivation. *Aquaculture Research*, 37: 313–318.

- Dall W. 1981. Lipid absorption and utilization in the Norwegian lobster, *Nephrops norvegicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 50: 33–45.
- De Yta, A.G. 2009. Hatchery, nursery, nutrition and stock evaluation of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Tesis doctoral. Auburn University, Auburn, Alabama.
- Dobson, S.H., Holmes, R.M. 1984. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25: 649–656.
- Dong, G. F., Yang, Y. O., Yao, F., Wan, Q., Yu, L., Zhou, J. C., Li, Y. 2013. Responses of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson) to low-protein diets and subsequent recovery. *Aquaculture Nutrition*, 19(3): 430-439.
- Eroldogan, O.T., Kumlu, M., Kiris, G.A., Sezer, B. 2006. Compensatory growth response of *Sparus aurata* following different starvation and refeeding protocols. *Aquaculture Nutritional*, 12: 203–210.
- Eroldogan, O.T., Tasbozan, O., Tabakoglu, S. 2008. Effects of restricted feeding regimes on growth and feed utilization of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(2): 267–273.
- FAO. 2014. SOFIA - Estado Mundial de la Acuicultura. <http://www.fao.org>.
- Figueiredo, M.S.R.B., Krickler, J.A., Anderson, A.J. 2001. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 21(2): 334–344.
- Figueiredo, J., Penha-Lopes, G., Narciso, L., Lin, J. 2008. Effect of starvation during late megalopa stage of *Mithraculus forceps* (Brachyura: Majidae) on larval duration, synchronism of metamorphosis, survival to juvenile, and newly metamorphosed juvenile size. *Aquaculture*, 274: 175–180.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–509.
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A. 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry*, 18 (7): 673–674.
- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Domezain, A., Sanz, A. 2008. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 149: 420–425.

- Gao, M., Luo, Y.P., Cao, Z.D. 2006. Effect of dietary carbohydrate on digestive enzyme activities in southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) juveniles. *Journal of Southwest China Normal University*, 31: 119–123.
- García-Guerrero, M., Racotta, I.S., Villarreal-Colmenares, H. 2003. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23: 1–6.
- Gaylord, T.G., Gatlin, D.M. 2001. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 194: 337–348.
- Geary, N., Langhans, W., Scharrer, E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *American Journal of Physiology*, 10: 330–335.
- Gebauer, P., Paschke, K., Anger, K. 2010. Seasonal variation in the nutritional vulnerability of first-stage larval porcelain crab, *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 386: 103–112.
- Gisbert, E., Fernández, I., Álvarez-González, C.A. 2011. Prolonged feed deprivation does not permanently compromise digestive function in migrating European glass eels *Anguilla anguilla*. *Journal Fish Biology*, 78: 580–592.
- Gómez, S., Torres, V., García, Y., Navarro, J.A. 2012. Statistical procedures most used in the analysis of measures repeated in time in the agricultural sector. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46 (1), 1–7.
- Gu, H., Anderson, A.J., Mather, P.B., Capra, M.F. 1996. Effects of feeding level and starvation on growth and water and protein content in juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Marine and Freshwater Research*, 47: 745–748.
- Gutiérrez, M.L., Rodríguez, E.M. 2010. Effect of protein source on growth of early juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Freshwater Crayfish*, 17: 23–29.
- Hagen, Ø., Fernandes, J.M.O., Solberg, C., Johnston, I.A. 2009. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B*, 152: 47–53.
- Hayward, R.S., Wang, N., Noltie, D.B. 2000. Group holding impedes compensatory growth of hybrid sunfish. *Aquaculture*, 183: 299–305.
- Heide, A., Foss, A., Stefansson, S.O., Mayer, I., Norberg, B., Roth, B., Jenssen, M.D., Nortvedt, R., Imsland, A.K. 2006. Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: Effects of short-term starvation periods and subsequent feeding. *Aquaculture*, 261: 109–117.

- Hernández, M.P., Rouse, D.B., Olvera, M.A. 2002. Effect of dietary protein– lipid ratios on survival and growth of Australian crayfish (*Cherax quadricarinatus*) hatchlings and juveniles. *Freshwater Crayfish*, 13: 36–45.
- Huang, G., Wei, L., Zhang, X., Gao, T. 2008. Compensatory growth of juvenile brown flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) following thermal manipulation. *Journal of Fish Biology*, 72: 2534–2542.
- Icely, J.D., Nott, J.A. 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. Pp. 147–201 en Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod, Crustacea*, vol. 10. Wiley-Liss, New York, NY, USA.
- Jalihal, D.R., Sankolli, K.N., Shenoy, S. 1993. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 65: 365–376.
- Jiwyam, W. 2010. Growth and compensatory growth of juvenile *Pangasius bocourti* relative to ration. *Aquaculture*, 306: 393–397.
- Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman y Hall, London.
- Jobling, M. 2010. Are compensatory growth and catch-up growth two sides of the same coin? *Aquaculture International*, 18: 501–510.
- Jobling, M., Melù, O.H., dos Santos, J., Christiansen, B. 1994. The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history. *Aquaculture International*, 2: 75–90.
- Jobling, M., Kostela, J. 1996. Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *Journal of Fish Biology*, 49: 658–667.
- Johnston, D.J., Alexander, C.G., Yellowhees, D. 1998. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). *Journal of Crustacean Biology*, 18: 271–278.
- Johnston, D.J., Calvert, K.A., Crear, B.J., Carter, C.G. 2003. Dietary carbohydrate/lipid ratios and nutritional condition in juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 220: 667–682.
- Jones, C.M. 1990. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Information series, QI90028. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane.
- Jones, C.M. 1995. Production of juvenile redclaw craysfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) II. Juvenile nutrition and habitat. *Aquaculture*, 138: 239–245.

- Jones, C.M. 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries, Queensland.
- Jones, C.M., Ruscoe, I.M. 2000. Assessment of stocking size and density in the production of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae), cultured under earthen pond conditions. *Aquaculture*, 189 (1–2): 63–71.
- Jones, P.L., Obst, J.H. 2000. Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 20: 431–441.
- Jussila, J., Mannonen, A. 1997. Marron (*Cherax tenuimanus*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) hepatopancreas energy and its relationship to moisture content. *Aquaculture*, 149: 157–161.
- Känkänen, M., Pirhonen, J. 2009. The effect of intermittent feeding on feed intake and compensatory growth of whitefish *Coregonus lavaretus* L. *Aquaculture*, 288: 92–97.
- Kindischi, G.A. 1988. Effect of intermittent feeding on growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Aquaculture and Fisheries Management*, 19: 213–215.
- Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Saravanan, S., Priyadarshi, H. 2012. Short-term exposure to higher temperature triggers the metabolic enzyme activities and growth of fish *Labeo rohita* fed with high-protein diet. *Aquaculture Nutrition*, 19: 186–198.
- Levi, T., Barki, A., Hulata, G., Karplus, I. 1999. Mother-offspring relationships in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology* 19: 477–484.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208: 107–125.
- Li, Z.H., Xie, S., Wang, J.X., Chen, D.Q. 2007. Effects of intermittent starvation on growth and some digestive enzymes in the shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Fisheries of China*, 31: 456–462.
- Li, Z.H., Xie, S., Wang, J.X., Sales, J., Li, P., Chen, D.Q. 2009. Effect of intermittent starvation on growth and some antioxidant indexes of *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture Research*, 40: 526–532.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265–275.
- Luo, W., Zhao, Y. L., Zeng, C., Cui, L. L., Li, J. Y., Yang, S. B. 2008. Biochemical changes during the embryonic development of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fisheries of China*, 31: 303–310.

- McCue, M.D. 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 156: 1–18.
- Marques, H.L.A., Lombardi, J.V. 2011. Compensatory growth of Malaysian prawns reared at high densities during the nursery phase. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40 (4): 701–707.
- Masser, M.P., Rouse, D.B. 1997. Australian Red Claw Crayfish. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication No. 244. Southern Regional Aquaculture Center, Stoneville, MS.
- Mattila, J., Koskela, J., Pirhonen, J. 2009. The effect of the length of repeated feed deprivation between single meals on compensatory growth of pikeperch *Sander lucioperca* *Aquaculture*, 296: 65–70.
- Mazlum, Y., Güner, Ö., Sirin., S. 2011. Effects of feeding interval on growth, survival and body composition of narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 11: 1–7.
- Meade, M. E., S. A., Watts. 1995. Toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to juvenile Australian crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Shellfish Research*, 14(2): 341–346.
- Meade, M.E., Doeller, J.E., Kraus, D., Watts, S.A. 2002. Effects of temperature and salinity on weight gain, oxygen consumption rate, and growth efficiency in juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33: 188–198.
- Mezek, T., Simcic, T., Arts, M.T., Brancel, A. 2010. Effect of fasting on hypogean (*Niphargus stygius*) and epigeal (*Gammarus fossarum*) amphipods: a laboratory study. *Aquatic Ecology*, 44: 397–408.
- Miglavs, I., Jobling, M. 1989. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth. *Journal of Fish Biology*, 34: 947–957.
- Mohseni, M., Pourkazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H. R., Salehpour, M. 2006. Effects of feeding rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 278–283.
- Mommsen, T.P. 1998. Growth and metabolism. Pp. 65-97 en Evans, D.H (ed.). *The Physiology of Fishes* 2nd edition, CRC press LLC, USA.
- Naranjo-Páramo, J., Hernandez-Llamas, A., Villarreal, H. 2004. Effect of stocking density on growth, survival and yield of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*

- (Decapoda: Parastacidae) in gravel-lined commercial nursery ponds. *Aquaculture*, 242: 197–206.
- Nykänen, M. 2006. Effects of temperature and feeding regime on compensatory growth of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Tesis de Maestría. University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland.
- Oh, S.Y., Noh, C.H., Kang, R.S., Kim, C.K., Cho, S.H., Jo, J.Y. 2008. Compensatory growth and body composition of juvenile black rockfish *Sebastes schlegeli* following feed deprivation. *Fisheries Science*, 74: 846–852.
- Ong, B.L., Johnston, D. 2006. Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Journal of Shellfish Research*, 25: 113–121.
- Palacios, E., Perez-Rostro, C.I., Ramirez, J.L., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp *Penaeus vannamei* reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*, 171: 309–321.
- Palma, E.H., Takahashi I, L.S., Dias, L.T.S., Gimbo, R.Y., Kojima, J.T., Daniel Nicodemo, D. 2010. Feeding strategies with cycles of restriction and refeeding on growth performance of Nile tilapia juveniles, GIFT line. *Ciência Rural*, 40 (2): 421–426.
- Panné Huidobro, S., Alvarez, M., Luchini, L. 2004. Cultivo de la langosta australiana o Redclaw (*Cherax quadricarinatus*). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura. Buenos Aires, Argentina. <http://www.sapgya.mecon.gov.ar>.
- Parnes, S., Sagi, A. 2002. Intensification of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* culture I. Hatching and nursery system. *Aquacultural Engineering*, 26: 251–262.
- Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A. 2011. Lack of compensatory growth response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles following starvation and subsequent refeeding. *Aquaculture* 318, 384–388.
- Picha, M.E., Silverstein, J.T., Borski, R.J. 2006. Discordant regulation of hepatic IGF-I mRNA and circulating IGF-I during compensatory growth in a teleost, the hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *General and Comparative Endocrinology*, 147: 196–205.
- Picha, M.E., Biga, P.R., Galt, N., McGinty, A.S., Gross, K., Hedgpeth, V.S. 2014. Overcompensation of circulating and local insulin-like growth factor-1 during catch-up growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following temperature and feeding manipulations. *Aquaculture*, 428–429: 174–183.

- Pinto, G.F., Rouse, D.B. 1996. Growth and survival of the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* at three densities in earthen ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27 (2): 192–197.
- Powell, M. L. 2000. The effects of temperature and nutrient level on energy metabolism in two sympatric crayfish species. Tesis Doctoral. University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA.
- Powell, M.L., Watts, S.A. 2010. Response to long-term nutrient deprivation and recovery in the crayfishes *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus* (Crustacea, Decapoda): component and proximate analyses. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40 (1): 71–80.
- Qian, X., Cui, Y., Xiong, B., Yang, Y. 2000. Compensatory growth, feed utilization and activity in gibel carp, following feed deprivation. *Journal of Fish Biology*, 56: 228–232.
- Quinton, J.C., Blake, R.W. 1990. The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37:33–41.
- Rivera-Pérez, C., Navarrete del Toro, M.A., García-Carreño, F.L. 2011. Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 300: 163–168.
- Rodríguez-González, H., Hernández-Llamas, A., García-Ulloa, M., Racotta, I.S., Montoya-Mejía, M., Villareal, H. 2014. Effect of protein and lipids levels in diets for female red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* on quality of offspring (juvenile) with emphasis on growth performance, biochemical composition and stress resistance to low oxygen, high ammonia and salinity. *Aquaculture Nutrition*, 20 (5): 557–565.
- Sacristán, H. J., Nolasco-Soria, H., López Greco, L. S. 2014. Effect of attractant stimuli, starvation period and food availability on digestive enzymes in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). *Aquatic Biology*, 23: 87–99.
- Sacristán, H.J., Fernández Giménez A., Chaulet, A., Franco Tadic, L., Fenucci, J., López Greco, L.S. 2015. Influence of different diets on digestive enzyme activities, in vitro digestibility, and midgut gland structure in juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Acta Zoologica. En prensa*.
- Sæther, B. S., Jobling, M. 1999. The effects of ration level on feed intake and growth, and compensatory growth after restricted feeding, in turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*, 30(9): 647–653.
- Sánchez De Bock, M., López Greco, L.S. 2010. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): effect of increasing temperature and androgenic gland extract in the diet. *Aquaculture International*, 18: 231–243.

Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340: 184–193.

Saoud, I.P., De Yta, A.G., Ghanawi, J. 2012. Nutritional biology and dietary requirements of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquaculture Nutrition*, 18: 349–368.

Saoud, I.P., Ghanawi, J., Thompson, K.R., Webster, C.D. 2013. A review of the culture and diseases of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Journal of World Aquaculture Society*, 4: 1–29.

Scheirer, C.J., Ray, W.S., Hare, N. 1976. The Analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. *Biometrics*, 32: 429–434.

Schwarz, F. J., Plank, J., Kirchgessner, M. 1985. Effects of protein or energy restriction with subsequent realimentation on performance parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 48(1): 23-33.

Secor, S.M., Whang, E.E., Lane, J.S., Ashley, S.W., Diamond, J. 2000. Luminal nutrient signals trigger intestinal adaptation in the Burmese python (*Python molurus*). *American Journal of Physiology*, 279: 1177–1187.

Sevgili, H., Hoşsu, B., Emre, Y. y Kanyılmaz, M. 2012. Compensatory growth after various levels of dietary protein restriction in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 344-349: 126–134.

Singh, R.K. y Balange, A.K. 2007. Compensatory growth and changes in nutrient composition in post-larvae of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, following starvation. *Journal of Applied Aquaculture*, 19: 39–49.

Sousa, L.G., Petriella, A.M. 2000. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell*, 24:189–195.

Storch, V., Juario, J.V., Pascual, F. 1984. Early effects of nutritional stress on the liver of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), and on the hepatopancreas of the tiger prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, 36: 229–236.

Sureshkumar, S., Kurup, B. 1999. Variations in hepatosomatic index and biochemical profiles among the male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 176: 285–293.

Tian, X., Qin, J.G. 2003. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 224: 169–179.

- Tian, X., Qin, J.G. 2004. Effects of previous ration restriction on compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 235 (1-4): 273–283.
- Thompson, K.R., Bailey, T.J., Metts, L.S., Brady, Y.J., Webster, C.D. 2010. Growth response and fatty acid composition of juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture Nutritional*, 16: 604–615.
- Tropea, C., Piazza, J., López Greco, L.S. 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the “redclaw” crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 302: 49–56.
- Turano, M. J., Borski, R. J., Daniels, H.V. 2007. Compensatory growth of pond-reared hybrid striped bass, *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*, fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38: 250–261.
- Turano, M. J., Borski, R. J., Daniels, H.V. 2008. Effects of cyclic feeding on compensatory growth of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) foodfish and water quality in production ponds. *Aquaculture Research*, 39: 1514–1523.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry* 11: 256–265.
- Van Weel, P. B. 1974. Hepatopancreas?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 47(1): 1–9.
- Vázquez, F.J., López Greco, L.S. 2007. Sexual differentiation in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Revista de Biología Tropical*, 55: 33–38.
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Civera, R. 1993. The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*: I - properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 106: 547–550.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G. A., Storelli, C. 2001. D-glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative and Biochemistry Physiology - Part B*, 130: 585–606.
- Versaw, W.K., Cuppett, S.L., Winters, D.D., Williams, L.E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54: 1557–1568.
- Villarreal-Colmenares, H. 2002. Avances en Nutrición Acuícola. Pp. 114–142 en Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G. y Simoes, N. (eds.). *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.

- Vogt, G., Storch, V., Quintio, E.T. y Pascual, F.P. 1985. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture* 48: 1–12.
- Wang, T., Hung, C., Randall, D.J. 2006. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annual Review of Physiology*, 68: 223–251.
- Wang, Y., Cui, Y., Yang, Y., Cai, F. 2000. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*, reared in seawater. *Aquaculture*, 189: 101–108.
- Wang, Y., Cui, Y., Yang, Y., Cai, F. 2005. Partial compensatory growth in hybrid tilapia *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus* following food deprivation. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 389–393.
- Wasiolesky Jr, W., Froes, C., Fóes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L. 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish Research*, 32(3): 799–806.
- Watts, A.J.R., McGill, R.A.R., Albalat, A., Neil, D.M. 2014. Biophysical and biochemical changes occur in *Nephrops norvegicus* during starvation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 457: 81–89.
- Wei, L.Z., Zhang, X.M., Li, J., Huang, G.Q. 2008. Compensatory growth of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* following hypoxic exposure. *Aquaculture International*, 16:455–470.
- Wen, X., Chen, L., Ku, Y., Zhou, K. 2006. Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 252: 598–607.
- Wicki, G., Rossi, F., Merino, O., Luchini, L. 2008. Engorde de la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*), en el subtrópico argentino: primeros resultados. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Wu, L., Dong, S. 2002a. The effects of repetitive “starvation-and- refeeding” cycles on the compensatory growth response in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) (Decapoda: Penaeidae). *Crustaceana*, 74: 1225–1239.
- Wu, L. y Dong, S. 2002b. Compensatory growth responses in juvenile Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, at different temperatures. *Journal of Crustacean Biology*, 22 (3): 511–520.
- Wu, L., Dong, S., Wang, F. y Tian, X. 2000. Compensatory growth response following periods of starvation on Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* Osbeck. *Journal of Shellfish Research*, 19 (2): 717–722.

- Wu, L., Dong, S., Wang, F., Tian, X., Ma, S. 2001. The effect of previous feeding regimes on the compensatory growth response in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Crustacean Biology*, 21(3): 559–565.
- Xiao, J.X., Zhou, F., Yin, N., Zhou, J., Gao, S., Li, H., Shao, Q.J., Xu, J.Z. 2013. Compensatory growth of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* with cyclical feed deprivation and refeeding. *Aquaculture Research*, 44: 1045–1057.
- Xie, S., Zhu, X., Cui, Y., Wootton, R.J., Lei, T., Yang, Y. 2001. Compensatory growth in the gibel carp following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Journal of Fish Biology*, 58: 999–1009.
- Yengkokpam, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., Kumar, S., Jain, K.K. 2014. Compensatory growth, feed intake and body composition of *Labeo rohita* fingerling following feed deprivation. *Aquaculture Nutrition*, 20 (2): 101–108.
- Young, A., Morris, P.C., Huntingford, F.A., Sinnott, R. 2005. The effects of diet, feeding regime and catch-up growth on flesh quality attributes of large (1+ sea winter) Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 248: 59–73.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zeng, L.Q., Li, F.J., Li, X.-M., Cao, Z.D., Fu, S.J., Zhang, Y.G. 2012. The effects of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 162: 200–211.
- Zheng, Z.H., Dong, S.L., Tian, X.L. 2008. Effects of intermittent feeding of different diets on growth of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 28(1): 21–26.
- Zhu, X., Xie, S., Zou, Z., Lei, W., Cui, Y., Yang, Y., Wootton, R.J. 2004. Compensatory growth and food consumption in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, and Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris*, experiencing cycles of feed deprivation and re-feeding. *Aquaculture*, 241: 235–247.
- Zhu, X., Xie, S., Zou, Z., Lei, W., Cui, Y., Yang, Y., Wootton, R.J. 2005. Compensatory growth in the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* following feed deprivation: Temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Aquaculture*, 248: 307–314.
- Zhu, Z.M., Lin, X.T., Pan, J.X., Xu, Z.N. 2014. Effect of cyclical feeding on compensatory growth, nitrogen and phosphorus budgets in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 1–7.