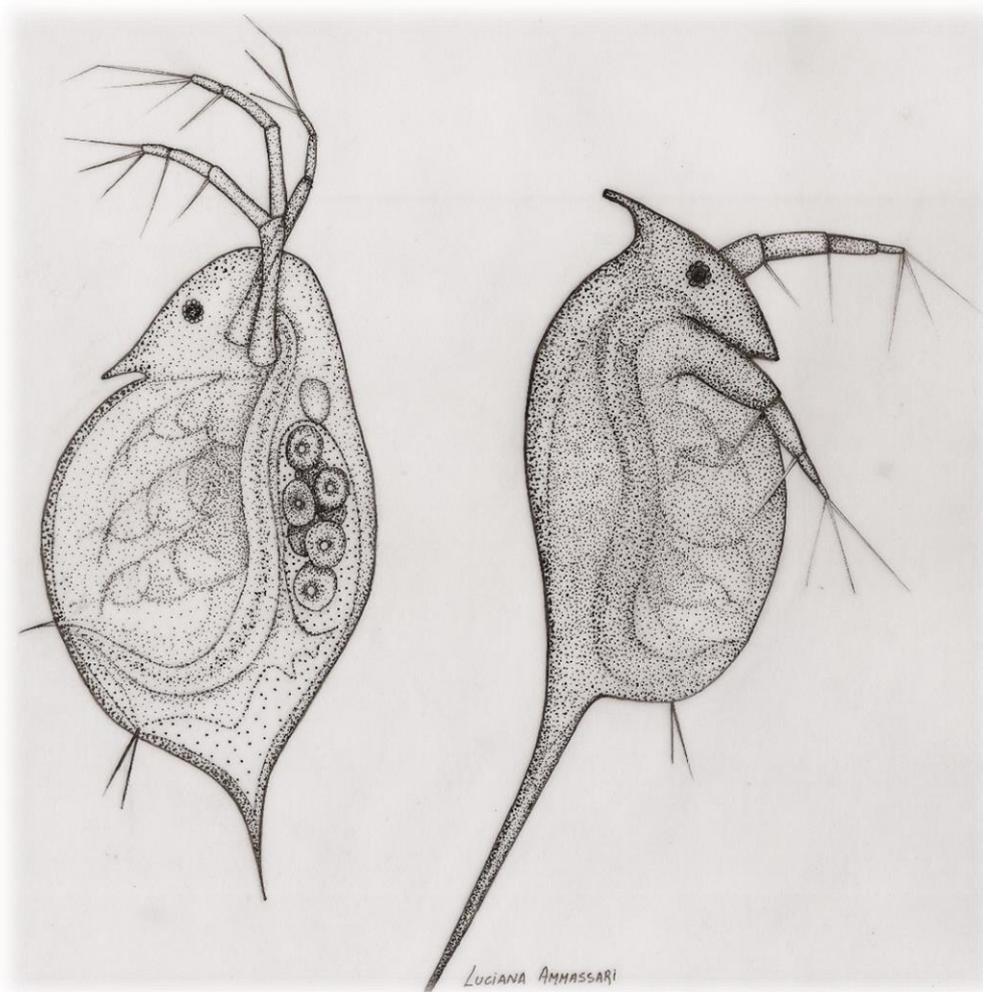


*Respuestas eco-fisiológicas de  
Daphnia frente a la radiación  
ultravioleta y variables  
ambientales*

Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

1972



Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Biología

Lic. Laura Wolinski

Directora: Dra. Beatriz Modenutti

Co-Director: Dr. Esteban Balseiro

2018

## AGRADECIMIENTOS

*A mis directores Beatriz, Esteban y Sol, que entre otras tantas cosas trabajaron a la par conmigo, dedicando tiempo, paciencia, ganas e interés. Sobre todo, por hacer el trabajo más ameno y enseñarme a tener un pensamiento crítico a lo largo de este período.*

*A mis compañerxs del Limnolab, Marce, Vero, Flor, Chili, Nico, Caro, Uara, Luca, Eve y Cande. Por ser parte de mi día a día y por acompañarnos y apoyarnos en nuestro trabajo y proyectos, tanto académicamente como personalmente.*

*A mis amigxs de Bariloche, que son mi segunda familia. Gracias por tanto, son lo mejor que me pasó en estos 15 años que llevo acá. Particularmente a Lu, que aparece aunque sea en la portada de esta Tesis. A Gon, Chini, Ani, Guada, Dani y Diego por acompañarme a muestrear.*

*Especialmente a mi familia y sobretodo a mis padres (Los abuelos Beto y Susy), qué aunque la distancia nos separe siempre están cerca. A Nacho y Martincho, que también fueron parte de los muestreos. A Luján, que también es familia.*

*A la universidad del Comahue por haberme dado la posibilidad recibirme de Bióloga y continuar mis estudios de posgrado en este centro regional.*

*A la educación pública en la Argentina, que esperemos no tener que seguir defendiendo.*

*Al INIBIOMA, CONICET y MINCyT por darme lugar de trabajo y las becas para poder realizar este doctorado.*

*Este trabajo de posgrado se pudo llevar a cabo gracias a los subsidios otorgados por el FONCyT: PICT 2012-0929, 2011-2240, 2014-1002, 2015-0418.*

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
CAPITULO I.....	9
Introducción General .....	9
<i>Objetivo General:</i> .....	18
<i>Objetivos específicos:</i> .....	18
<i>Hipótesis:</i> .....	19
CAPITULO II.....	20
Efecto de la RUV en el proceso de muda de <i>Daphnia commutata</i> , utilizando la actividad de la Quitobiasa como indicador. ....	20
<b>Introducción .....</b>	<b>20</b>
<i>Objetivo:</i> .....	23
<i>Hipótesis:</i> .....	23
<i>Predicciones:</i> .....	23
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>24</b>
<i>Experimento exposición a RUV</i> .....	24
<i>Experimento de recuperación</i> .....	25
<i>Características de la luz</i> .....	25
<i>Determinaciones bioquímicas</i> .....	25
<i>Análisis estadístico</i> .....	26
<b>Resultados.....</b>	<b>27</b>
<i>Experimento de exposición a RUV</i> .....	27
<i>Experimento de recuperación</i> .....	29
<b>Discusión .....</b>	<b>30</b>
CAPITULO III .....	33
Efectos interactivos entre calidad de alimento, temperatura y RUV en la actividad de la fosfatasa alcalina en <i>Daphnia commutata</i> .....	33

<b>Introducción .....</b>	<b>33</b>
<i>Objetivo: .....</i>	36
<i>Hipótesis: .....</i>	36
<i>Predicciones:.....</i>	36
<b>Métodos.....</b>	<b>37</b>
<i>Efecto de estrés oxidativo en AFA.....</i>	37
<i>Diseño experimental con RUV.....</i>	37
<i>Características de la luz.....</i>	40
<i>Cultivo de algas.....</i>	41
<i>Determinaciones bioquímicas .....</i>	41
<i>Análisis estadístico.....</i>	42
<b>Resultados.....</b>	<b>43</b>
<i>Crecimiento somático de Daphnia commutata bajo diferentes temperaturas y calidades de alimento.....</i>	43
<i>Efectos del estrés oxidativo en AFA.....</i>	44
<i>Experimento de exposición a RUV.....</i>	45
<i>Experimento de reparación de RUV .....</i>	47
<b>Discusión .....</b>	<b>48</b>
CAPITULO IV .....	51
Análisis del nivel de estrés oxidativo generado por la exposición a RUV en dáfnidos con pigmentos foto-protectores ( <i>Daphnia dadayana</i> ).....	51
<b>Introducción: .....</b>	<b>51</b>
<i>Objetivo: .....</i>	54
<i>Hipotesis: .....</i>	54
<i>Predicciones:.....</i>	54
<b>Métodos.....</b>	<b>55</b>
<i>Experimento exposición a RUV.....</i>	55
<i>Características de la luz.....</i>	56

<i>Análisis de imágenes</i> .....	56
<i>Determinaciones bioquímicas</i> .....	57
<i>Análisis estadístico</i> .....	57
<b>Resultados</b> .....	<b>59</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>62</b>
CAPITULO V .....	64
Balance entre producción de defensas plásticas y defensas antioxidantes enzimáticas en <i>Daphnia dadayana</i> . .....	64
<b>Introducción</b> .....	<b>64</b>
<i>Objetivo:</i> .....	67
<i>Hipotesis:</i> .....	67
<i>Predicción:</i> .....	67
<b>Métodos</b> .....	<b>68</b>
<i>Experimento</i> .....	68
<i>Determinaciones morfológicas</i> .....	69
<i>Características de la luz</i> .....	70
<i>Determinaciones bioquímicas</i> .....	70
<i>Análisis estadístico</i> .....	71
<b>Resultados</b> .....	<b>72</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>75</b>
CAPITULO VI .....	77
Conclusiones generales.....	77
Bibliografía.....	80
Publicación de Respaldo: "Interactive effects of temperature, ultraviolet radiation and foodquality on zooplankton alkaline phosphatase activity" .....	90

## Resumen

Los grandes lagos andino-Patagónicos se caracterizan por ser muy profundos, ultraoligotróficos y albergar especies planctónicas con estrategias para enfrentar a bajas calidades y cantidades de nutrientes y altas radiaciones de luz. Por otra parte, en la región también se pueden encontrar numerosos pequeños lagos someros con características diferentes; ya que poseen una mayor concentración de materia orgánica disuelta que disminuye la penetración de luz. A pesar de los contrastes entre estos ambientes, ambos son sensibles a los cambios climáticos globales vinculados a incrementos en las Radiación Ultravioleta (RUV) y a la temperatura; lo que producirá que los organismos exhiban respuestas frente a estos cambios. El objetivo de esta Tesis fue analizar las estrategias fisiológicas, tanto nutricionales, reproductivas y de defensa que poseen organismos planctónicos del género *Daphnia* frente a escenarios actuales y futuros de incremento en la RUV y en la temperatura fundamentalmente.

Una vez que llega a la superficie de la Tierra, la luz del sol penetra la superficie del agua y se atenúa a medida que llega a mayor profundidad. Las partículas y materia orgánica disuelta son las que mayor efecto ejercen en la atenuación de radiaciones de luz. Las longitudes de onda que comprenden entre los 280 y 380 nm de luz se caracterizan por su gran reactividad con las moléculas orgánicas y la generación de subproductos reactivos (EROs, “especies reactivas de oxígeno”) que a su vez reaccionan con los organismos del ambiente, generando daño celular. El estrés oxidativo es el desbalance entre la manifestación de EROs y la capacidad biológica del sistema de neutralizarlos. Para hacer frente a este fenómeno, los organismos tienen que aumentar sus defensas, como pueden ser las enzimas y los pigmentos, para lograr neutralizar la reactividad de las EROs y su potencial daño celular.

Esta Tesis fue organizada en 6 capítulos. En el primero se presentan e introducen los conceptos teóricos enfocándolos hacia la pregunta de esta Tesis; asimismo se presentan las hipótesis planteadas y los objetivos generales y específicos. En el segundo capítulo se analiza en *Daphnia commutata* el efecto de la RUV en la actividad de una enzima involucrada en el proceso de muda. En el tercer capítulo se analiza el efecto interactivo entre la calidad de alimento, la temperatura y la RUV en la actividad enzimática de defensa contra el estrés oxidativo de *D. commutata* y en una enzima encargada de hacer disponibles nutrientes en particular P (fósforo). En el cuarto capítulo

se analiza la respuesta enzimática antioxidante de *D. dadayana* frente a la exposición a RUV y se evalúa la importancia de la melanina como pigmento foto-protector de la RUV y el estrés oxidativo. En el quinto capítulo se analiza el efecto de la RUV en la respuesta plástica de *D. dadayana* frente a la presencia de depredadores invertebrados. Por último, en el sexto capítulo se incluyen las conclusiones finales de la Tesis.

La quitobiasa (QB) es una enzima encargada de degradar la quitina del exosqueleto en artrópodos para que pueda desprenderse adecuadamente de la nueva cutícula en el momento de la muda. En este momento el zooplancton se encuentra expuesto y vulnerable, además de encontrarse sincronizado en *Daphnia* con el desprendimiento de huevos partenogénicos. Por esta razón, en el segundo capítulo se evaluó el efecto de la RUV en la enzima QB y el consecuente efecto en el proceso de muda de *D. commutata*. Para llevar a cabo esto, se expuso a neonatos de *Daphnia* de la misma cohorte a 2 h de RUV por día durante 8 días y se extrajeron ejemplares a diario para las determinaciones de la actividad de la QB. Si bien los resultados no muestran una disminución de la actividad de QB cuando se expone *Daphnia* a una dosis diaria de RUV si se observa una desincronización, tanto para la actividad de QB como para la sincronización de la cohorte para mudar. Este efecto de la RUV en la sincronización de la muda se podría ver reflejado, no sólo en el crecimiento, sino también en la reproducción, ya que los neonatos tendrían dificultades para poder salir del nuevo caparazón.

Se analizó cómo *D. commutata* responde a la combinación de factores de estrés utilizando la actividad de la fosfatasa alcalina (AFA) como un proxy del requerimiento de P y a la Glutation-S-Transferasa (GST) como un biomarcador del estrés oxidativo. Se realizaron experimentos de laboratorio donde a neonatos de *D. commutata* se les proporcionó tres calidades de alimento (baja, media y alta) bajo dos temperaturas distintas (10 °C y 20 °C) y se los dejó crecer durante una semana. El día siete fueron expuestos a RUV y luego reservados para medir su actividad enzimática antioxidante (GST) y la respuesta en la AFA. Se observó que la calidad del alimento que obtiene el zooplancton afecta sus respuestas frente a factores de estrés, como la RUV y la temperatura. Los resultados muestran que cuando *Daphnia* se encuentra con baja calidad de alimento y a una temperatura de 20 °C se ve limitada su actividad antioxidante. Bajo estas condiciones se registra una baja capacidad de respuesta frente al efecto de la radiación ultravioleta en comparación con el mismo tratamiento con media y buena calidad de alimento. Por otra

parte, también disminuye la capacidad de adquirir P del alimento (AFA) y este efecto se ve incrementado aún más por la exposición a RUV. En cambio, a 10 °C, hay una clara respuesta al incrementar la AFA en las calidades de alimento baja y media en comparación con alta calidad, significando que con buena calidad de nutrientes no es necesario utilizar la AFA para adquirir más nutrientes. La calidad del alimento resulta un factor muy importante bajo escenarios futuros donde según las predicciones del cambio climático podría aumentar la temperatura y la incidencia de RUV en los ambientes acuáticos.

Los pigmentos fotoprotectores son la primera barrera contra el posible daño de las RUV. En la región se observaron individuos melánicos de *Daphnia*, por lo cual en el cuarto capítulo se planteó analizar la respuesta plástica de aumento de la concentración de melanina vs la actividad de antioxidantes frente a la exposición a RUV. Para ello se expusieron neonatos del cladócer melánico *D. dadayana* a RUV por 2 horas todos los días, durante una semana. A través de fotografías laterales se midió la intensidad del pigmento del caparazón de *Daphnia* día a día y al finalizar el experimento se midió la actividad de GST para determinar el nivel de estrés oxidativo de *Daphnia*. Los resultados muestran que hay un incremento de la concentración de melanina en el tiempo. Por otro lado, la actividad de GST no presenta diferencias significativas entre control y tratamiento de RUV. Este resultado podría estar reflejando la efectividad de la melanina que sintetiza *D. dadayana* ya que no hay un daño visible por exposición a las dosis de RUV suministradas en estos organismos.

Las defensas plásticas frente la depredación intrazooplancónica significan una inversión de energía ya que generalmente involucran estructuras morfológicas, siendo éstas inducidas por señales químicas (kairomonas) que los depredadores liberan al medio. *D. dadayana* se registra en la región con formas con o sin yelmo, por lo cual en el último capítulo se planteó, evaluar el costo de la producción de yelmo, a través de la actividad de GST, cuando *D. dadayana* con y sin yelmo se encuentra expuesta a RUV. Para llevar a cabo este objetivo se expusieron hembras con huevos partenogénicos a señal química del copépodo depredador *Parabroteas sarsi* para inducir la defensa morfológica en forma de yelmo en los neonatos. En primer lugar, se logró verificar que la liberación de kairomonas por parte de *P. sarsi* efectivamente induce la formación de yelmo, lo cual explicaría la existencia de los dos dos morfos de *D. dadayana* en la naturaleza. Por otra parte, continuando con el experimento una vez nacidos, los neonatos

fueron expuestos a RUV durante 3 días para observar el desarrollo de la estructura anti-depredación y la actividad de GST en organismos que necesitan invertir nutrientes en las defensas. Los resultados muestran que *D. dadayana* no tuvo problemas en mantener el yelmo cuando es expuesto a RUV y que su tamaño se incrementa un 25% más que en individuos sin señal de depredador. Sin embargo, el costo en producir una defensa plástica no reveló un aumento del estrés oxidativo cuando son expuestos a RUV en comparación con el control sin defensa.

Las conclusiones generales de esta Tesis indican que las RUV condicionan numerosas respuestas de las poblaciones de *Daphnia* en Patagonia norte sobre todo en organismos transparentes sin pigmentos melánicos. Estos cladóceros habitan lagos profundos y con presencia de depredadores visuales (peces), por lo tanto, su única estrategia para evitar la exposición a las RUV es permanecer en regiones oscuras (hipolimnion) durante el día. Sin embargo, también se observó que las respuestas frente al estrés pueden variar en función de la temperatura y la calidad de alimento. Por otra parte, las especies melánicas que aparecen en lagunas someras (*D. dadayana*) parecen exhibir un grado bajo de estrés frente a la exposición directa de RUV. Además, las estrategias morfológicas frente a la depredación intrazooplanctónica no afecta sus niveles de respuesta frente al estrés lumínico. Por último, las actividades enzimáticas resultan biomarcadores muy sensibles para visualizar efectos celulares en el zooplancton y son una herramienta muy eficaz a la hora de determinar efectos sub-letales como los generados por la RUV y otros factores ambientales como los estudiados en este trabajo.

**Abstract**

North-Andean Patagonian large and deep lakes are characterized by their ultra-oligotrophic waters. In these environments, planktonic species develop different strategies to cope with low nutrient qualities and quantities of food, and high exposure to Ultraviolet radiation (UVR). At the same time, the region has numerous shallow lakes with higher dissolved organic matter concentration and low penetration of light. Even though, both environments are sensitive to global climate change, particularly to increase in UVR and temperature that may produce different responses in their biota. The objective of this Thesis was to analyze the physiological responses of planktonic organisms from the genus *Daphnia* under present and future scenarios of increases in UVR, interacting with other ecological factors as nutritional stress nutritional, temperature and antipredator defenses.

Sunlight attenuates while reaching Earth surface, and keeps attenuating while penetrates the water column of aquatic environments. Particulate and dissolved organic matter represent the main attenuators of underwater light. Wavelengths between 280 and 380 nm are characterize by their great reactivity with organic molecules and the generation of reactive byproducts (ROS, "reactive oxygen species") that, in turn, react with organisms, generating cell damage. Oxidative stress is the imbalance between ROS manifestation and the biological capacity of the system to neutralize them. To deal with these stressors, organisms have to increase their defenses, such as pigments and antioxidant enzymes, to neutralize the reactivity of ROS and their potential cellular damage.

This Thesis was organize in six chapters. The first one presents theoretical concepts focusing towards the main question of this Thesis. This introduction also presents the general and specific objectives and the hypotheses. In the second chapter, we analyzed the effect of UVR on the enzymatic activity involved in the molting process of *D. commutata*. The third chapter, the interactive effect between food quality, temperature and UVR, is analyzed with the enzymatic activity against oxidative stress in *Daphnia commutata* and with an enzyme which makes nutrients available, in particular P (phosphorus). In the fourth chapter, the enzymatic antioxidant response and the importance of melanin as a photo-protective pigment is analyze when *D. dadayana* is expose to UVR. In the fifth chapter, we determine the effect of the UVR on the plastic

response of *D. dadayana* against the invertebrate predator presence. Finally, the sixth chapter presents the conclusions of the Thesis.

The enzyme chitinase (CB) is responsible for the chitin degrading process, allowing the old shell to be properly detached from the new one at molting. During this period, zooplankton is exposed and vulnerable to predation, and in *Daphnia* is synchronize with the detachment of parthenogenetic eggs. Therefore, in the second chapter, we analyzed UVR effect on the CB enzyme activity and the consequent effect on the molting process of *D. commutata*. We carried out an experiment in which *Daphnia* neonates from the same cohort grew for eight days with daily exposition of 2 h to UVR and a control (protected from UVR). Each day of experimentation CB activity was determined on individuals of each treatment. Results showed a decrease in the CB activity when *Daphnia* was expose to UVR. In addition, a desynchronization was observe in the CB activity and in molt synchronization. Consequently, a decrease in the growth of UVR exposed individuals was observe after the fourth day of UVR exposure. UVR effect on molt synchronization could imply a cost, not only in growth but also in reproduction, since neonates would have difficulties to leave the old shell.

In the next chapter, we analyzed how *D. commutata* responds to the combination of stress factors using the alkaline phosphatase activity (APA) as a proxy of the P requirement and Glutathione-S-Transferase (GST) as an oxidative stress biomarker. Laboratory experiments were conducted with *D. commutata* neonates growing for a week fed with three food qualities (low, medium and high) under two different temperatures (10 °C and 20 °C). On day seven, they were expose to UVR and then reserved to measure their antioxidant enzymatic activity (GST) and APA. It was observe that food quality obtained by zooplankton affects its responses to stress factors, such as UVR and temperature. The results showed that when *Daphnia* is under low food quality at 20 °C, its antioxidant activity is limited. Under these conditions, there was a low response capacity against UVR effect compared to the same temperature with medium and high food quality. The ability to acquire P from the food (APA) also decreased under low food quality at 20 °C and this effect is further increased by UVR exposure. On the other hand, treatments at 10 °C showed an increase in APA under low and medium food qualities compared to high quality, meaning that with high quality of nutrients there is no need to increase APA to acquire more. The food quality represents an important factor under

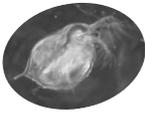
future scenarios where, according to climate change predictions, temperature and UVR incidence in aquatic environments could increase.

Photo-protective pigments are the first barrier against UVR damage. In Patagonia *Daphnia dadayana* was observed with melanic individuals. We analyzed the plastic response of increasing melanin concentration in this species and the antioxidant activity when exposed to UVR. We carried out experiment were neonates of *D. dadayana* were expose to UVR for 2 hours every day, during a week with a control protected from this short wavelength radiation. Pigment intensity in *Daphnia* carapace was measure daily through lateral images. At the end of the experiment, GST activity was measure to determine oxidative stress level. The results showed that there was an increase in melanin concentration over time. On the other hand, GST activity did not show significant differences between control and UVR treatment. This result could enlighten the melanin effectiveness of *D. dadayana* carapace, as there was no measurable response when individuals were expose to UVR.

Plastic defenses against the intra-zooplanktonic predation are morphological structures inducible by chemical signals (kairomones) that the predators release to the environment. These defenses involve an energy cost that have been relate to a decrease in reproduction. In this chapter, we analyzed if this cost also affect antioxidant responses. *D. dadayana* was recorded with or without a helmet, thus we evaluated the helmet production cost, through the GST activity when *D. dadayana* with and without helmet is exposed to UVR. The predatory copepod *Parabroteas sarsi* was used for induce helmet production in neonates. In fact, kairomones release by *P. sarsi* effectively induced helmet formation in neonates, which would explain the existence of the two *D. dadayana* morphs in nature. Neonates with and without helmet were expose to UVR or protected for 3 days in a factorial design. Results showed that *D. dadayana* with and without helmet did not showed differences in antioxidant response when exposed to UVR. Thus, the plastic defense did not affect the antioxidant response.

In summary, we present two different strategies in *Daphnia* of north Patagonia. On the one hand, in unpigmented *Daphnia commutata* that lives in transparent lakes with fish, UVR interacts with other factors as temperature and food quality affecting the capacity of P assimilation. In addition, UVR may have important effect in the molting process through the negative effect on the enzyme chitobiase. This effect can induce a desynchronization in the molting process with consequences at population level. On the

other hand, the melanic species *D. dadayana*, inhabits shallow and fishless lakes. This species showed low antioxidant response to UVR due to the accumulation of the protective pigment. Finally, the presence of helmet, a plastic antipredator morphological defense, did not change the enzymatic response to UVR.



### CAPITULO I

#### Introducción General

Durante el desarrollo del planeta Tierra, la radiación ultravioleta (RUV) ha estado presente con intensidades inicialmente muy altas antes que cualquier organismo vivo (Cockell y Horneck 2001). La atmósfera y, en particular la capa de ozono, protege la vida sobre la Tierra ya que absorbe la mayor parte de las longitudes de onda corta (radiación ultravioleta C = 100 a 280 nm y B = 280 a 320 nm). Sin embargo, una proporción de esta radiación (radiación ultravioleta B y A = 320 a 400 nm) aún entra y llega a la superficie del planeta afectando a la biosfera. La intensidad de la RUV que llega a la superficie terrestre puede tener notables variaciones. Su incidencia puede cambiar rápidamente durante semanas o incluso días debido a la elevación solar y a los cambios en la cobertura de nubes y cantidad de aerosoles (Smith et al. 1992, Madronich et al. 1998). Una vez que llega a la superficie terrestre los fotones dispersados por la columna de agua aún pueden interactuar con la materia orgánica disuelta y particulada (MOD y MOP) y con los organismos del medio, generalmente sometiéndolos a estrés. Esta radiación es potencialmente dañina para la vida fundamentalmente porque genera daños en el ADN y en otras moléculas orgánicas (Harm 1980, Kielbassa et al. 1997, Ravanat et al. 2001) (Figura I.1). Por esta razón, se ha señalado que los organismos desarrollan una larga serie de adaptaciones evolutivas para disminuir sus efectos negativos (Rozema et al. 2002)

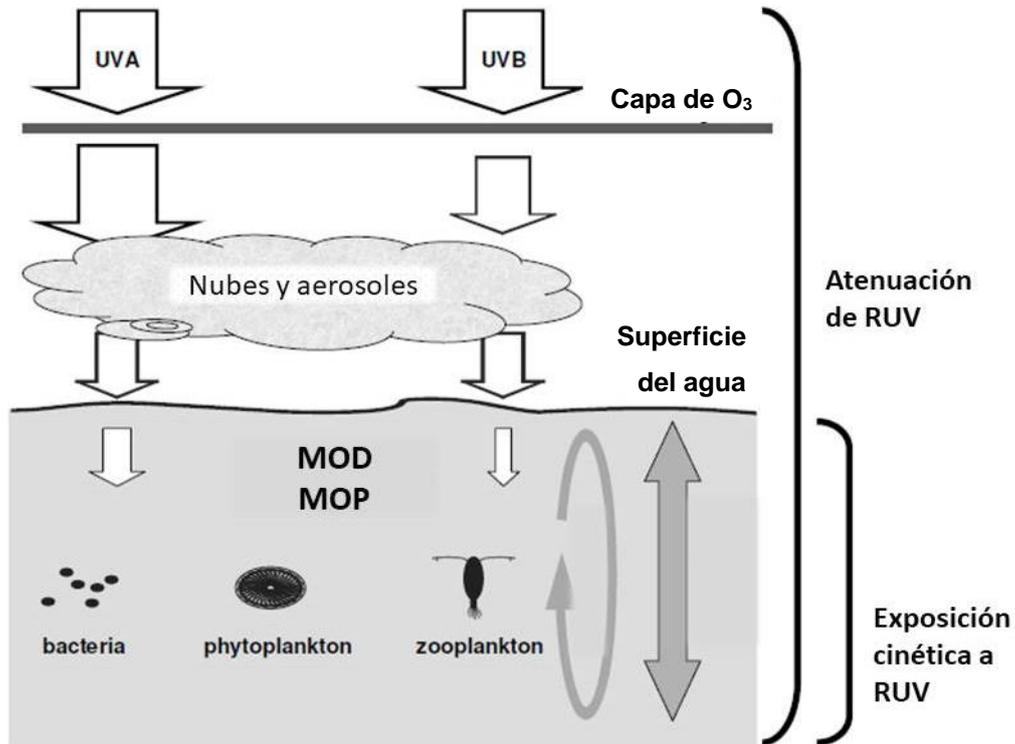
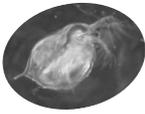


Fig. I.1: **Esquema del ingreso de las radiaciones Ultravioletas a la Tierra e interacción con el medio acuático.** Las RUV se atenúan al traspasar la capa de ozono, nubes y aerosoles de la atmósfera y disminuyen aún más su incidencia al traspasar la superficie del agua. Donde aún pueden interactuar con la materia orgánica disuelta y particulada (MOD y MOP) y con los organismos vivos del medio, a este último proceso se lo llama exposición cinética. Figura extraída y modificada de Gonçalves et al. (2010).

En los ambientes de agua dulce la penetración de la RUV puede llegar desde unos pocos centímetros a varios metros de profundidad (Morris et al. 1995) dependiendo de la composición del agua, sobretodo de la concentración de MOD (Leavitt et al. 2003). Ambientes acuáticos donde las concentraciones de MOD son bajas (por debajo de  $2 \text{ mg de C L}^{-1}$ ), pequeños cambios en la cantidad de MOD pueden causar grandes cambios en la penetración de la RUV en la columna de agua y, en consecuencia, generar productos reactivos de la RUV en interacción con la MOD (Leavitt et al. 2003). La exposición de MOD y MOP a RUV genera radicales libres debido a la alta reactividad de la luz, que



## CAPITULO I: Introducción general

---

afectan la biota acuática, al ser altamente reactivas. La materia orgánica generada en el ecosistema terrestre y transportada por los ríos a los sistemas acuáticos lénticos representa un importante porcentaje del MOD de estos sistemas (Cauwet 2002, Hansell et al. 2004, Zanardi-Lamardo et al. 2004). Sin embargo, sufre transformaciones que resultan en cambios en la absorción de RUV (Del Vecchio y Blough 2002, Twardowski y Donaghay 2002). Por otro lado, el nitrógeno (N) y el fósforo (P) pueden limitar la productividad en ecosistemas terrestres y acuáticos. A su vez, la RUV puede afectar al ciclo del N de varias formas, incluyendo cambios en la composición de materia orgánica con contenido de N y a través de efectos en la fijación del N. Adicionalmente, en ecosistemas acuáticos las interacciones de la RUV con el nitrógeno inorgánico como nitratos y nitritos resulta en una importante fuente de especies reactivas de oxígeno, incluyendo radicales como el hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Zepp et al. 2007) (Ver figura I.2). Mientras que en ecosistemas terrestres los cambios en la RUV afectan en forma directa a la fijación del carbono; en los sistemas acuáticos los productores primarios se encuentran afectados directa e indirectamente por la RUV al estar expuestos e indirectamente por los radicales libres que se generan (Zepp et al. 2011). También el ciclo del fósforo se puede ver afectado, a través del efecto de la RUV sobre la actividad de la fosfatasa alcalina presente en diversos organismos (Boavida y Wetzel 1998, Korbee et al. 2012).

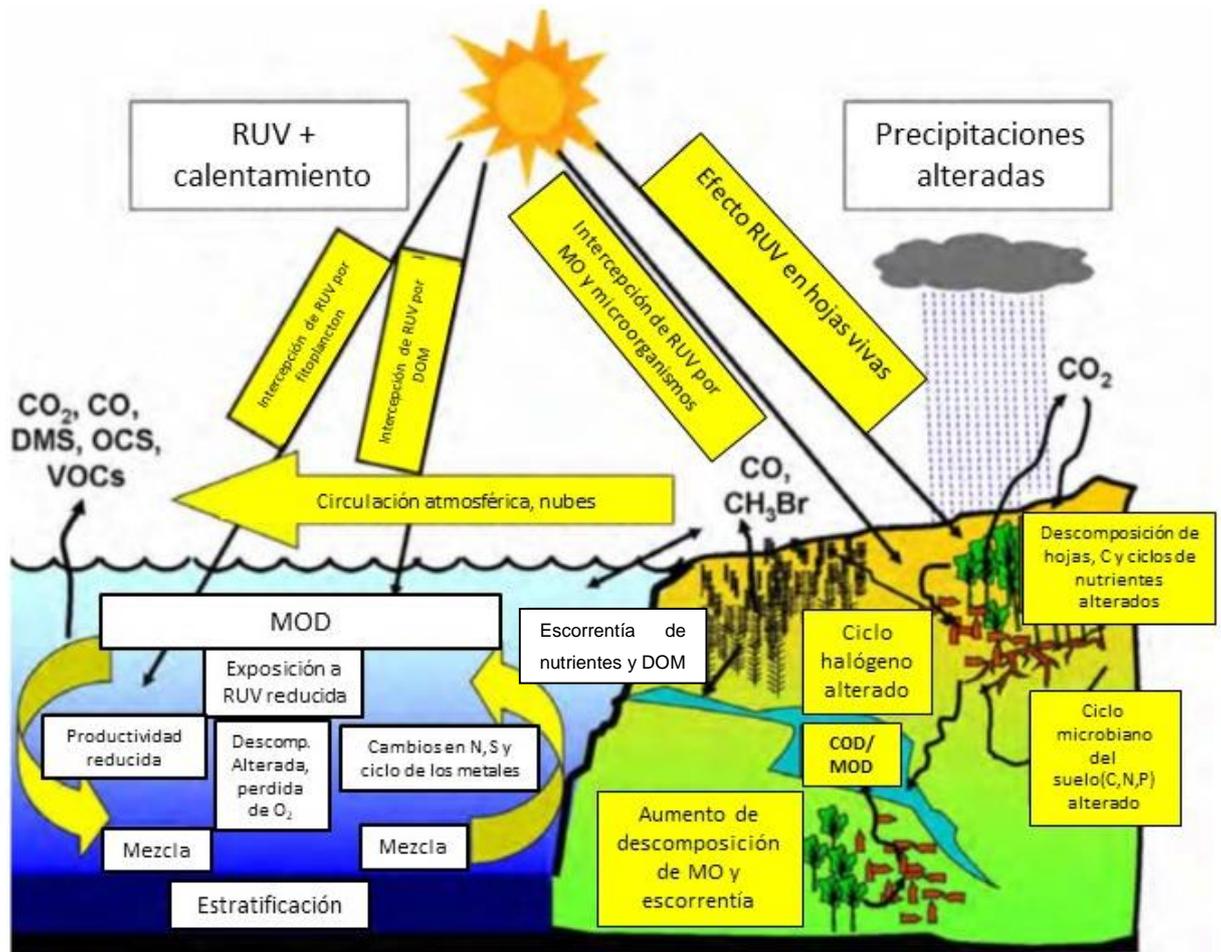


Fig. I.2: Modelo conceptual ilustrando los potenciales efectos de la Radiación Ultravioleta y el cambio climático en los ciclos biogeoquímicos: MO (materia orgánica), MOD (materia orgánica disuelta),  $CO_2$  (dióxido de carbono),  $CO$  (monóxido de carbono). La imagen fue extraída y castellanzada del trabajo de Zepp et al. (2007)

La RUV genera Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”, EROs en español) a partir de su interacción con la materia orgánica disuelta y particulada (Zepp et al. 2007). Las EROs son moléculas con electrones desapareados constituyendo radicales libres ( $O_2^-$ ,  $^*OH$ ,  $H_2O_2$ ) característica que las hace altamente reactivas. El estrés oxidativo se produce por el mantenimiento de niveles altos de EROs por encima de las capacidades de defensa de un organismo (Lesser 2006). Estas EROs son consecuencia de diversos procesos internos como la respiración (EROs endógenas) y también pueden incrementarse por estresores externos como las RUV



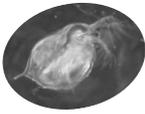
## CAPITULO I: Introducción general

---

(Borgeraas y Hessen 2000, Balseiro et al. 2008) y cambios de temperatura (Bae et al. 2016). La acumulación intracelular de estas especies tóxicas puede causar daños celulares graves y sus efectos pueden manifestarse de diversas formas y a diferentes escalas (menor tasa de reproducción, pérdida de movimiento, muerte celular) (Sørensen et al. 2003, Hessen et al. 2013). A nivel molecular, el aumento de EROs causa daños en diversas macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN) y provoca alteraciones que pueden ser severas o letales para los organismos (Browman et al. 2000). Cuando esto ocurre es necesario “neutralizar” la reactividad de estas moléculas para que no interactúen con otras moléculas vitales para el funcionamiento celular. En tal sentido, los antioxidantes neutralizan los radicales libres pero este mecanismo genera un costo energético extra y, por lo tanto, mientras mejor sea el estado nutricional de los organismos, mejor será su capacidad de respuesta (Balseiro et al. 2008).

Por otro lado, las RUV contribuyen a la disminución en las relaciones C:P (Carbono: Fósforo) y N:P (Nitrógeno: Fósforo) en productores primarios, fundamentalmente debido al efecto negativo que las RUV tienen sobre el sistema fotosintético (Xenopoulos et al. 2002, Leu et al. 2006, Leu et al. 2007). El incremento de la exposición amplifica el efecto negativo de las RUV en la fijación del carbono en los sistemas acuáticos. Las RUV modifican el ciclo del Carbono (C) a través de efectos en la fijación del C inorgánico (Fotosíntesis), el contenido de C (biomasa y materia orgánica), y en su liberación al medio (respiración y descomposición fotoquímica) (Häder et al. 1998). Dentro de los efectos indirectos de las RUV se observó que en copépodos alimentados con algas expuestas a RUV se reduce la producción de huevos y se incrementa la proporción de larvas malformadas, debido a la deficiencia de componentes esenciales en la dieta de las madres (Kouwenberg y Lantoiné 2007). Esto se podría relacionar con que las RUV afectan también otras rutas metabólicas del fitoplancton que podrían modificar la síntesis y estabilidad de algunos compuestos esenciales para el zooplancton (por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados) (Leu et al. 2006).

Al analizar la importancia de los nutrientes sobre los mecanismos fisiológicos de los organismos planctónicos, resulta imprescindible considerar los conceptos involucrados en la teoría de la estequiometría ecológica, que estudia el balance de múltiples elementos químicos en las interacciones ecológicas (Sterner y Elser 2002) Las diferentes especies animales poseen relaciones distintivas en las proporciones de los elementos: Carbono (C), Nitrógeno (N) y Fósforo (P). En los autótrofos estas relaciones



## CAPITULO I: Introducción general

---

son muy variables y dependen de la relación luz-nutrientes (Sterner et al. 1997). Por lo cual, los consumidores están sometidos a un alimento con relaciones elementales variables y serán negativamente afectados si el alimento es de baja calidad (alto C:nutrientes) (Acharya et al. 2004b, Acharya et al. 2005, McCarthy et al. 2006, McCarthy y Irvine 2010). En particular, se ha demostrado que si la calidad del alimento es baja, la capacidad de respuesta enzimática frente al estrés oxidativo generado por la RUV también será baja (Balseiro et al. 2008). De esta manera, se genera un balance entre los costos de los mecanismos enzimáticos frente al aumento del estrés oxidativo y aquellos para mantener las actividades fisiológicas básicas funcionando (Monaghan et al. 2009). Por ejemplo, en la “economía fisiológica” de un determinado individuo, una disminución en la disponibilidad de P, no sólo afecta la síntesis de determinadas moléculas (ej. ADN, ARN, NADPH, fosfolípidos), sino también otras vías metabólicas básicas (Wojewodzic et al. 2011). Las RUV pueden tener diferentes efectos con respecto al proceso por el cual el zooplancton obtiene, ingiere, digiere y asimila su alimento (Gonçalves et al. 2010). La asimilación de algunos nutrientes puede medirse a través de actividades enzimáticas, por ejemplo, para medir la adquisición del P se utiliza la Actividad de la Fosfatasa Alcalina (AFA), ya que esta enzima libera fosfatos permitiendo su transporte e incorporación celular. Se han realizado estudios que indican que la AFA es un indicador de deficiencia de P en el zooplancton (Elser et al. 2010, McCarthy et al. 2010, Wojewodzic et al. 2011), presentando un aumento en su actividad, tanto para la deficiencia de P en el alimento como por la presencia de otros estresores nutricionales (Wagner y Frost 2012). También se ha determinado que la exposición a RUV afecta la AFA negativamente (Zepp et al. 2003, Tank et al. 2005).

En un contexto de cambio global, otra variable que cobra crucial importancia es la temperatura que puede ejercer efectos sinérgicos o antagonistas con las RUV (Borgeraas y Hessen 2000, Persaud y Williamson 2005, Gonçalves et al. 2010, Williamson et al. 2010, Helbling et al. 2011). La temperatura es un factor muy importante en ectotermos, ya que el metabolismo y la actividad celular incrementan con el aumento de la misma y, por lo tanto, el efecto del estrés oxidativo se incrementa también (Lesser 1996b, Borgeraas y Hessen 2000). Cambios en la temperatura afectan los umbrales de limitación por elementos, por lo que a iguales relaciones C:nutrientes, el efecto sobre los organismos se verá acentuado con el incremento de la temperatura (Persson et al. 2011). Entonces, la resultante de la interacción de variables (RUV, temperatura, alimento, por



## CAPITULO I: Introducción general

---

ejemplo) es compleja de analizar (Araújo y Luoto 2007). Un aumento de temperatura corresponderá seguramente con una mayor necesidad de adquirir nutrientes ya que un metabolismo más alto requiere de una alimentación de mejor calidad (Wojewodzic et al. 2011). Estos dos factores a su vez interactuando con la RUV podrían tener un efecto sinérgico y ser perjudiciales para los organismos que se encuentran bajo estas condiciones.

Para minimizar los daños de la RUV, el zooplancton utiliza diferentes estrategias de protección, incluyendo la migración vertical diaria (MVD) (Williamson et al. 2011), sistemas de reparación celular (ej. enzimas) (Macfadyen et al. 2004), y la acumulación de compuestos protectores de RUV (ej. pigmentos) (Hirston 1979, Rhode et al. 2001). Dentro de los compuestos fotoprotectores se encuentran la melanina, carotenoides y micosporinas (MAAs: Mycosporin-Like-Aminoacids) (Hansson y Hylander 2009). La melanina es una molécula sintetizada por parte de los cladóceros, mientras que carotenoides y micosporinas son generados por las algas y algunas bacterias (alimento) y acumulados por los copépodos. Las defensas frente a la RUV son parte de la habilidad de los organismos para amortiguar el posible daño que ejercen las mismas (Hansson 2004, Tollrian y Heibl 2004) y dependen de la interacción con otros parámetros biológicos y físicos como la disponibilidad y calidad del alimento, la presión de depredación (Hansson et al. 2004, Moeller et al. 2005) y la temperatura del medio (Borgeraas y Hessen 2000, Connelly et al. 2009). En tal sentido, los organismos que habitan ambientes ultra-oligotróficos, como lagos profundos y con baja concentración de materia orgánica disuelta, deben afrontar condiciones de alta exposición a las RUV o EROs generados por la RUV y baja calidad de alimento, en términos de alta relación Carbono: nutrientes.

Frente al estrés oxidativo de origen lumínico, los organismos han desarrollado mecanismos celulares particulares entre los que se pueden mencionar a las enzimas de reparación de ADN, así como a las enzimas antioxidantes y detoxificantes (Sinha y Häder 2002, Souza et al. 2007, Balseiro et al. 2008, Rautio y Tartarotti 2010, Souza et al. 2010b). En particular, para bio-transformar e hidrolizar las EROs las células poseen sistemas de defensa complejos que abarcan desde compuestos antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) (Souza et al. 2010a, Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo 2011, Becker et al. 2011) hasta enzimas como Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Glutatión S-transferasa (GST) y Glutatión Reductasa (GR) (Borgeraas y Hessen 2002, Souza et al. 2007, Souza et al. 2010b). CAT cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )



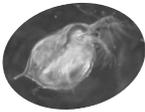
## CAPITULO I: Introducción general

---

en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ) y, por lo tanto, protege a la célula de los efectos detrimentales de las EROs de mayor vida media. GST por su parte, cataliza la conjugación del glutatión con distintas sustancias electrofílicas, cumpliendo un rol importante en la detoxificación de hidroperóxidos orgánicos formados en situaciones de estrés, de manera de eliminarlos o al menos dejarlos con menor actividad. Ambas enzimas son consideradas biomarcadores sensibles de estrés oxidativo en plancton (Barata et al. 2005a). Sin embargo, su importancia relativa puede variar ampliamente entre los diferentes grupos taxonómicos. La SOD actúa sobre los radicales de superóxido ( $*O_2^-$ ) dismutándolos a  $H_2O_2$  que luego es hidrolizado por la CAT y la Glutatión Peroxidasa (GP).

El mantenimiento de niveles adecuados de mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) implica un gran consumo de energía (Balseiro et al. 2008, Souza et al. 2010b) (Ver Figura I.3). Por ejemplo, parte de los metabolitos de la glucólisis deberían ser re direccionados a vías de producción de antioxidantes, que a su vez implicaría una reducción de glucólisis derivada a la producción de energía. Otras enzimas podrían también ser afectadas por la RUV, y en consecuencia procesos muy importantes como la muda del caparazón en crustáceos. La Quitobiasa (QB) está involucrada en la degradación del exoesqueleto y el reciclado de quitina en el proceso de muda de caparazón en artrópodos (Duchet et al. 2011). La actividad de la QB incrementa cuando hay que degradar el caparazón viejo de quitina a monómeros de N-acetylglucosamina (NAG) para que puedan ser reutilizados para la formación del nuevo exoesqueleto. Además esta enzima cobra crucial importancia porque su actividad periódica está sincronizada con la formación y liberación de huevos partenogenéticos en el zooplancton *Daphnia*, en los que ya se han observado efectos en la actividad de QB por exposición a compuestos químicos (Song et al. 2017a).

Dada las características de los lagos oligotróficos patagónicos, el aumento de las RUV podría alterar la composición, el tamaño, la distribución y la productividad de la comunidad acuática (Helbling 2003, Häder et al. 2007). Los lagos andino-patagónicos representan ambientes particulares dado que se caracterizan por ser ultra-oligotróficos, muy transparentes, pobres en nutrientes y materia orgánica disuelta y particulada y con una zona eufótica extensa (Modenutti et al. 2001, Pérez et al. 2002, Balseiro et al. 2007). En estos, las dosis biológicamente efectivas de RUV pueden penetrar a niveles profundos de la columna de agua (Morris et al. 1995, Alonso et al. 2004) sometiendo a un estrés constante a los organismos que los habitan (Balseiro et al. 2008). Las RUV pueden



## CAPITULO I: Introducción general

provocar un amplio rango de alteraciones moleculares en los organismos incluyendo daños del material genético, alteraciones enzimáticas, y estrés químico (Sinha y Häder 2002, Helbling 2003, Souza et al. 2010a, Souza et al. 2012).

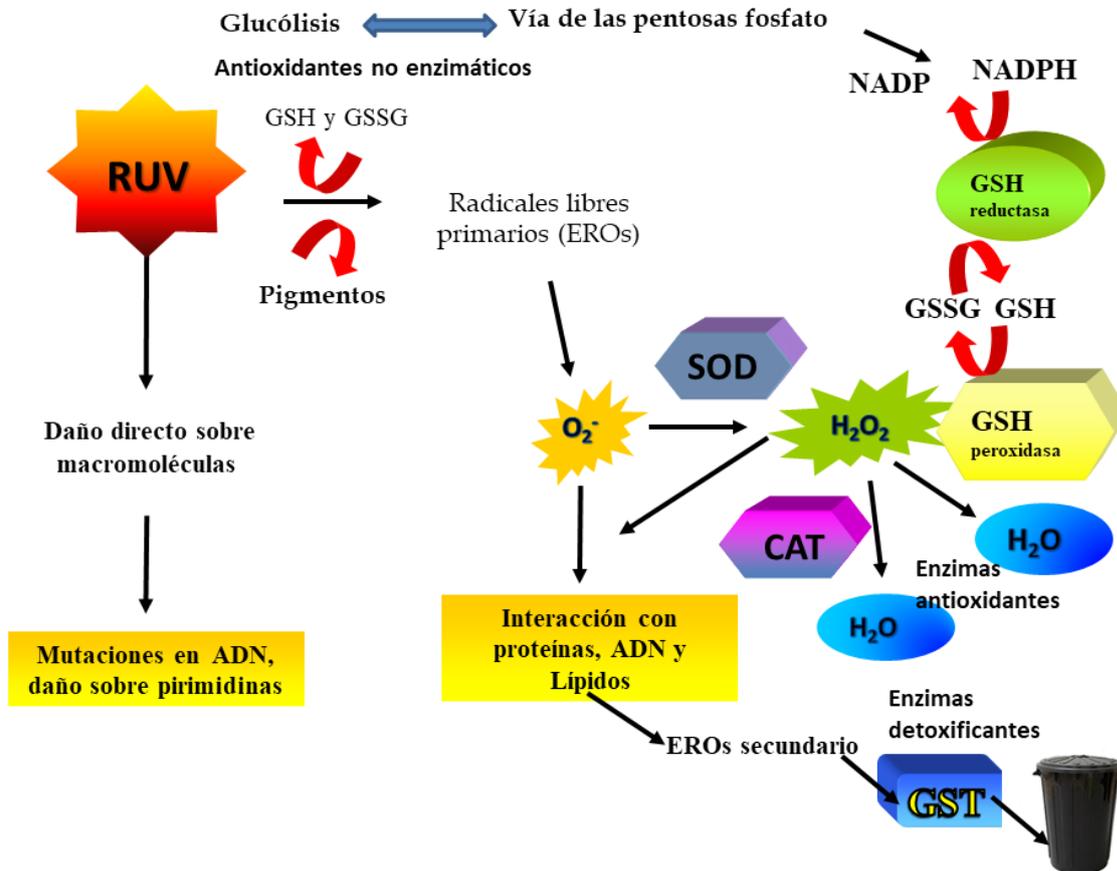
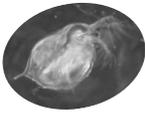


Fig. I.3: Esquema explicativo del efecto de RUV a nivel celular y las vías de defensa de los organismos acuáticos para neutralizar las EROs generadas. Como primera protección a la RUV aparecen los pigmentos y luego los antioxidantes (enzimáticos o no).

Dentro de una perspectiva evolutiva, el zooplancton ha experimentado los efectos de la RUV y, por lo tanto, ha evolucionado con esta variable por millones de años. Hoy en día los cambios ambientales son impredecibles y avanzan muy rápidamente por el efecto antrópico (Zepp et al. 2011) y, por lo tanto, los organismos tienen que adaptarse con mucha rapidez a los potenciales peligros. En su ambiente natural, el zooplancton se ve afectado por múltiples factores ya que los ambientes presentan distintas condiciones



## CAPITULO I: Introducción general

---

de profundidad, viento, depredación, temperatura, incidencia de la RUV, calidad y cantidad de alimento, entre otros. Ante la exposición a múltiples estresores en forma conjunta, la mayor calidad de alimento se relacionará con una mayor capacidad de los organismos de generar y mantener estados fisiológicos adecuados y, por lo tanto, una mayor capacidad de respuesta enzimática.

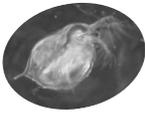
En esta Tesis analizamos al cladóceros *Daphnia* en sus respuestas fisiológicas frente a la RUV pero en interacción con estresores ambientales como los mencionados.

### *Objetivo General:*

El objetivo de esta Tesis es analizar las respuestas fisiológicas de cladóceros del género *Daphnia*, frente a la radiación ultravioleta en interacción con otros estresores.

### *Objetivos específicos:*

1. Evaluar el efecto de la RUV en la enzima quitobiasa y el consecuente efecto en el proceso de muda de *Daphnia commutata*.
2. Analizar cómo *Daphnia commutata* responde a la combinación de factores de estrés utilizando la actividad de la fosfatasa alcalina (AFA) como un indicador del requerimiento de P y a la GST como un biomarcador de estrés oxidativo.
3. Analizar cómo el aumento de la concentración de melanina en *Daphnia dadayana* afecta la actividad antioxidante frente a la exposición a RUV.
4. Analizar si la inducción de estructuras anti-depredadoras (yelmo) disminuye la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo.



### *Hipótesis:*

1. La actividad de la quitobiasa y los intervalos de muda serán afectados por la exposición de *Daphnia* a niveles sub-letales y crónicos de RUV.
2. Las relaciones elementales de C:P del alimento interactuarán con la temperatura y la RUV en la capacidad de obtener P (AFA) por parte de *D. commutata*.
3. La generación de melanina se modificará por la exposición a RUV lo que a su vez afectará a la actividad antioxidante.
4. La generación de yelmo como estructuras anti-depredadoras afectará a la respuesta de la actividad antioxidante.



### CAPITULO II

#### **Efecto de la RUV en el proceso de muda de *Daphnia commutata*, utilizando la actividad de la Quitobiasa como indicador.**

##### **Introducción**

Los crustáceos, como el resto de los artrópodos, se caracterizan por crecer a través de mudas en las que cambian de exoesqueleto, pasando de un estadio al siguiente (Stevenson 1985). Este proceso se encuentra regulado por un complejo sistema neuroendocrino (Žitňan et al. 2007), y es conocido como muda. El proceso de muda está regulado por una serie de hormonas y mediado por enzimas que se encargan de desprender el caparazón (cutícula) viejo del nuevo, que aun blando, se agranda y luego endurece para servir de sostén y protección hasta el nuevo proceso de muda. Durante el ciclo de muda, ocurren una serie de cambios fisiológicos y comportamentales, tales como la formación de una nueva cutícula, la degradación y reabsorción de la vieja cutícula, su desprendimiento (ecdisis) y finalmente la post-ecdisis que corresponde al endurecimiento y pigmentación de la nueva cutícula (Reynolds 1987). El fluido que se encuentra en el espacio intersticial entre la nueva y vieja cutícula es un combinación de enzimas e iones inorgánicos involucrados en la degradación y reciclaje de las vieja cutícula (Reynolds y Samuels 1996). Estas enzimas incluyen predominantemente enzimas quitinolíticas, correspondientes a quitinasas y quitobiasa, y varios tipos de proteasas (Reynolds y Samuels 1996). En este proceso, las proteasas catalizan las proteínas cuticulares a péptidos y aminoácidos, mientras que las enzimas quitinolíticas son las responsables del proceso de degradación de la cutícula de quitina a monómeros de N-acetyl- $\beta$ -glucosamina (NAG) (Reynolds y Samuels 1996, Merzendorfer y Zimoch 2003). El control de la expresión y secreción de estas enzimas es vital para lograr una muda exitosa en artrópodos.

Dentro de las enzimas quitinolíticas, la quitinasa degrada la quitina a oligosacáridos (dímeros y trímeros de NAG) (Roff et al. 1994) mientras que la quitobiasa (QB) hidroliza estos oligosacáridos resultantes a monómeros (Muzzarelli 1977) los que son reabsorbidos para la nueva cutícula (Buchholz y Buchholz 1989). Estas enzimas se



## CAPITULO II: RUV y muda

encuentran en el espacio que separa el caparazón viejo del nuevo y una vez que ocurre la ecdisis, la quitobiasa es liberada al medio (Vrba y Macháček 1994). Esto significa que en este momento la QB disminuye su concentración en el individuo, y vuelve a aumentar en el espacio intersticial cuando se encuentra cerca de la próxima muda. Por esta razón, el aumento de la actividad enzimática dentro del organismo ocurre en intervalos discretos a través del ciclo de vida y mientras más cerca se encuentre del momento de ecdisis mayor será su abundancia y actividad (Espie y Roff 1995a). La QB, ha sido ampliamente utilizada como biomarcador para estudiar la influencia de estresores ambientales en la muda, crecimiento, biomasa y dinámicas poblacionales en artrópodos (Espie y Roff 1995a, Sastri y Roff 2000, Zou 2005, Richards et al. 2008, Conley et al. 2009, Duchet et al. 2011, Qi et al. 2013). La expresión de la QB está positivamente regulada por una hormona de la muda endógena (20-hydroxyecdisona) a través de la activación transcripcional del receptor de ecdisona (Zou y Fingerman 1999, Merzendorfer y Zimoch 2003, Zheng et al. 2008). Esta hormona se secreta de a pulsos cuando es necesario comenzar el proceso de muda. Ambas actividades de la QB (interna y externa) sirven como indicadores de frecuencia y calidad de muda en crustáceos (Espie y Roff 1995a, Sastri y Roff 2000, Hanson y Lagadic 2005).

La actividad de QB fue señalada como un indicador eficiente de la activación del receptor de ecdisona por antagonistas (fármacos) (Zou y Fingerman 1999). Algunos compuestos químicos antagonistas a 20-hydroxyecdisona pueden interactuar con el receptor de ecdisona y modular la señal de la muda. La exposición del receptor de ecdisona a ciertos químicos genera un atraso o una muda precoz, mayormente relacionado con la perturbación de la ecdisis (Song et al. 2017a). Varios pesticidas han sido desarrollados sobre esta base, para contrarrestar los efectos perjudiciales de los artrópodos en los cultivos (Nakagawa 2005). Sin embargo, en algunos casos pueden afectar otras especies como, por ejemplo, a crustáceos acuáticos cuando los químicos llegan al agua, generando cambios en el proceso de muda (De Wilde et al. 2013).

En crustáceos como el cladóceros *Daphnia*, la cantidad de mudas durante su vida no es fija, sino que depende de distintos factores, como la temperatura, y la disponibilidad de recursos (Threlkeld 1985, Ebert 1992, Espie y Roff 1995b). Existen evidencias que algunos compuestos químicos pueden modificar el tiempo entre muda y muda (Overturf et al. 2015), además de las variables ambientales ya mencionadas. La exposición a radiación ultravioleta (RUV) genera un efecto negativo en el zooplancton (Leech y



## CAPITULO II: RUV y muda

---

Williamson 2000, Hessen et al. 2003, Rautio y Tartarotti 2010) afectando sus actividades enzimáticas (Barata et al. 2005b, Souza et al. 2010a, Souza et al. 2010b). Sin embargo, aún no hay evidencias sobre el efecto de la exposición a RUV en la muda de los zoopláncteres. La muda es un momento crucial en el ciclo del zooplancton ya que los individuos se encuentran en un estado vulnerable y mientras más se extienda el período de cambio de caparazón mayor es la probabilidad de no poder escapar de otros riesgos (i.e. depredación) (Ohman 1988). El proceso de muda, además de tener un efecto directo en el crecimiento, también está involucrado en la liberación de neonatos partenogenéticos y en el desprendimiento de huevos de resistencia en cladóceros (Halcrow 1976, Skinner 1985). Por lo tanto, es un proceso crucial en el ciclo de vida del zooplancton y resulta muy interesante evaluar el posible efecto de las RUV al interactuar con la enzima QB.

En particular en la región andina norpatagónica, *Daphnia commutata* es una especie transparente que habita lagos profundos con depredadores visuales (peces) y bajo contenido de carbono orgánico disuelto (Balseiro et al. 2007). En estos lagos, la absorción de luz por parte de las sustancias disueltas es baja y la radiación solar llega a niveles profundos (Pérez et al. 2002). En consecuencia, el zooplancton está muy expuesto a los posibles efectos de la RUV y esto lo haría vulnerable a potenciales efectos sobre la muda. En este capítulo, se analiza el efecto de la RUV sobre la actividad de QB en *Daphnia commutata* para evaluar el impacto de estresores subletales como es la RUV (comparable a los efectos que producen algunos químicos) en un momento vulnerable del ciclo de vida de los crustáceos.



*Objetivo:*

Evaluar el efecto de la RUV en la enzima QB y el consecuente efecto en el proceso de muda de *Daphnia commutata*.

*Hipótesis:*

La actividad de la QB y los intervalos de muda serán afectados por la exposición de *Daphnia* a niveles subletales y crónicos de RUV.

*Predicciones:*

- a. La actividad de la QB antes de la ecdisis será menor en animales expuestos a RUV que en el control.
  
- b. La sincronización de la muda entre animales de la misma cohorte se verá desincronizada por los efectos negativos de las RUV.



### Materiales y métodos

*Daphnia commutata* fue elegida para realizar este experimento ya que muda en intervalos frecuentes, es fácilmente cultivada bajo condiciones de laboratorio, y representan una fracción importante de la biomasa zooplanctónica de los ambientes de agua dulce de la Patagonia andina. Los individuos de *D. commutata* utilizados en estos experimentos provienen de un cultivo de laboratorio, el que fue iniciado a partir de individuos del lago Mascaridí (Parque Nacional Nahuel Huapi, en la Patagonia, Argentina). Los especímenes utilizados se encuentran en cultivos de laboratorio en condiciones constantes de temperatura (15 °C), fotoperiodo (14:10 hs luz:oscuridad) y alimento (*Chlamydomonas reinhardtii* cultivadas en laboratorios con medio MBL).

#### *Experimento exposición a RUV*

Se mantuvieron clones madres de *D. commutata*, correspondientes a la misma cohorte, bajo condiciones de laboratorio controladas (Temperatura: 15 °C y fotoperiodo 14:10 h luz:oscuridad) alimentadas *ad libitum* para que desarrollen la mayor cantidad de huevos posibles, de forma sincronizada. Los neonatos nacidos durante un periodo de 12 h (es decir que tuvieron la misma edad) fueron separados y colocados en nuevo medio con alimento (*Chlamydomonas reinhardtii*) en concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> de C.

Los neonatos fueron distribuidos de a diez en frascos de cuarzo de 150 mL y se los expuso a RUV 2 h todos los días durante 8 días, con un respectivo control en frascos de vidrio y cubiertos con acetato de celulosa para evitar que la RUV incida en estos tratamientos (ver más abajo Características de la luz). Todos los días, después de la exposición a RUV se extrajeron 4 individuos de *Daphnia* de cada réplica (4 réplicas) los que se colocaron inmediatamente en freezer -80 para su posterior análisis enzimático.

Diariamente se contabilizaron la cantidad de mudas para verificar si el efecto de la RUV afectaba la muda de *Daphnia* y se tomaron fotos laterales de individuos al azar para determinar su crecimiento en cada tratamiento. Este procedimiento se llevó a cabo con un microscopio estereoscópico con una cámara adicionada al mismo y fueron procesadas a través del software Image-Pro Plus, (Media Cybernetics), siguiendo Acharya et al. (2004a) y Balseiro et al. (2007).



### *Experimento de recuperación*

Adicionalmente se llevó a cabo un experimento donde se expuso a los neonatos a las mismas condiciones del tratamiento con RUV sólo que al 5to día se los dejó de irradiar para evaluar la capacidad de recuperación a los daños generados por la RUV durante los primeros 5 días de vida. Se extrajeron y posteriormente se realizó la medición enzimática de la QB del día 5 al 8 del experimento.

### *Características de la luz*

La fuente de luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 340 nm), dos lámparas fluorescentes de luz día y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30 W). Las lámparas luz día (“RFA” – Radiación Fotosintéticamente Activa) + la luz negra sin UV corresponden al tratamiento control. El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al. 1999). La luz negra se incluyó para llenar la brecha entre el máximo de emisión de UVA340 ( $\lambda_{\text{max}}$ : 350 nm) y las lámparas fluorescentes de luz diurna ( $\lambda_{\text{min}}$ : 400 nm). Durante la incubación, los animales recibieron  $35 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  de 340 nm de longitud de onda, un nivel de irradiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis diaria de 340 nm fue de  $2520 \text{ J m}^{-2}$ .

### *Determinaciones bioquímicas*

La actividad de QB se determinó siguiendo a Oosthuis y colaboradores (2000) con 4 especímenes por medición. Cada réplica se homogeneizó con un homogeneizador ultrasónico (Sartorius, LABSONIC M, con 0.6 ciclos, 80% de la amplitud y punta de 2 mm Ø) en solución buffer 100  $\mu\text{L}$  (Citrato-Fosfato pH = 6). La actividad de QB se determinó fluorométricamente (Perkin-Elmer LS45) con cinética enzimática con una excitación de 360 nm / 10 nm y una emisión de 420 nm / 10 nm y para cada muestra se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de MUF-NAG 300  $\mu\text{M}$  como sustrato. QB se expresó en nmoles de producto formado (MUF)  $\text{min}^{-1} * \mu\text{g}^{-1}$  de peso seco de los animales.



### *Análisis estadístico*

Las diferencias en la actividad de la QB de *Daphnia commutata* expuesta a RUV y RFA se analizaron con un test-*T* pareado, con el fin de comparar día a día las diferencias entre cada tratamiento. El mismo test se aplicó para analizar el experimento de recuperación de RUV. Todos los gráficos y análisis de actividad enzimática se realizaron en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.

Para analizar el crecimiento de *D. commutata* se realizó una prueba de ANCOVA (factor: Luz y Co-variable: Tiempo) seguido de un test *a posteriori* Tukey de comparaciones múltiples. Este análisis se realizó con el programa RStudio (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL: <http://www.rstudio.com/>). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.



### Resultados

#### *Experimento de exposición a RUV*

La exposición a RUV de *Daphnia commutata* generó un efecto en la actividad de la enzima QB, con una significativa disminución en los individuos del tratamiento RUV en interacción con el tiempo (test-*T* pareado;  $T = 4.207$   $GL = 27$   $P < 0.001$ ; Figura II.1a). Esto significa que los organismos más grandes presentan mayor actividad coincidiendo con Vrba y Machacek (1994). La disminución en la actividad de la QB generó una desincronización en la muda de *Daphnia commutata* (Figura II.1b); los individuos expuestos a RUV no presentan una muda sincronizada como lo hacen los del tratamiento control. Por otro lado, también se observó una disminución en el crecimiento de los individuos expuestos a RUV con respecto al control en interacción con el tiempo (ANCOVA luz\*tiempo;  $F_{6, 42} = 3.758$   $P = 0.004$ ; Figura II.1c). Además, hubo un aumento en la diferencia de tamaño en el tiempo entre los tratamientos (PAR y RFA) que se evidenció en los últimos días del experimento (Figura II.1c).

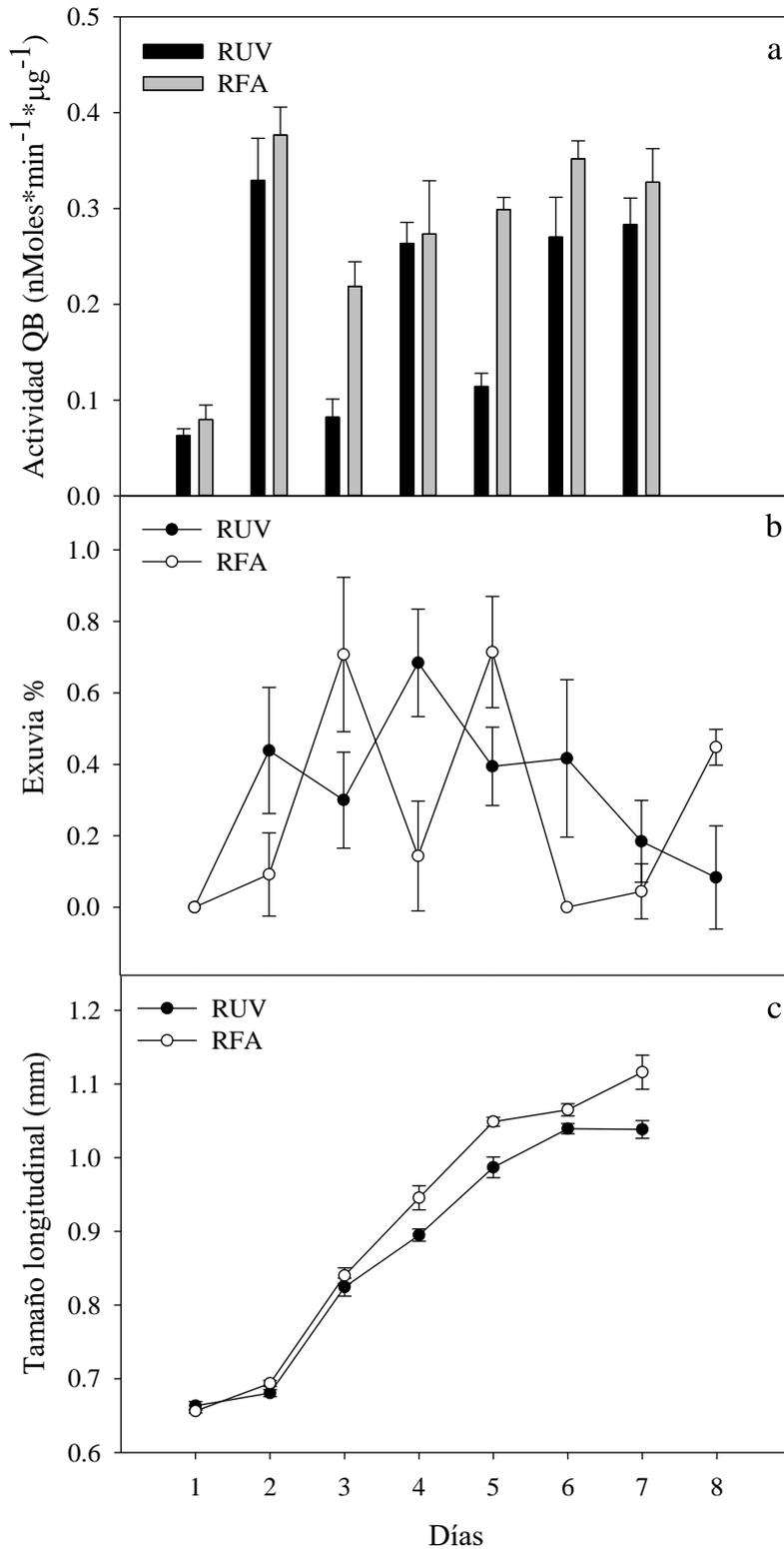


Fig III.1. **Resultados de exposición de *D. commutata* a RUV.** (a) Actividad de la QB bajo dos condiciones de luz (barras negras = RUV y barras blancas = RFA) en un período de 8 días. (b) Porcentaje de exuvias de la cohorte utilizada para el experimento durante 8 días bajo dos condiciones de luz (puntos negros = RUV y puntos blancos = RFA). (c) . Las barras de error representan el error estándar en todos los gráficos.



### Experimento de recuperación

Los resultados del experimento de recuperación indican que *D. commutata* no pudo recuperar su actividad enzimática dañada por la exposición a RUV. No se encontraron diferencias significativas entre organismos expuestos y no expuestos a partir del 5to día de exposición a RUV (*test-T* pareado;  $T = 0.109$   $GL = 11$   $P = 0.457$ ; Figura II.2). Por lo tanto, según los resultados obtenidos no habría una capacidad de recuperar la actividad enzimática dañada por la exposición a RUV en los primeros días de vida de *Daphnia*.

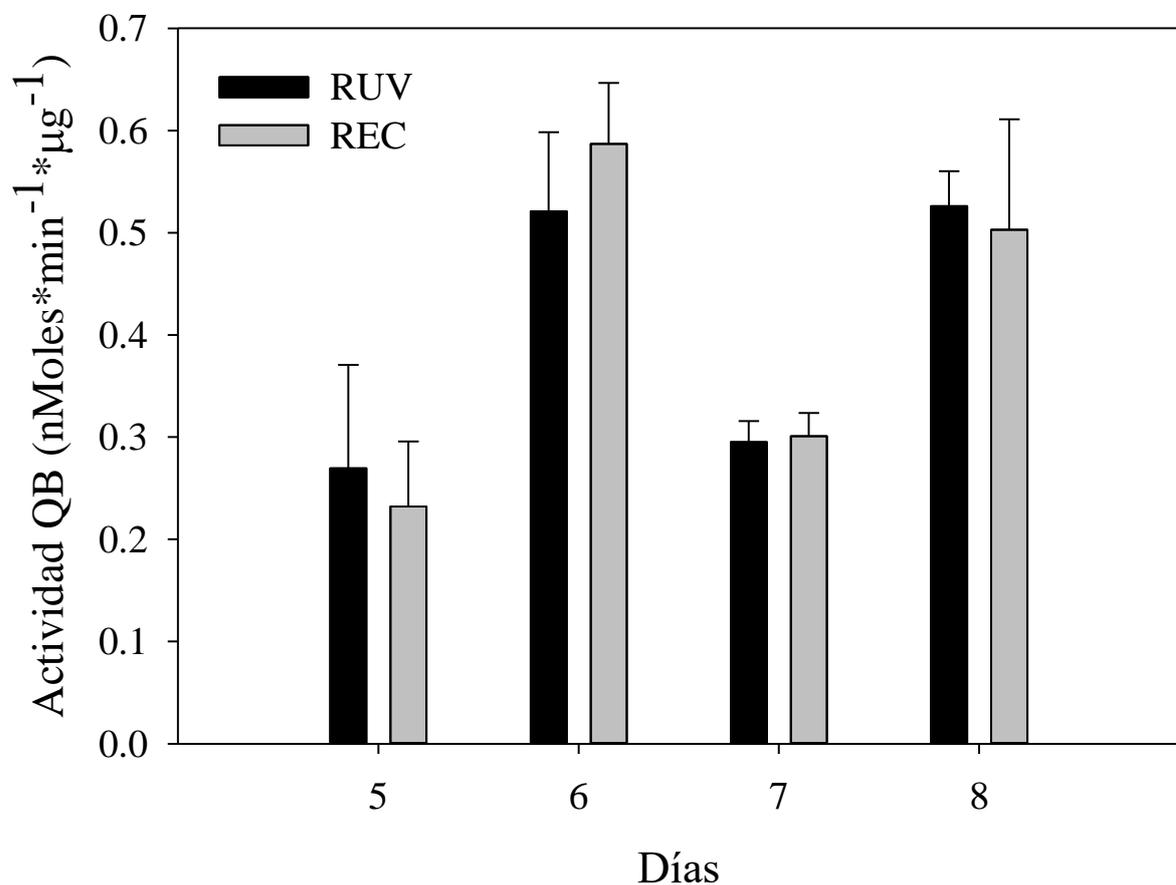


Fig II.2. Experimento de recuperación en *D. commutata*. Actividad de QB en dos condiciones de luz (barras negras = RUV y barras grises = REC (luz RFA solamente) del día 5 al 8 de exposición. Las barras de error representan el error estándar.



### Discusión

En relación a la hipótesis planteada, se confirma que la actividad de la QB y los intervalos de muda fueron afectados por las RUV en *D. commutata*. El efecto de la RUV en la muda de caparazón de *D. commutata*, resulta en una desincronización de los individuos pertenecientes a la misma cohorte, probablemente debido a la disminución en la actividad de QB. Este resultado se ve reflejado, además, en la disminución del crecimiento de los organismos expuestos a RUV. Como ya se mencionó, la actividad de QB es un indicador de la producción de biomasa del zooplancton (Oosterhuis 2000). A pesar que el grupo expuesto a RUV no presenta un número menor de mudas total en los resultados, la desincronización observada puede afectar otros procesos importantes como el desprendimiento de huevos de resistencia, en el caso que no lleguen a formarse a tiempo, o el nacimiento de huevos partenogenéticos (Halcrow 1976, Skinner 1985). Que normalmente se encuentran sincronizado con el momento de la ecdisis, así como la vitelogénesis, en las que ambas requieren grandes cantidades de energía. En general, ninguno de los procesos tiende a ser exitoso si se encuentran desincronizados (Bodar et al. 1990)

El momento de la ecdisis es crucial por varias razones, por un lado, cuando se está desprendiendo la muda hay un incremento virtual del tamaño, ya que el volumen efectivamente ocupado por ambos caparazones es mayor, y combinado con la reducción en la capacidad de escape, los individuos se vuelven más vulnerables a los depredadores. Por otro lado, la deposición de nuevos huevos en la cámara ocurre justo después de la ecdisis y son mantenidos por debajo del caparazón hasta el nuevo proceso de muda donde se liberan los neonatos al medio (Rinke y Vijverberg 2005), por lo tanto una desincronización en el proceso de muda, afecta directamente el éxito reproductivo de *Daphnia*. También se ha comprobado que en el momento de la ecdisis aumenta la vulnerabilidad de *Daphnia* a tóxicos (Lee y Buikema Jr 1979). Sumado a esto el efecto de la exposición a RUV también podría complicar el desprendimiento del caparazón viejo y dificultar la expansión del nuevo caparazón en caso que el viejo no llegue a desprenderse adecuadamente por la falta o deficiencia de QB. De manera similar se ha demostrado que algunos químicos interactúan con el receptor de ecdisona e impiden la liberación del caparazón viejo, causando la muerte de *Daphnia* por acumulación de exuvias que no han llegado a la ecdisis completa (Song et al. 2017b). Exposiciones más intensas o prolongadas en el tiempo a RUV, podrían tener efectos similares, y causar



## CAPITULO II: RUV y muda

muerte como consecuencia de la alteración de un proceso complejo y vital como es la ecdisis.

*D. commutata* es una especie de caparazón transparente que habita lagos profundos de la región Andina Nord-Patagónica. En estos ambientes, se encuentra expuesta a depredación por parte de peces planctívoros visuales y, por lo tanto, su estrategia efectiva para mitigar el riesgo de depredación es la migración vertical (Balseiro et al. 2007). La migración hacia niveles profundos en lagos (hipolimnion) permite que los depredadores visuales (peces) detecten menos a las presas (zooplancton) (Balseiro et al. 2007) y al mismo tiempo los cladóceros pueden refugiarse de los efectos negativos de la RUV del epilimnion. Sin embargo, el zooplancton realiza el proceso de muda y liberación de huevos partenogénicos en la zona del epilimnion (Rinke y Petzoldt 2008), debido a que la cantidad de alimento y la temperatura son más favorables para el proceso enzimático relacionado con la muda. El zooplancton de lagos con peces depredadores visuales migra a la zona del epilimnion mayormente por la noche (Williamson et al. 2011), así puede evitar los daños por la radiación del sol y la posibles depredadores. Un comportamiento similar fue descrito para *D. commutata* en lagos andinos nord-patagónicos (Balseiro et al. 2007). La desincronización que se observa experimentalmente en *Daphnia* bajo tratamiento RUV, podría modificar los horarios de muda y consecuentemente el riesgo de depredación si el proceso se demora y por ende la migración a zonas profundas durante el día. Por otra parte, la liberación de neonatos ocurre luego de la ecdisis (Rinke y Vijverberg 2005) y, por lo tanto, es muy importante conocer cómo se afectará el ciclo reproductivo de *Daphnia* cuando hay una desincronización en la muda. En tal sentido, sería importante determinar si será capaz de liberar neonatos en el tiempo que corresponde para su correcto desarrollo, en su ambiente natural. Ya que estos procesos se encuentran sincronizados y regulados por la disponibilidad de alimento y la temperatura (Espie y Roff 1995b). El resultado final podría afectar a la población de *Daphnia* con un aumento en la mortalidad por depredación, o el incremento de un efecto subletal por la exposición a RUV durante el proceso de ecdisis.

En nuestros experimentos sólo se midió la actividad de QB para entender mejor cómo es la dinámica del efecto de la RUV en la muda de *Daphnia*. Por otro lado, en este trabajo no se identificaron mecanismos por los cuales se produce el daño. Es posible que la RUV genere algún tipo de daño al receptor de ecdisona, que también puede ser la causa



## CAPITULO II: RUV y muda

de la disminución de la actividad de QB con la consiguiente desincronización de la muda, tal como ha sido observado en este trabajo.



### CAPITULO III

#### **Efectos interactivos entre calidad de alimento, temperatura y RUV en la actividad de la fosfatasa alcalina en *Daphnia commutata***

##### **Introducción**

Los ecosistemas acuáticos están siendo afectados por el aumento de la temperatura y la radiación ultravioleta (RUV). Estos cambios modifican la intensidad de la luz y la entrada de nutrientes, afectando en consecuencia la relación C:P (carbono: fósforo) de los productores primarios (Sterner et al. 1997), y por lo tanto, la calidad del alimento para el zooplancton (Dobberfuhl y Elser 2000, Elser et al. 2000). En este contexto, los organismos que necesitan un alto contenido de nutrientes son más susceptibles al alimento de baja calidad (Sterner et al. 1993), consecuentemente, animales bien nutridos hacen frente a los factores de estrés de manera más eficiente que los que están empobrecidos nutricionalmente (Balseiro et al. 2008).

El zooplancton herbívoro constituye un eslabón muy importante en las redes tróficas acuáticas, ya que transfieren los nutrientes de los productores primarios (al consumirlos) a niveles tróficos más altos (al ser consumidos) (McQueen et al. 1989, Carpenter et al. 2001, Sterner y Elser 2002). La incorporación de nutrientes por parte del zooplancton puede vincularse a algunas actividades enzimáticas; por ejemplo, la adquisición de P está estrechamente relacionada con la fosfatasa alcalina (FA). La FA es una enzima frecuente en los organismos y se encuentra comúnmente unida a la superficie celular o en la fracción disuelta (Tank et al. 2005). Esta enzima libera fosfatos unidos a macromoléculas, permitiendo el transporte y la absorción sub-celular de fósforo (P) proveniente de los alimentos (Elser et al. 2010, Wojewodzic et al. 2011). La actividad de FA (AFA) está considerada como un indicador de la deficiencia de P en el zooplancton y la actividad aumenta cuando el alimento es pobre en P (Elser et al. 2010, McCarthy et al. 2010, Wagner y Frost 2012). Otros factores como la temperatura modifican los



### CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

requerimientos de P (Persson et al. 2011) y, por lo tanto, cambios térmicos podrían afectar a la AFA.

La RUV puede afectar las actividades enzimáticas de las poblaciones planctónicas a causa del aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Hessen 1993, Barata et al. 2005a, Souza et al. 2010b). Enzimas antioxidantes como Glutación S-Transferasa (GST) representan un importante mecanismo de defensa contra las EROs, mediante la inactivación de metabolitos secundarios durante el proceso de estrés oxidativo (Hayes et al. 2005). Además, la GST reduce hidroperóxidos lipídicos generados por estrés oxidativo de RUV (Hurst et al. 1998, Collinson y Grant 2003) que llevan a la destrucción de la membrana (Cho et al. 2000). Por otro lado, algunas enzimas fundamentales pueden verse afectadas de forma negativa por la RUV; se observó, por ejemplo, una disminución de la AFA extracelular en algas bajo exposición a RUV (Tank et al. 2005, Li et al. 2013). Es de esperar que la FA anclada a la membrana se encuentre “refugiada” de la RUV en el interior del cuerpo animal, pero animales que no poseen pigmentos de foto-protección, como *Daphnia commutata*, no tienen suficiente protección para las potencialmente peligrosas longitudes de onda corta de la RUV. Los cladóceros no acumulan foto-protectores tales como micosporinas (MAAs) (Siebeck et al. 1994), y la incorporación de carotenoides está registrada en pocas especies (Rhode et al. 2001). Sin embargo, algunas especies pueden sintetizar el pigmento melanina y depositarlo en la cutícula como pigmento foto-protector (Herbert y Emery 1990). Dado que un alto número de especies de *Daphnia* no son melánicas otros mecanismos de defensa como la foto-reparación (Huebner et al. 2006, Connelly et al. 2009) se vuelven muy importantes y le permiten su éxito en colonizar ambientes transparentes donde hay una alta incidencia de RUV.

En la literatura se han citado dos mecanismos alternativos para hacer frente a los efectos de la RUV sobre el ADN: Reparación Foto-enzimática (PER) y Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) (Essen y Klar 2006). La principal diferencia entre ambos es que PER no demanda de energía (ATP) para funcionar mientras que NER sí. La PER actúa en presencia de luz entre 380 y 400 nm, lo que produce la activación lumínica de la enzima fotoliasa, que revierte productos fotoquímicos del ADN inducidos por RUV (Sutherland 1981, Mitchell y Karentz 1993). La NER también revierte el daño del ADN pero actúa en condiciones de oscuridad y es una reacción enzimática múltiple que depende de un suministro de ATP (Sancar 1996). Debido a las diferencias en la demanda



### CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

de P entre ambos mecanismos se podrían esperar diferencias en la AFA en ambas condiciones.

Los grandes lagos andinos son ultra-oligotróficos, altamente transparentes y con muy bajas concentraciones de nutrientes, en particular P (Morris et al. 1995, Markert et al. 1997, Modenutti et al. 2000). Por otra parte, los lagos andinos de la Patagonia Norte exhiben una alta penetración de RUV debido a su bajo contenido de materia orgánica disuelta (Morris et al. 1995, Modenutti et al. 2013); ausencia de contaminantes aéreos (Mladenov et al. 2011) y por su proximidad a la zona de adelgazamiento de la capa de ozono (Villafañe et al. 2001). Esta zona también es propensa a ser afectada por el aumento de temperatura en el próximo siglo (Barros et al. 2015). En esta área, organismos con altos requerimientos de P (como *Daphnia*) se distribuyen de acuerdo a la relación C:P del fitoplancton (Balseiro et al. 2007) y sus respuestas enzimáticas al estrés por RUV también se ven limitadas por la disponibilidad de nutrientes (Balseiro et al. 2008).

La temperatura, la exposición a la RUV y la calidad del alimento son posibles factores de estrés que afectan el éxito de *Daphnia* en ambientes acuáticos, sin embargo, el efecto combinado de estos factores ambientales da la posibilidad de respuestas sinérgicas o antagónicas en la AFA. Este capítulo tiene como objetivo analizar cómo *D. commutata* responde a la combinación de factores de estrés utilizando la AFA como un proxy del requerimiento de P y GST como un biomarcador de estrés oxidativo. Para este fin se realizó un diseño experimental de laboratorio en el que *Daphnia commutata* fue cultivada bajo diferentes condiciones controladas de calidad de alimento (relación C:P), temperatura y luz UV, simulando a las condiciones de los lagos andinos. Basado en Balseiro et al. (2008) y Persson et al. (2011) que postula que *Daphnia* creciendo con alimento de alta relación C:P y a alta temperatura se verá más afectada por la RUV, resultando en un aumento de la AFA y una disminución en la actividad de GST.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

### *Objetivo:*

Analizar cómo *D. commutata* responde a la combinación de factores de estrés utilizando la AFA como un proxy del requerimiento de P y GST como un biomarcador de estrés oxidativo.

### *Hipótesis:*

Las relaciones elementales de C:P del alimento del zooplancton herbívoro afectará la capacidad de respuesta enzimática. En consecuencia, se verá modificada su aptitud biológica frente a cambios en la intensidad de RUV y temperatura.

### *Predicciones:*

- a. Individuos alimentados con altas relaciones C:P serán más susceptibles al aumento de la RUV y la temperatura.
- b. Una disminución de la calidad de alimento producirá un aumento en la actividad de FA. Por su parte, un incremento de la RUV implicará un aumento de las actividades de enzimas antioxidantes. Dado que para la síntesis de ambas enzimas (FA y antioxidantes) se requiere energía en forma de ATP (es decir P), la AFA podría disminuir con las RUV para permitir una mayor síntesis e incremento de actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos.
- c. El incremento de la temperatura aumentará la limitación por P, por lo que se requerirá de mayor AFA. En consecuencia, la interacción con las RUV podría reducir las respuestas antioxidantes por mayor limitación de P. Es decir, habría un efecto sinérgico entre las RUV y la temperatura.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

### Métodos

Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizó un cultivo de *D. commutata* generado a partir de un clon aislado del lago Mascaradi (Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina). El clon se mantuvo en condiciones de laboratorio por al menos 5 años antes de comenzar el experimento. Temperatura 15 °C y se alimentado “ad libitum” con un cultivo del alga de *Chlamydomonas reinhartii*.

#### *Efecto de estrés oxidativo en AFA*

Con el fin de determinar el efecto del estrés oxidativo sobre GST y AFA se realizó un experimento previo en el que *D. commutata* se expuso a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 4 h. Un efecto directo resultaría en el daño de la FA por contacto directo con las longitudes de onda corta de RUV (Tank et al. 2005, Li et al. 2013), mientras que un daño indirecto en la FA sería causado por las EROs generadas por el contacto de la RUV con moléculas orgánicas. Para separar estos dos posibles efectos, se analizó la AFA en organismos expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una concentración de ~ 1000 nM, basado en Rusak (2006) y Meinertz et al. (2008). Esta concentración es equivalente a la dosis de RUV del experimento con exposición a RUV (ver “*Características de la luz*”) que no es letal para *Daphnia* (Meinertz et al. 2008). La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al comienzo del experimento fue de 975 nM y después de 2 h llegó a 650 nM (en 4 h la mayor parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se redujo). Debido al decaimiento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> luego de 4 h, sólo mostramos los resultados de 2 h de exposición. El experimento se realizó con dos calidades de alimento (media: C:P = 850 y baja C:P = 1150) y en dos escenarios: con y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Previo a iniciar la experimentación, se aclimataron a individuos de *D. commutata* bajo las dos calidades de alimento durante 6 días y posteriormente fueron dispuestos de a 10 en frascos de 100 mL bajo las mismas condiciones que el experimento de exposición a RUV, la mitad de los frascos recibieron un suministro de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y todas las réplicas se mantuvieron a 20 °C en oscuridad. Una vez transcurridas las 2 h se extrajeron los individuos de los frascos para ser congelados para su posterior determinación de AFA y actividad de GST.

#### *Diseño experimental con RUV*

Se llevó a cabo un experimento de exposición a RUV (RUV + RFA, 290-700 nm **RUV** en adelante vs. radiación fotosintéticamente activa + luz negra 380-700 nm, **RFA**



### CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

en adelante) bajo dos tratamientos de temperatura (10 °C y 20 °C) y con tres calidades de alimentos: **alta calidad**, con baja relación C:P = 550; **mediana calidad**, con relación C:P = 850 y **baja calidad**, con una alta relación C:P = 1150. Antes de iniciar la exposición a RUV, se realizó una aclimatación de *D. commutata* durante 6 días bajo las dos temperaturas y las tres calidades de alimento mencionadas. Esta aclimatación se estableció en base a estudios previos (Hessen et al. 2002). Para ello 20 neonatos de *D. commutata* (<24 h de edad) fueron dispuestos en frascos de cuarzo de 250 mL con medio de cultivo animal COMBO libre de P (Kilham et al. 1998) y cultivo de *C. reinhartii* como alimento (0.5 mg L<sup>-1</sup> de C), con la calidad de alimento correspondiente (alta, media y baja, véase más arriba). El medio (COMBO-libre P) y la comida fueron reemplazados cada 48 h. Las concentraciones totales de P y C particulado también fueron monitoreados cada 48 h con un análisis estándar antes de añadir nuevo alimento a los frascos (véase más adelante "*Determinaciones bioquímicas*"). La aclimatación comprendió un total de 36 frascos (3 repeticiones para cada tratamiento calidad de alimento, temperatura y posterior dos condiciones de luz) y se llevó a cabo en una cámara de cultivo tipo Walk-in para ambas temperaturas y bajo RFA (longitud de onda 400-700 nm y la intensidad de 92 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con 14:10 horas de fotoperíodo (luz:oscuridad). Todo el material de vidrio y cuarzo fue cuidadosamente limpiado y esterilizado. Durante todo el experimento no se observó mortalidad de *Daphnia*.

Después de 6 días de aclimatación, la mitad de los frascos de cuarzo (seleccionados al azar) fueron expuestos a RUV, mientras que la otra mitad sólo a RFA (protegidos con una hoja nueva de filtros de acetato para eliminar longitudes de onda más cortas que 400 nm; CourtgardTM, CPFilms (Doyle et al. 2005) durante 4 horas. Después de las 4 h de exposición a la RUV se retiraron las muestras para su posterior análisis y los individuos restantes fueron expuestos a 6 h de radiación RFA+Negra (380-700 nm) para que reparen el daño de la exposición a RUV con la enzima fotoliasa y realicen la reparación PER. Una vez finalizado este período se retiraron muestras para su posterior medición y los restantes fueron dispuestos 6 h bajo condiciones de oscuridad, para que realicen el proceso de NER.

Después de las 4 horas de exposición a la RUV y RFA se extrajeron con pipeta 8 individuos de cada réplica para su posterior análisis. Todos los individuos muestreados fueron inmediatamente congelados a -80 °C para determinar AFA y actividad de GST. Antes de realizar las determinaciones bioquímicas, cada individuo fue enjuagado con



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

agua Milli-Q y medido a través de la toma de imágenes laterales para ser procesadas a través del software Image-Pro Plus, (Media Cybernetics), siguiendo Acharya et al. (2004a) y Balseiro et al. (2007). Las mediciones realizadas fueron convertidas a biomasa (peso seco en  $\mu\text{g}$ ) basado en la regresión longitud-peso obtenido de Balseiro et al. (2008) y, finalmente, se determinó el crecimiento de los individuos expuestos a las tres calidades de los alimento y las dos temperaturas. Después de cada período de reparación (PER y NER respectivamente), 4 individuos fueron extraídos de cada réplica para determinar la APA. Ver Figura III.1.

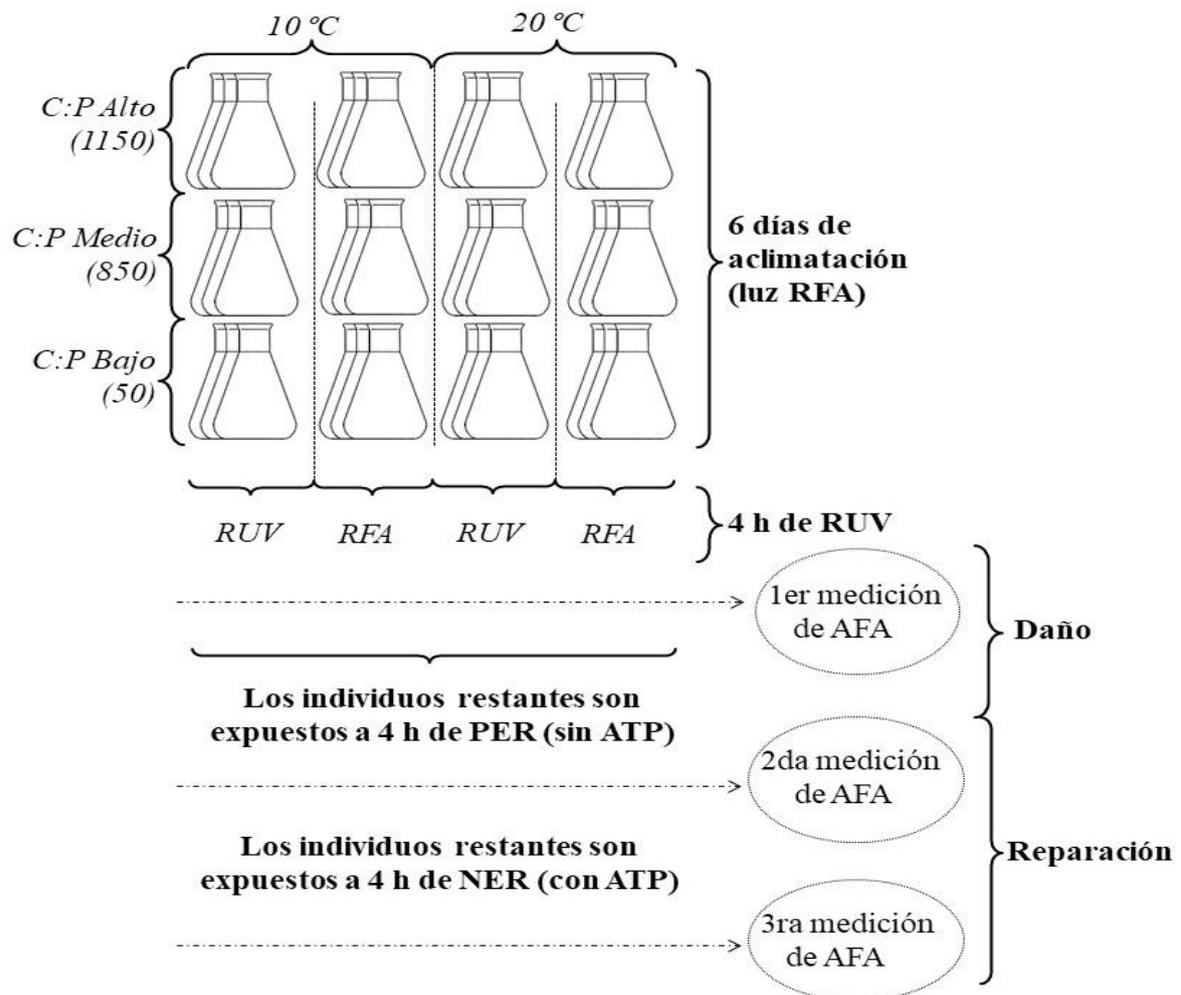


Fig. III.1. Esquema de diseño del experimento de exposición a RUV y de recuperación. En letra “negrita” se describen los tiempos y exposiciones del experimento. En “cursiva” las condiciones de cada cultivo en cuanto a calidad de alimento, temperatura y condición de RUV. Dentro de los globos punteados se marcan los momentos de extracción de individuos para su posterior análisis enzimático.



### *Características de la luz*

La fuente de luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 340 nm), dos lámparas fluorescentes de luz diurna (Philips TLT 40 W) y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30W). El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al. 1999). La luz negra se incluyó para llenar la brecha entre el máximo de emisión de UVA340 y las lámparas fluorescentes de luz diurna (Figura III.2). Durante la incubación, los animales recibieron  $35 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  de 340 nm de longitud de onda, un nivel de irradiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos andinos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis total de 340 nm en las 4 horas de exposición fue de  $5040 \text{ J m}^{-2}$ .

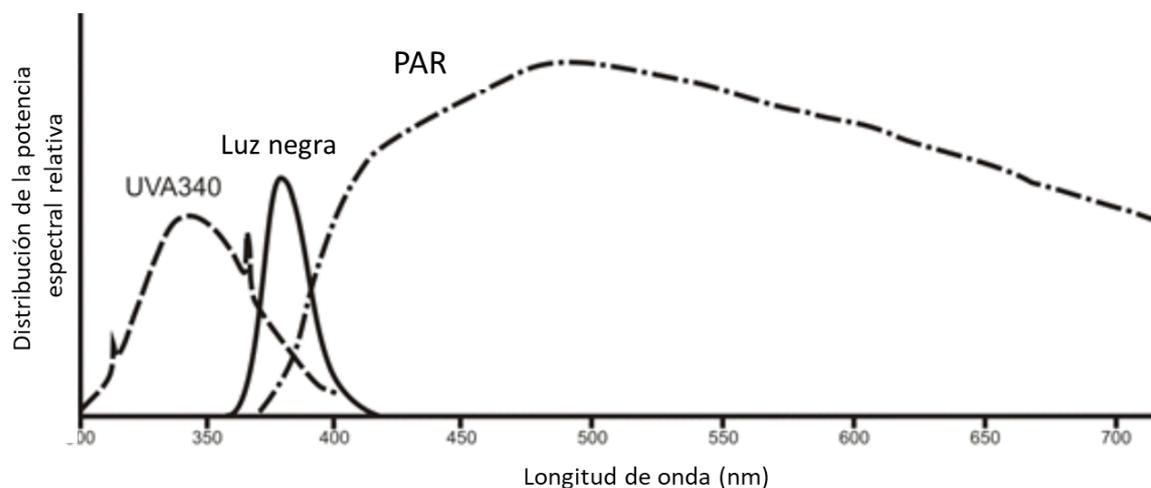


Fig. III.2. **Distribución de la potencia espectral relativa** del set de luces experimentales de acuerdo con la emisión de sus longitudes de onda en nanómetros (nm) y a las especificaciones del fabricante. La primera curva (de 300 a 400 nm) representa las dosis de RUV relativas, la segunda curva (de 350 a 410 nm) representa la dosis relativa de luz negra y la tercer curva (de 400 a 750) representa la dosis de luz RFA relativa.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

### *Cultivo de algas*

El alimento utilizado para los experimentos se obtuvo de un cultivo de algas de *C. reinhartii*. Para obtener diferentes relaciones C:P del cultivo, se utilizó medio de cultivo MBL (Guillard y Lorenzen 1972) pero con concentraciones de P más bajas (10 veces menor que la concentración original de P). La calidad de alimento baja (relación C:P = 1150) se obtuvo directamente a partir del MBL bajo en P mientras que las calidades media (relación C:P = 850) y alta (relación C:P = 550) se obtuvieron siguiendo a Persson et al. (2011) con la adición de diferentes cantidades de  $K_2HPO_4$  a los cultivos de algas en MBL de bajo P permitiéndoles a las algas asimilar P durante una hora en oscuridad.

Después de estos procedimientos (con adición o sin adición de P), los cultivos de algas fueron centrifugados a 13000 g. Una vez centrifugados los cultivos, se descartó el sobrenadante para re-suspender el pellet (algas) en COMBO libre-P. Esta suspensión se utilizó tanto para alimentar *Daphnia* como para hacer el análisis de concentración de C y P particulado. Basado en la concentración de C, se añadió la suficiente cantidad de cultivo de algas para llegar a una concentración de  $0.5 \text{ mg C L}^{-1}$  de *C. reinhartii* (concentración similar a la del lago Mascardi) a cada frasco de 250 mL, que contenía 20 individuos de *D. commutata* en COMBO libre-P.

### *Determinaciones bioquímicas*

La concentración de C de los cultivos de *C. reinhartii* se analizó con un analizador elemental CHN (Thermo Finnigan EA1112, Thermo Fisher, Milán, Italia). El fósforo total de *C. reinhartii* se determinó con una digestión con persulfato seguida de una reacción con molibdato (APHA 2005). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en al menos tres réplicas.

AFA se determinó siguiendo a Wagner y Frost (2012) con 1 espécimen por medición. Cada *D. commutata* se homogeneizó con un homogeneizador ultrasónico (Sartorius, LABSONIC M, con 0.6 ciclos, 80% de la amplitud y punta de 2 mm Ø) en solución buffer 120  $\mu\text{L}$  (Tris pH = 8) y se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a  $4^\circ \text{C}$  para obtener el sobrenadante de enzima. En cada muestra se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de 4-Metilumbeliferona-fosfato (MUP)  $0.05 \mu\text{M}$  como sustrato. La AFA se determinó fluorométricamente con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS45, con una excitación



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

de 360 nm y una emisión de 420 nm y se expresó en  $\mu\text{mol}$  de Metilumbeliferona (MU)  $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de peso seco de cada *D. commutata*.

La actividad de GST se determinó según Habig et al. (1974) en  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de buffer de fosfato (pH = 6.5), con  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu en acetonitrilo (1% v/v) y  $0.75 \text{ mg mL}^{-1}$  de L-glutación reducido como sustratos para registrar la absorbancia de GST a 340 nm, usando un espectrofotómetro Shimadzu UV 2450 a  $23 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . La actividad de GST se expresó en  $\mu\text{moles}$  de producto formado  $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de peso seco de los animales.

### *Análisis estadístico*

El efecto del experimento previo de estrés oxidativo (con y sin exposición  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se analizó con una prueba de ANOVA de dos vías (factor A: exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el factor B: calidad de alimento).

Las diferencias en la actividad de la FA y GST de *D. commutata* expuestos a la RUV y RFA en diferentes temperaturas y tratamientos de alimento fueron analizadas con un ANOVA de tres vías (factor A: temperatura, factor B: calidad de alimento y factor C: luz). Para analizar las etapas de reparación posteriores (PER Y NER), se realizó una prueba de ANOVA de dos vías (factor A: temperatura y factor B: calidad de alimento) para cada fase de recuperación. Cuando se observaron diferencias significativas se aplicó un test *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey HSD ( $\alpha= 0.05$ ).

El crecimiento somático se analizó también mediante un ensayo ANOVA de dos vías (factor A: temperatura y el factor B: calidad de alimento), seguido de un método de comparación múltiple *a posteriori* de Holm-Sidak ( $\alpha= 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos se realizaron en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y la homocedasticidad. El crecimiento somático fue transformado logarítmicamente con el fin de cumplir con el requerimiento de normalidad.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

### Resultados

#### *Crecimiento somático de Daphnia commutata bajo diferentes temperaturas y calidades de alimento*

El crecimiento somático se vio afectado por la interacción de la temperatura y la calidad de alimento (ANOVA;  $F_{2, 192} = 6.027$   $P = 0.003$ ; Figura III.3). La biomasa de *Daphnia* fue mayor a 20 °C (*a posteriori* Holm-Sidak:  $p < 0.001$ ) que a 10 °C para las 3 calidades alimento. A 20 °C se observaron diferencias significativas dentro de las 3 calidades de alimento, la baja calidad presentó valores de biomasa significativamente más bajos que la media y alta calidad (*a posteriori* Holm-Sidak:  $p < 0.001$ ). Por el contrario, a 10 °C las biomásas fueron similares para las 3 de calidades de alimento y no se observaron diferencias significativas (Figura III.3).

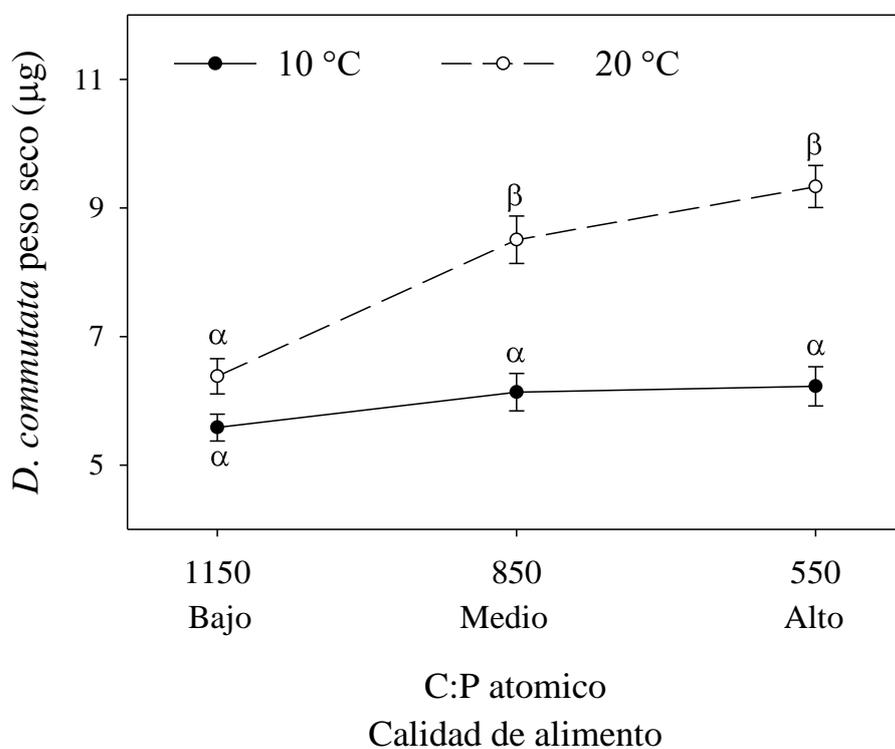


Fig. III.3. **Crecimiento somático** de *D. commutata* con tres calidades de alimento (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550) y dos temperaturas (10 °C y 20 °C). Las barras de error representan el error estándar.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

### Efectos del estrés oxidativo en AFA

Durante las 2 h de exposición a 20 °C se observó que la actividad de GST aumentó en los dos tratamientos de calidad de alimento en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANOVA de dos vías  $F_{1, 17} = 47.026 P < 0.001$ ; Figura: III.4a), mientras que se observó una disminución de AFA (ANOVA de dos vías  $F_{1, 22} = 46.757 P < 0.001$ ; Figura III.4b). Sin embargo, la respuesta en AFA resultó mayor en el tratamiento de calidad de alimento media (C: P 850) (ANOVA de dos vías  $F_{1, 22} = 60.068 P < 0.001$ ; Figura III.4b).

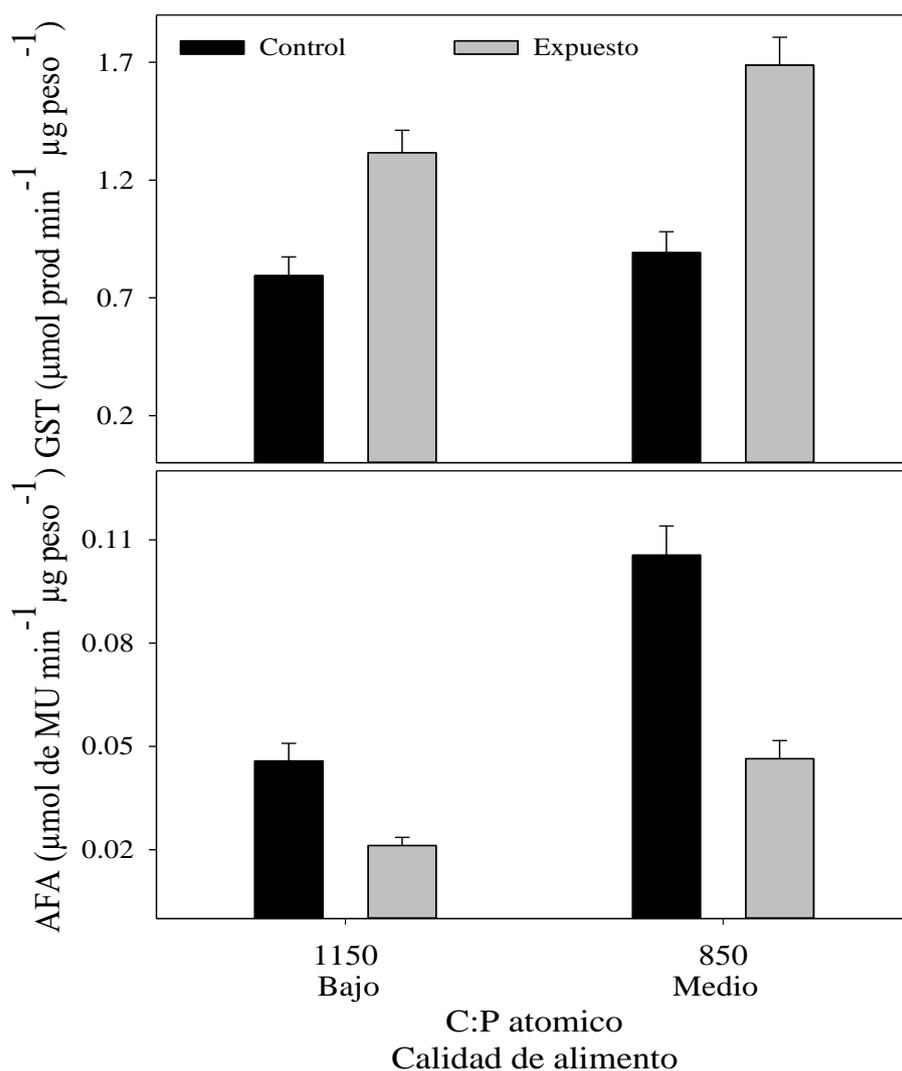


Fig. III.4. **Actividad de GST y AFA bajo exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (a) Actividad de GST después de 2 h de exponer a *D. commutata* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con baja y media calidad de alimento, a 20 °C. (b) APA después de 2 h de exponer a *D. commutata* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con baja y media calidad de alimento, a 20 °C. Las barras de error representan el error estándar.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

### *Experimento de exposición a RUV*

Durante las 4 h de exposición a la RUV se observó una disminución significativa en la AFA en relación con el tratamiento RFA (control). Por su parte, la temperatura también afectó la respuesta de AFA, siendo mayor en el tratamiento a 20 °C (ANOVA de tres vías,  $F_{1, 62} = 26.806$   $P < 0.001$ ; Figura III.5). Por otro lado, aunque la calidad del alimento tuvo efectos significativos (ANOVA de tres vías,  $F_{2, 62} = 7.064$   $P = 0.002$ ; Figura III.5) no se registró una respuesta unívoca con la temperatura. A baja temperatura (10 °C) la AFA disminuyó a medida que la calidad del alimento aumentó, a 20 °C se observó la mayor respuesta de AFA a media calidad (*a posteriori* Tukey HSD  $p < 0.001$ ), mientras que la calidad de alimento baja presentó la AFA más baja (*a posteriori* Tukey HSD,  $p < 0.001$ ; Figura III.5b).

La actividad de GST exhibió diferencias significativas entre los tratamientos de luz sólo a 20 °C (ANOVA de dos vías  $F_{1, 36} = 6.507$   $P = 0.015$ ; Figura III.6) resultando más alta bajo RUV. Además, a 20 °C se observó una tendencia a una mayor actividad de GST en animales que fueron alimentados con algas de un valor nutritivo más alto, con diferencias significativas entre la baja calidad de alimento y la media y alta calidad de alimento (Figura III.6b). Por último, la temperatura resultó con diferencias significativas en la exposición a la RUV, pero no así en el tratamiento sólo con luz RFA.



### CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

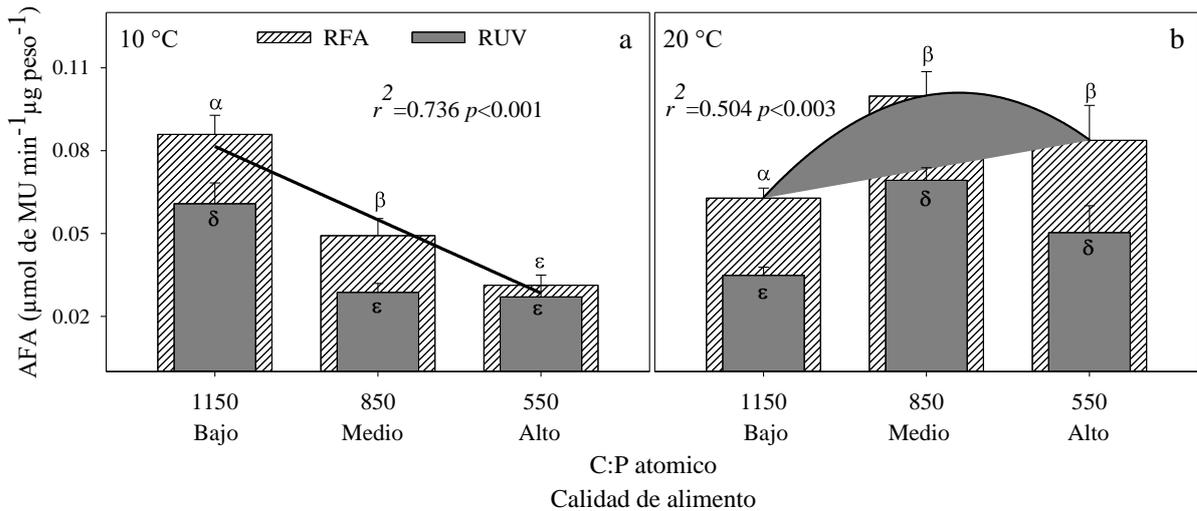


Fig. III.5. **AFA bajo exposición a RUV y RFA.** Respuesta de la AFA en *D. commutata* a la exposición a RUV vs. exposición a RFA para tres calidades de alimento (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550), en dos temperaturas a 10 °C (a) y 20 °C (b). Las barras de error representan el error estándar.

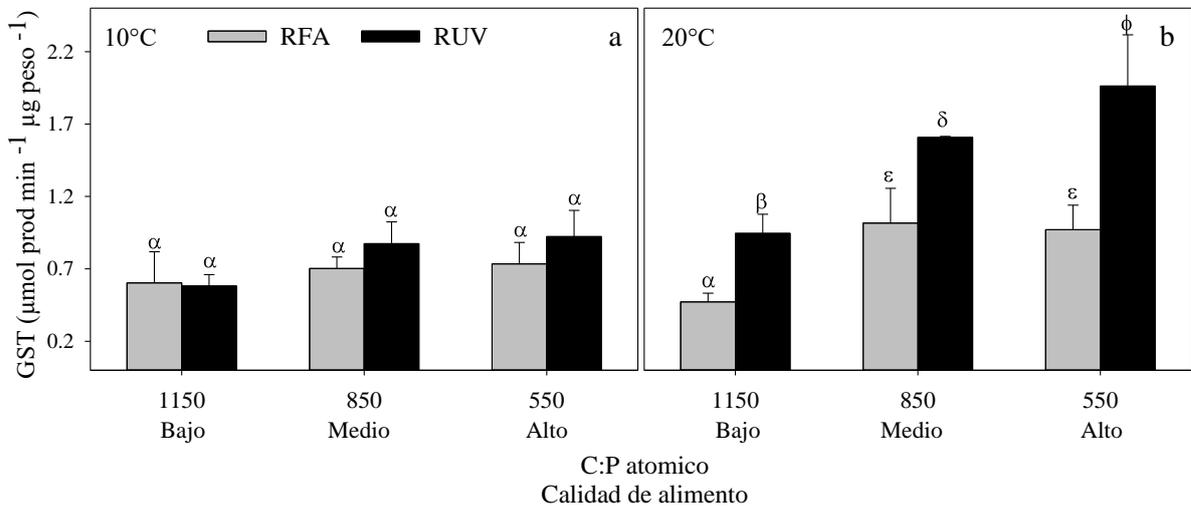


Fig. III.6. **Actividad de GST bajo exposición a RUV y a RFA.** Actividad de GST en *D. commutata* para las tres calidades de alimento utilizadas (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550), después de la exposición a RUV vs. RFA, bajo dos temperaturas a 10 ° (a) y a 20 °C (b). Las barras de error representan el error estándar.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

### Experimento de reparación de RUV

Después del primer período de recuperación (PER) de la exposición a RUV, la APA se mantuvo similar a los valores obtenidos después de la exposición RUV (Figura II.6). Por el contrario, después del segundo periodo de recuperación (NER) de la exposición a RUV se observó que la respuesta de AFA a 20 °C resultó más alta que a 10 °C (ANOVA de dos vías  $F_{1, 21} = 60.950 P < 0.001$ ; Figuras III.7c y III.7d). A 20 °C el tratamiento de la calidad de alimento media exhibió la mayor respuesta de AFA y la baja calidad de alimento la actividad enzimática más baja (Figura III.7d), aunque la curva de ajuste de la Figura III.7 no resultó significativa, la interacción temperatura X calidad de alimento si lo fue (ANOVA de dos vías  $F_{2, 21} = 12.453 P < 0.001$ ).

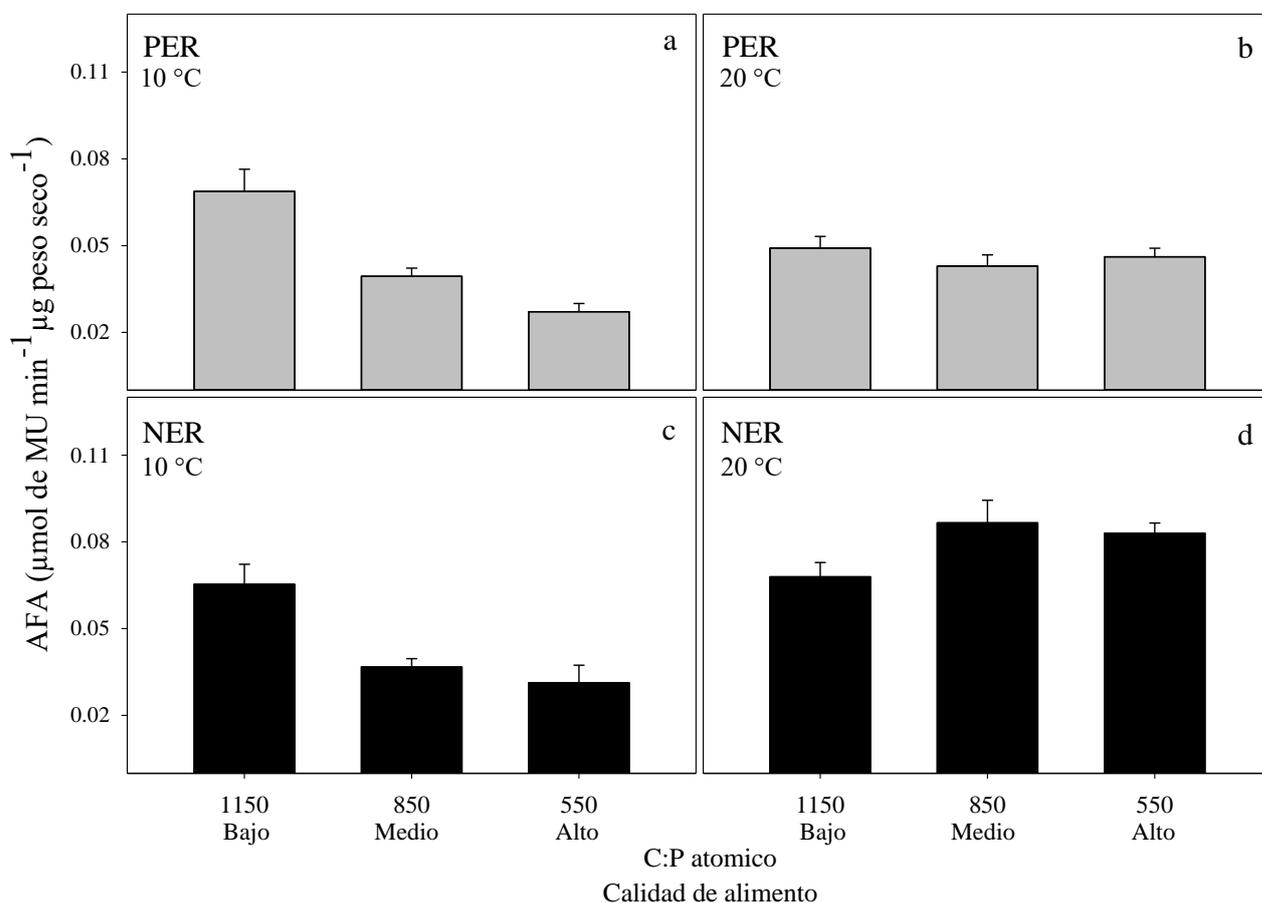


Fig. III.7. **AFA en la fase de recuperación de la exposición a RUV.** Respuesta de AFA de *D. commutata* para las fases de recuperación (PER y NER) con las tres calidades de alimento utilizadas (Bajo: C:P 1150, Medio: C:P 850, Alto: C:P 550). PER a 10 °C (a) y a 20 °C (b) y NER at 10 °C (c) y a 20 °C (d). Las barras de error representan el error estándar.



## CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

### Discusión

En los ecosistemas acuáticos, la RUV es reconocida como un importante factor de estrés biológico que causa daño celular de moléculas fundamentales (ADN, proteínas y lípidos), apoptosis y estrés oxidativo (Martindale y Holbrook 2002, Souza et al. 2012), alterando los niveles de glutatión reducidos y aumentando la actividad de ciertas enzimas involucradas en el metabolismo de especies de EROs como catalasa, glutatión reductasa y GST entre otros (Souza et al. 2007, Souza et al. 2010b). El aumento de estas defensas antioxidantes implica demandas extra de energía y requiere alta calidad de alimento para generar una respuesta adecuada (Balseiro et al. 2008, Souza et al. 2010b). Adicionalmente, la producción de EROs aumenta a temperaturas más altas (Lesser 1996a). Nuestros resultados apoyaron las premisas mencionadas ya que se observó una mayor actividad de GST a 20 °C y con alta calidad alimento (Figura III.6). Por el contrario, con baja calidad de alimento (C:P = 1150) GST exhibió valores de actividad comparativamente más bajos que indican que *Daphnia* fue fuertemente limitada por P, al no poder generar enzimas para neutralizar las EROs. Se observó la misma tendencia en el experimento con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura III.4) confirmando que GST respondió con baja actividad al estrés oxidativo cuando fue alimentada con baja calidad.

La AFA respondió negativamente tanto para la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura III.4) como para RUV (Figura III.5). Aunque, los valores absolutos de actividad fueron muy diferentes en los dos escenarios (RUV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la respuesta de calidad de alimento en ambos experimentos a 20 °C da resultados similares. Se observó que la respuesta de AFA de *D. commutata* dependió de la relación C:P de la comida con un aumento significativo en el tratamiento 20 °C en comparación con el 10 °C (Figura III.5). Crecer a una alta temperatura aumenta la limitación de nutrientes (P) porque implica mayores necesidades de nutrientes para mantener el metabolismo y crecimiento adecuados (Persson et al. 2011) y adicionalmente para proporcionar más energía para el incremento de ciertos procesos como locomoción, respiración y reproducción (Wojtal-Frankiewicz 2012). Por otro lado, a 10 °C se observó un aumento en AFA con baja calidad de alimento, lo que confirma que la AFA responde monótonamente a calidad del alimento; siendo que la AFA disminuye a medida que aumenta la calidad del alimento. A baja temperatura, se observaron bajos requerimientos de nutrientes para el crecimiento somático (Rhee y Gotham 1981) y no se ven cambios en la susceptibilidad a RUV para las 3 calidades de alimento (Borgeraas y Hessen 2000). Por lo tanto, la respuesta de la AFA en condiciones



### CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

de baja calidad de alimento (C:P = 1150) parecería cumplir con los requerimientos de P a 10 °C, con una relación negativa entre la AFA y la concentración de P, tal como se esperaba. Sin embargo, a 20 °C AFA mostró una tendencia diferente, con valores más bajos para baja calidad de alimento. Además, se observó la misma tendencia en nuestro experimento de exposición H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se llevó a cabo a 20 °C (Figura III.4). En un estudio con *D. magna*, Wojewodzic et al. (2011) indicaron que AFA fue mayor a temperaturas más bajas, sin embargo, en este estudio AFA resultó ser mayor a 20 °C que a 10 °C. Persson et al. (2011) demostraron que la limitación de P aumenta con la temperatura, por lo tanto, es probable que individuos creciendo a mayor temperatura están más limitados por P y exhibirían mayor AFA, como se observó en este estudio.

El alimento algal empobrecido (bajo contenido de P) reduce la disponibilidad de P mineral dietario disponible para *Daphnia*, por lo tanto, la AFA puede ser utilizado como un indicador de estrés por P (McCarthy et al. 2010). La cantidad de P en la comida también regula la cantidad de FA que se libera al agua, McCarthy et al. (2010) demostraron que una reducción de liberación de FA al medio es ventajoso para *Daphnia* cuando se encuentra limitada por falta de P. Así, bajo limitación por P la AFA extracelular se reduce y la concentración de FA anclada a la membrana es mayor que en animales bien alimentados (McCarthy et al. 2010). En nuestros experimentos la AFA somática más alta se observó para baja calidad de alimento a 10 °C, pero no así a 20 °C. Persson et al. (2011) demostraron que la limitación de P aumenta con la temperatura, por lo tanto a 20 °C *D. commutata* podría encontrarse tan limitada por este nutriente que ni siquiera tendría recursos para poder sintetizar FA. En este sentido, sugerimos que en virtud de la limitación de P severa (baja calidad de los alimento y alta temperatura) hay un equilibrio entre la producción de FA y otras proteínas constitutivas, por lo que la AFA no mostró una tendencia creciente al disminuir la calidad del alimento (Wojewodzic et al. 2011).

Durante la primera y segunda fase de recuperación (PER y NER) de productos fotoquímicos del ADN (no medidos en este estudio), observamos diferentes tendencias en la AFA. La primera fase (PER, 380-700nm) se caracterizó por no presentar cambios en AFA. Durante esta fase la enzima fotoliasa utiliza fotones de luz como fuente de energía, por lo tanto no requiere de energía extra (ATP) para reparar los daños generados por la RUV (Park y Rho 2002, Essen y Klar 2006). En la siguiente fase (oscuridad), se observaron cambios en la AFA que indican cambios en las demandas de P (Figura III.7c y 7d). Estudios previos observaron que se requiere ATP para la reparación del ADN en



### CAPITULO III: Alimento-Temperatura y RUV

---

NER (Park y Rho 2002), por lo tanto los requerimientos de P deberían aumentar. Es probable que este aumento de la demanda de P para la reparación (el daño en el ADN no se midió en el presente estudio) implique mayor AFA. Curiosamente, de nuevo a 20 °C, AFA mostró una tendencia similar a la observada después de la exposición a RUV, con el máximo para media calidad de alimento. Del mismo modo, podemos suponer que, a alta temperatura, con baja calidad de alimento los organismos estarían tan limitados por P que incluso la síntesis de FA se vio afectada. El hecho de que en las tres exposiciones (UVR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NER) a 20 °C mostraron la misma tendencia en la AFA, refuerza la idea que no aumenta monótonamente con la disminución de la calidad de los alimentos.



### CAPITULO IV

#### **Análisis del nivel de estrés oxidativo generado por la exposición a RUV en dáfnidos con pigmentos foto-protectores (*Daphnia dadayana*).**

##### **Introducción:**

La presencia de depredadores, la radiación ultravioleta y la disponibilidad de alimento, entre otros, son factores ecológicos importantes para el conocimiento de la dinámica poblacional y comunitaria del zooplancton. A través de la evolución, el zooplancton ha desarrollado estrategias fisiológicas, morfológicas y comportamentales que le permitan enfrentar exitosamente estas variables ambientales (Tollrian y Heibl 2004, Gabriel et al. 2005). Dentro de ellas las más conocidas son la capacidad de realizar migraciones verticales para evitar ondas de luz potencialmente dañinas y a los depredadores (Williamson et al. 2011) u obtener mejor calidad de alimentos (Lampert 1989); otra se basa en la capacidad de acumular pigmentos foto-protectores (Goodwin 1986, Herbert y Emery 1990, Shick y Dunlap 2002, Tollrian y Heibl 2004) para evitar el daño por exposición a RUV.

La exposición del zooplancton a RUV genera un daño en las estructuras celulares como el ADN y las proteínas. Estas longitudes de onda corta son potencial y efectivamente muy nocivas y aún niveles normales de RUV en latitudes templadas están asociados con un aumento en la mortalidad del zooplancton (Zagarese et al. 1994, Leech y Williamson 2000). Para evitar el daño de estas radiaciones, el zooplancton utiliza variadas estrategias como por ejemplo: mecanismos comportamentales (migración vertical), acumular compuestos foto-protectores que funcionan como barreras de RUV y mecanismos enzimáticos que contrarrestan los radicales generados por la exposición a RUV (Hairston 1976, Vinebrooke y Leavitt 1999) (Ver Figura IV.1).



Fig. IV.1: **Esquema de interacción de RUV con sistema acuático.** Efectos sobre agua y materia orgánica y estrategias de defensa por parte de los organismos acuáticos.

Los compuestos foto-protectores pueden ser obtenidos del alimento (algas fundamentalmente) y acumulado en el cuerpo del animal como es el caso de las micosporinas (MAAs) y carotenos en los copépodos (Hairston 1976, Moeller et al. 2005) y otros son sintetizados por el propio animal como es el caso de la melanina en cladóceros (Herbert y Emery 1990). Es interesante mencionar que si bien los MAAs efectivos foto-protectores (Shick y Dunlap 2002) no están presentes en los cladóceros (Tartarotti et al. 2001, 2004) por lo cual la presencia de melanina resultaría muy relevante en el estudio de la foto-protección en estos organismos.

La capacidad de sintetizar o adquirir pigmentos es una característica plástica, este tipo de plasticidad fenotípica es clave para el éxito de los organismos, especialmente cuando las variables ambientales varían temporal y espacialmente como lo es en las comunidades pelágicas (Hansson et al. 2007). La plasticidad fenotípica se refiere a la expresión de un fenotipo (carácter) que se da, como respuesta a una señal ambiental, que



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

---

suele ser química y debe ser recibida en un momento particular del desarrollo del organismo para poder generarse la respuesta (Agrawal 2001).

Los cladóceros que sintetizan melanina, poseen una distribución corporal heterogénea del pigmento con una máxima concentración en la zona nugal del caparazón que protege el vulnerable tubo digestivo, debido a la posición en la que nadan (Herbert y Emery 1990). Las especies de *Daphnia* sintetizan melanina cuando se encuentran expuestas a RUV y, por lo tanto, la concentración de melanina en su cuerpo está directamente relacionada a la dosis que recibe de RUV (Hansson et al. 2007). Este mecanismo es plástico, ya que genera costos metabólicos en mantener la concentración de melanina cuando el organismo no está expuesto. Hansson y colaboradores (2007) mostraron que una *Daphnia* del sub-ártico de Siberia reduce su pigmentación un 40% cuando se le excluye la exposición a RUV. Por lo tanto la melanización del caparazón se pierde cuando los animales son criados sin la porción de longitudes de onda corta del espectro lumínico (RUV) (Luecke y O'Brien 1983, Hessen et al. 1999).

La exposición a RUV genera un aumento del estrés oxidativo (Bishop et al. 1980, Souza et al. 2010a, Souza et al. 2010b, Souza et al. 2012) y, en consecuencia, se activan los sistemas de defensa enzimática para neutralizar las EROs generadas que pueden dañar las estructuras celulares; pero al mismo tiempo en las especies de *Daphnia* melánicas hay un aumento de melanina producto de dicha exposición (Rautio y Korhola 2002, Tollrian y Heibl 2004). Estudios previos demostraron en copépodos que la pigmentación y las enzimas antioxidantes son sistemas de defensas flexibles que pueden ser inducidos cuando son necesarios (Hylander et al. 2012). En particular, en los copépodos se observó que las respuestas antioxidantes se aumentan cuando la pigmentación se reduce por efecto del riesgo de depredación por peces (Hylander et al. 2012).

En la región patagónica *Daphnia dadayana* es una especie endémica de la región que habita cuerpos de agua someros y, en general, sin peces (Paggi 1999b). Esta especie es melánica por lo cual resulta muy interesante analizar la capacidad de sintetizar melanina en relación con la exposición a RUV y, a su vez, comparar la concentración de melanina en relación con el aumento de actividad de sistemas enzimáticos antioxidantes como Glutation S-transferasa (GST) que neutraliza las EROs.



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

---

### *Objetivo:*

Analizar la respuesta plástica de aumento de la concentración de melanina vs la actividad de antioxidantes frente a la exposición a RUV.

### *Hipotesis:*

En *Daphnia dadayana*, la concentración de melanina actuará como primera defensa a la RUV y por lo tanto no habrá cambios en la actividad antioxidante.

### *Predicciones:*

- a. Habrá un aumento de melanina en la zona nugal de *D. dadayana* a medida que aumente la exposición a RUV a través del tiempo.
- b. La actividad antioxidante no se incrementará en *D. dadayana* con mayor concentración de melanina.



### Métodos

*Daphnia dadayana* fue elegida para realizar este experimento por su capacidad de sintetizar melanina, pueden ser cultivados bajo condiciones de laboratorio, y representa una especie endémica patagónica. Los especímenes utilizados provienen de la laguna los Juncos, Bariloche, Patagonia (Bariloche, Patagonia, Argentina) y estuvieron mantenidos en cultivos de laboratorio en condiciones constantes de temperatura, fotoperiodo y alimento.

La Laguna los Juncos (41° 04' S 71° W) es un ambiente temporario situado en la meseta patagónica a 911 msnm. Las precipitaciones son de 550 mm por año y constituyen el principal aporte de agua al ambiente. La laguna tiene un hidro-período entre Junio y Enero, sin embargo este período puede variar de manera notable debido a intervenciones antrópicas sobre el ambiente. La laguna posee una superficie de 2 ha y profundidad máxima de 1 m. El agua es levemente alcalina (pH= 7.8) y conductividad de 500  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (Modenutti et al. 1998).

Paggi (1999a) describió esta especie en varias lagunas de la Patagonia argentina y chilena entre los 39° y 52° de latitud sur también incluyendo una descripción general de los ambientes que habita *D.dadayana*: lagunas someras, mayormente temporarias, de zonas áridas y semiáridas. Estas lagunas son característicamente turbias, alcalinas (pH = 8.2 - 8.8) y con una conductividad que varía de 635 a 2700  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Aunque esta información solamente es de unas pocas lagunas de todas las que se pudieron obtener los datos a parte de los ejemplares de *D. dadayana*.

#### *Experimento exposición a RUV*

Se mantuvieron clones madres de *D. dadayana*, correspondientes a la misma cohorte, bajo condiciones de laboratorio controladas (Temperatura: 15 °C y fotoperiodo 16:8 h luz:oscuridad) alimentadas *ad libitum* para que desarrollen la mayor cantidad de huevos posibles, de forma sincronizada. Los neonatos nacidos durante un periodo de 12 h fueron separados y colocados en nuevo medio con alimento (*Chlamydomonas reinhardtii*) en concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> de C.

Los neonatos fueron distribuidos de a diez en frascos de cuarzo de 150 mL y se los expuso a RUV 2 h todos los días durante 6 días (tratamiento RUV), con un control en frascos de vidrio y cubiertos con acetato de celulosa para evitar el efecto de la RUV



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

(Tratamiento RFA). Al final de este experimento (6 días) los ejemplares fueron almacenados en micro tubos Eppendorff en ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis enzimático

Durante el experimento, se extrajeron 3 ejemplares de *Daphnia* (por 3 réplicas) cada 3 días (inicial, 3 días y 6 días de exposición) que fueron almacenadas en micro tubos Eppendorff en ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis de la melanina.

### *Características de la luz*

La fuente de luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 380 nm), dos lámparas fluorescentes de luz diurna (Philips TLT 40 W) y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30 W). El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al.). La luz negra se incluyó para abarcar el rango entre el máximo de emisión de UVA340 ( $\lambda_{\text{max}}$ : 350 nm) y las lámparas fluorescentes de luz diurna ( $\lambda_{\text{min}}$ : 400 nm). Durante la incubación, los animales recibieron  $35\text{ mW cm}^{-2}\text{ nm}^{-1}$  de 340 nm de longitud de onda, un nivel de irradiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis diaria de 340 nm fue de  $2520\text{ J m}^{-2}$ .

### *Análisis de imágenes*

De cada ejemplar extraído (inicial, día 3 y día 6) se tomaron fotografías laterales para evaluar si había diferencias de intensidad de color entre tratamiento RUV y control. Para realizar este procedimiento se utilizó un microscopio estereoscópico con una cámara fotográfica y las imágenes fueron procesadas con el software Image-Pro Plus, (Media Cybernetics). Posteriormente se midió la intensidad del color de un punto de la zona nugal (Figura IV.2) de *Daphnia* con el programa Image J/FIJI (Schindelin et al. 2012), utilizando imágenes formato TIFF en composición de colores RGB. Estas imágenes fueron normalizadas y transformadas en blanco y negro para que sean comparables, utilizando la aplicación BaSic adaptado para utilizarse con ImageJ/FIJI. (Peng et al. 2017). La intensidad del color esta expresada en valores numéricos para el formato de colores RGB transformados a imágenes en blanco y negro. El color negro corresponde al



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

valor 0 y el blanco al 255, por lo tanto, los organismos que presentaron valores más altos en la medición son los que menor concentración de melanina tenían.

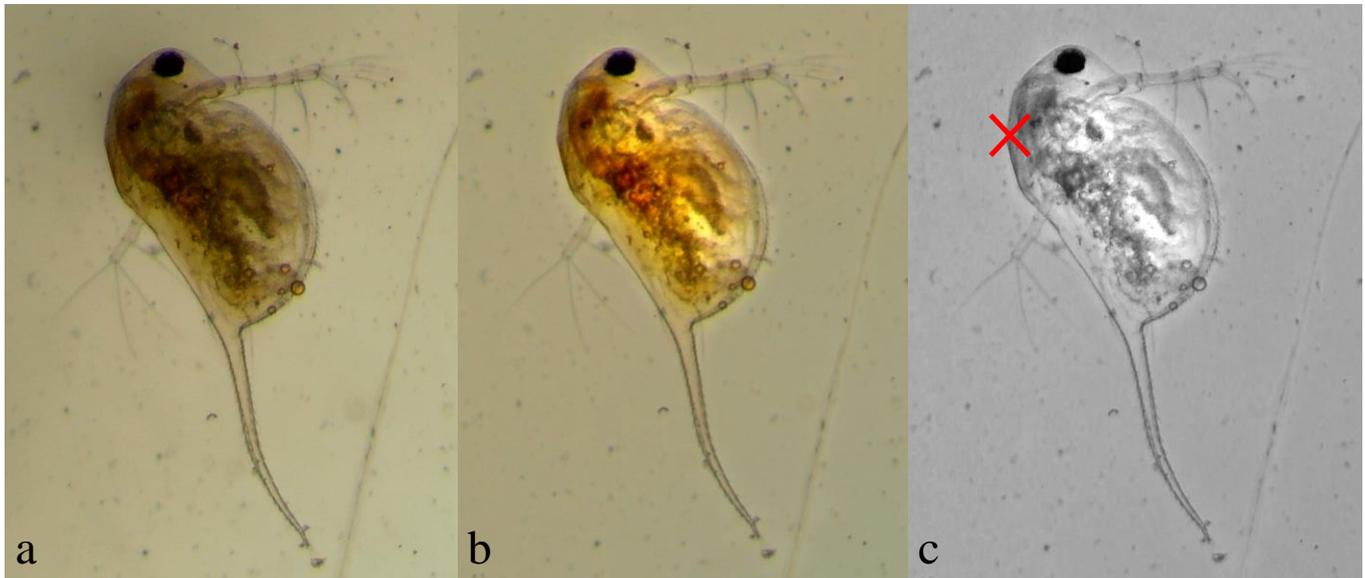


Fig IV.2. **Imagen de *Daphnia dadayana* en formato RGB original (a), imagen neutralizada (b) e imagen transformada a blanco y negro (c) para realizar la medición. La cruz roja de la imagen c, ubicada en la nuca de *D. dadayana* indica el punto donde se midió la intensidad del color de las imágenes.**

### *Determinaciones bioquímicas*

La actividad de GST se determinó según Habig y colaboradores (Habig et al.) en 0.1 mol L<sup>-1</sup> de buffer de fosfato (pH = 6.5), con 0.1 mg mL<sup>-1</sup> de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno en acetonitrilo (1% v/v) y 0.75 mg mL<sup>-1</sup> de L-glutación reducido como sustratos para registrar la absorbancia de GST a 340 nm, usando un Shimadzu 2450 espectrofotómetro a 23 ± 0.5 ° C. La actividad de GST se expresó en µmoles de producto formado min<sup>-1</sup> ind<sup>-1</sup> de *D. dadayana*.

### *Análisis estadístico*

Para comparar la actividad de GST de *D. dadayana* en el último día del experimento se realizó un test-T para comparar diferencias significativas del grupo RUV



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

---

vs. RFA. Este análisis estadístico se realizó en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.

Las diferencias en la intensidad de la melanina de *D. Dadayana* expuestas a RUV y RFA durante el tiempo inicial y los días, 3 y 6 fueron analizadas con un ANCOVA (factor: Luz y Co-variable: Días) seguido de un método de comparación múltiple *a posteriori* de Tukey (= 0.05). Este análisis estadístico se realizó en RStudio (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL: <http://www.rstudio.com/>). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.



### Resultados

El análisis de las fotografías obtenidas nos permitió realizar exitosamente el análisis de la melanización en *D. dadayana*. En el tiempo inicial no se observan diferencias significativas lo que nos permite inferir que los cambios posteriores se deben al tratamiento lumínico diferencial (RUV vs RFA). En los tiempos sucesivos (T3 y T6) se observó un aumento significativo de la melanización en la zona nucal cuando *D. dadayana* es expuesta a RUV (ANCOVA  $F_{2,24} = 16.69$   $P < 0.001$ ; Figura IV.3), siendo mayor el grado de melanización cuanto mayor es la exposición de *Daphnia* a RUV (*a posteriori* Tukey Luz\*día 1  $P = 0.841$ ; Luz\*día 3  $P = 0.001$ ; Luz\*día 6  $P < 0.001$ ; Figura IV.4)

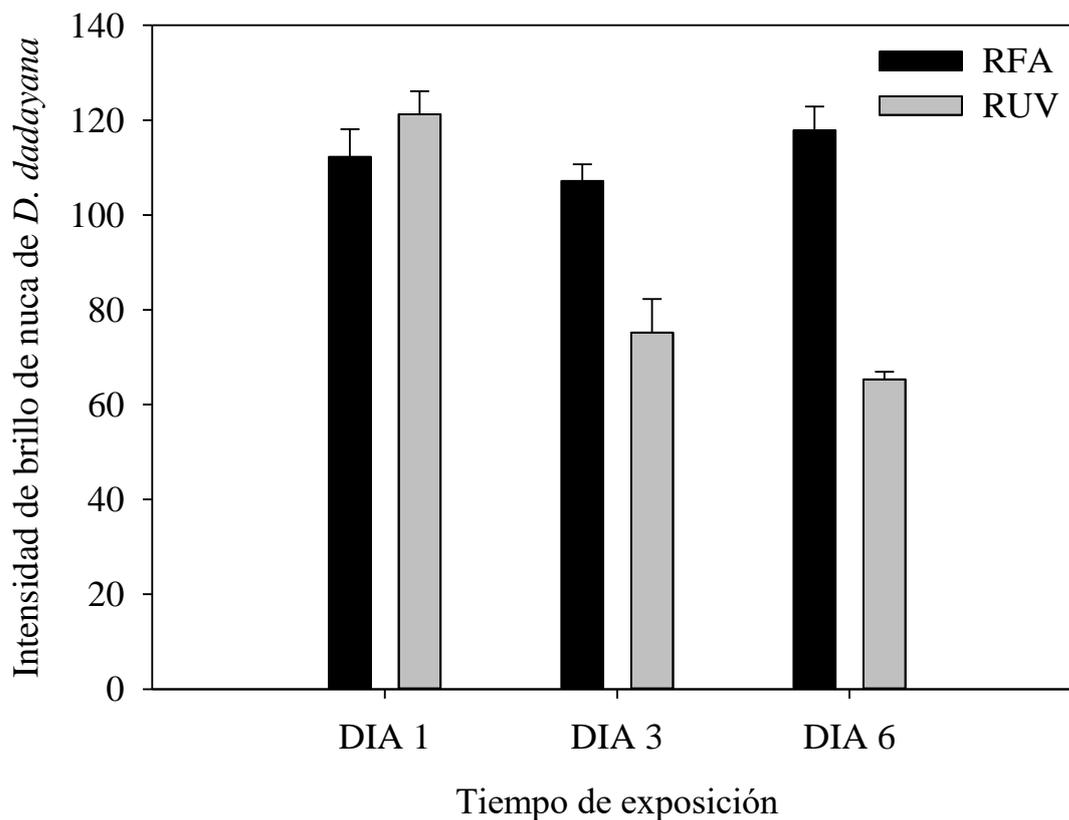


Fig IV.3. **Resultados de exposición de *D. dadayana* a RUV.** Actividad de GST bajo dos condiciones de luz (barra negra = RFA y barra gris = RUV) en un período de 6 días. Las barras de error representan el error estándar en todos los gráficos.



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

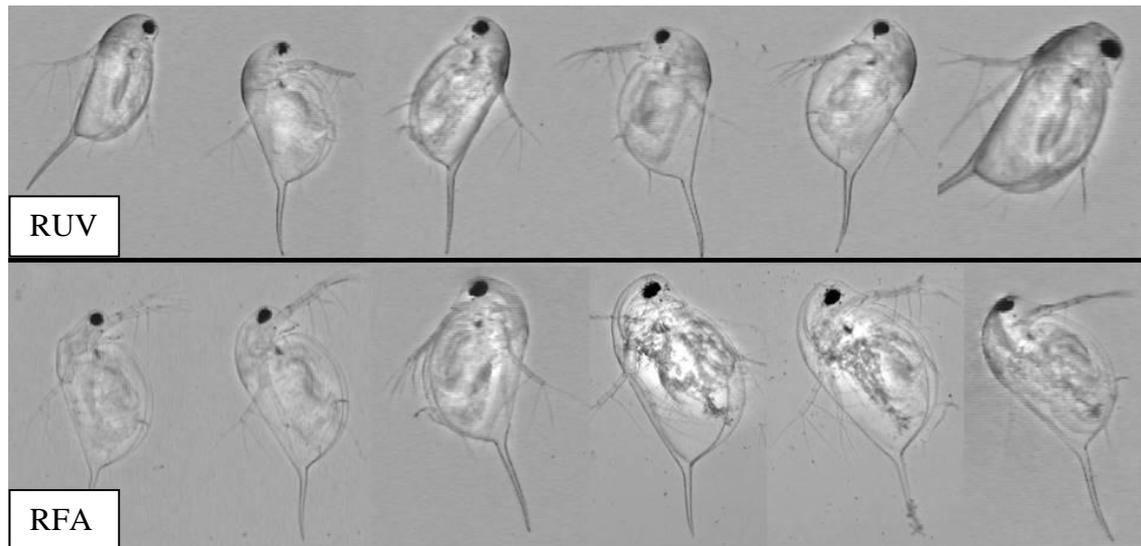


Fig IV.4. Esquema de fotos utilizadas para realizar gráfico y análisis de la fig 4 correspondientes al día 6 del experimento.

Al día 6 de exposición diferencial RUV vs. RFA se observa que la actividad antioxidante (estimada como GST) no presenta diferencias entre ambos tratamientos (Figura IV.5). Si bien en el tratamiento RUV se observa una tendencia a aumentar la actividad antioxidante (Figura IV.5) la actividad de GST en *D. dadayana* expuesta RUV no muestra diferencias significativas comparada con el tratamiento con luz RFA (Test- $T = -1.439$ ,  $GL = 14$ ,  $P = 0.086$ ).

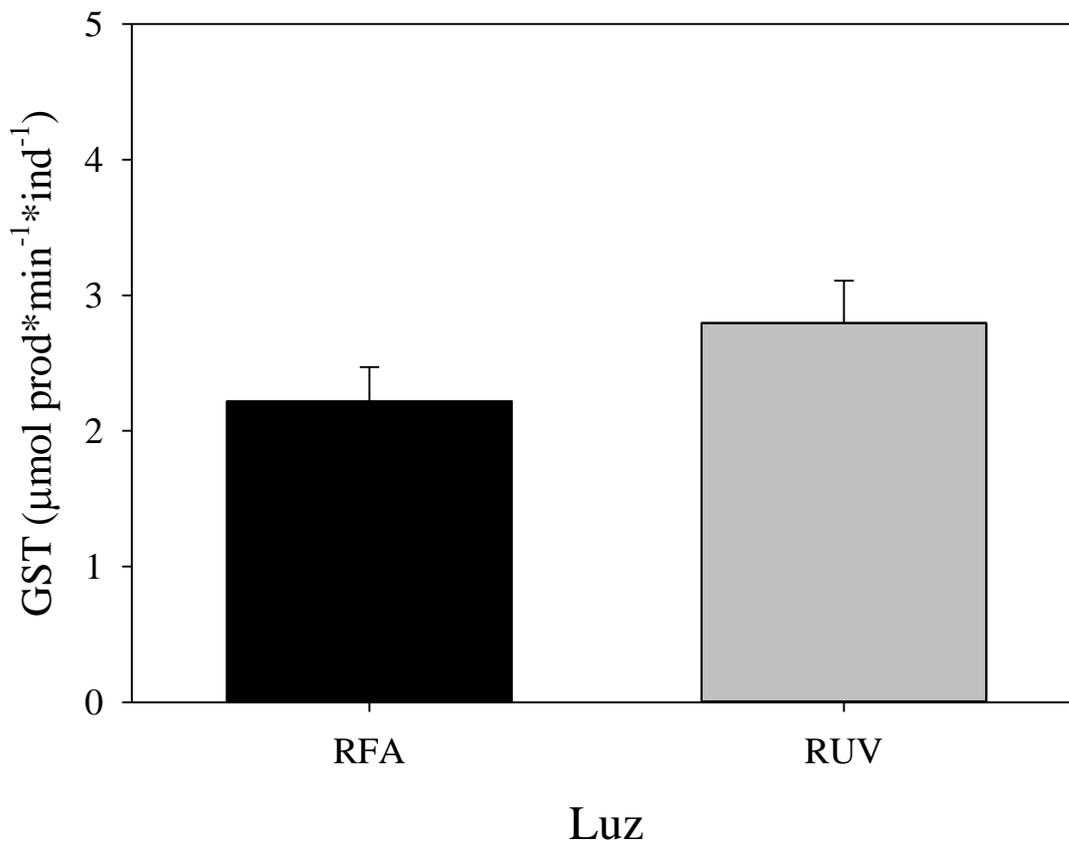


Fig IV.5. **Resultados de intensidad de color en caparazón de *D. dadayana* expuesta a RUV.** Intensidad de brillo bajo dos condiciones de luz (barra negra = RFA y barra gris = RUV) en un período de 6 días. Las barras de error representan el error estándar en todos los gráficos



### Discusión

La metodología utilizada de análisis fotográfico nos permitió exitosamente analizar la variación melánica en esta *Daphnia* de Patagonia. Se decidió medir la intensidad del brillo del caparazón, debido a que la concentración de melanina en *Daphnia* es mayormente en la zona nucal de los organismos (Herbert y Emery 1990) y, por lo tanto, medir siempre en el mismo punto cuando las fotografías son neutralizadas nos puede dar información muy acertada acerca de las diferencias de concentración de melanina de los individuos, sin importar su tamaño. Por el contrario, la medición química de la melanina puede ser más subjetiva en proporción a la superficie del caparazón de cada individuo, además que el tamaño de estos organismos no permite utilizar un individuo por muestra (Hobæk y Wolf 1991).

*D. dadayana* no mostró incrementos significativos en la actividad antioxidante cuando es expuesta a RUV. El efecto de la melanización del caparazón parece ser una barrera muy importante para evitar el daño generado por la exposición a RUV, ya que otras especies de *Daphnia* no melánicas de la Patagonia norte muestran un aumento significativo de la actividad antioxidante cuando son expuestos a RUV (Souza et al. 2007, Balseiro et al. 2008). En otras especies de lagos andino-patagónicos se ha observado que la estrategia comportamental de evasión de los niveles superiores de la columna de agua durante el día resulta efectiva para evitar las potencialmente dañinas RUV (Balseiro et al. 2007, Laspoumaderes et al. 2017). Por el contrario, *D. dadayana* presenta un carácter fenotípico plástico de producción de melanina, ya que en los ambientes someros que frecuenta no puede migrar verticalmente como otras especies que utilizan la técnica de evasión en vez de acumular pigmentos. Esta característica le da ventajas en su ambiente, donde las formas melánicas de *Daphnia* sobreviven mejor en los estratos superiores del agua que especies de *Daphnia* sin pigmentos (Herbert y Emery 1990, Zellmer 1995, Hessen y Lydersen 1996, Hessen et al. 1999), y probablemente aprovechan mejor el tiempo para coleccionar alimento de las capas superiores del cuerpo de agua sin ser severamente afectadas por la RUV (Zellmer 1995). *D. dadayana* habita lagos someros sin peces y, por lo tanto, la producción de melanina es muy necesaria; mientras que, en lagos profundos andinos donde generalmente hay depredadores visuales (peces), las especies de *Daphnia* no poseen pigmentos y la mejor estrategia para evitar el daño de las RUV y a los depredadores es migrar verticalmente durante el día a zonas profundas y con



## CAPITULO IV: RUV y pigmentos

---

poca luminosidad. Esta situación disminuye el riesgo de depredación visual (Balseiro et al. 2007).

Bajo exposición a RUV, los organismos son capaces de alternar defensas; sin embargo, *Daphnia* parece mantenerse en una combinación de evasión y acumulación de pigmentos (Borgeraas y Hessen 2002). En ecosistemas acuáticos, los organismos tienen que hacer frente a múltiples factores detrimentales y, por lo tanto, los mecanismos de evasión a la RUV son muy importantes (Hansson et al. 2007). Sin embargo, también hay factores que podrían ser cruciales, como el tiempo de detección de un riesgo en relación con el tiempo que tarda en formarse la defensa, y el costo que implica generarla para luego revertirla cuando ya no hay riesgo (Tollrian y Heibl 2004, Gabriel et al. 2005). Estos costos fueron medidos en copépodos, donde se observó que la acumulación de pigmentos era utilizada alternativamente a la respuesta antioxidante en presencia o no de peces (Hylander et al. 2012). En el caso estudiado la melanización del caparazón aparecería como crucial para el éxito de *D. dadayana* en ambientes someros y no se observó una respuesta significativa para evitar el aumento del estrés oxidativo de RUV por parte del complejo enzimático analizado. De manera interesante en copépodos de Laguna Fantasma (Perez et al. 2012) se ha demostrado que la exposición a RFA+RUV estimula la acumulación de fotoprotectores (MAAs) (Perez et al. 2012).

En un contexto de cambio climático, donde los organismos tengan que enfrentarse a un aumento de factores de estrés, sus estrategias y mecanismos de defensa serán cruciales para la adaptación y supervivencia de cada especie. Acumular pigmentos en el caparazón aparece como una estrategia exitosa para *D. dadayana* en ambientes someros que habita. Sin embargo, *Daphnia* podría ser expuesta a otros factores como depredadores visuales y cambios estacionales en la calidad de alimento, en los que la melanización resultaría perjudicial (aumento del riesgo de depredación y costo energéticos en sintetizar pigmentos). Estos factores y la interacción con otros organismos, definirá el éxito de esta especie en la Patagonia frente a un ecosistema constantemente cambiante y afectado por la antropización.



### CAPITULO V

#### **Balance entre producción de defensas plásticas y defensas antioxidantes enzimáticas en *Daphnia dadayana*.**

##### **Introducción**

En la naturaleza, la biota acuática está expuesta a muchos factores potencialmente perjudiciales, como por ejemplo depredadores, parásitos, baja calidad de alimento, y exposición a RUV (Häder et al. 2007). Estos factores actúan de forma diferente con cada especie las que deben priorizar los riesgos más importantes y evadirlos aún con algún costo (energético fundamentalmente). Cuando esto sucede se generan relaciones de Costo-beneficio (“Trade-off” en inglés) que ocurren cuando un carácter beneficioso para un organismo está relacionado con otro que resulta un detrimento. Por ejemplo, producir defensas morfológicas para evitar la depredación es muy beneficioso, pero a su vez implica un alto costo energético y, por lo tanto, el zooplancton tiene que compensarlo obteniendo más alimento o bajando su rendimiento metabólico (Adler y Harvell 1990, Tollrian 1995, Tollrian y Harvell 1999).

Para evitar o disminuir la depredación por invertebrados acuáticos, el zooplancton ha desarrollado cambios morfológicos, como por ejemplo el aumento temprano de tamaño o estructuras espinosas (Dodson 1974, Tollrian 1995). Estas estructuras son, en general, plásticas y se expresan sólo en presencia de depredadores ya que existe un costo energético para producirlas que causa una disminución en las tasas reproductivas (Riessen et al. 1984). Estas defensas incluyen alteraciones morfológicas, como pueden ser espinas o protuberancias del caparazón, un exosqueleto endurecido, incremento o decrecimiento en el tamaño del cuerpo, así como también reducción en los niveles de actividad y modificaciones en los patrones de distribución y migración dentro del cuerpo de agua (Havel 1987, Tollrian y Harvell 1999, Relyea 2001, Laforsch y Tollrian 2004).

Dentro del género *Daphnia*, varias especies generan estructuras morfológicas de defensa como dientes nucales y crestas cuando se encuentran en presencia de insectos depredadores como *Chaoborus* o *Notonecta* (O'Brien et al. 1979, Hebert y Grewe 1985,



## CAPITULO V: Defensas plásticas

---

Dodson y Havel 1988). La presión por depredación de *Chaoborus* sobre *Daphnia* es usualmente mayor en neonatos y juveniles que en adultos, quienes al tener un mayor tamaño son menos vulnerables a los ataques de *Chaoborus* (Repka y Walls 1998, Riessen 1999). En juveniles de *Daphnia* se ha observado también un crecimiento alométrico de la espina del caparazón (Balseiro y Vega 1994) y estas estructuras anti-depredación producen una reducción del fitness que se traduce en un costo demográfico de la población (Riessen y Sprules 1990). La inducción de defensas anti-depredación en *Daphnia* es generada a través de kairomonas, que son sustancias químicas liberadas al medio por los organismos que dan señal de alerta a las presas sobre la presencia de depredadores en el ambiente (Tollrian y Dodson 1999). En *Daphnia*, la recepción de kairomonas inicia una serie de reacciones biológicas, señales neurales que se convierten a señales endócrinas que subsecuentemente inducen cambios en la expresión de factores morfo-genéticos resultando en la formación de una estructura de defensa (Miyakawa et al. 2010).

La morfología de las presas y determinados patrones de comportamiento, así como el modo y la velocidad de natación son factores importantes que disminuyen su vulnerabilidad frente a copépodos depredadores. Vega (1995) estudió las estrategias de defensa de distintas especies del zooplankton andino-patagónico que son potenciales presas del copépodo calanoideo depredador *Parabroteas sarsi*. Dentro de las especies expuestas a *P. sarsi* (*Bosmina longirostris*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia ambigua* y *Daphnia middendorffiana*) las más pequeñas (*Bosmina longirostris* y *Ceriodaphnia dubia*) y los estadios juveniles resultaron ser las más vulnerables, debido a la dificultad de manipular presas grandes por parte de los copépodos. Para atrapar las presas *P. sarsi* realiza movimientos espasmódicos típicos de copépodos calanoideos lo que hace que su efectividad de ataques sea muy alta (Vega 1995). El ataque se produce con los maxilipedios extendidos (Diéguez y Balseiro 1998), donde la presa es capturada al estrecharla contra el resto de las piezas bucales del depredador. Estos ataques se corresponden en más de un 70% de las veces en ataques dorsales en la zona de unión del caparazón, que corresponde a la zona engrosada por las estructuras anti-depredación morfológicas. Vega (1995) también observó que modificar la trayectoria de natación es un factor importante para evadir los ataques de *P.sarsi*, así también como la estrategia de “hombre muerto” por parte de algunas especies de cladóceros. Por último, el aumento de tamaño en juveniles de *D. middendorffiana* donde se alarga la espina caudal en presencia



## CAPITULO V: Defensas plásticas

---

de *P. sarsi*, indicó que un aumento del tamaño aparente dificulta la manipulación de las presas por parte de *P. sarsi* (Balseiro y Vega 1994).

*Daphnia dadayana* es un cladócero que habita ambientes acuáticos someros, donde la incidencia de RUV es muy alta y a su vez hay una alta presión de depredación por invertebrados acuáticos como el copépodo calanoideo *Parabroteas sarsi*. Este copépodo alcanza en ambientes someros tamaños considerables (7 mm) (Vega 1999) y accede a una gran variedad de presas incluyendo al género *Daphnia* (Balseiro y Vega 1994, Vega 1995). Dentro de las defensas que exhibe *Daphnia* frente a *Parabroteas* se encuentra el mencionado crecimiento alométrico de la espina del caparazón lo que contribuye de manera efectiva a disminuir las tasas de depredación (Balseiro y Vega 1994). En ambientes someros *Daphnia* necesariamente debe generar alguna protección contra las RUV, ya que no puede realizar migraciones verticales para escaparse. Por otro lado, otras estructuras como la formación de yelmo pueden ser efectivas si la recepción de kairomonas ocurre durante los primeros días de desarrollo de los huevos partenogénéticos (Miyakawa et al. 2010) cuando los neonatos aún se encuentran bajo el caparazón materno. *D. dadayana* desarrolla estructuras antidepredatorias generando yelmo (Paggi 1999a) (Figura V.1). En función de las relaciones costo-beneficio planteamos si la defensa antidepredatoria (yelmo) interactúa con la RUV en una relación de costo-beneficio y puede ser determinada a través de respuestas enzimáticas.



## CAPITULO V: Defensas plásticas

### *Objetivo:*

Evaluar el costo de la producción de yelmo, a través de la actividad de GST, cuando *D. dadayana* con y sin yelmo se encuentra expuesta a RUV.

### *Hipotesis:*

La inversión en defensas antidepredación en *D. dadayana* afectará la actividad de complejos enzimáticos antioxidantes.

### *Predicción:*

La producción de yelmo afectará negativamente la actividad de GST cuando *D. dadayana* sea expuesta a RUV.

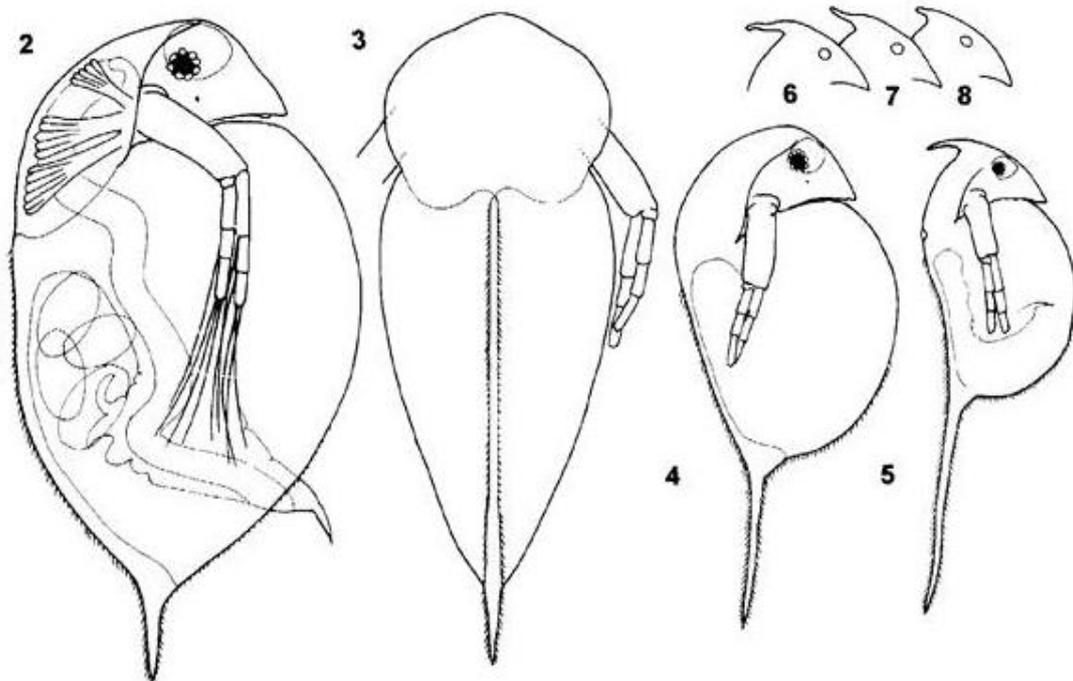


Fig. V.1. **Ilustración de *D. dadayana***. Extracción de Paggi (1999a). (2 y 3) Hembra partenogenética madura, vista lateral y dorsal, (4) hembra partenogenética inmadura, (5 a 8) Segundo estadio de juvenil hembra con estructuras anti-depredación (yelmo).



## CAPITULO V: Defensas plásticas

---

### Métodos

Para realizar este estudio es necesario la obtención de organismos con y sin yelmo en condiciones experimentales similares. Los individuos de *Daphnia dadayana* fueron colectados del lago Los Juncos (Bariloche, Patagonia, Argentina) y transportados al laboratorio para ser cultivados bajo condiciones controladas de luz, temperatura y alimento (Fotoperiodo de 14:10 h, *C. reinhardtii*). *D. dadayana* fue mantenida en medio COMBO con el correspondiente alimento durante 10 generaciones antes de comenzar el experimento. Estos individuos de *D. dadayana* de cultivo no tenían yelmo.

El copépodo depredador *Parabroteas sarsi* fue utilizado para inducir el yelmo en *D. dadayana*. Para este propósito, individuos de *P. sarsi* fueron colectados el día antes de comenzar el experimento y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que *D. dadayana*.

### *Experimento*

Al comenzar el experimento se mantuvieron madres sin yelmo de *D. dadayana* bajo dos condiciones: a-sin señal de depredador (control) y b-con señal del depredador para inducir la formación de yelmo en los neonatos, exponiéndolos a señal de kairomonas del depredador *Parabroteas sarsi* (tratamiento). Las madres fueron dispuestas de a 15 individuos en frascos de 2 L con 3 réplicas para tratamiento y control, en el tratamiento se colocaron 10 individuos de *P. sarsi* aislados con una malla de 200  $\mu\text{m}$  para evitar ataques directos a *Daphnia* pero permitiendo el suficiente intercambio de agua para que pueda llegar la señal de las kairomonas a los receptores de *D. dadayana*. *P. sarsi* fue alimentada con conespecíficos de *D. dadayana* para aumentar la señal de alarma, siguiendo trabajos que han utilizado la misma técnica con otros depredadores invertebrados (Laforsch et al. 2006).

Una vez que nacieron los neonatos, se seleccionaron bajo microscopio estereoscópico para asegurar uniformidad de tamaño y forma (tanto para individuos inducidos por kairomonas como para el control) y fueron mantenidos con 1.5 mg de  $\text{C L}^{-1}$  de alimento (*Chlamydomonas reinhardtii*) durante 3 días. A los 3 días la mitad de las réplicas de ambos tratamientos (con inducción de yelmo y sin inducción) transferidos a frascos de cuarzo para ser expuestos a 2 h de RUV, la mitad restante fue cubierta con acetato de celulosa que evita la entrada de longitudes de onda menores a 400 nm (RUV) para generar un control. Se realizaron 4 réplicas de 3 individuos por tratamiento. Una vez



## CAPITULO V: Defensas plásticas

que fueron expuestos a las 2 h de RUV se pipetearon los individuos a tubos Eppendorff de 1.5 mL para ser almacenados a -80 °C en un ultra-freezer para las posteriores determinaciones enzimáticas (ver figura V.2).

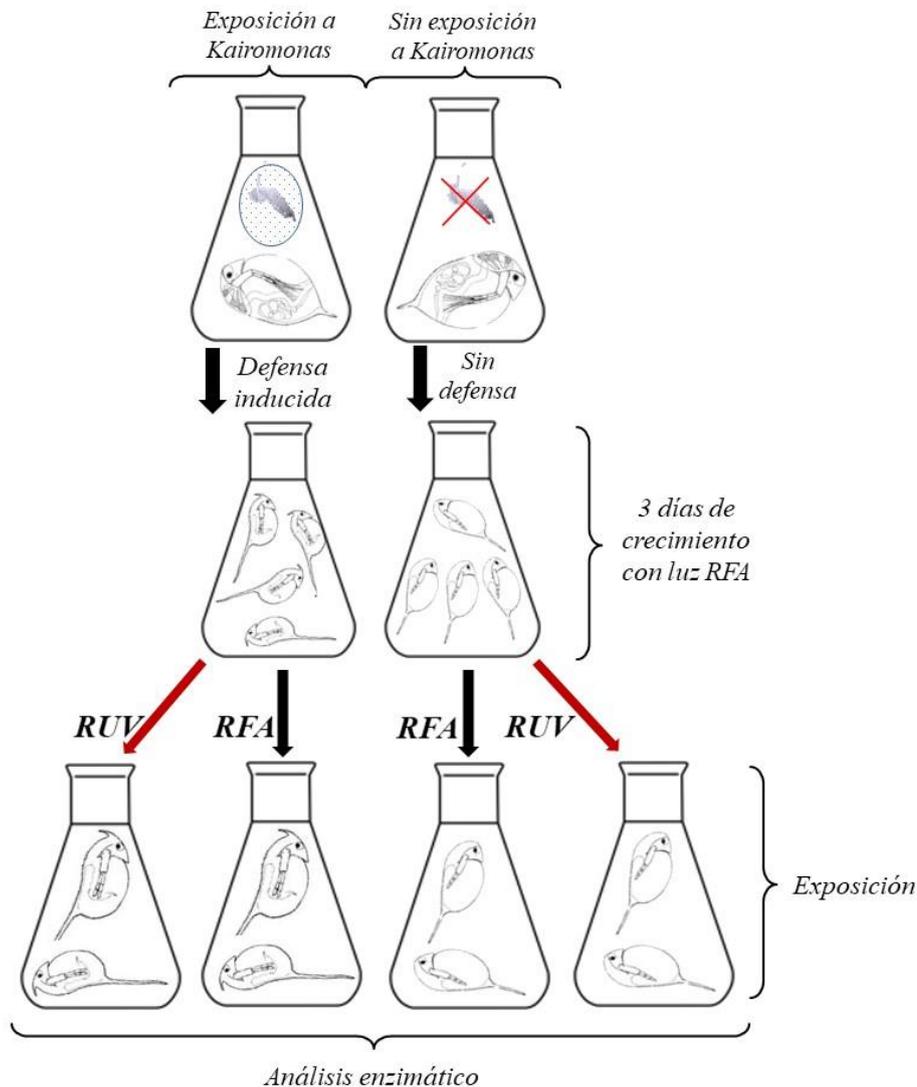


Fig. V.2: Esquema del experimento de exposición a RUV.

### *Determinaciones morfológicas*

Se tomaron fotos laterales de neonatos de *D. dadayana* con inducción de yelmo y sin, para realizar comparaciones morfológicas. Este procedimiento se realizó con neonatos inducidos (señal de Kairomonas) y sin inducción, bajo un microscopio



## CAPITULO V: Defensas plásticas

estereoscópico y las imágenes fueron analizadas con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics). Se tomaron medidas longitudinales de los individuos teniendo en cuenta el largo total, largo del cuerpo, largo de defensa (que incluye a la espina caudal y al yelmo) (ver Figura V.3).

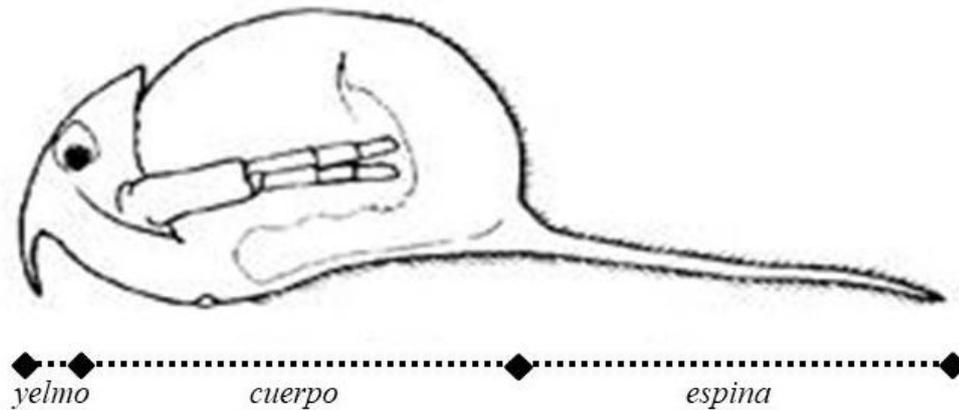


Fig. V.3: Esquema de criterio tenido en cuenta para las mediciones morfológicas en *D. dadayana*.

### *Características de la luz*

La fuente de luz utilizada para llevar a cabo los experimentos fue emitida por dos lámparas fluorescentes UVA 340 (UVA 340 lámpara de Q-Panel Lab Products, con máxima emisión a 380 nm), dos lámparas fluorescentes de luz diurna (Philips TLT 40 W) y dos lámparas fluorescentes luz negra (Philips TL-D 30 W). El espectro UV de la luz de las lámparas UVA340 se asemeja al espectro solar entre 280 nm y 350 nm (Shick et al.). La luz negra se incluyó para abarcar el rango entre el máximo de emisión de UVA340 ( $\lambda_{\max}$ : 350 nm) y las lámparas fluorescentes de luz diurna ( $\lambda_{\min}$ : 400 nm). Durante la incubación, los animales recibieron  $35 \text{ mW cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  de 340 nm de longitud de onda, un nivel de irradiación que es equivalente a la luz del sol que llega a la superficie de los lagos durante el verano (Modenutti et al. 2005). La dosis diaria de 340 nm fue de  $2520 \text{ J m}^{-2}$ .

### *Determinaciones bioquímicas*

La actividad de GST se determinó según Habig y colaboradores (Habig et al. 1974) en  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de buffer de fosfato (pH = 6.5), con  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzono en acetonitrilo (1% v/v) y  $0.75 \text{ mg mL}^{-1}$  de L-glutatión reducido como sustratos para registrar la absorbancia de GST a 340 nm, usando un Shimadzu 2450



## CAPITULO V: Defensas plásticas

---

espectrofotómetro a  $23 \pm 0.5$  ° C. La actividad de GST se expresó en  $\mu\text{moles}$  de producto formado  $\text{min}^{-1} \text{ind}^{-1}$  de *D. dadayana*.

### *Análisis estadístico*

Para comparar las diferencias de longitudes entre individuos con inducción de defensa y el control se realizó un test-T para cada una de las longitudes tenidas en cuenta (largo Total, largo del cuerpo y largo de defensa). Para comparar la actividad de GST de *D. dadayana* expuesta a RUV, con o sin defensa morfológica (yelmo), se realizó un ANOVA de dos vías (Factor A: Defensa y factor B: Luz) para comparar diferencias significativas en la interacción de luz\*defensa.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EE.UU.). Para todos los datos se comprobó la normalidad y homocedasticidad.



## CAPITULO V: Defensas plásticas

### Resultados

A partir de la exposición de madres partenogénicas de *D. dadayana* a la presencia del copépodo depredador *P. sarsi* se observó la formación de yelmo en neonatos (Figura V.4) que representa un aumento del 5% de la longitud total del cuerpo. También se observó un alargamiento significativo de la espina caudal en comparación con con-específicos que nacieron sin presencia de depredador (test-*T*;  $T = 15.753$   $GL = 27$   $P < 0.001$ , Figura V.5) presentando una media de  $0.58 \pm 0.02$  mm para individuos expuestos a *Parabroteas* versus  $0.43 \pm 0.03$  mm en el control.

*D. dadayana* expuesta a kairomonas también es significativamente más grande que el control (test-*T*;  $T = 14.867$   $GL = 27$   $P < 0.001$ , Figura V.5), con una media de longitud total de  $1.25 \pm 0.04$  mm versus  $0.99 \pm 0.05$  mm del control, presentando un ~25% de aumento del largo total entre el alargamiento de la espina y la formación del yelmo en organismos que son expuestos a kairomonas.

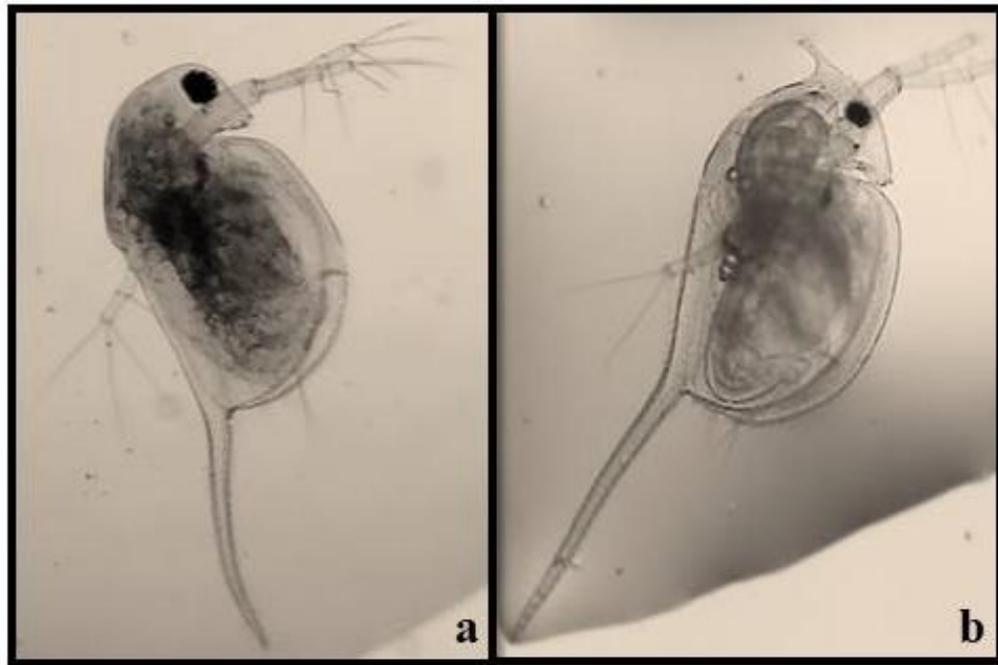


Fig. V.4: Fotos de neonatos de *Daphnia dadayana* con inducción de defensa (b) y sin (a).

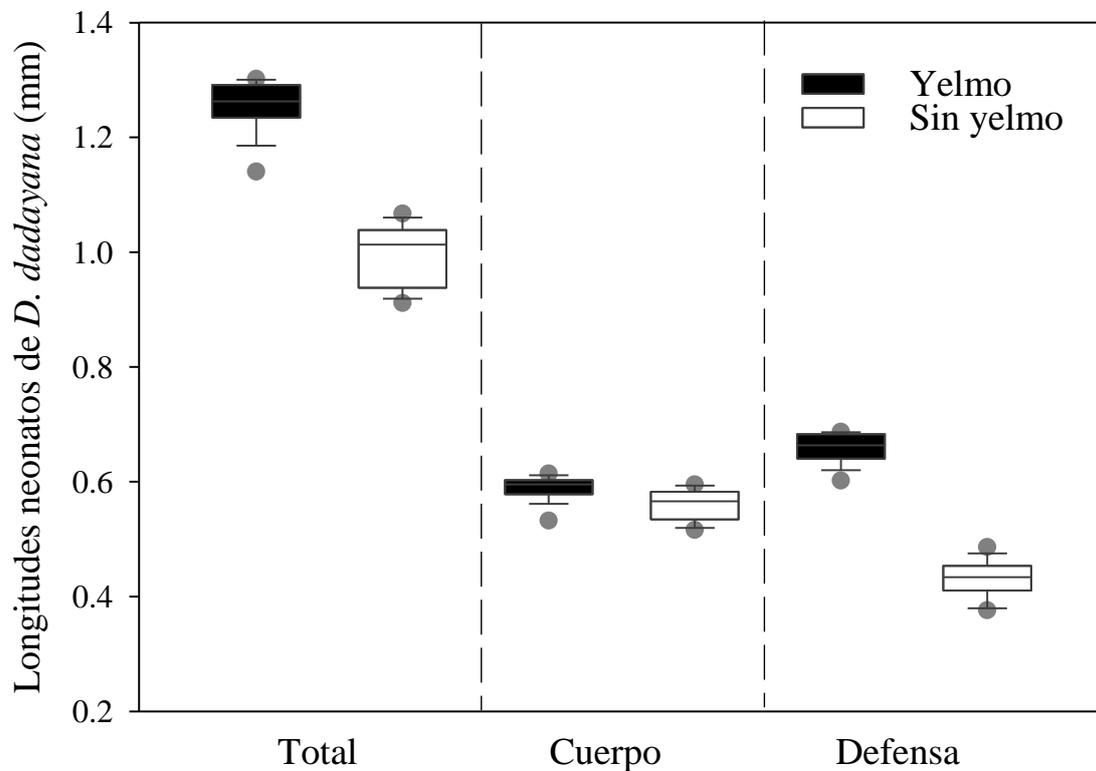


Fig. V.5: **Longitudes del cuerpo de *D. dadayana* en mm.** Diferencias de tamaño para organismos con inducción de yelmo (negros) y sin (blancos). Largo total, largo del cuerpo y largo defensa, incluyendo espina y yelmo en el caso que corresponda.

Con respecto al experimento de exposición a RUV de *D. dadayana* con o sin yelmo no se observaron efectos significativos en la producción de la enzima GST. En particular, no se observó un efecto en la interacción defensa y luz en la actividad de GST (ANOVA de dos vías  $F_{1,12} = 0.00656$ ;  $P = 0.937$ ; Figura V.6). Tampoco hay diferencias entre tratamientos de luz ni entre tipos de defensa. Por lo tanto, no solo no hay un efecto en la actividad de GST por la producción de defensas, sino que tampoco hay una diferencia significativa por exposición a RUV (2 horas) de *D. dadayana*.

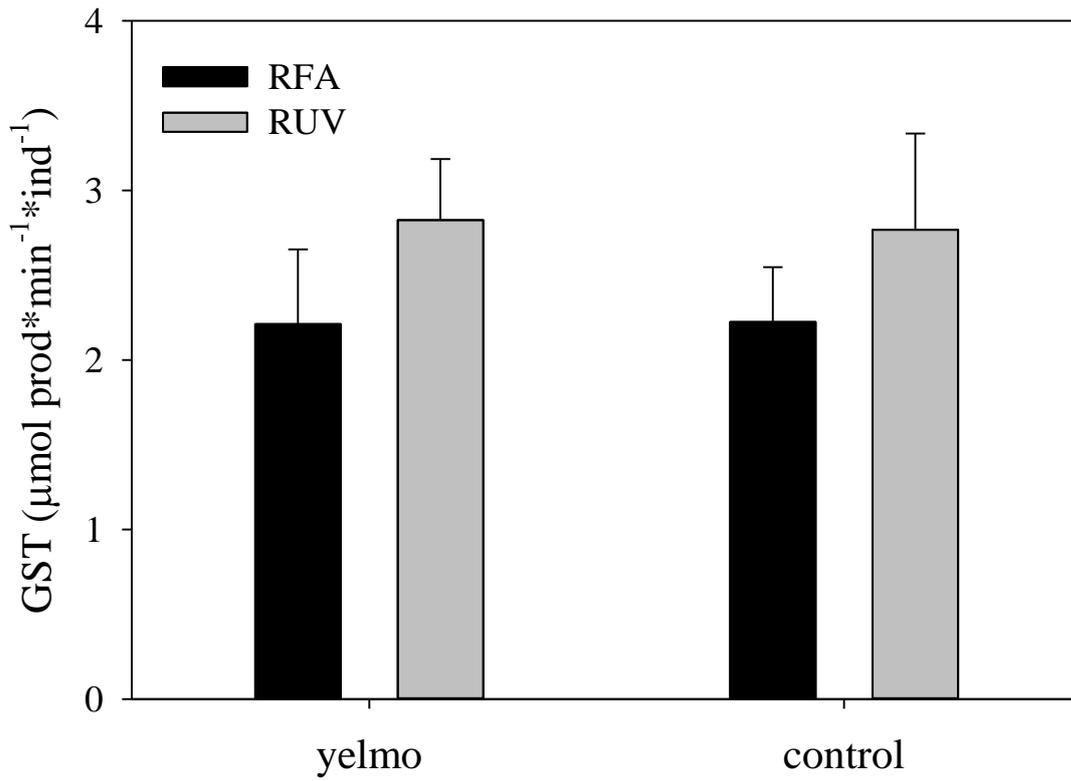


Fig. V.6: **Actividad de GST** frente a dos condiciones de luz (Barras negras = RFA y barras grises = RUV) y dos estados de defensa al 3er día de crecimiento. Las barras de error representan el error estándar en todos los gráficos.



### Discusión

*D. dadayana* en presencia del depredador *P. sarsi* desarrolla una estructura morfológica de defensa (yelmo) y alarga su espina caudal en comparación con con-específicos que no son expuestos a señal de peligro por parte del depredador. Esto demuestra que *P. sarsi* es inductor de esta estructura plástica temporal que genera un aumento del 25% del largo total *Daphnia*. Esta respuesta es similar a la obtenida por Balseiro y Vega (1994) con otra especie de *Daphnia*, por lo que puede esperarse una análoga disminución en las tasas de depredación.

Aunque es evidente el cambio morfológico en *D. dadayana* cuando es expuesta a kairomonas, la actividad antioxidante de GST no fue afectada por la inversión realizada en generar defensas antidepredador. Asimismo, tampoco hubo un impacto significativo en la actividad enzimática cuando *D. dadayana* es expuesta a RUV, independientemente de haber generado defensa o no. Este resultado debe relacionarse con lo expuesto anteriormente sobre la capacidad que *D. dadayana* de acumular melanina que es un pigmento fotoprotector muy efectivo. Por otra parte, estos resultados pueden ser consecuencia de la provisión de una alta calidad de alimento y en concentración suficiente para que no haya un efecto perjudicial a la hora de reubicar nutrientes cuando son faltantes. Esta situación no necesariamente ocurre en la naturaleza donde los períodos de escasez de alimento pueden ser extendidos (Urabe et al. 2002).

Otra posibilidad que explique la ausencia de respuesta es que la GST resulte una buena enzima indicadora para evidenciar los costos que implican la formación de una estructura anti-depredación. En tal sentido, las respuestas relacionadas con la reproducción resultaron buenos predictores del costo de generar defensas antidepredatorias (Riessen y Sprules 1990). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el daño en estrés oxidativo medido como disminución en la actividad de GST no sería un buen estimador de estos costos.

Resumiendo, las distintas evidencias obtenidas en este trabajo, podemos concluir que *D. dadayana* es un cladóceros exitoso en ambientes someros, donde estaría expuesto a depredación por parte de invertebrados (*P. sarsi*) y al efecto potencialmente deletéreo de la RUV. Bajo estas circunstancias, *D. dadayana* exhibió dos respuestas; por un lado, la generación de estructuras antidepredatorias (yelmo y crecimiento de espina posterior) y, por el otro, la acumulación de melanina. Los resultados de los diferentes experimentos realizados indicaron que estas dos respuestas resultaron muy efectivas ya que la actividad



## CAPITULO V: Defensas plásticas

---

de GST no se vio afectada por el estrés ambiental causado por la RUV ni se pudieron identificar costos en esta enzima por la generación de estructuras antidepredatorias.



## CAPITULO VI

### Conclusiones generales

La incidencia de RUV en la superficie de la Tierra tiene distintos efectos en cada organismo siendo en la mayoría de los casos negativos (Williamson 1995, Carrillo et al. 2008, Ballare et al. 2011). Debido al fuerte impacto antrópico en el cambio climático global, es difícil predecir como variará la incidencia de RUV en la superficie de la Tierra y las posibles consecuencias en otros seres vivos. Por lo tanto, resulta interesante entender cuáles son los mecanismos que tienen otros organismos para hacer frente a este posible estrés. La RUV es solo uno de los factores ambientales que está en constante cambio y su impacto puede incrementarse al interactuar con otras variables. En esta tesis se estimaron distintos efectos de la RUV en interacción con otras variables ambientales, en organismos planctónicos del género *Daphnia* de lagos andino-patagónicos. Las respuestas analizadas fueron en su mayoría actividad de enzimas que resultaron ser biomarcadores muy efectivos del nivel de estrés oxidativo generado, la capacidad de adquirir nutrientes (P) y la capacidad de realizar procesos cruciales para el desarrollo y la reproducción como es la muda en cladóceros.

La actividad de la Fosfatasa alcalina, que estima la necesidad de adquirir fósforo (McCarthy et al. 2010), se ve afectada por el estrés oxidativo (tanto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como por la exposición a RUV). Sin embargo, se observa que la respuesta de la AFA a la radiación UV también se ve afectada por la temperatura y la calidad del alimento. En este contexto, se determinó que a temperaturas más altas la RUV tiene un mayor efecto perjudicial sobre la AFA, probablemente debido a mayores tasas metabólicas y a más reactividad a RUV (Macfadyen et al. 2004). *D. commutata* creciendo con alta relación C:P de su alimento y alta temperatura se ve más afectada por la acción de la RUV. Por lo tanto, la baja calidad de alimento en ambientes transparentes como ocurre en los lagos oligotróficos constituyen ambientes de desafío para *Daphnia*. En un contexto de cambio global, es importante tener en cuenta todas estas variables interactivas. Ya que, la temperatura, la RUV y los nutrientes son variables que van a interactuar de manera diferencial en la respuesta de *Daphnia*.



## CAPITULO VI: Conclusiones generales

---

La muda en artrópodos es un factor muy importante para el desarrollo individual y a nivel reproductivo en muchos casos, además de ser un momento muy vulnerable frente a posibles depredadores y daño químico (Lee y Buikema Jr 1979, Ohman 1988). Aumentos en la incidencia de RUV mostraron generar una desincronización en la muda de organismos de la misma cohorte, afectando el correcto funcionamiento de la enzima quitobiasa (único parámetro medido para estimar el efecto de la RUV en la muda) pero también podría estar afectando otras enzimas o señales químicas importantes durante un proceso tan vital, donde se sincroniza la vitelogénesis con la muda y ésta no puede desarrollarse adecuadamente en caso de no encontrarse sincronizados ambos procesos (Bodar et al. 1990). Muchos zoopláncteres y larvas de artrópodos también pueden ser afectados en el proceso de muda por cambios en la incidencia de RUV en ambientes acuáticos por lo cual este efecto deberá ser tenido en cuenta en futuros estudios.

Los pigmentos foto-protectores pueden ser beneficiosos frente a la exposición a la RUV en ambientes someros y en ausencia de depredadores visuales. En tal sentido, *D. dadayana* es un cladóceros exitoso en ambientes someros patagónicos y según los resultados obtenidos la actividad antioxidante de GST no se ve afectada por la exposición a RUV ni por el costo de generar defensas anti-depredación. La melanina en *Daphnia dadayana* genera entonces una protección muy eficiente más aún cuando su concentración aumenta con la exposición prolongada a RUV. Esta estrategia del zooplancton para hacer frente a las RUV es muy efectiva en ambientes sin depredadores visuales ya que el acumular pigmentos en el caparazón genera una mayor vulnerabilidad frente a estos depredadores.

En resumen, se muestran aquí dos estrategias importantes en cladóceros del género *Daphnia*, la especie *D. commutata* que habita lagos transparentes y con depredadores visuales despliega respuestas enzimáticas que interactúan con otros factores como la temperatura y la calidad de alimento. Estas respuestas se complementan además con mecanismos comportamentales como es la migración vertical (Balseiro et al 2007). Sin embargo, también remarcamos la importancia que en esta especie que podría tener la RUV en la muda por el efecto negativo en quitobiasa, pudiendo provocar una desincronización del proceso con probables efectos poblacionales. Por otra parte, la especie *D. dadayana* que habita ambientes someros presenta la estrategia de acumular el pigmento melanina en su caparazón lo que se vincularía con el bajo estrés por RUV



## CAPITULO VI: Conclusiones generales

observado en nuestros experimentos. Sin embargo, destacamos que esta estrategia es posible sólo en ausencia de depredadores visuales.

---

## Bibliografía

- Acharya, K., J. D. Jack, y P. A. Bukaveckas. 2005. Dietary effects on life history traits of riverine *Bosmina*. *Freshwater Biology* **50**:965-975.
- Acharya, K., M. Kyle, y J. J. Elser. 2004a. Biological stoichiometry of *Daphnia* growth: An ecophysiological test of the growth rate hypothesis. *Limnology and Oceanography* **49**:656-665.
- Acharya, K., M. Kyle, y J. J. Elser. 2004b. Effects of stoichiometric dietary mixing on *Daphnia* growth and reproduction. *Oecologia* **138**:333-340.
- Adler, F. R., y C. D. Harvell. 1990. Inducible defenses, phenotypic variability and biotic environments. *Trends in Ecology & Evolution* **5**:407-410.
- Agrawal, A. A. 2001. Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* **294**:321-326.
- Alonso, C., V. Rocco, J. P. Barriga, M. A. Battini, y H. Zagarese. 2004. Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* **49**:225-232.
- APHA. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, AWWA, Washington, D.C.
- Araújo, M. B., y M. Luoto. 2007. The importance of biotic interactions for modelling species distributions under climate change. *Global Ecology and Biogeography* **16**:743-753.
- Arzate-Cárdenas, M. A., y F. Martínez-Jerónimo. 2011. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): integrated biomarker response implementation. *Aquatic Toxicology* **105**:528-534.
- Bae, E., P. Samanta, J. Yoo, y J. Jung. 2016. Effects of multigenerational exposure to elevated temperature on reproduction, oxidative stress, and Cu toxicity in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **132**:366-371.
- Balseiro, E. G., B. E. Modenutti, C. Queimaliños, y M. Reissig. 2007. *Daphnia* distribution in Andean Patagonian lakes: effect of low food quality and fish predation. *Aquatic Ecology* **41**:599-609.
- Balseiro, E. G., M. S. Souza, B. E. Modenutti, y M. Reissig. 2008. Living in transparent lakes: Low food P:C ratio decreases antioxidant response to ultraviolet radiation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **53**:2383-2390.
- Balseiro, E. G., y M. Vega. 1994. Vulnerability of *Daphnia middendorffiana* to *Parabroteas sarsi* predation: the role of the tail spine. *Journal of Plankton Research* **16**:783-793.
- Barata, C., I. Varo, J. C. Navarro, S. Arun, y C. Porte. 2005a. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140**:175-186.
- Barata, C., I. Varo, J. C. Navarro, S. Arun, y C. Porte. 2005b. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **140**:175-186.
- Barros, V. R., J. A. Boninsegna, I. A. Camilloni, M. Chidiak, G. O. Magrín, y M. Rusticucci. 2015. Climate change in Argentina: trends, projections, impacts and adaptation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* **6**:151-169.
- Becker, D., B. F. Brinkmann, B. Zeis, y R. J. Paul. 2011. Acute changes in temperature or oxygen availability induce ROS fluctuations in *Daphnia magna* linked with fluctuations of reduced and oxidized glutathione, catalase activity and gene (haemoglobin) expression. *Biology of the cell* **103**:351-363.
- Bishop, W. H., L. Henke, J. P. Christopher, y D. B. Millar. 1980. Photodestruction of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**:1980-1982.

- Boavida, M. J., y R. G. Wetzel. 1998. Inhibition of phosphatase activity by dissolved humic substances and hydrolytic reactivation by natural ultraviolet light. *Freshwater Biology* **40**:285-293.
- Bodar, C. W. M., P. A. Voogt, y D. I. Zandee. 1990. Ecdysteroids in *Daphnia magna*: their role in moulting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology* **17**:339-350.
- Borgeraas, J., y D. O. Hessen. 2000. UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. *Journal of Plankton Research* **22**:1167-1183.
- Borgeraas, J., y D. O. Hessen. 2002. Variations of antioxidant enzymes in *Daphnia* species and populations as related to ambient UV exposure. *Hydrobiologia* **477**:15-30.
- Browman, H. I., C. A. Rodriguez, F. Bélaud, J. J. Cullen, R. R. Davis, J. H. M. Kouwenberg, P. S. Kuhn, B. McArthur, J. A. Runge, J. F. St-Pierre, y R. D. Vetter. 2000. Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: A synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Marine Ecology Progress Series* **199**:293-311.
- Buchholz, C., y F. Buchholz. 1989. Ultrastructure of the integument of a pelagic Crustacean: moult cycle related studies on the Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Marine Biology* **101**:355-365.
- Carpenter, S. R., J. J. Cole, J. R. Hodgson, J. E. Kitchell, M. L. Pace, D. Bade, K. L. Cottingham, T. E. Essington, J. N. Houser, y D. E. Schindler. 2001. Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: Whole-lake experiments. *Ecological Monographs* **71**:163-186.
- Cauwet, G. 2002. DOM in the coastal zone. Pages 579-609 *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Elsevier.
- Cho, G., S. Na, S. W. Suh, y G. Jung. 2000. Expression of Recombinant HBV Pol Proteins in HepG2 Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **33**:440-447.
- Cockell, C. S., y G. Horneck. 2001. The history of the UV radiation climate of the earth— theoretical and space-based observations. *Photochemistry and Photobiology* **73**:447-451.
- Collinson, E. J., y C. M. Grant. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* **278**:22492-22497.
- Conley, J. M., M. S. Schorr, M. L. Hanson, S. J. Symes, y S. M. Richards. 2009. Is ambient chitinase activity a monitoring tool for impacts on secondary production in lotic systems? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **66**:1274-1281.
- Connelly, S. J., R. E. Moeller, G. Sanchez, y D. L. Mitchell. 2009. Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* **85**:144-152.
- De Wilde, R., L. Swevers, T. Soin, O. Christiaens, P. Rougé, K. Cooreman, C. Janssen, y G. Smaghe. 2013. Cloning and functional analysis of the ecdysteroid receptor complex in the opossum shrimp *Neomysis integer* (Leach, 1814). *Aquatic Toxicology* **130**:31-40.
- Del Vecchio, R., y N. V. Blough. 2002. Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling. *Marine Chemistry* **78**:231-253.
- Diéguez, M., y E. Balseiro. 1998. Colony size in *Conochilus hippocrepis*: defensive adaptation to predator size. *Hydrobiologia* **387**:421-425.
- Dobberfuhl, D. R., y J. J. Elser. 2000. Elemental stoichiometry of lower food web components in arctic and temperate lakes. *Journal of Plankton Research* **22**:1341-1354.
- Dodson, S. I. 1974. Adaptive change in plankton morphology in response to size-selection predation: A new hypothesis on cyclomorphosis. *Limnology and Oceanography* **19**:721-729.
- Dodson, S. I., y J. E. Havel. 1988. Indirect prey effects: Some morphological and life history response of *Daphnia pulex* exposed to *Notonecta undulata*. *Limnology and Oceanography* **33**:1274-1285.
- Doyle, S. A., J. E. Saros, y C. E. Williamson. 2005. Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* **50**:1362-1367.

- Duchet, C., M. Mitie Inafuku, T. Caquet, M. Larroque, E. Franquet, C. Lagneau, y L. Lagadic. 2011. Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and diflubenzuron. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**:800-810.
- Ebert, D. 1992. A food-independent maturation threshold and size at maturity in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* **37**:878-881.
- Elser, J. J., A. L. Peace, M. Kyle, M. Wojewodzic, M. L. McCrackin, T. Andersen, y D. O. Hessen. 2010. Atmospheric nitrogen deposition is associated with elevated phosphorus limitation of lake zooplankton. *Ecology Letters* **13**:1256-1261.
- Elser, J. J., R. W. Sterner, E. Gorokhova, W. F. Fagan, T. A. Markow, J. B. Cotner, J. F. Harrison, S. E. Hobbie, G. M. Odell, y L. J. Weider. 2000. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters* **3**:540-550.
- Espie, P. J., y J. C. Roff. 1995a. A biochemical index of duration of the molt cycle for planktonic Crustacea based on the chitin-degrading enzyme, chitobiase. *Limnology and Oceanography* **40**:1028-1034.
- Espie, P. J., y J. C. Roff. 1995b. Characterization of Chitobiase from *Daphnia magna* and Its Relation to Chitin Flux. *Physiological Zoology* **68**:727-748.
- Essen, L. O., y T. Klar. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**:1266-1277.
- Gabriel, W., B. Luttbeg, A. Sih, y R. Tollrian. 2005. Environmental tolerance, heterogeneity, and the evolution of reversible plastic responses. *American Naturalist* **166**:339-353.
- Gonçalves, R. J., M. Sol Souza, J. Aigo, B. E. Modenutti, E. G. Balseiro, V. E. Villafañe, V. Cussac, y E. W. Helbling. 2010. Responses of plankton and fish from temperate zones to UVR and temperature in a context of global change. *Ecología Austral* **20**:129-153.
- Goodwin, T. 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annual review of nutrition* **6**:273-297.
- Guillard, R. R. L., y C. J. Lorenzen. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J Phycol* **8**:10-14.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, y W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**:7130-7139.
- Häder, D. P., E. W. Helbling, C. E. Williamson, y R. C. Worrest. 2007. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* **10**:242-260.
- Häder, D. P., H. D. Kumar, R. C. Smith, y R. C. Worrest. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**:53-58.
- Hairton, N. 1976. Photoprotection by carotenoid pigments in the copepod *Diaptomus nevadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**:971-974.
- Hairton, N. G. 1979. The relationship between pigmentation and reproduction in two species of *Diaptomus* (Copepoda). *Limnology and Oceanography* **24**:38-44.
- Halcrow, K. 1976. The fine structure of the carapace integument of *Daphnia magna* Straus (Crustacea Branchiopoda). *Cell and tissue research* **169**:267-276.
- Hansell, D. A., H. W. Ducklow, A. M. Macdonald, y M. O. Baringer. 2004. Metabolic poise in the North Atlantic Ocean diagnosed from organic matter transports. *Limnology and Oceanography* **49**:1084-1094.
- Hanson, M., y L. Lagadic. 2005. Chitobiase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. *Aquatic Ecosystem Health & Management* **8**:441-450.
- Hansson, L.-A., M. Gyllstrom, A. Stahl-Delbanco, y M. Svensson. 2004. Responses to fish predation and nutrients by plankton at different levels of taxonomic resolution. *Freshwater Biology* **49**:1538-1550.
- Hansson, L.-A., S. Hylander, y R. Sommaruga. 2007. Escape from UV threats in zooplankton: a cocktail of behavior and protective pigmentation. *Ecology* **88**:1932-1939.
- Hansson, L. A. 2004. Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* **85**:1005-1016.

- Hansson, L. A., y S. Hylander. 2009. Effects of ultraviolet radiation on pigmentation, photoenzymatic repair, behavior, and community ecology of zooplankton. *Photochemical and Photobiological Sciences* **8**:1266-1275.
- Harm, W. 1980. Biological effects of ultraviolet radiation.
- Havel, J. E. 1987. Predator-induced defenses: A review. Pages 263-278 in W. C. Kerfoot y A. Sih, editors. *Predation: Direct and indirect impacts on aquatic communities*. University Press of New England, Hanover, N.Y.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan, y I. R. Jowsey. 2005. GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**:51-88.
- Hebert, P. D. N., y P. M. Grewe. 1985. *Chaoborus* induced shifts in the morphology of *Daphnia ambigua*. *Limnology and Oceanography* **30**:1291-1297.
- Helbling, E. W., A. G. J. Buma, P. Boelen, H. J. v. d. Strate, M. V. F. Giordanino, y V. E. Villafañe. 2011. Increase in Rubisco activity and gene expression due to elevated temperature partially counteracts ultraviolet radiation-induced photoinhibition in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* **56**:1330-1342.
- Helbling, E. W. Z. H. 2003. UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Herbert, P., y C. Emery. 1990. The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Functional Ecology*:703-710.
- Hessen, D. O. 1993. DNA-damage and pigmentation in Alpine and Arctic zooplankton as bioindicators of UV-radiation. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **25**:482-486.
- Hessen, D. O., T. Andersen, P. Brettum, y B. A. Faafeng. 2003. Phytoplankton contribution to sestonic mass and elemental ratios in lakes: Implications for zooplankton nutrition. *Limnology and Oceanography* **48**:1289-1296.
- Hessen, D. O., J. Borgeraas, K. Kessler, y U. H. Refseth. 1999. UV-B susceptibility and photoprotection of Arctic *Daphnia* morphotypes. *Polar Research* **18**:345-352.
- Hessen, D. O., J. J. Elser, R. W. Sterner, y J. Urabe. 2013. Ecological stoichiometry: An elementary approach using basic principles. *Limnology and Oceanography* **58**:2219-2236.
- Hessen, D. O., P. J. Faerovig, y T. Andersen. 2002. Light, nutrients, and P : C ratios in algae: Grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* **83**:1886-1898.
- Hessen, D. O., y E. Lydersen. 1996. The zooplankton story of humic Lake Skjervatjern during whole catchment acidification. *Environment International* **22**:643-652.
- Hobæk, A., y H. G. Wolf. 1991. Ecological genetics of Norwegian *Daphnia*. II. Distribution of *Daphnia longispina* genotypes in relation to short-wave radiation and water colour. Pages 229-243 in V. Kořínek y D. G. Frey, editors. *Biology of Cladocera: Proceedings of the Second International Symposium on Cladocera, Tatranska Lomnica, Czechoslovakia, 13–20 September 1989*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Huebner, J. D., D. L. W. Young, N. L. Loadman, V. J. Lentz, y M. D. Wiegand. 2006. Age-dependent survival, reproduction and photorepair activity in *Daphnia magna* (Straus, 1820) after exposure to artificial ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology* **82**:1656-1661.
- Hurst, R., Y. Bao, P. Jemth, B. Mannervik, y G. Williamson. 1998. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem. J.* **332**:97.
- Hylander, S., M. S. Souza, E. G. Balseiro, B. E. Modenutti, y L. A. Hansson. 2012. Fish-mediated trait compensation in zooplankton. *Functional Ecology* **26**:608-615.
- Kielbassa, C., L. Roza, y B. Epe. 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* **18**:811-816.
- Kilham, S. S., D. A. Kreeger, S. G. Lynn, C. E. Goulden, y L. Herrera. 1998. COMBO - A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**:147-159.
- Korbee, N., P. Carrillo, M. T. Mata, S. Rosillo, J. M. Medina-Sánchez, y F. L. Figueroa. 2012. Effects of ultraviolet radiation and nutrients on the structure–function of phytoplankton in a high mountain lake. *Photochemical & Photobiological Sciences* **11**:1087-1098.

- Kouwenberg, J. H. M., y F. Lantoine. 2007. Effects of ultraviolet-B stressed diatom food on the reproductive output in Mediterranean *Calanus helgolandicus* (Crustacea; Copepoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **341**:239-253.
- Laforsch, C., L. Beccara, y R. Tollrian. 2006. Inducible defenses: The relevance of chemical alarm cues in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **51**:1466-1472 Abstract.
- Laforsch, C., y R. Tollrian. 2004. Embryological aspects of inducible morphological defenses in *Daphnia*. *Journal of Morphology* **262**:701-707.
- Lampert, W. 1989. The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton. *Functional Biology* **3**:21-27.
- Laspoumaderes, C., M. S. Souza, B. Modenutti, y E. Balseiro. 2017. Glacier melting and response of *Daphnia* oxidative stress. *Journal of Plankton Research* **39**:675-686.
- Leavitt, P. R., B. F. Cumming, J. P. Smol, M. Reasoner, R. Pienitz, y D. A. Hodgson. 2003. Climatic control of ultraviolet radiation effects on lakes. *Limnology and Oceanography* **48**:2062-2069.
- Lee, D. R., y A. L. Buikema Jr. 1979. Molt-Related Sensitivity of *Daphnia pulex* in Toxicity Testing. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **36**:1129-1133.
- Leech, D. M., y C. E. Williamson. 2000. Is tolerance to UV radiation in zooplankton related to body size, taxon, or lake transparency? *Ecological Applications* **10**:1530-1540.
- Lesser, M. P. 1996a. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* **41**:271-283.
- Lesser, M. P. 1996b. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* **41**:271-283.
- Lesser, M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* **68**:253-278.
- Leu, E., S. Falk-Petersen, y D. O. Hessen. 2007. Ultraviolet radiation negatively affects growth but not food quality of arctic diatoms. *Limnology and Oceanography* **52**:787-797.
- Leu, E., S.-A. Wangberg, A. Wulff, S. Falk-Petersen, J. B. ObeK, y D. O. Hessen. 2006. Effects of changes in ambient PAR and UV radiation on the nutritional quality of an Arctic diatom (*Thalassiosira antarctica* var. *borealis*). *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **337**:65-81.
- Li, P., W. Liu, y K. Gao. 2013. Effects of temperature, pH, and UV radiation on alkaline phosphatase activity in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Journal of Applied Phycology* **25**:1031-1038.
- Luecke, C., y W. J. O'Brien. 1983. The effect of *Heterocope* predation on zooplankton communities in arctic ponds. *Limnology and Oceanography* **28**:367-377.
- Macfadyen, E. J., C. E. Williamson, G. Grad, M. Lowery, W. H. Jeffrey, y D. L. Mitchell. 2004. Molecular Response to Climate Change: Temperature Dependence of Uv-Induced Dna Damage and Repair in the Freshwater Crustacean *Daphnia Pulicaria*. *Global Change Biology* **10**:408-416.
- Madronich, S., R. L. McKenzie, L. O. Björn, y M. M. Caldwell. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**:5-19.
- Markert, B., F. Pedrozo, W. Geller, K. Friese, S. Korhammer, G. Baffico, M. Diaz, y S. Wolf. 1997. A contribution to the study of the heavy-metal and nutritional element status of some lakes in the southern Andes of Patagonia (Argentina). *Science of the Total Environment* **206**:1-15.
- Martindale, J. L., y N. J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* **192**:1-15.
- McCarthy, S. D. S., S. R. Rafferty, y P. C. Frost. 2010. Responses of alkaline phosphatase activity to phosphorus stress in *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology* **213**:256-261.
- McCarthy, V., I. Donohue, y K. Irvine. 2006. Field evidence for stoichiometric relationships between zooplankton and N and P availability in a shallow calcareous lake. *Freshwater Biology* **51**:1589-1604.

- McCarthy, V., y K. Irvine. 2010. A test of stoichiometry across six Irish lakes of low-moderate nutrient status and contrasting hardness. *Journal of Plankton Research* **32**:15-29.
- McQueen, D. J., M. R. Johannes, y J. R. Post. 1989. Bottom-up and top-down impacts on freshwater pelagic community structure. *Ecological Monographs* **59**:289-309.
- Meinertz, J. R., S. L. Greseth, M. P. Gaikowski, y L. J. Schmidt. 2008. Chronic toxicity of hydrogen peroxide to *Daphnia magna* in a continuous exposure, flow-through test system. *Science of the Total Environment* **392**:225-232.
- Merzendorfer, H., y L. Zimoch. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* **206**:4393-4412.
- Mitchell, D. L., y D. Karentz. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. Pages 345-377 in A. R. Young, L. O. Bjorn, J. Moan, y W. Nultsch, editors. *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York.
- Miyakawa, H., M. Imai, N. Sugimoto, Y. Ishikawa, A. Ishikawa, H. Ishigaki, Y. Okada, S. Miyazaki, S. Koshikawa, R. Cornette, y T. Miura. 2010. Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Developmental Biology* **10**:45.
- Mladenov, N., R. Sommaruga, R. Morales-Baquero, I. Laurion, L. Camarero, M. Diéguez, A. Camacho, A. Delgado, O. Torres, y Z. Chen. 2011. Dust inputs and bacteria influence dissolved organic matter in clear alpine lakes. *Nature communications* **2**:405.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, M. Bastidas Navarro, C. Laspoumaderes, M. S. Souza, y F. Cuassolo. 2013. Environmental changes affecting light climate in oligotrophic mountain lakes: The deep chlorophyll maxima as a sensitive variable. *Aquatic Sciences* **75**:361-371.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, C. Callieri, R. Bertoni, y C. P. Queimaliños. 2005. Effect of UV-B and different PAR intensities on the primary production of the mixotrophic planktonic ciliate *Stentor araucanus*. *Limnology and Oceanography* **50**:864-871.
- Modenutti, B. E., M. C. Dieguez, y H. Segers. 1998. A new *Keratella* from Patagonia. *Hydrobiologia* **389**:1-5.
- Modenutti, B. E., G. Pérez, E. G. Balseiro, y C. Queimaliños. 2001. The relationship between light attenuation, chlorophyll a and total suspended solids in a Southern Andes glacial lake. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **27**:2648-2651.
- Modenutti, B. E., G. L. Perez, E. G. Balseiro, y C. P. Queimaliños. 2000. Relationship between light availability, chlorophyll a and total suspended solid in a glacial lake of South Andes. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **27**:2648-2651.
- Moeller, R. E., S. Gilroy, C. E. Williamson, G. Grad, y R. Sommaruga. 2005. Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod. *Limnology and Oceanography* **50**:427-439.
- Monaghan, P., N. B. Metcalfe, y R. Torres. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* **12**:75-92.
- Morris, D. P., H. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. E. Modenutti, R. Moeller, y C. Queimaliños. 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography* **40**:1381-1391.
- Muzzarelli, R. A. A. 1977. CHAPTER 4 - CHITINASES AND RELATED ENZYMES. Pages 155-181 *Chitin*. Pergamon.
- Nakagawa, Y. 2005. Nonsteroidal ecdysone agonists. *Vitamins & Hormones* **73**:131-173.
- O'Brien, W. J., D. Kettle, y H. Riessen. 1979. Helmets and invisible armor: structures reducing predation from tactile and visual planktivores. *Ecology* **60**:287-294.
- Ohman, M. D. 1988. Behavioral Responses of Zooplankton to Predation. *Bulletin of Marine Science* **43**:530-550.
- Oosterhuis, H. 2000. Stepchildren of nature: Krafft-Ebing, psychiatry, and the making of sexual identity. University of Chicago Press.
- Overturf, C., A. Wormington, K. Blythe, N. Gohad, A. Mount, y A. Roberts. 2015. Toxicity of noradrenaline, a novel anti-biofouling component, to two non-target zooplankton species,

- Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **171**:49-54.
- Paggi, J. 1999a. Status and phylogenetic relationships of *Daphnia sarsi* Daday, 1902 (Crustacea: Anomopoda). Hydrobiologia **403**:27-38.
- Paggi, J. C. 1999b. Status and phylogenetic relationships of *Daphnia sarsi* Daday, 1902 (Crustacea : Anomopoda). Hydrobiologia **403**:27-37.
- Park, E. Y., y H. M. Rho. 2002. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic response element. Molecular and Cellular Biochemistry **24**:47.
- Peng, T., K. Thorn, T. Schroeder, L. Wang, F. J. Theis, C. Marr, y N. Navab. 2017. A BaSiC tool for background and shading correction of optical microscopy images. Nature communications **8**:14836.
- Perez, A. P., M. A. Ferraro, y H. E. Zagarese. 2012. The relative contributions of diet and associated microbiota to the accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the freshwater copepod *Boeckella antiqua*. Freshwater Biology **57**:993-1004.
- Pérez, G. L., C. P. Queimaliños, y B. E. Modenutti. 2002. Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. Journal of Plankton Research **24**:591-599.
- Persaud, A. D., y C. E. Williamson. 2005. Ultraviolet and temperature effects on planktonic rotifers and crustaceans in northern temperate lakes. Freshwater Biology **50**:467-476.
- Persson, J., M. W. Wojewodzic, D. O. Hessen, y T. Andersen. 2011. Increased risk of phosphorus limitation at higher temperatures for *Daphnia magna*. Oecologia **165**:123-129.
- Qi, S., C. Wang, X. Chen, Z. Qin, X. Li, y C. Wang. 2013. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitinase activities. Ecotoxicology and Environmental Safety **98**:339-344.
- Rautio, M., y A. Korhola. 2002. UV-induced pigmentation in subarctic *Daphnia*. Limnology and Oceanography **47**:295-299.
- Rautio, M., y B. Tartarotti. 2010. UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. Freshwater Reviews **3**:105-131.
- Ravanat, J. L., T. Douki, y J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **63**:88-102.
- Relyea, R. A. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. Ecology **82**:523-540.
- Repka, S., y M. Walls. 1998. Variation in the neonate size of *Daphnia pulex*: the effects of predator exposure and clonal origin. Aquatic Ecology **32**:203-209.
- Reynolds, S. E. 1987. The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. Pest Management Science **20**:131-146.
- Reynolds, S. E., y R. I. Samuels. 1996. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. Pages 157-232 Advances in insect physiology. Elsevier.
- Rhee, G. Y., y I. J. Gotham. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. Limnology and Oceanography **26**:635-648.
- Rhode, S. C., M. Pawlowski, y R. Tollrian. 2001. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. Nature **412**:69-72.
- Richards, S., S. Kelly, y M. Hanson. 2008. Zooplankton chitinase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. Archives of environmental contamination and toxicology **54**:637-644.
- Riessen, H. P. 1999. Predator-induced life history shifts in *Daphnia*: a synthesis of studies using meta-analysis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **56**:2487-2494.
- Riessen, H. P., W. J. O'Brien, y B. Loveless. 1984. An analysis of the components of *Chaoborus* predation on zooplankton and the calculation of relative prey vulnerabilities. Ecology **65**:514-522.

- Riessen, H. P., y W. G. Sprules. 1990. Demographic costs of antipredator defenses in *Daphnia pulex*. *Ecology* **71**:1536-1546.
- Rinke, K., y T. Petzoldt. 2008. Individual-based simulation of diel vertical migration of *Daphnia*: A synthesis of proximate and ultimate factors. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* **38**:269-285.
- Rinke, K., y J. Vijverberg. 2005. A model approach to evaluate the effect of temperature and food concentration on individual life-history and population dynamics of *Daphnia*. *Ecological Modelling* **186**:326-344.
- Roff, J., J. Kroetsch, y A. Clarke. 1994. A radiochemical method for secondary production in planktonic crustacea based on rate of chitin synthesis. *Journal of Plankton Research* **16**:961-976.
- Rozema, J., L. O. Bjorn, J. F. Bornman, A. Gaberscik, D. P. Häder, T. Trost, M. Germ, M. Klisch, A. Groniger, R. P. Sinha, M. Lebert, Y. Y. He, R. Buffoni-Hall, N. V. J. De Bakker, J. Van De Staaij, y B. B. Meijkamp. 2002. The Role of Uv-B Radiation in Aquatic and Terrestrial Ecosystems - an Experimental and Functional Analysis of the Evolution of Uv-Absorbing Compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **66**:2-12.
- Rusak, S. R., L; Peake, B; Cooper, W. 2006. Trends in hydrogen peroxide levels in relation to solar radiation in the water of Leith.
- Sancar, A. 1996. DNA excision repair. Pages 43-81 *Annual Review of Biochemistry*
- Sastri, A. R., y J. C. Roff. 2000. Rate of chitinase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**:1965-1968.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, y B. Schmid. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**:676.
- Shick, J. M., y W. C. Dunlap. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Physiology* **64**:223-262.
- Shick, J. M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pagés, y J.-P. Gattuso. 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* **44**:1667-1682.
- Siebeck, O., T. Vail, C. E. Williamson, R. Vetter, D. Hessen, H. E. Zagarese, E. Little, E. G. Balseiro, B. E. Modenutti, J. Seva, y A. Shumate. 1994. Impact of UV-B radiation on zooplankton and fish in pelagic freshwater ecosystems *Archiv für Hydrobiologie Beihrage Ergebnisse der Limnologie* **43**:101-104.
- Sinha, R. P., y D. P. Häder. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* **1**:225-236.
- Skinner, D. M. 1985. Molting and regeneration. *The biology of Crustacea* **9**:43-146.
- Smith, R. C., B. Prezelin, K. Baker, R. Bidigare, N. Boucher, T. Coley, D. Karentz, S. MacIntyre, H. Matlick, y D. Menzies. 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* **255**:952-959.
- Song, Y., L. M. Evenseth, T. Iguchi, y K. E. Tollefsen. 2017b. Release of chitinase as an indicator of potential molting disruption in juvenile *Daphnia magna* exposed to the ecdysone receptor agonist 20-hydroxyecdysone. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **80**:954-962.
- Song, Y., D. L. Villeneuve, K. Toyota, T. Iguchi, y K. E. Tollefsen. 2017a. Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods: Review and Adverse Outcome Pathway Development. *Environmental Science & Technology* **51**:4142-4157.
- Sørensen, J. G., T. N. Kristensen, y V. Loeschcke. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**:1025-1037.
- Souza, M. S., E. G. Balseiro, C. Laspoumaderes, y B. E. Modenutti. 2010a. Effect of ultraviolet radiation on Acetylcholinesterase activity in freshwater copepods. *Photochemistry and Photobiology* **86**:367-373.

- Souza, M. S., L.-A. Hansson, S. Hylander, B. E. Modenutti, y E. G. Balseiro. 2012. Rapid Enzymatic Response to Compensate UV Radiation in Copepods. *PLoS One* **7**:e32046.
- Souza, M. S., B. E. Modenutti, y E. G. Balseiro. 2007. Antioxidant defences in planktonic crustaceans exposed to different underwater light irradiances in Andean lakes. *Water, Air, and Soil Pollution* **183**:49-57.
- Souza, M. S., B. E. Modenutti, P. Carrillo, M. Villar-Argaiz, J. M. Medina-Sánchez, F. Bullejos, y E. G. Balseiro. 2010b. Stoichiometric dietary constraints influence the response of copepods to ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Limnology and Oceanography* **55**:1024-1032.
- Sterner, R. W., y J. J. Elser. 2002. Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University Press, Princeton, NJ USA.
- Sterner, R. W., J. J. Elser, E. J. Fee, S. J. Guildford, y T. H. Chrzanowski. 1997. The light:nutrient ratio in lakes: The balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *The American Naturalist* **150**:663-684.
- Sterner, R. W., D. D. Hagemeier, y W. L. Smith. 1993. Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **38**:857-871.
- Stevenson, J. 1985. Dynamics of the integument. *The biology of Crustacea* **9**:1-42.
- Sutherland, B. M. 1981. 24 Photoreactivating Enzymes. Pages 481-515 *Enzymes*.
- Tank, S., M. Xenopoulos, y L. Hendzel. 2005. Effect of ultraviolet radiation on alkaline phosphatase activity and planktonic phosphorus acquisition in Canadian boreal shield lakes. *Limnology and Oceanography* **50**:1345-1351.
- Tartarotti, B., G. Baffico, P. Temporetti, y H. E. Zagarese. 2004. Mycosporine-like amino acids in planktonic organisms living under different UV exposure conditions in Patagonian lakes. *Journal of Plankton Research* **26**:753-762.
- Tartarotti, B., I. Laurion, y R. Sommaruga. 2001. Large variability in the concentration of mycosporine-like aminoacids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. *Limnology and Oceanography* **46**:1546-1552.
- Threlkeld, S. T. 1985. Resource variation and the initiation of midsummer declines of caldoceran populations. *Archiv fur Hydrobiologie Beih. Ergebn. Limnol.* **21**:333-340.
- Tollrian, R. 1995. Predator-induced morphological defenses: Costs, life history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* **76**:1691-1705.
- Tollrian, R., y S. Dodson. 1999. Inducible defenses in Cladocera: Constraints, costs, and multipredator environments. *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*:177 - 202.
- Tollrian, R., y C. D. Harvell. 1999. The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton University Press.
- Tollrian, R., y C. Heibl. 2004. Phenotypic plasticity in pigmentation in *Daphnia* induced by UV radiation and fish kairomones. *Functional Ecology* **18**:497-502.
- Twardowski, M. S., y P. L. Donaghay. 2002. Photobleaching of aquatic dissolved materials: Absorption removal, spectral alteration, and their interrelationship. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **107**.
- Urabe, J., M. Kyle, W. Makino, T. Yoshida, T. Andersen, y J. J. Elser. 2002. Reduced light increases herbivore production due to stoichiometric effects of light/nutrient balance. *Ecology* **83**:619-627.
- Vega, M. 1995. La depredación intrazooplanktonica: un estudio sobre *Parabroteas sarsi*. Doctoral Dissertation, University of Comahue:211 pp.
- Vega, P. M. 1999. Life-State Differences in the Diet of *Parabroteas sarsi* (Daday) (Copepoda, Calanoida): A Field Study. *Limnologica* **29**:186-190.
- Villafañe, V., E. W. Helbling, y H. E. Zagarese. 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* **30**:112-117.
- Vinebrooke, R. D., y P. R. Leavitt. 1999. Differential responses of littoral communities to ultraviolet radiation in an alpine lake. *Ecology* **80**:223-237.
- Vrba, J., y J. Macháček. 1994. Release of dissolved extracellular  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase during crustacean moulting. *Limnology and Oceanography* **39**:712-716.

- Wagner, N. D., y P. C. Frost. 2012. Responses of alkaline phosphatase activity in *Daphnia* to poor nutrition. *Oecologia* **170**:1-10.
- Williamson, C. E., J. M. Fischer, S. M. Bollens, E. P. Overholt, y J. K. Breckenridge. 2011. Towards a more comprehensive theory of zooplankton diel vertical migration: Integrating ultraviolet radiation and water transparency into the biotic paradigm. *Limnology and Oceanography* **56**:1603-1623.
- Williamson, C. E., C. Salm, S. L. Cooke, y J. E. Saros. 2010. How do UV radiation, temperature, and zooplankton influence the dynamics of alpine phytoplankton communities? *Hydrobiologia* **648**:73-81.
- Wojewodzic, M. W., M. Kyle, J. J. Elser, D. O. Hessen, y T. Andersen. 2011. Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia* **165**:837-846.
- Wojtal-Frankiewicz, A. 2012. The effects of global warming on *Daphnia* spp. population dynamics: A review. *Aquatic Ecology* **46**:37-53.
- Xenopoulos, M. A., P. C. Frost, y J. J. Elser. 2002. Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology* **83**:423-435.
- Zagarese, H. E., C. E. Williamson, M. Mislivets, y P. Orr. 1994. The vulnerability of *Daphnia* to UV-B radiation in the Northeastern United States. *Archiv fur Hydrobiologie Beih. Ergebn. Limnol.* **43**:207-216.
- Zanardi-Lamardo, E., C. A. Moore, y R. G. Zika. 2004. Seasonal variation in molecular mass and optical properties of chromophoric dissolved organic material in coastal waters of southwest Florida. *Marine Chemistry* **89**:37-54.
- Zellmer, I. D. 1995. UV-B-tolerance of alpine and arctic *Daphnia*. *Hydrobiologia* **307**:153-159.
- Zepp, R. G., T. V. Callaghan, y D. J. Erickson Iii. 2003. Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2**:51-61.
- Zepp, R. G., D. J. Erickson Iii, N. D. Paul, y B. Sulzberger. 2007. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**:286-300.
- Zepp, R. G., D. J. Erickson Iii, N. D. Paul, y B. Sulzberger. 2011. Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10**:261-279.
- Zheng, J., T. Nakatsuji, R. D. Roer, y R. D. Watson. 2008. Studies of a receptor guanylyl cyclase cloned from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and its possible functional link to ecdysteroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology* **155**:780-788.
- Žitňan, D., Y. J. Kim, I. Žitňanová, L. Roller, y M. E. Adams. 2007. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *General and Comparative Endocrinology* **153**:88-96.
- Zou, E. 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integrative and Comparative Biology* **45**:33-38.
- Zou, E., y M. Fingerman. 1999. Chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. *Marine Biology* **133**:97-101.

**Publicación de Respaldo: "Interactive effects of temperature, ultraviolet radiation and foodquality on zooplankton alkaline phosphatase activity"**