

Indução do crescimento ovariano em *Aegla uruguayana* (Crustacea, Anomura, Aeglidae) mediante a incorporação de neuroreguladores ao alimento

Daniela da S. Castiglioni¹, Alejandra Valeria Cahansky², Enrique Rodríguez², Bibiana K. Dutra³, Guendalina T. Oliveira³ & Georgina Bond-Buckup¹

1. Departamento de Zoologia, Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43435, sala 217, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. (danielacastiglioni@yahoo.com.br)
2. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. II, C1428AXC Buenos Aires, Argentina.
3. Departamento de Fisiologia, Faculdade de Biociências, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681/Prédio 12A, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT. Induction of ovarian growth in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae) by means of neuroregulators incorporated to food. The stimulatory effect of the spiperone and naloxone on the ovarian growth was evaluated in females of *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942, being that these neuroregulators were incorporated to food and administrated at a dose of 10^{-8} mol/animal to each session food. Adult females were sampled with nets in a stream near the municipality of Salto, Province of Buenos Aires, Argentina. At the beginning of the experiment, 10 females were randomly selected, sacrificed, weighed and their ovaries were quickly dissected and weighed to serve as the initial control for evaluating the degree of ovarian growth (gonadosomatic index -GI). Others females (30) were divided in three experimental groups – (a) control: females fed on control pellets composed by fish food – 34% protein and 43% protein; (b) spiperone: females fed on pellets enriched with the dopaminergic antagonist spiperone; (c) naloxone: females fed on pellets enriched with the enkephalinergic antagonist naloxone. After seven week of experiment the females were sacrificed and evaluated the GI. The lipids and cholesterol levels of ovaries and hepatopancreas were quantified. Naloxone produced a significant increase of lipids levels in both ovaries and hepatopancreas in relation to control group. Spiperone caused significant increase of lipids levels at the gonads and hepatopancreas and cholesterol in hepatopancreas when compared with the control. The lipids levels were significantly lower in hemolymph of the females that were fed with pellets with spiperone and higher at the females treated with naloxone when compared to females that were fed only fish food. The spiperone and naloxone when inhibited the effect of the dopamine and endogenous opioids, probably caused the secretion of the gonad stimulating hormone and the inhibition of the gonad inhibiting hormone, therefore induction of the ovarian development. Such hypothesis can be strengthened for the increases of gonadosomatic indices in these experimental groups.

KEYWORDS. Anomura, ovarian growth, spiperona, naloxone, intermediary metabolism.

RESUMO. O efeito estimulante da spiperona e da naloxana sob a maturação ovariana foram avaliados em fêmeas de *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 e, para isto, tais neuroreguladores foram incorporados ao alimento e administrados a uma dose de 10^{-8} mol/animal a cada sessão de alimentação. Fêmeas adultas foram coletadas com puçã em um arroio próximo à cidade de Salto, Província de Buenos Aires, Argentina. Dez fêmeas foram sacrificadas, medidas, pesadas e os seus ovários foram retirados e pesados para a determinação do índice gonadossomático (IG). As demais fêmeas (30) foram divididas em três grupos experimentais - (a) controle: alimentadas com pellets controle composto por ração para peixe - 34% de proteína e 43% de proteína; (b) spiperona: alimentadas com pellets controle enriquecidos com spiperona; (c) naloxana: alimentadas com pellets controle enriquecidos com naloxana. Após 7 semanas as fêmeas foram sacrificadas e avaliado o IG. Os ovários e o hepatopâncreas foram quantificados quanto aos níveis de lipídeos totais e colesterol. A naloxana produziu um aumento significativo nos níveis de lipídeos tanto nas gônadas como no hepatopâncreas em relação ao grupo controle. A spiperona produziu aumento significativo nos níveis de lipídeos nas gônadas e no hepatopâncreas e de colesterol no hepatopâncreas quando comparados ao controle. Os níveis de lipídeos foram significativamente menores na hemolinfa das fêmeas que foram alimentadas com pellets com spiperona e maiores nas fêmeas tratadas com naloxana quando comparadas as fêmeas que foram alimentadas apenas com ração. A spiperona e a naloxana, ao inibir os efeitos da dopamina e dos opióides endógenos, provavelmente causaram a secreção do hormônio estimulante das gônadas e a inibição do hormônio inibidor das gônadas, causando, portanto indução do desenvolvimento ovariano. Tal hipótese é reforçada pelos aumentos do índice gonadossomático verificado nestes grupos experimentais.

PALAVRAS-CHAVE. Anomura, crescimento ovariano, spiperona, naloxana, metabolismo intermediário.

A reprodução nos crustáceos, especialmente nos decápodos, ocorre geralmente durante a intermuda. A muda e o desenvolvimento gonadal são os principais eventos metabólicos e envolvem mobilização cíclica de reservas orgânicas estocadas que serão direcionadas para a epiderme e gônadas através de ação hormonal (ADIYODI & ADIYODI, 1970). Assim, o desenvolvimento ovariano em crustáceos é regulado principalmente por dois neurohormônios, o hormônio inibidor da gônada (GIH) secretado pelo complexo órgão X - glândula do sinus, localizados nos pedúnculos oculares e o hormônio estimulante da gônada (GSH), secretado pelo cérebro e

gânglio torácico (ADIYODI & ADIYODI, 1970; EASTMAN-REKS & FINGERMAN, 1984; WAINWRIGHT & REES, 2001).

Dentre os hormônios que possuem alguma função na reprodução dos crustáceos, se encontram os esteróides, tais como a 17α OH-progesterona, produzida pelos ovários (FINGERMAN *et al.*, 1993). Seu efeito estimulante sobre o crescimento ovariano em várias espécies de crustáceos foi observado após a sua administração *in vivo*, por via injetável (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002a) ou incorporado ao alimento (ZAPATA *et al.*, 2003). Estudos realizados *in vitro* registraram um crescimento oocitário significativo no camarão *Pennaeus vannamei*

Boone, 1931 por efeito da $17\alpha\text{OH}$ -progesterona e hormônios juvenis (TSUKIMURA & KAMEMOTO, 1991). Resultados semelhantes foram confirmados no caranguejo estuarino *Neohelice granulata* (Dana, 1851) com $17\alpha\text{OH}$ -progesterona administrados *in vivo* (incorporada ao alimento) e *in vitro* (pedaços de ovários foram incubados com o hormônio) (ZAPATA *et al.*, 2003) e parcialmente no lagostim *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) quando injetada a uma dose de 100 μl (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002a). Outra família de hormônios não peptídeos, que controlam a reprodução em crustáceos, são os sesquiterpenóides, que compreendem basicamente o metil farnesoato (MF), secretado pelo órgão mandibular e seu precursor imediato, o hormônio juvenil III (HJIII, a forma ativa em insetos) (HOMOLA & CHANG, 1997). Efeitos do metil farnesoato, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre o crescimento ovariano foram observados em *P. clarkii* (LAUFER *et al.*, 1998; RODRÍGUEZ *et al.*, 2002a, b).

O efeito estimulante da serotonina sobre a maturação ovariana (FINGERMAN, 1997) pode ser antagonizado *in vivo* pela dopamina, outro neurotransmissor descrito em crustáceos, o qual provavelmente inibe a liberação do hormônio estimulante da gônada (GSH) produzido pelo cérebro e gânglio torácico. Dessa maneira, a dopamina pode estimular a liberação do hormônio inibidor da gônada (GIH) (FINGERMAN, 1997); já a spiperona, um inibidor dopaminérgico exógeno, irá agir contra a ação inibitória da dopamina sob a secreção de CHH (Hormônio Hiperglicêmico de Crustáceos) pelos pedúnculos oculares (SAROJINI *et al.*, 1995) e dessa maneira podendo causar indução ovariana, aumentando o número de oócitos ao suprimir a estimulação dopaminérgica sobre a secreção do hormônio GIH (FINGERMAN, 1997; LORENZON *et al.*, 2004). A naloxana, um inibidor de opióides endógenos, também pode causar maturação ovariana em crustáceos, atuando sobre as vias nervosas que inervam tanto os pedúnculos oculares como o cérebro e o gânglio torácico (NAGABHUSHANAM *et al.*, 1995; SAROJINI *et al.*, 1995; SAROJINI *et al.*, 1996).

A espécie de anomuro de água doce *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 é encontrada na Argentina, Brasil e Uruguai (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1994) e vive em habitats límnicos, tais como lagos, arroios, banhados e cavernas. Alguns aspectos ecológicos e reprodutivos desta espécie já foram analisados, assim como a morfologia do aparelho sexual (LOPRETTO, 1978; VIAU *et al.*, 2006), o cuidado parental (LÓPEZ GRECO *et al.*, 2004) e a alimentação. Como esta espécie de crustáceo é encontrada facilmente e devido ao elevado número de exemplares na região da Província de Buenos Aires, a mesma foi escolhida para se testar o efeito estimulante *in vivo* dos neurotransmissores spiperona e naloxana sobre a maturação ovariana, com o intuito de contribuir para estudos futuros com espécies de crustáceos de interesse comercial. Além disso, os níveis de colesterol e de lipídeos totais dos ovários e do hepatopâncreas e os níveis de glicose, de proteínas, de lipídeos e de colesterol da hemolinfa foram quantificados com a finalidade de correlacionar estes valores com o grau de crescimento ovariano, uma vez que constituem fonte energética que podem estar sendo mobilizadas para este fim.

MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas adultas de *A. uruguayana* foram coletadas com puçá em um arroio localizado próximo a cidade de Salto ($34^{\circ}18'15.6''$ S, $60^{\circ}20'$ W), Província de Buenos Aires, Argentina, em Setembro/2005 (outono) e levadas para o laboratório de Fisiologia Animal Comparada da Universidade de Buenos Aires, onde foram realizados os experimentos. De acordo com López Greco (comun. pess.), esta espécie se reproduz com maior intensidade nos meses mais quentes do ano (primavera e verão) na Argentina. Assim, os experimentos foram realizados no período pré-reprodutivo (setembro e outubro).

Inicialmente 10 fêmeas foram selecionadas aleatoriamente para avaliação do grau inicial de crescimento ovariano. Elas foram sacrificadas, medidas, pesadas e posteriormente seus ovários foram retirados e pesados para a determinação do índice gonadossomático: $\text{IG} = (\text{peso fresco da gônada} / \text{peso corporal}) \times 100$ (CAHANSKY *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ *et al.*, 2002b).

As demais fêmeas amostradas foram divididas em 3 grupos, totalizando 50 dias de cultivo experimental: (a) controle: fêmeas alimentadas diariamente *ad libitum* com pellets controle composto por ração para peixe (TetraPond®, 34% de proteína e TetraDiskus®, 43% de proteína, em proporção de 1:1); (b) spiperona (antagonista dopaminérgico de receptores D2): fêmeas alimentadas 2 vezes por semana com um pellet enriquecido com spiperona e nos demais dias da semana com pellets controle *ad libitum*; (c) naloxana (antagonista opióide): fêmeas alimentadas 2 vezes por semana com pellets enriquecidos com naloxana e nos demais dias da semana com pellets controle *ad libitum*.

Os antagonistas mencionados foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo) e misturados ao alimento balanceado para peixe. A mistura resultante foi repeletizada e seca em estufa a fim de se obter pellets de consistência firme e contendo cada um uma dose de 10^{-8} moles de algum dos antagonistas ensaiados ou o controle. Cada fêmea recebeu somente um pellet a cada seção de alimentação, assegurando que as mesmas estavam ingerindo a devida dose de 10^{-8} mol/animal. Esta dose foi selecionada de acordo com estudos prévios realizados com outras espécies de crustáceos (CAHANSKY *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ *et al.*, 2002a).

Em cada experimento foram utilizadas 10 fêmeas adultas, sendo que as mesmas foram colocadas em aquários de 1 L, com aeração constante e refúgios e mantidas em fotoperíodo de 14 h:10 h (luz:escuro) e temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Anteriormente aos ensaios, elas foram medidas quanto ao comprimento do cefalotórax (mm) e pesadas. As fêmeas foram alimentadas diariamente, sendo que 2 vezes por semana era administrada o pellet com o antagonista (spiperona ou naloxana) e nos demais dias, alimentadas *ad libitum* com pellet controle. Diariamente, os animais eram inspecionados, registrando-se a muda ou morte eventual, com a troca de água dos aquários 3 vezes por semana.

Foi realizada a extração de hemolinfa a partir da articulação das coxas dos pereiópodos, mediante seringa

de 1 ml com agulha 27G, utilizando-se oxalato de potássio a 10% como anticoagulante. Estas amostras foram colocadas em tubos de eppendorf de 1 ml e conservadas a -20°C até o seu processamento.

Das amostras de hemolinfa foram quantificadas a concentração de lipídeos totais, colesterol, glicose e proteínas. As proteínas totais foram quantificadas através do método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. Os lipídeos foram quantificados através do método da sulfofosfovalina (MEYER & WALTER, 1981) e os níveis de colesterol mediante kit da Labtest (Colesterol total – Liquiform). Os níveis de glicose foram quantificados através do método da glicose oxidase (kit da Labtest). Os níveis de lipídeos e colesterol dos tecidos (gônadas e hepatopâncreas) foram extraídos utilizando-se o método de FOLCH *et al.* (1957) e analisados com o mesmo protocolo mencionado acima.

Para a comparação dos índices gonadossomáticos e dos níveis de metabólitos entre os diferentes grupos experimentais foi aplicada análise de variância (ANOVA one-way), seguida do teste de comparação de Tukey (ZAR, 1996) ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

As fêmeas alimentadas com pellets enriquecidos com spiperona e naloxana sofreram aumento significativo do índice gonadossomático em relação ao grupo controle inicial ($p < 0,05$, Tab. I).

Tabela I. Índice gonadossomático médio \pm erro padrão das fêmeas de *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 dos distintos grupos experimentais (N, número de fêmeas). Letras diferentes indicam diferença significativa do índice gonadossomático entre os diferentes grupos experimentais ($p < 0,05$).

	Média	N
Controle inicial	0,50 \pm 0,11 d	10
Controle	0,86 \pm 0,12 c	8
Spiperona	1,11 \pm 0,22 a	7
Naloxana	0,95 \pm 0,18 b	7

Tabela II. Níveis médios \pm erro padrão de fêmeas de *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 de lipídeos (mg/g⁻¹) e colesterol (mg/g⁻¹) das gônadas e hepatopâncreas dos distintos grupos experimentais. Os valores estão expressos em mg/g. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de cada metabólito entre os diferentes grupos experimentais.

Grupo	Gônadas		Hepatopâncreas	
	Lipídeos	Colesterol	Lipídeos	Colesterol
Controle	13,270 \pm 0,581 c	0,2541 \pm 0,139 a	24,307 \pm 3,397 b	0,1779 \pm 0,058 b
Spiperona	38,462 \pm 1,184 b	0,1715 \pm 0,045 b	31,063 \pm 3,409 a	0,3771 \pm 0,085 a
Naloxana	46,088 \pm 2,585 a	0,2487 \pm 0,068 a	33,659 \pm 15,629 a	0,1419 \pm 0,034 b

Tabela III. Níveis médios \pm erro padrão de glicose, proteínas, lipídeos e colesterol presente na hemolinfa de fêmeas de *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 dos distintos grupos experimentais. Os valores estão expressos em mg/ml⁻¹. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de cada metabólito entre os diferentes grupos experimentais.

Grupo	Hemolinfa			
	Glicose	Proteínas	Lipídeos	Colesterol
Controle	20,514 \pm 2,001 a	4,055 \pm 0,345 a	40,792 \pm 4,841 b	3,117 \pm 0,401 a
Spiperona	15,943 \pm 1,716 a	3,776 \pm 0,330 a	32,709 \pm 7,972 c	2,571 \pm 0,392 a
Naloxana	17,678 \pm 2,494 a	4,052 \pm 0,320 a	51,367 \pm 13,674 a	3,706 \pm 0,90 a

A naloxana produziu um aumento significativo nos níveis de lipídeos tanto nas gônadas como no hepatopâncreas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Tab. II). A spiperona produziu aumento significativo nos níveis de lipídeos nas gônadas e hepatopâncreas e colesterol no hepatopâncreas quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

As fêmeas que foram alimentadas com pellets enriquecidos com neuroreguladores (spiperona e naloxana) não apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose, proteínas e colesterol em relação às fêmeas controle (Tab. III). Entretanto, os níveis de lipídeos foram significativamente menores nas fêmeas que foram alimentadas com pellets com spiperona e maiores nas fêmeas tratadas com naloxana quando comparadas às fêmeas alimentadas apenas com ração ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Recentemente CAHANSKY *et al.* (2002, 2003) verificaram o efeito estimulante *in vivo* da spiperona, aumentando o índice gonadossomático, assim como também um incremento na produção de fêmeas ovígeras do lagostim de água doce *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868). Quando injetada durante o início da vitelogênese, a spiperona também produziu um aumento no índice gonadossomático em *P. clarkii* (100 μ l) (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002a) e em *N. granulata* (50 μ l) (ZAPATA *et al.*, 2003). Em *A. platensis* Schmitt, 1942, o efeito da spiperona sobre a estimulação do desenvolvimento ovariano foi observada quando a mesma foi incorporada ao alimento (CAHANSKY *et al.*, 2008).

Resultados de estudos utilizando a naloxana como neuroregulador mostraram que este é capaz de induzir a maturação dos ovários do caranguejo estuarino *Uca pugilator* (BOSC, 1802) (SAROJINI *et al.*, 1995), no lagostim *P. clarkii* (SAROJINI *et al.*, 1996) e também em *A. platensis* (CAHANSKY *et al.*, 2008). Em *A. uruguayana*, tanto a spiperona como a naloxana causaram indução ovariana, sendo esta indução mais pronunciada quando foi utilizada a spiperona.

As desovas que as fêmeas produzem durante o período reprodutivo devem-se, fundamentalmente, ao acúmulo prévio de vitelogenina nos oócitos em crescimento, seja através da captação desse recurso da hemolinfa e/ou pela produção endógena da glicolipoproteína (CHARNIAUX-COTTON, 1985). A vitelogênese secundária se encontra sob o controle inibitório do hormônio GIH (FINGERMAN, 1997; WAINWRIGHT & REES, 2001). Desta maneira, a spiperona, pode causar um aumento significativo do número de oócitos ao suprimir a estimulação dopaminérgica sobre a secreção do hormônio GIH. Por outro lado, pode ocorrer a inibição dopaminérgica sobre a secreção do hormônio estimulante da gônada GSH (FINGERMAN, 1997). A maturação ovariana foi verificada também a partir da administração de naloxana (SAROJINI *et al.*, 1995; SAROJINI *et al.*, 1996), por este ser um inibidor de opióides endógenos, tais como a metencefalina e leuencefalina (NAGABHUSHANAM *et al.*, 1995). Ambos os antagonistas mencionados acima, ao inibir os efeitos da dopamina e dos opióides endógenos, provavelmente causam a secreção do hormônio estimulante das gônadas (GSH) e a inibição do hormônio inibidor das gônadas (GIH) e, assim, estimulado o desenvolvimento gonadal (SAROJINI *et al.*, 1997). No caso das fêmeas de *A. uruguayana* analisadas no presente estudo, o efeito estimulante da spiperona e da naloxana sobre a maturação ovariana pode ser reforçado também pela diminuição dos lipídeos totais na hemolinfa de animais tratados com spiperona e o aumento dos lipídeos totais no hepatopâncreas e gônadas das fêmeas tratadas com spiperona e naloxana, assim como pelo aumento no índice gonadossomático verificado em ambos os tratamentos experimentais. Dessa maneira, pode-se constatar a mobilização das reservas energéticas do hepatopâncreas e hemolinfa para o desenvolvimento dos oócitos e subsequente desova em *A. uruguayana*.

Os resultados aqui observados incrementam o conhecimento básico sobre o papel fisiológico dos neurotransmissores envolvidos durante a época reprodutiva dos crustáceos. Estes neurotransmissores possuem uma elevada aplicação em aquicultura, já que os pellets enriquecidos com estas substâncias poderiam ser uma ferramenta muito valiosa para espécies de interesse econômico, tais como os lagostins, caranguejos e camarões de água doce.

Agradecimentos. Ao CNPq, pela concessão de uma bolsa de pós-graduação (nível doutorado) à primeira autora; à CAPES, pelo auxílio recebido através do programa binacional (Argentina-Brasil) CAPES-SECYT (projeto 050/03), e aos colegas do Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade de Buenos Aires, pelo auxílio durante as atividades de campo e laboratoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIYODI, K. G. & ADIYODI, R. G. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. **Biological Review** **45**:121-165.
- BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. 1994. A familia Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Archivos de Zoología** **2**:159-346.
- CAHANSKY, A. V.; LÓPEZ GRECO, L. S. & RODRÍGUEZ, E. M. 2002. Inducción de crecimiento ovárico en *Cherax quadricarinatus* mediante hormonas y neuroreguladores incorporados en el alimento. In: **I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**, 720-724. Disponível em: <http://www.civa2002.org>.
- . 2003. Incremento de la producción de hembras ovígeras de la langosta de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*) durante el período reproductivo, mediante la administración de hormonas y neuroreguladores. In: **II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**, 512-517. Disponível em: <http://www.civa2003.org>.
- CAHANSKY, A. V.; DUTRA, B. K.; CASTIGLIONI, D. S.; OLIVEIRA, G. T.; BOND-BUCKUP, G. & RODRÍGUEZ, E. M. 2008. Induction of ovarian growth in *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae) by means of neuroregulators incorporated to food. **Revista de Biología Tropical** **56**(3):1201-1207.
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1995. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. **American Zoologist** **25**:197-206.
- EASTMAN-REKS, S. & FINGERMAN, M. 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. **Comparative Biochemistry and Physiology** **79**(A):679-684.
- FINGERMAN, M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. **Invertebrate Reproduction and Development** **31**:47-54.
- FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM, R. & SAROJINI, R. 1993. Vertebrate-type hormones in crustaceans: localization, identification and functional significance. **Zoological Science** **10**:13-29.
- FOLCH, J.; LEESM M. & STANLEY, H. S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry** **226**:497-503.
- HOMOLA, E. & CHANG, E. S. 1997. Methyl farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of function. **Comparative Biochemistry and Physiology** **117**(B):347-356.
- LAUFER, H.; BIGGERS, W. J. & AHL, J. S. B. 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. **General and Comparative Endocrinology** **111**:113-118.
- LÓPEZ GRECO, L. S.; VIAU, V.; LAVOLPE, M.; BOND-BUCKUP, G. & RODRÍGUEZ, E. M. 2004. Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). **Journal of Crustacean Biology** **24**:309-313.
- LOPRETTO, E. C. 1978. Estructura exoesqueletaria y miológica del quinto par de pereopodos del macho de la familia Aeglidae (Crustacea, Anomura). **Limnobiología** **1**:284-298.
- LORENZON, S.; BREZOVEC, S. & FERRERO, E. A. 2004. Species-specific effects on hemolymph glucose control by serotonin, dopamine, and L-enkephalin and their inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (Crustacea). **Journal of Experimental Zoology A** **301**(9):727-730.
- LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FAU, A. L. & RANDAL, R. J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** **193**:265-275.
- MEYER, E. & WALTHER, A. 1980. Methods for the estimation of protein, lipid, carbohydrate and chitin levels in freshwater invertebrates. **Archiv für Hydrobiologie** **113**:161-177.
- NAGABHUSHANAM, R.; SAROJINI, R.; REEDY, P. S.; DEVI, M. & FINGERMAN, M. 1995. Opioid peptides in invertebrates: localization, distribution and possible functional roles. **Current Science** **69**(8):659-671.
- RODRÍGUEZ E.; MEDESANI, D.; LÓPEZ GRECO, L. S. & FINGERMAN, M. 2002a. Effects of some steroids and other compounds on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during early vitellogenesis. **Journal of Experimental Zoology** **292**:82-87.
- RODRÍGUEZ, E. M.; LÓPEZ GRECO, L. S.; MEDESANI, D. A.; LAUFER, H. & FINGERMAN, M. 2002b. Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. **General and Comparative Endocrinology** **125**:34-40.
- SAROJINI, R.; NAGABHUSHANAM, R. & FINGERMAN, M. 1995. Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **General and Comparative Endocrinology** **97**:160-170.

- _____. 1996. In vivo assessment of opioid agonists and antagonists on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology** **115**(C):149-153.
- _____. 1997. An in vitro study of the inhibitory action of methionine enkephalin on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology** **117**(C):207-210.
- TSUKIMURA, B. & KAMEMOTO, F. I. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** **92**:59-66.
- VIAU, V. E.; LÓPEZ, L. S. G.; BOND-BUCKUP, G. & RODRÍGUEZ, E. M. 2006. Size at the onset of sexual maturity in the anomuran crab, *Aegla uruguayana* (Aegliidae). **Acta Zoologica** **87**(4):253-264.
- WAINWRIGHT, G. & REES, H. H. 2001. Hormonal regulation of reproductive development in crustaceans. In: ATINKSON, D. & THORNDYKE, M. eds. **Environment and Animal Development**. Oxford, Bios Scientific Publishers. p.71-84.
- ZAPATA, V.; LÓPEZ GRECO, L. S.; MEDESANI, D. & RODRÍGUEZ, E. M. 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year: in vivo and in vitro studies. **Aquaculture** **224**:339-351.
- ZAR, J. H. 1996. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, Upper Saddle River. 941p.