

Thermal stress and energy
metabolism in two
circumtropical decapod
crustaceans: Response to acute
temperature events

By Sebastiano Dose



Heat Wave

OBBIETTIVI DELLO STUDIO

- 1) Confrontare le risposte allo stress termico delle due specie in analisi, ovvero *Rhynchocinetes durbanensis* (un gambero) e *Calcinus laevimanus* (un paguro) utilizzando un set di biomarker relativi a stress termico, ossidativo, neurotossicità e metabolismo.
- 2) Determinare e confrontare lo stato di salute dei due animali, tramite indici integrati dei biomarker.
- 3) Analizzare la performance degli animali monitorando sostanzialmente mortalità e stato di salute.

METODI E MATERIALI



METODI E MATERIALI

- 30 esemplari per specie distribuiti in vasche uguali contenenti 7-8 individui l'una
- Acclimatazione a $25 \pm 0.5^\circ \text{C}$ per 2 settimane. In seguito la T è stata portata prima a 27°C per 24h e poi a 30°C e mantenuta per 2 settimane. L'ultimo giorno la T fu fatta tornare a 25°C
- Ovviamente c'erano delle control tank
- Le condizioni ambientali delle vasche venivano controllate 2 volte a settimana
- Gli animali venivano nutriti 2 volte al giorno
- I campionamenti erano preceduti da un digiuno di 24h, seguivano transetti randomici con sacrificio di 5 individui a colpo e avvenivano al T0, T7 e T14 in tre momenti distinti della giornata
- Gli individui venivano pesati, misurati e gli organi interni (muscoli e massa viscerale) estratti e conservati a -80°C per le analisi biochimiche.

METODI E MATERIALI

Biomarker utilizzati:

- Proteine (in particolare Hsp70)
- Catalasi (CAT, enzima di difesa contro lo stress ossidativo)
- Perossidi lipidici (LPO, si formano quando i lipidi subiscono danni di tipo ossidativo)
- Acetilcolinesterasi (AChE, enzima fondamentale per il sistema nervoso)
- Rapporto molare C:N (alti valori indicano abbondanza di riserve e quindi lipidi, bassi valori indicano più proteine e massa strutturale... è un dato utile a capire che strategia metabolica adottano per far fronte allo stress)
- %C (proxy delle riserve lipidiche)

RISULTATI

Table 1

Factorial ANOVAs results in muscle tissue of a) *Rhynchocinetes durbanensis* and b) *Calcinus laevimanus*. Effect of temperature (25 °C vs 30 °C) and its interaction with time (T0, T7, T14) on biomarker levels (thermal, oxidative and neurotoxic stress). Significant results (p -value < 0.05) are presented in bold.

	a)				b)			
	Temperature		Temp × Time		Temperature		Temp × Time	
	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Hsp70	4.88	0.036	14.03	< 0.001	0.40	0.528	0.72	0.493
Ub	0.66	0.423	1.00	0.382	0.01	0.967	0.01	0.992
CAT	12.51	0.001	6.10	0.007	0.02	0.869	0.01	0.993
LPO	0.00	1.00	0.07	0.929	0.00	0.984	0.00	0.999
GST	5.35	0.029	13.33	< 0.001	0.04	0.829	0.12	0.879
SOD	0.47	0.496	0.14	0.868	0.63	0.432	0.22	0.800
AChE	3.42	0.076	1.21	0.315	0.18	0.671	0.46	0.632

RISULTATI

Table 2

Factorial ANOVAs results in visceral mass tissue of a) *Rhynchocinetes durbanensis* and b) *Calcinus laevimanus*. Effect of temperature (25 °C vs 30 °C) and its interaction with time (T0, T7, T14) on biomarker levels (thermal and oxidative stress). Significant results (p -value < 0.05) are presented in bold.

	a)				b)			
	Temperature		Temp × Time		Temperature		Temp × Time	
	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Hsp70	4.92	0.036	2.48	0.104	5.34	0.029	4.59	0.020
Ub	4.34	0.048	5.66	0.009	18.30	< 0.001	4.58	0.020
CAT	0.54	0.468	2.94	0.071	36.71	< 0.001	9.28	0.001
LPO	0.73	0.398	0.67	0.516	11.68	0.002	3.25	0.056
GST	0.954	0.338	3.76	0.037	20.92	< 0.001	12.05	< 0.001
SOD	3.18	0.086	2.75	0.083	3.02	0.094	1.47	0.249

RISULTATI

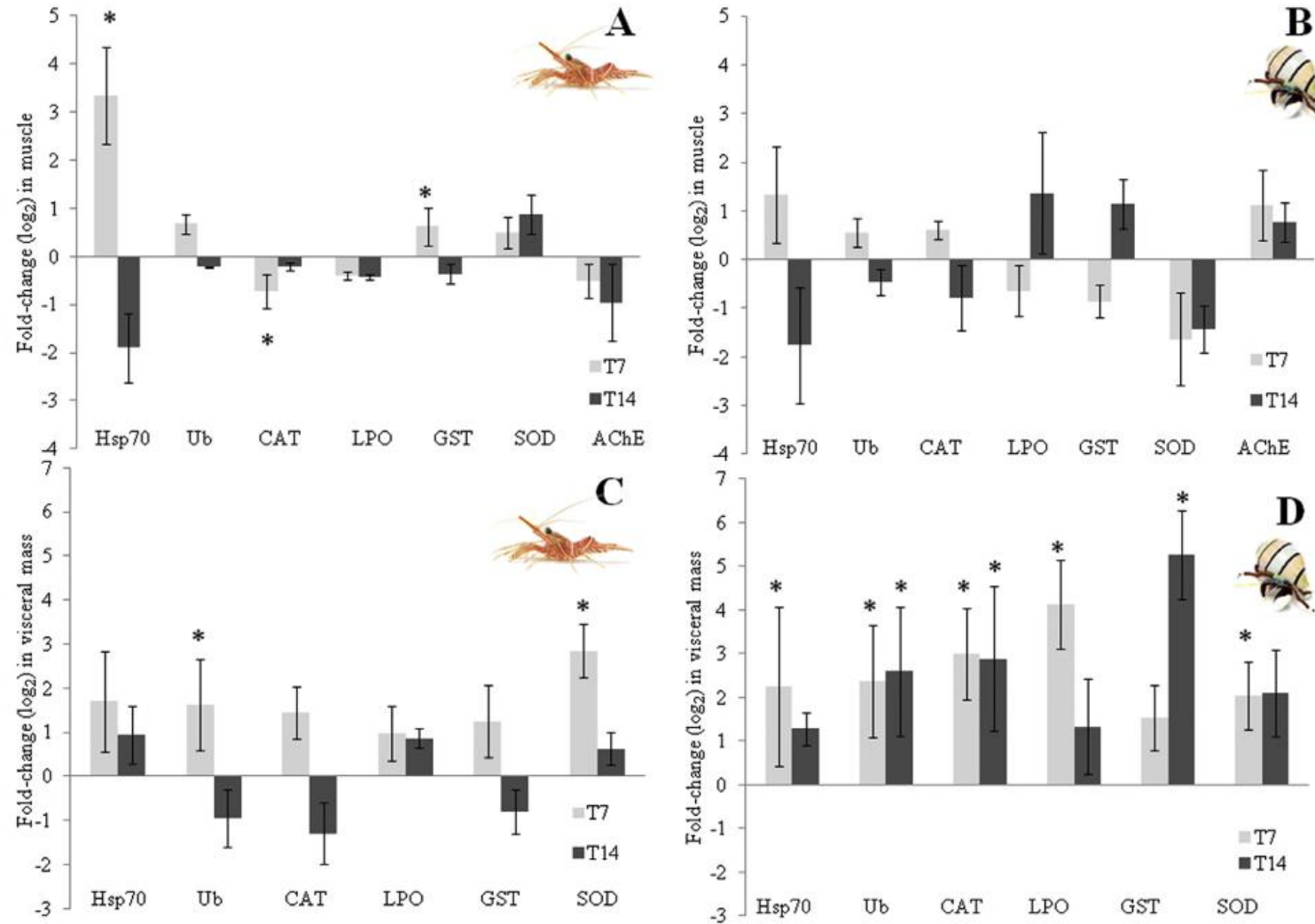


Fig. 1. Biomarker log₂ fold-change after 7 and 14 days of exposure to heat wave simulation: A) *Rhynchocinetes durbanensis* muscle, B) *Calcinus laevimanus* muscle, C) *R. durbanensis* visceral mass, D) *C. laevimanus* visceral mass. Significant differences from control (T0, fold-change 0) are presented with an asterisk (*, p-value < 0.05; see also fig. SM1-SM4 and tables SM1-SM2 in supplemental material for original biomarker data).

RISULTATI

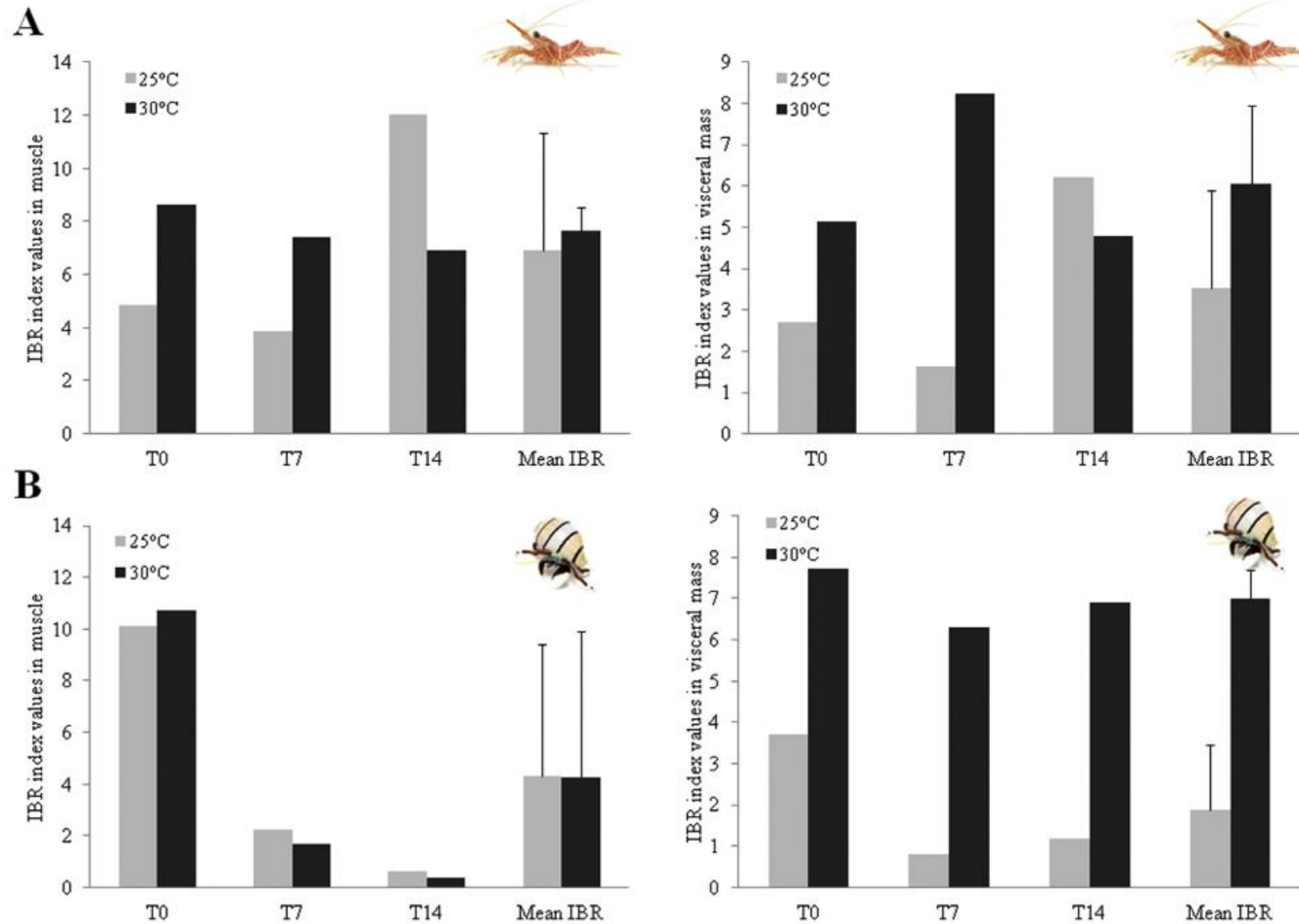


Fig. 2. Integrated biomarker response index (IBR) after experimental trials at 25 °C and 30 °C in each timepoint sampled, and mean + SD of all timepoints in muscle and visceral mass of A) *Rhynchocinetes durbanensis* and B) *Calcinus laevimanus*.

RISULTATI

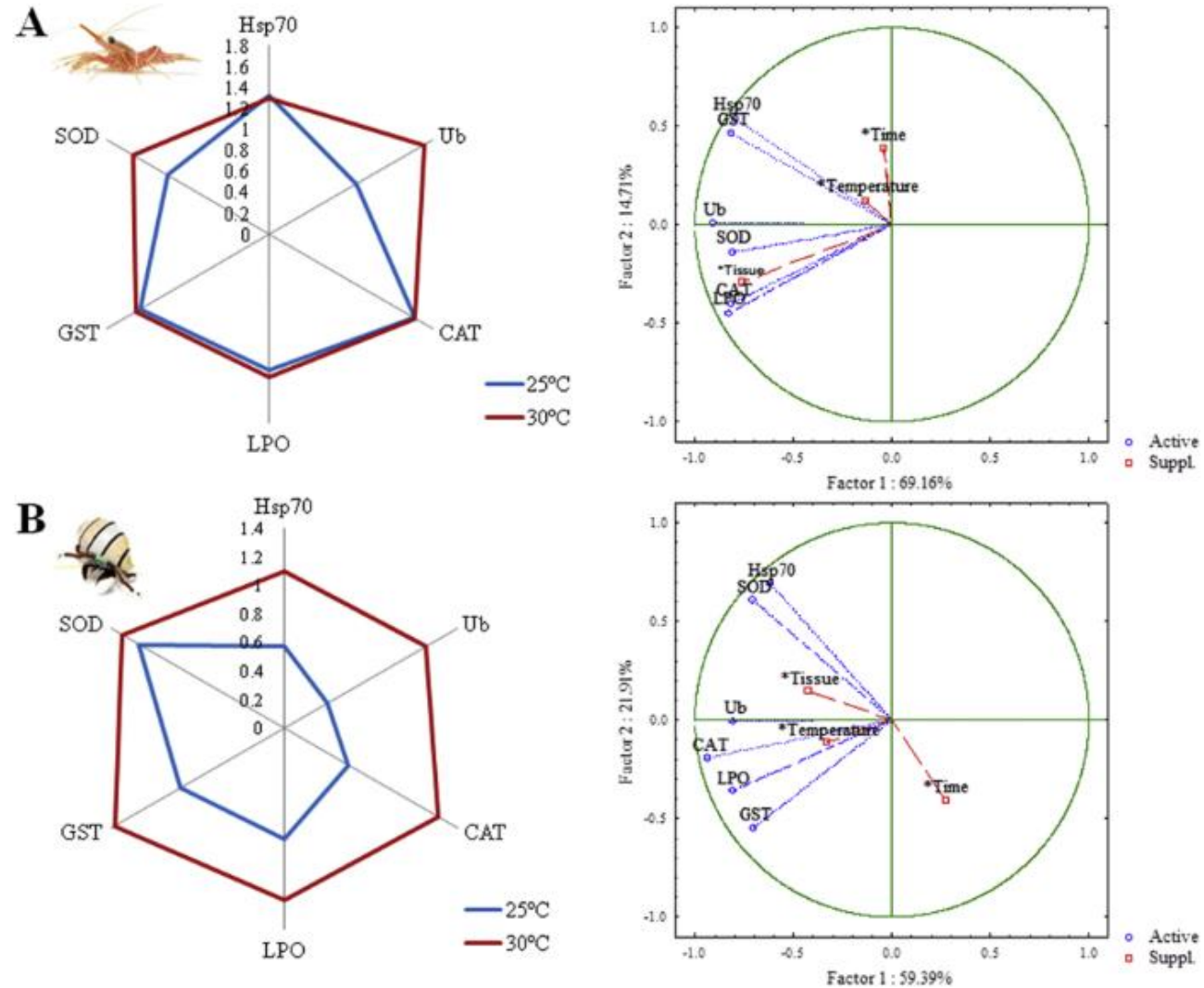


Fig. 3. Integrated biomarker response index (IBR) and visual representation of variables in the principal components analysis carried out for each species A) *Rhynchocinetes durbanensis* and B) *Calcinus laevimanus* exposed to 25 °C and 30 °C, considering all sampling times (0, 7 and 14 days) and both tissues (muscle and visceral mass).

RISULTATI

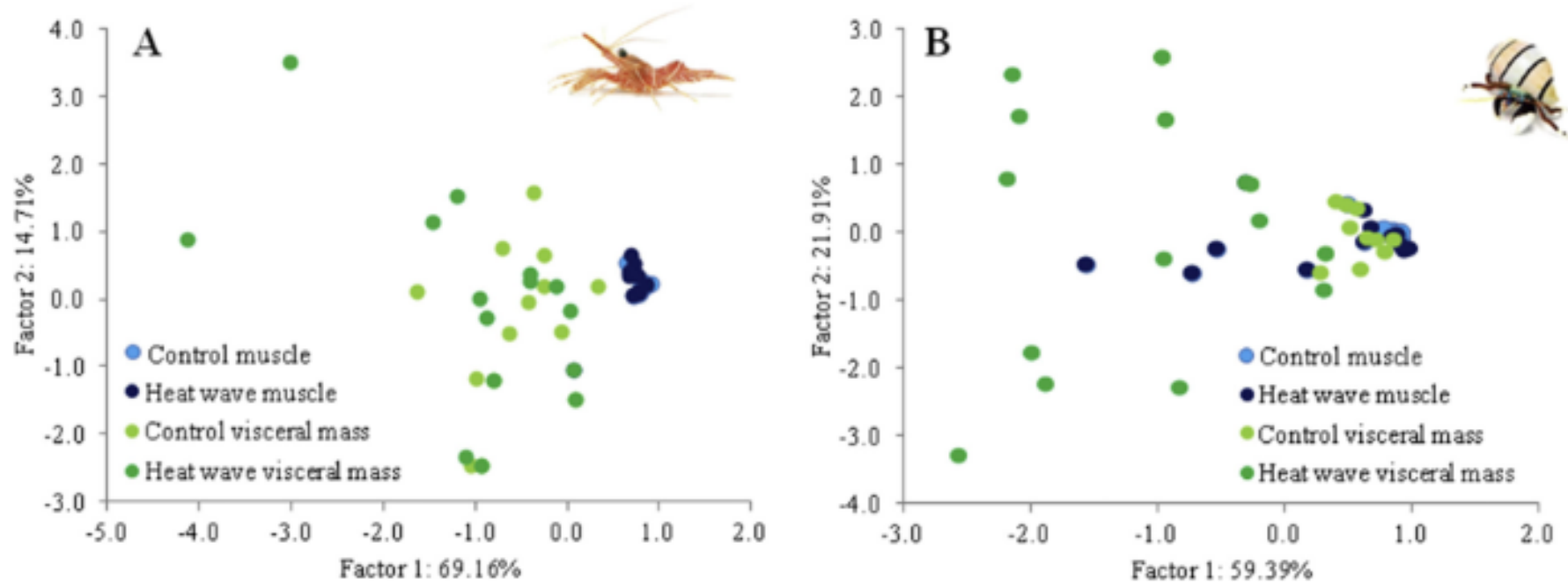


Fig. 4. Factor 1 and factor 2 of the principal components analysis carried out for both tissues (muscle and visceral mass) in A) *R. durbanensis* and B) *C. laevimanus* exposed to 25 °C (control) and 30 °C (heat wave).

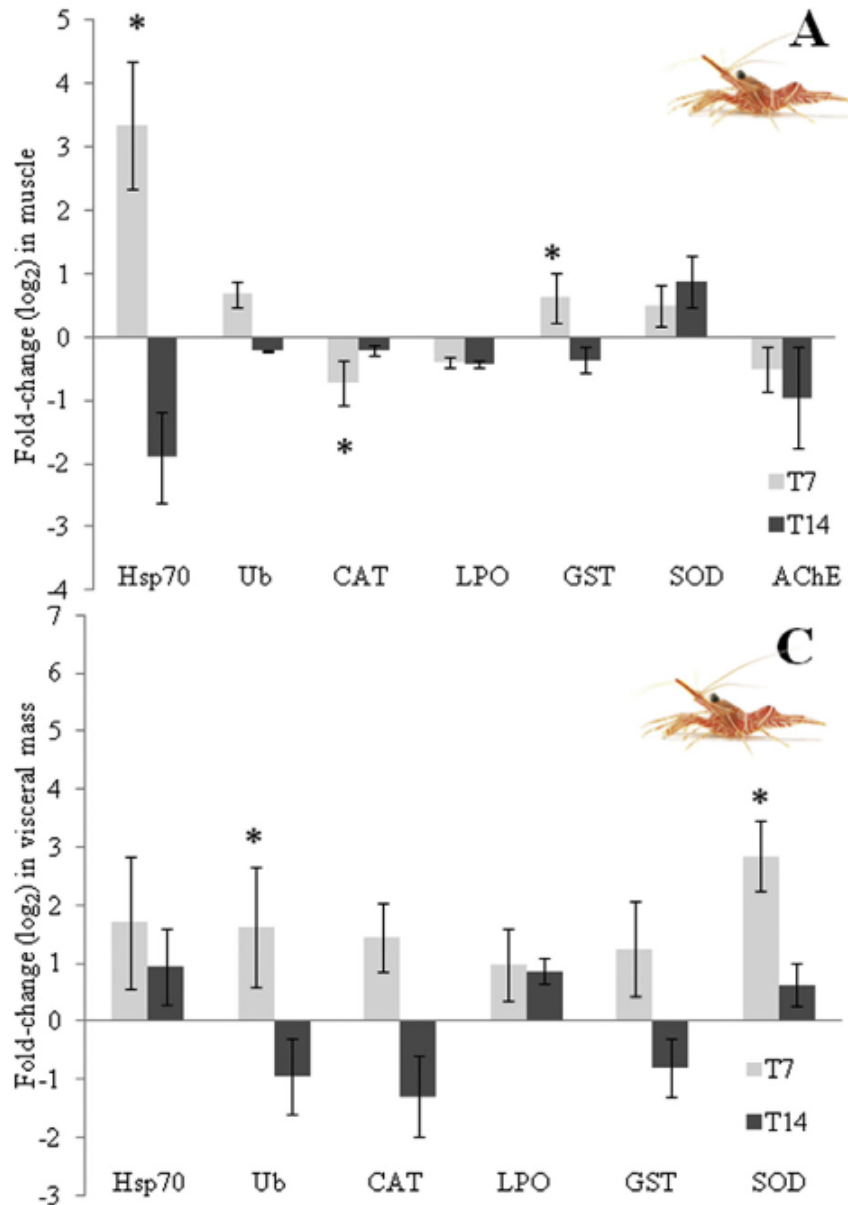
RISULTATI

Table 3

Student t-tests performed on condition parameters after exposure to a 2-week heat wave simulation experiment. Significant results (p-value < 0.05) are presented in bold.

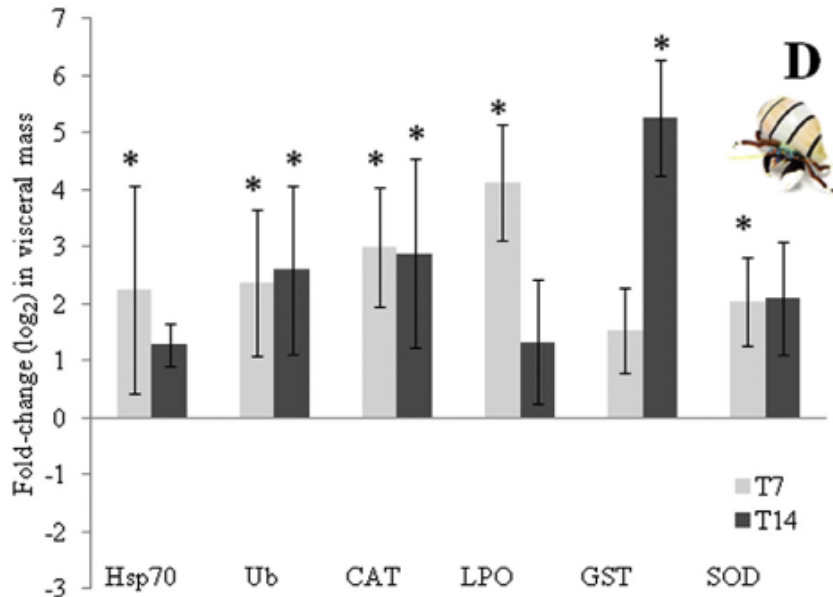
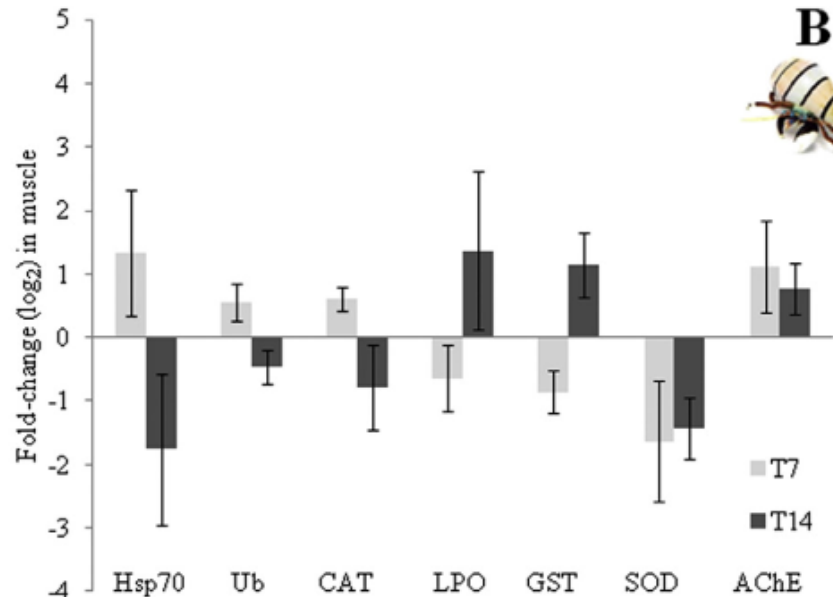
	Fulton's K		Total protein		%C		C:N molar ratio	
	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>
<i>R. durbanensis</i>	-2.513	0.017	0.527	0.601	2.497	0.018	0.474	0.638
<i>C. laevimanus</i>	0.806	0.908	-0.966	0.437	-1.682	0.994	0.411	0.613

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE



La magnitudine dell'aumento di Hsp70 nel muscolo e SOD nelle viscere ci indica che l'aumento delle temperature ha causato folding delle proteine e aggregazioni citotossiche nei muscoli e un grande flusso di superossidi radicali nelle viscere

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE



La magnitude maggiore si è osservata in GST al T14 nelle viscere, suggerendo un'attività enzimatica per detossificare i superossidi lipidici a seguito di stress ossidativo al T7

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

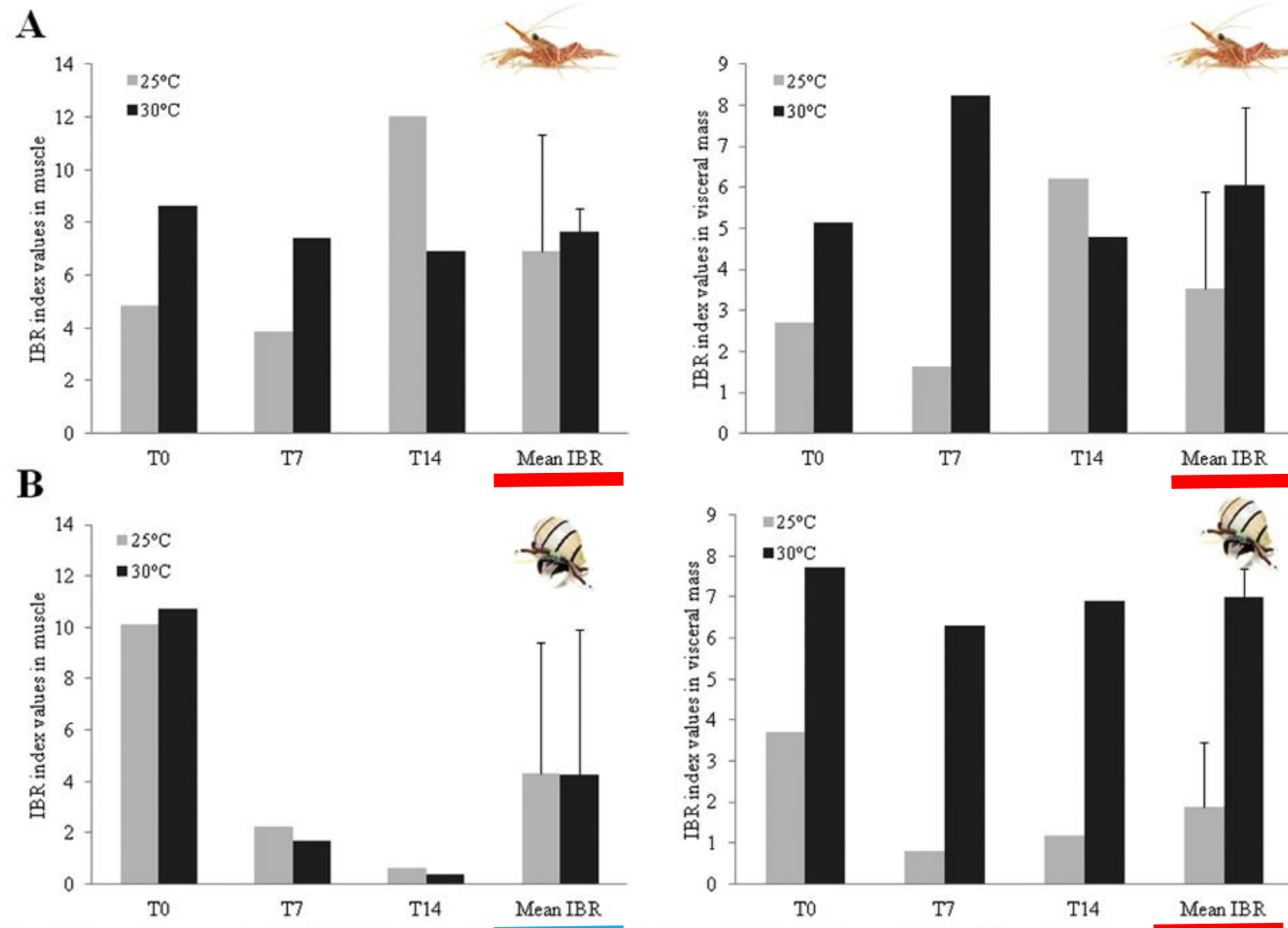


Fig. 2. Integrated biomarker response index (IBR) after experimental trials at 25 °C and 30 °C in each timepoint sampled, and mean + SD of all timepoints in muscle and visceral mass of A) *Rhynchocinetes durbanensis* and B) *Calcinus laevimanus*.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Table 3

Student t-tests performed on condition parameters after exposure to a 2-week heat wave simulation experiment. Significant results (p-value < 0.05) are presented in bold.

	Fulton's K		Total protein		%C		C:N molar ratio	
	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>
<i>R. durbanensis</i>	-2.513	0.017	0.527	0.601	2.497	0.018	0.474	0.638
<i>C. laevimanus</i>	0.806	0.908	-0.966	0.437	-1.682	0.994	0.411	0.613

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Correlazione tra %C e LPO (Lipidic Peroxides):

- Positiva in *R. durbanensis*
- Negativa in *C. laevimanus*

Due ipotesi:

1. Più grasso, più stress ossidativo derivante dall'ossidazione di questi lipidi che porta quindi ad un accumulo di LPO
2. Più grasso, più energie e riserve per combattere lo stress ossidativo, il che porterebbe a livelli inferiori di LPO

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

0% mortalità... si ma...