



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**PRODUCCION DE ECDIESTEROIDES**  
**DURANTE EL CICLO DE MUDA Y**  
**MADURACION DE REPRODUCTORES**  
***PENAEUS VANNAMEI***

**Ana Gutiérrez Alarcón**

**TESIS DE GRADO**

**Previa la obtención del Título de:**

**ACUACULTOR**

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**2001**

**INDICE**

ABREVIATURAS	I
TABLA DE CONTENIDO	III
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VII
INTRODUCCION	1
1. ANTECEDENTES	
1.1. HISTORIA DE LA INDUSTRIA CAMARONERA	4
1.2. ENDOCRINOLOGÍA EN DECAPODOS	6
1.2.1. Sistema Nervioso Central	6
1.3. PROCESO DE LA MUDA	8
1.4. MADURACIÓN DE CAMARÓN EN CAUTIVERIO	11
1.5. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA CON ENZIMA LIGADA (ELISA)	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. ANIMALES	17
2.2. CARACTERIZACION DE LOS ECDIESTEROIDES DURANTE LA MUDA Y MADURACION	17
2.2.1. Determinación de Estadios de Muda	17
2.2.2. Extracción de hemolinfa	18
2.2.3. Disección de los órganos Y	19
2.2.4. Proceso de Maduración	20
2.2.4.1. Determinación de estadios de desarrollo gonadal	20
2.2.4.2. Extracción de ovarios	21
2.3. EFECTO DE NEUROPEPTIDOS SOBRE ÓRGANOS Y	22
2.3.1. Extracción de Sistema Nervioso Central y neuropéptidos	22

2.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de órganos Y	23
2.3.2.1. Metodología	23
2.3.2.2. Efecto de extractos de sistema nervioso en órganos Y	23
2.4. Ensayo de Inmunoabsorbancia con enzima ligada	25
2.4.1. Curva Estándar	25
2.4.2. Procedimiento	25
2.4.3. Tratamiento de muestras	29
2.4.4. Estandarización de la técnica, detección de niveles de hormona en la hemolinfa	30
3. RESULTADOS	
3.1. Estandarización de análisis de inmunoabsorbancia con enzima ligada	31
3.2. Tratamientos de muestras	32
3.3. Caracterización de ecdiesteroides durante la muda	33
3.3.1. Niveles de ecdiesteroides en la hemolinfa	33
3.3.2. Producción de ecdiesteroides por órganos y cultivados <i>in vitro</i>	34
3.4. Caracterización de ecdiesteroides durante la maduración	37
3.5. Efecto de extractos de sistema nervioso sobre la producción de ecdiesteroides	39
DISCUSION TECNICA	41
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
ANEXOS	66

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de 20 hidroxiecdisona por órgano Y	35
---	----

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales moléculas de ecdiesteroides producidos por órganos Y	9
Figura 2. Modelo de interacción de calcio y cAMP en la producción de ecdiesteroides por YO en <i>Carcera antennarius</i>	10
Figura 3. Esquema del protocolo de análisis de inmunoabsorbancia con enzima ligada (ELISA) para identificación de ecdiesteroides	16
Figura 4. Estadios de muda de <i>Penaeus stylirostris</i> por observación de urópodo	18
Figura 5. Localización de órgano Y en especies peneidas	20
Figura 6. Estadios de madurez ovárica de <i>Penaeus vannamei</i>	21
Figura 7. Preparación de la curva para los estándares de ecdisona o 20-hidroxiecdisona	26
Figura 8. Concentraciones de ecdiesteroides en hemolinfa de reproductores machos <i>P. vannamei</i> , durante el ciclo de muda	34
Figura 9. Concentraciones de 20-E por OY cultivados <i>in vitro</i>	36
Figura 10. Comparación de los niveles de ecdiesteroides en ovarios y hemolinfa en diferentes estadios de madurez	37
Figura 11. Niveles de ecdiesteroides por gramo de ovario	38

- Figura 12. Comparación de concentraciones de ecdiesteroides producidos por  
órganos Y de hembras adultas durante la maduración y valores promedio  
establecidos en los órganos Y en la muda 39
- Figura 13. Tasa de estimulación de extractos de hembras maduras e inmaduras en la  
síntesis de ecdiesteroides por órganos Y en diferentes estadios de muda 40
- Figura 14. Modelo de acción de la hormona estimuladora de la muda 50

## RESUMEN

En este estudio se determinó el rol de los ecdiesteroides en los procesos de muda y reproducción del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Para éste efecto se estudiaron los diferentes niveles de ecdiesteroides en diferentes estadios y en diferentes órganos. Los niveles de ecdiesteroides en la hemolinfa durante la postmuda (estadios A-B) e intermuda (estadio C), fueron bajos ( $4.29 \pm 3.12$  ng 20-E/ml), en comparación con estadios posteriores. Los niveles comienzan a elevarse en la premuda, estadio D<sub>0</sub> ( $18.56 \pm 13.19$  ng 20-E/ml) hasta alcanzar un máximo de  $58.6 \pm 35.24$  ng 20-E/ml, en el estadio D<sub>1</sub>, luego se observa una disminución en los niveles momentos antes de la muda, D<sub>2-3</sub>.

Posteriormente, se estableció la cinética de producción de ecdiesteroides por parte de los órganos Y en cultivos *in vitro*, afirmándose una estrecha correlación entre la variación de niveles de ecdiesteroides en la hemolinfa y las concentraciones producidas por el órgano Y durante el ciclo de muda.

Debido a la similitud endocrinológica existente entre crustáceos e insectos, se postula que los ecdiesteroides desempeñan un rol en la maduración en camarones. Se determinó los niveles de ecdiesteroides en ovarios en diferentes estadios de maduración, observándose concentraciones constantes a lo largo del desarrollo gonadal ( $5.76 \pm 0.53$  ng 20-E /ovario) y los niveles registrados en la hemolinfa no aumentaron con la maduración. Paralelamente se determinó la producción de ecdiesteroides *in vitro* de los órganos Y pertenecientes a las hembras evaluadas, y presentaron una variación similar a los niveles establecidos para los estadios de

muda. De esta manera se excluyó a los ecdiesteroides como hormonas involucradas en el proceso de maduración de esta especie.

La posible existencia de un factor adicional que estimule la muda en crustáceos ha sido propuesta. Con el objetivo de revelar la presencia de este factor estimulante de la producción de ecdiesteroides en especies peneidas, posiblemente de origen nervioso, se determinó el efecto de extractos de sistemas nerviosos provenientes de hembras maduras e inmaduras sobre la cinética de producción de ecdiesteroides por órganos Y en diferentes estadios de muda, observándose una mayor estimulación con el extracto de 50% de AcN de hembras maduras. Finalmente se postula un modelo de acción de la hormona estimulante presente en el extracto de 50% AcN, durante la premuda temprana hasta el inicio del estadio D<sub>1</sub>.

## INTRODUCCION

El crecimiento en crustáceos, está relacionado con un evento cíclico denominado muda, la cual consiste en el desprendimiento del tejido conectivo y la formación de un nuevo y más grande exoesqueleto (Chang, 1989). La formación de la nueva epicutícula involucra cambios en las reservas de lípidos, un aumento en la división celular de los tejidos y síntesis de nuevas proteínas.

Es notable el hecho de que los crustáceos logren crecer a través de este evento, ya que el animal queda vulnerable a predadores y problemas físicos (muda incompleta de exoesqueleto viejo). El impacto del proceso de muda en la industria camaronera además del hecho de que es el mecanismo de crecimiento, está asociado a problemas por estrés, y por la presencia de enfermedades. Se desconoce el motivo por el cual el animal estresado tiende a mudar, sin embargo, puede reflejar el estado de salud en que se encuentran, ya que sólo los animales saludables podrán sobreponerse a este proceso. Además, la vulnerabilidad a la cual está sujeto el camarón como parte de este proceso, facilita la propagación de enfermedades presentes en el medio, que actualmente están relacionadas directamente con la muda.

Estas razones sugieren la necesidad de estudios básicos sobre la muda y del establecimiento de métodos que ayuden a controlar el proceso de muda en poblaciones domésticas, y así evitar los inconvenientes resultantes de la ocurrencia de la muda en condiciones adversas o no adecuadas durante el ciclo de cultivo.

Por otra parte, está determinado que la muda influye directa o indirectamente sobre otros procesos fisiológicos, como son el metabolismo, comportamiento, osmoregulación y reproducción (Kuo *et al.*, 1996). Se conoce que en especies de



télico abierto la muda y la reproducción son procesos alternados y necesitan sincronizarse para asegurar su desarrollo normal. La importancia del control de la muda en la reproducción en cautiverio está relacionada con la ablación del pedúnculo ocular, método comúnmente usado para inducir a la maduración ovárica, y cuya eficiencia reside en el estadio de muda en el que se encuentren los animales al efectuar esta operación. Estudios realizados sobre reproducción en cautiverio a través de maduración inducida recomiendan la ablación en la intermuda, momento en el cual no se interfiere con el proceso de muda; sin embargo este no es considerado al momento de efectuar la ablación a nivel comercial, por lo que generalmente menos del 30% de los animales logran madurar.

La reproducción en cautiverio lograda a través de la aceleración en el proceso de maduración de las hembras, aplicando la técnica de ablación del pedúnculo ocular, conlleva a la alteración de otros procesos fisiológicos como el aumento en la frecuencia de la muda, ocasionando un desgaste energético al animal ablacionado. Además, los desoves inducidos por este método, afectan directamente a la resistencia y crecimiento de las larvas, observándose una disminución durante los siguientes desoves después de la ablación (Palacios *et al.*, 1999). Por otra parte, la utilización de reproductores silvestres implica un riesgo económico debido a la introducción de patógenos a los sistemas de cultivo.

Se hace evidente el desarrollo de sistemas de domesticación y selección en vías de mejorar la productividad relacionada con el crecimiento (rapidez y homogeneidad) y resistencia de enfermedades, que implica lograr una independencia de las poblaciones naturales. Estos pueden ser ayudados con la implementación de otros métodos de

maduración que implican una manipulación a nivel endócrino de los procesos de muda y reproducción.

El inicio del proceso de muda está regulado por hormonas denominadas ecdiesteroides, éstas fueron caracterizadas primeramente en insectos, y debido a la similitud existente entre estos y los crustáceos se iniciaron los estudios para identificarlos denominándolos hormonas de muda. En crustáceos, los ecdiesteroides son sintetizados y liberados en la hemolinfa por el órgano Y (Bollenbacher y O'Connor, 1973; Chang y O'Connor, 1977). Su estudio durante el ciclo de muda ha sido desarrollado en pocos decápodos tales como cangrejos (Chang *et al.*, 1976; MacCarthy y Skinner, 1977; Hopkins, 1983; Soumoff y Skinner, 1983), crayfish (Keller y Schmid, 1979; Steveson *et al.*, 1979; Jegla *et al.*, 1983), y langosta (Chang y Bruce, 1980). Adicionalmente, en virtud de la semejanza antes mencionada entre crustáceos e insectos, se postula una posible intervención de los ecdiesteroides en la regulación de la vitelogénesis (Bownes, 1989).

Con el objetivo de la búsqueda de métodos de maduración que no comprometan la integridad del animal, y debido a que la muda está relacionada con la reproducción en especies de tético abierto, el presente estudio se propone determinar el rol de los ecdiesteroides en reproductores *P. vannamei* durante el ciclo de muda y maduración ovárica, y posteriormente esclarecer la potencial existencia de un neuropéptido que ejerza una acción estimulante en la producción de ecdiesteroides, como una posible oportunidad de control de la muda.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. HISTORIA DE LA INDUSTRIA CAMARONERA EN EL ECUADOR**

La actividad camaronera en el país nace a finales de la década de los 60 en la provincia de El Oro. Los registros más antiguos de la industria datan desde 1968, cuando se construyó la primera finca comercial.

Durante los años 70, la industria creció lentamente. Los camaroneros con poco conocimiento y experiencia en acuicultura experimentaron con cultivos extensivos. Luego el gobierno autorizó la construcción de más piscinas, y en 1979 se reportó 5000 toneladas de camarón cosechado, cuando solo 440 Ha. estaban en producción.

A partir de 1980, la industria tuvo un desarrollo acelerado. La abundancia de larva silvestre debido al impacto del fenómeno El Niño, aportó grandes beneficios en la siembra de nuevas piscinas. La producción continuó en aumento, dando inicio a las exportaciones a Estados Unidos, como mayor comprador.

El boom camaronero junto con la expansión masiva de las áreas de cultivo incrementó la demanda de larvas, la cual no podía ser cubierta sólo con la recolección natural, pues su disponibilidad ha estado siempre sujeta a cambios climáticos.

Es así como surgieron los laboratorios de larvicultura de camarón. Esta nueva fase de la industria se expandió rápidamente a partir de 1985. Inicialmente los laboratorios dependían de las nauplieras, los cuales utilizaban hembras grávidas (copuladas con esperma) del medio natural para ser desovadas en cautiverio, para obtener nauplios. Luego, desde 1986 a 1989 proliferaron las instalaciones para cría de larvas, en su

mayoría ubicadas a lo largo de las costas del Guayas y Manabí. Sin embargo, en la década de los 90, la demanda de nauplios fue tal, que la indisponibilidad estacional de reproductores maduros dejó vacíos importantes en la demanda, justificándose la implementación de sistemas de reproducción en cautiverio (cópula natural e inseminación artificial), que ayuden a lograr una independencia parcial del medio natural.

La búsqueda de nuevos métodos para la inducción a la maduración no ha sido el único desafío que a experimentado la industria camaronera.

Desde sus inicios, ha enfrentado la aparición de enfermedades virales que afectaron fuertemente la producción, tales como el Síndrome de La Gaviota (1986–1990), el Síndrome de Taura (1992), la hepatopancreatitis necrotizante (1993), el síndrome del rostro deforme y enanismo (1994) asociada al IHNV. Actualmente de las 200.000 hectáreas destinadas para el cultivo, el 50% ha tenido que cesar su producción a causa de la “mancha blanca” o WSSV, la cual se ha presentado de manera aguda ocasionando elevadas mortalidades en los primeros 10 días de cultivo. Esta enfermedad afecta severamente a la cutícula del camarón, formando depósitos calcáreos a manera de manchas. La mayoría de las enfermedades mencionadas, se encuentran asociadas en parte con el proceso de muda, pues entre la sintomatología se presenta, un bajo crecimiento y/o variedad en las tallas, debilidad del exoesqueleto, y daños a nivel celular del hepatopáncreas, que al momento de la cosecha genera pérdidas económicas.

La necesidad del desarrollo de poblaciones domésticas y seleccionadas, que puedan ser más resistentes a la introducción de nuevas enfermedades presente en el medio y además con mejor crecimiento, es evidente. Para lo cual es necesario el estudio de

los procesos que tienen gran impacto en el cultivo de camarón, el proceso de muda como forma de crecimiento y la maduración.

## 1.2. ENDOCRINOLOGIA DE LOS DECAPODOS

Varios procesos fisiológicos como el crecimiento, metabolismo, reproducción, entre otros son regulados por elementos denominados hormonas, las cuales son sintetizadas por órganos específicos (glándulas endócrinas) y transportadas por el sistema circulatorio hasta los órganos blancos. Los órganos endócrinos establecidos en decápodos son:

- El sistema neurosecretor, el cual está compuesto por el Complejo Organo X- Glándula Sinusal del pedúnculo ocular, células neurosecretoras del sistema nervioso central y cerebro, órganos post-comisurales, órganos pericardiales.
- Órganos “Y”
- Glándulas androgénicas
- Ovarios
- Órgano mandibular.

### 1.2.1. Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central de los crustáceos consiste en una masa ganglionar, considerada como cerebro y un cordón nervioso ventral con un par de ganglios

correspondientes a cada somito embrionario (segmento correspondiente a cada par de periópodo).

El cerebro y el cordón nervioso central están unidos longitudinalmente por conectivos y transversalmente por comisuras (ver McLaughlin, 1983).

El ganglio supraesofágico o cerebro está constituido por 3 lóbulos primarios:

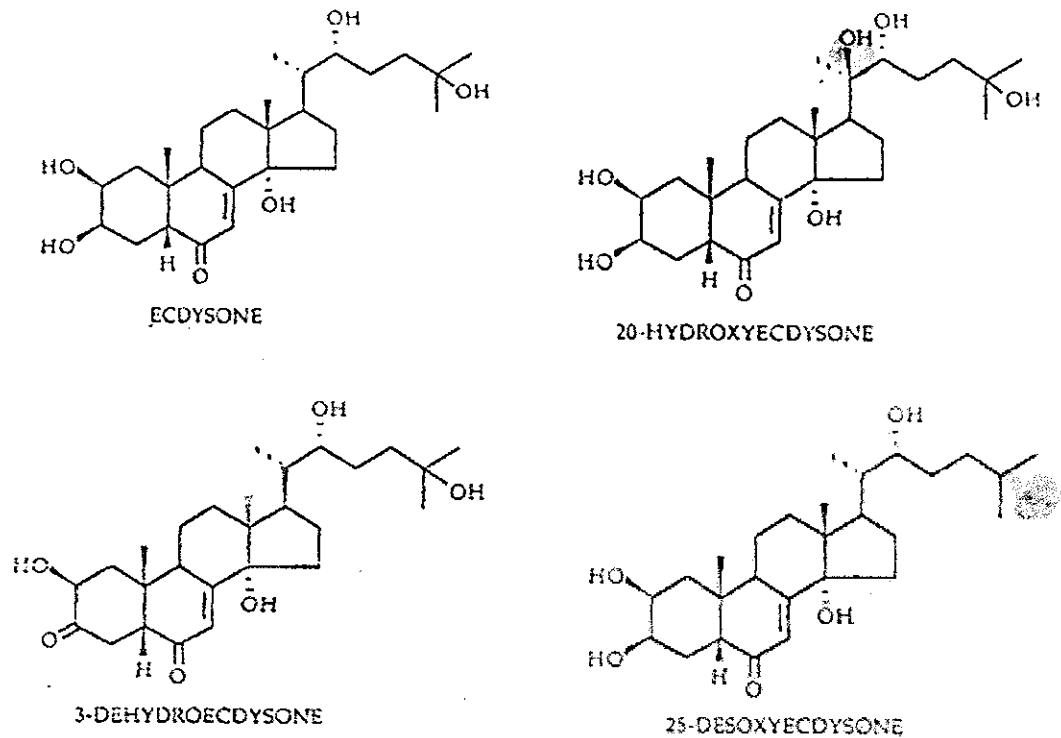
- Protocerebro, que inerva al ojo compuesto y/o naupliar; órgano frontal; glándula sinusal y músculos de la cabeza.
- Deutocerebro, que inerva las anténulas
- Titocerebro, que inerva a las antenas y nervios derivados del estómago.

Seguidamente se encuentra el ganglio subesofágico que está conectado al ganglio supraesofágico por medio de conexiones esofágales. Este generalmente representa la fusión de los ganglios mandibular y maxilar. Finalmente, se encuentra el cordón nervioso ventral.

### 1.3. PROCESO DE LA MUDA

El crecimiento en crustáceos se lleva a cabo a través del proceso de muda, el cual consiste en la pérdida y reformación periódica del exoesqueleto (ecdysis). Esta generalmente dividido en cuatro estadios, y cada especie posee su propia definición de subestadios según los cambios morfológicos internos observados así como la duración de los mismos (Roberston *et al.*, 1987, Kuo y Lin, 1996). En general, la postmuda (estadios A y B) es el estadio justo después de la exuviación; durante este período el exoesqueleto se expande debido a la absorción de agua, e inicia su endurecimiento. Seguidamente la intermuda (estadio C) es cuando el exoesqueleto obtiene su máxima rigidez a través de deposición de minerales y proteínas. La premuda (estadio D<sub>0</sub> y D<sub>1</sub>) está definida por la separación del viejo exoesqueleto y el inicio de la formación de nueva epicutícula, que se caracteriza por el aumento en las concentraciones de la hormona de la muda en la hemolinfa, y por último la ecdysis (estadio E) que consiste en el escape del crustáceo de su viejo exoesqueleto (ver Chang, 1992).

El ciclo de muda está controlado hormonalmente por los ecdiesteroides sintetizados y liberados en la hemolinfa por dos glándulas de origen epidérmico denominadas Órganos Y (OY). La ecdisona, es el principal producto de secreción (Chang y O'Connor, 1978), el cual se transforma en la molécula fisiológicamente activa, la 20-hidroiecdisona, por efecto de la hidroxilación en el C-20 ocurrida en tejidos periféricos (Lachaise y Lafont, 1984) (Figura 1). La producción de estas hormonas es a partir del colesterol ingerido en la dieta (Watson y Spaziani, 1985).



**Figura 1.** Moléculas principales de ecdiesteroides producidos por órganos Y.

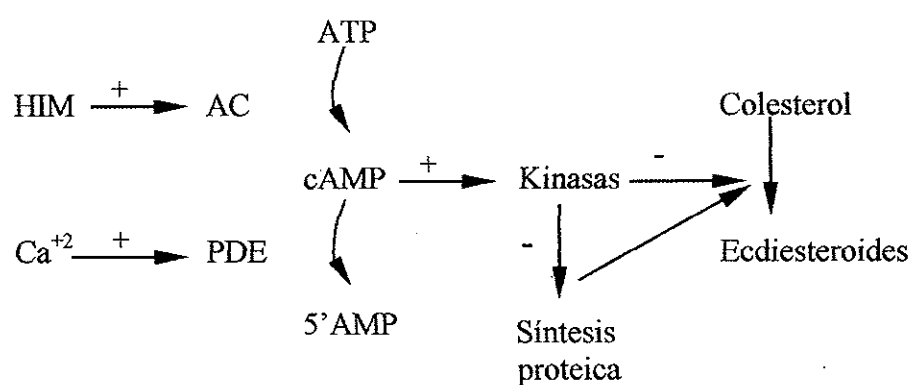
Las concentraciones de estas hormonas varían dramáticamente durante el transcurso del ciclo de muda. En algunas especies se observan durante la postmuda, pequeños picos que luego descienden durante la intermuda (Chang y O'Connor, 1978), pero en otras especies no se registra picos y los niveles bajos se mantienen constantes hasta la intermuda (Chang, 1984). En general, en los crustáceos estudiados, existe un incremento en las concentraciones de ecdiesteroides durante la premuda que luego disminuyen justo antes de la exuviación.

La elaboración y secreción de los ecdiesteroides se encuentran regulados por un neuropéptido (Rao, 1965) denominado Hormona Inhibidora de la Muda (HIM), presente en el pedúnculo ocular de los crustáceos (Bruce y Chang, 1984; Smith y Sedlmeier, 1990; Sefiani *et al.*, 1996); la HIM ha sido encontrada en otros órganos,



como lo demuestran pruebas realizadas en *Penaeus vannamei* en las que se detectó material genético relacionado a la HIM en tres partes del cerebro; el gen comparte 98% de homología con la secuencia aislada del pedúnculo ocular (Sun, 1995).

Matson y Spaziani (1987) propusieron un modelo de acción de HIM que involucra al Adenosin-monofosfato cíclico (cAMP) como mediador del proceso inhibitorio y al calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) como antagonista de la inhibición (figura 2).



**Figura 2.** Modelo de interacción de calcio y cAMP en la producción de ecdiesteroides por el OY en *Cancer antennarius*. La unión de la MIH al receptor de membrana activa una anilato ciclasa (AC), elevando los niveles cAMP, que a su vez activa las quinazas que regulan la inhibición de enzimas relacionadas con la síntesis de ecdiesteroides a partir del colesterol. Las quinazas afectan la síntesis proteica de manera negativa. El calcio activa a la fosfodiesterasa que degrada al cAMP, contrarrestando el efecto de la MIH (Ver Smith y Sedlmeier, 1990).

#### 1.4. MADURACION DE CAMARON EN CAUTIVERIO

La tecnología de maduración aplicada actualmente es una combinación de conocimientos transferidos de expertos de Francia, Panamá y Estados Unidos (Kawahigashi, 1992). Los sistemas implementados consisten básicamente en el control de parámetros ambientales (fotoperíodo, intensidad de luz, ruido, tamaño y color del tanque, recambio de agua, temperatura y salinidad) y biológicos (densidad, relación hembra-macho, cópula natural o inseminación artificial), la elaboración de dietas especiales y el corte unilateral del pedúnculo ocular de hembras (ablación). Estos factores aplicados conjuntamente han logrado inducir maduración, cópula, desoves y producción de cantidades aceptables de nauplios.

La ablación ha sido siempre indispensable para asegurar una maduración precoz de hembras en cautiverio. La eficiencia de la técnica reside en que el tallo ocular contiene hormonas inhibitoras, las cuales luego de la extirpación se reducen a la mitad, induciendo la maduración. En la mayoría de los departamentos de maduración, la ablación se realiza sin tomar en cuenta el estadio de muda en la que se encuentran los animales. Se recomienda realizar la ablación durante la fase de intermuda para optimizar la eficiencia de la ablación, pues animales en postmuda tienden a morir por estrés y en premuda, por conflicto entre los dos procesos tardan en madurar o nunca lo logran.

El ablacionar a las hembras, además de alterar el proceso de muda, afecta a otros procesos hormonales como pulsaciones del corazón, el metabolismo de proteínas y del azúcar, la pigmentación y osmoregulación (Beltz, 1988), debido a que también se han eliminado las hormonas que regulan estos procesos fisiológicos. Durante el

período seguido a la ablación, hay un aumento en las demandas metabólicas del animal, que le es imposible cubrir pues el período de maduración se reduce a 3 días. Además, se han reportado cierto grado de deformidad en los ovarios, una disminución de la fecundidad o viabilidad de los desoves en las maduraciones sucesivas, traduciéndose en la necesidad de renovar los animales luego de 4 meses (Kawahigashi, 1992); también se observan diferencias entre los nauplios y larvas resultantes comparadas con las del medio natural (Bray y Lawrence, 1992).

De acuerdo a lo descrito, se conoce que el proceso de maduración se encuentra regulado por la presencia y ausencia de hormonas específicas. La inhibición de la maduración está determinada por la hormona inhibidora de la gónada (HIG), cuya fuente es el pedúnculo ocular; su acción principal ocurre durante la vitelogénesis secundaria, por lo que se la conoce también como hormona inhibidora de la vitelogénesis (HIV). Esta hormona es sintetizada en el órgano X y transportada a la glándula sinusal donde es almacenada para su liberación al sistema circulatorio. Su acción fue descubierta por Panouse (1943), quien observó un desarrollo ovárico precoz con la ablación del pedúnculo ocular del camarón *Palaemon serratus*.

Por medio de estudios bioquímicos, la HIG ha sido caracterizada como un péptido en algunos decápodos (Bomirski *et al.*, 1981; Quackenbush y Herrkind, 1983; Quackenbush 1989; Kulkarni *et al.*, 1991; Aguilar *et al.*, 1992), su estructura primaria fue establecida en la langosta *Homarus americanus* (Soyez *et al.*, 1991) y crayfish (Huberman *et al.*, 1998) revelando semejanzas con otras hormonas que conforman la familia de neuropéptidos de la glándula sinusal (familia HHC/HIM).

Investigaciones realizadas por Quackenbush y Keeley (1988) sugieren que la HIG regula la síntesis de vitelina, aunque existen datos que aseguran la inhibición de la

unión de la vitelogenina a la membrana del oocito para su absorción (Payen en revisión).

Como contraparte, la existencia de una hormona estimuladora de la gónada (HEG) o de la vitelogénesis (HEV) ha sido propuesta. Investigaciones han demostrado al cerebro y ganglio torácico de varias especies de crustáceos como fuentes de un péptido que desempeña el papel de la HEG. Dichos estudios dieron resultados positivos por medio del uso de implantes o de la aplicación de extractos provenientes de hembras maduras (Hinsch y Bennett, 1979; Takayanagi *et al.*, 1986; Yano *et al.*, 1988; Mohamed y Diwan, 1991; Yano y Wyban, 1992).

Se ha sugerido también al órgano mandibular como el origen de otros factores estimulantes de la maduración entre los cuales están un terpenoide, el farnesoato de metilo, conocido precursor de la hormona juvenil en insectos, y los esteroides progesterona,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y  $17\beta$ - estradiol, generalmente identificados en vertebrados (Laufer *et al.*, 1987, 1998; Tsukimura y Kamemoto, 1991; Young *et al.*, 1992; Ghosh y Ray, 1993; Quintio *et al.*, 1994).

A partir de la hipótesis del control que ejercen los neurotransmisores en la síntesis y/o secreción de neurohormonas peptídicas en crustáceos (Fingerman, 1987), estudios recientes indican que el neurotransmisor 5-hidroxitriptamina (5-HT) actúa indirectamente en la maduración ovárica, estimulando la liberación de la HEG (Richardson *et al.*, 1991; Kulkarni *et al.*, 1992; Sarojini *et al.*, 1995).

En adición al neuropéptido inhibidor de la maduración se ha aislado un factor con actividad gonado-estimuladora de extractos crudos en crayfish (Huberman *et al.*, 1998) y cangrejo (Eastman-Reks y Fingerman, 1984).

Finalmente, opuesto al hecho de que el desarrollo ovárico y desove en camarones peneidos ocurre durante intermuda (Browdy, 1992), período en el cual los niveles de la hormona de la muda son bajos, se ha propuesto que los ecdiesteroides pueden estar involucrados en la regulación de la vitelogénesis. Estudios revelan la presencia de 20-hidroxiecdisona y ecdisona en ovarios, y un aumento en las concentraciones hasta que estos tejidos alcanzan su madurez (Lachaise *et al.*, 1981; Wilder *et al.*, 1991). Observaciones similares fueron realizadas en *Macrobrachium rosenbergii* (Young *et al.*, 1993a) y *Penaeus vannamei* (Chan, 1989) con la variante de que las cantidades de ecdiesteroides fueron expresadas por peso de ovarios en cada estadio. Sin embargo, un efecto inverso se estableció en *Penaeus monodon* (Young *et al.*, 1993b), pues las concentraciones de 20-E fue máxima en ovarios inmaduros, disminuyendo gradualmente hasta el final de la vitelogénesis secundaria.

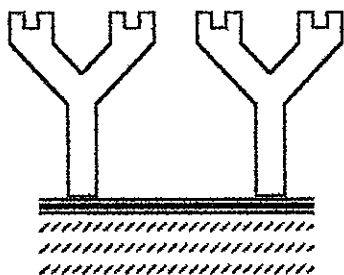
### 1.5. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA DE ENZIMA LIGADA (ELISA)

El ensayo inmunoenzimático (EIA) consiste en el uso de anticuerpos que pueden reconocer al antígeno de interés en una mezcla no purificada de antígeno, cuya reacción puede ser detectada por la presencia de una enzima unida al anticuerpo.

El término ELISA (ensayo de inmunoabsorbancia de enzima ligada) se aplica a un método heterogéneo, en el cual la actividad de la enzima aún se mantiene luego de la reacción entre el anticuerpo y el antígeno.

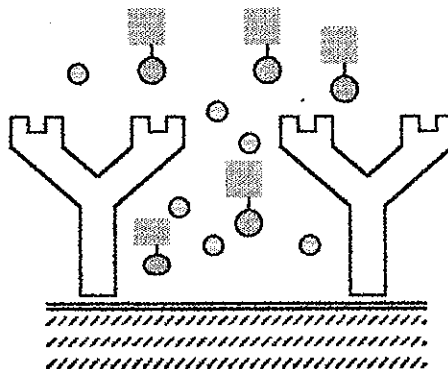
Recientemente el método ELISA del tipo competitivo ha sido diseñado para la cuantificación de ecdiesteroides en artrópodos (Porcheron *et al.*, 1989; De Reggi *et al.*, 1992; Pascual *et al.*, 1995), el cual se resume en el siguiente método de funcionamiento: El primer anticuerpo (IgG) es adherido a una fase sólida (Figura 3.1); posteriormente se adiciona el antígeno de interés que se desea cuantificar, luego se agrega otro antígeno marcado con una enzima, estos quedan libres en el medio y finalmente se agrega el segundo anticuerpo considerado como antisuero que se unirá al primer anticuerpo e identificará a los antígenos de interés. Este antisuero reconocerá ambos antígenos, la abundancia del antígeno de interés indicará mayor o menor grado de unión del antígeno marcado (Figura 3.2), lo cual se verá reflejado al agregar un sustrato a la celda (Figura 3.3), dando un cambio de color por la reacción con la enzima. Es decir que, la intensidad de color (grado de reacción) es inversamente proporcional a la cantidad del antígeno presente en la celda. La intensidad del color es leída en un espectrofotómetro, obteniendo resultados en absorbancias (unidades ópticas). Los resultados son interpolados en la curva estándar, la cual ha sido sujeta al mismo proceso que las muestras.

1



“Coating” de anticuerpo IgG en la fase sólida. El exceso se elimina por lavados

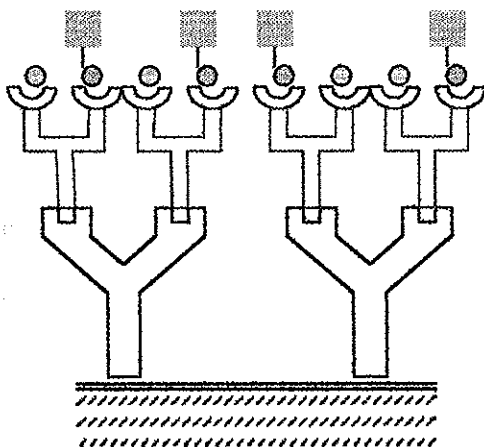
2



Adición de los diferentes grupos de antígenos: El material no es reconocido por el anticuerpo IgG, la reacción ocurre después de agregar el segundo anticuerpo

● tracer succinil 20-E ligado a peroxidasa  
○ estándar o molécula de ecdiesteroides presente en la muestra

3

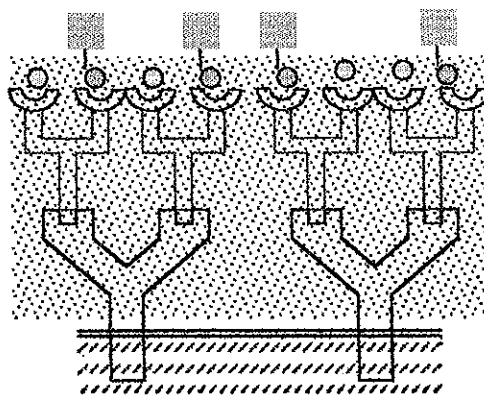


Se agrega el segundo anticuerpo AS4919, el cual será reconocido por el anticuerpo IgG, luego ocurre una competencia de unión entre el antígeno de interés presente en la muestra y el antígeno marcado por la enzima



anticuerpo AS4919 contra 20-E

4



Se agrega el sustrato que reaccionará con la enzima reflejando un cambio de color inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente

Figura 3. Esquema del protocolo del análisis de inmunoabsorbancia de enzima ligada para la determinación de ecdiesteroides (Porcheron *et al.*, 1989).

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. ANIMALES**

Reproductores *Penaeus vannamei* (45 – 70 g.) fueron capturados por pescadores artesanales en las zonas de Guayas (Ayangue y San Pedro) y Manabí (San Clemente). Hembras y machos fueron mantenidos en tanques separados de 18 ton. en el Departamento de Maduración (CENAIM-ESPOL), con fotoperíodo artificial (10:14 h), 300% de recambio de agua, a una temperatura de 25 °C en machos y 28.5 °C para hembras ablacionadas. Su régimen alimenticio se basó en dieta fresca congelada (mejillón, calamar y artemia adulta) al 12% de la biomasa en 4 raciones diarias.

### **2.2. CARACTERIZACIÓN DE ECDIESTEROIDES DURANTE LA MUDA Y MADURACIÓN**

#### **2.2.1. Determinación de Estadios de muda**

Los estadios de muda fueron establecidos según Robertson *et al* (1987) mediante corte del urópodo (Figura 4), montado sobre un portaobjeto y observado al microscopio a 100X.

- Estadio A: Inmediatamente después de la ecdysis, la matriz celular pigmentada llena completamente las bases setales.



- Estadío B: la matriz celular se retrae de la bases setales y se reconoce fácilmente el espacio presente.
- Estadío C: La matriz esta ausente de las bases setales y el pigmento aparece formando una línea de la epidermis en las bases de los nodos setales.
- Estadío D<sub>0</sub>-D<sub>1</sub>: El pigmento se retrae de las bases de los nodos, separándose de la vieja cutícula.
- Estadío D<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>: El pigmento se retrae más y se observa el desarrollo de nuevas setas.

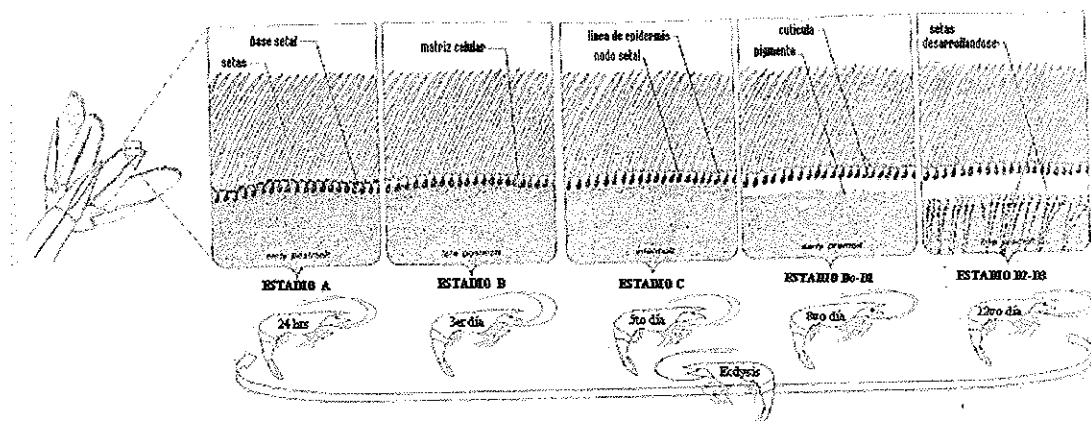


Figura 4. Estadios de muda (Robertson *et al.*, 1987) por observación de sección de urópodos.

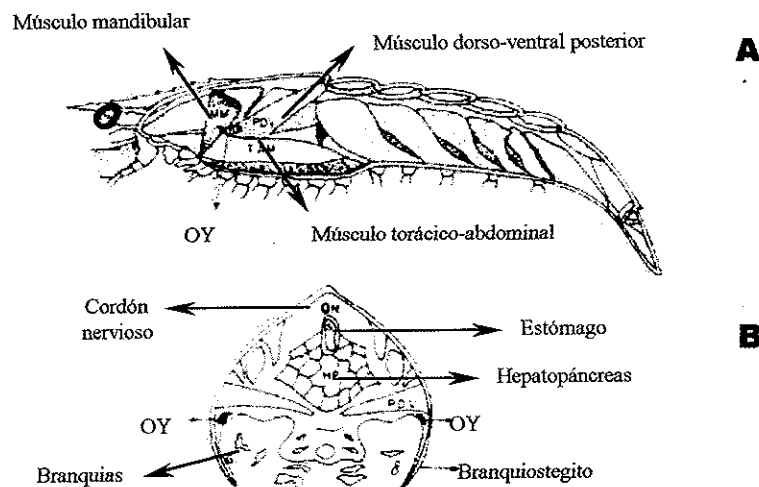
### 2.2.2 Extracción de hemolinfa

Para la extracción de hemolinfa se utilizaron jeringuillas descartables de 1 ml (Insulin Syringe 26 G 1/2) enjuagadas con anticoagulante (Citrato de sodio al 10% a 4 °C). La hemolinfa fue extraída del primer segmento abdominal, región ventral (membrana artropoidal) del animal, transferida a microtubos (1 ml polyprop,

Cambridge Scientific, Co.), centrifugada a 4.000 r.p.m. por 5 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

### **2.2.3 Disección de órganos "Y"**

Una vez tomada la muestra de hemolinfa, se colocó el animal en agua salada con hielo por 5 minutos, para desacelerar el metabolismo. Luego se realizó un corte, separando el cefalotórax del abdomen; un segundo corte longitudinal desde la región dorsal a la ventral, que lo divide en dos mitades iguales. Sobre una bandeja pequeña de metal con agua de mar (4 °C), se fijó a una almohadilla de caucho una de las secciones colocando la parte del exoesqueleto hacia abajo. Seguidamente se separó el otro lado hacia atrás (branquias y periópodos) y se sujetó con agujas a la almohadilla ambos lados, de manera que quedó expuesta la epidermis que recubre la región branquial. Se realizó un corte siguiendo la línea de unión de la epidermis con el exoesqueleto que cubre la cámara branquial desde donde nace el branquiopodito hasta un nervio que se observa transversalmente (Figura 6); luego se completó el corte hacia arriba y en los extremos en forma de un rectángulo. Finalmente se transfirió la fina película de tejido a un microtubo con agua de mar estéril (4 °C), por 10 minutos, para su estabilización previa a la incubación al medio de cultivo o en metanol para su análisis.



**Figura 5.** Localización del órgano Y en el camarón *P. indicus* ( Vijayan *et al.*, 1993 ). A: vista lateral de la posición del órgano Y en relación con los músculos adyacentes. B: Vista de la sección transversal de la parte anterior del cefalotórax.

## **2.2.4. Proceso de Maduración**

### **2.2.4.1. Determinación de estadios de desarrollo gonadal**

Los estadios de desarrollo ovárico fueron estimados por observación externa de acuerdo con el siguiente esquema:

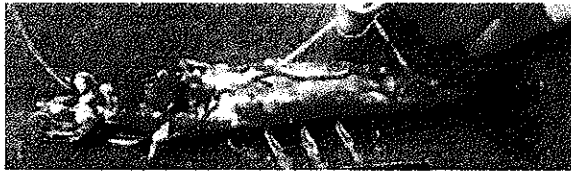
Estadio I: El ovario se presenta transparente sin distinción de los bordes (figura 6.1).

Estadio II: El ovario se hace visible como una fina línea opaca a lo largo del eje dorsal central (figura 6.2).

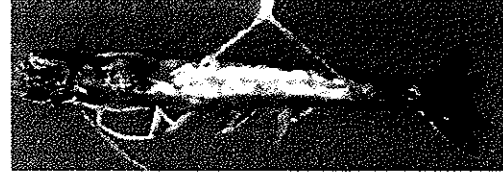
Estadio III: El ovario se observa un poco engrosado, respecto al estadio anterior (figura 6.3).

Estadio IV: El ovario se ve abultado y opaco, y se puede distinguir sus bordes (figura 6.4).

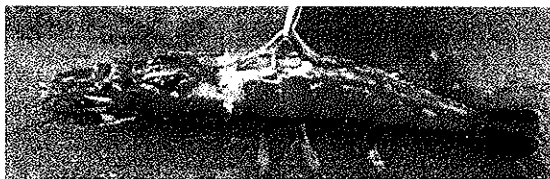
Estadio V: El ovario están totalmente abultado y muy opaco.



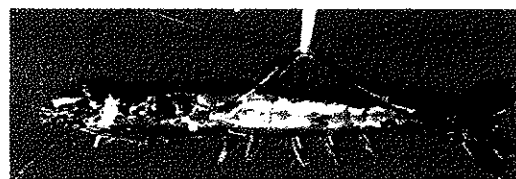
1. Vista interna de ovario en estadio I o inmaduro



2. Vista interna de ovario en estadio II



3. Vista interna de ovario en estadio III



4. Vista interna de ovario en estadio IV

**Figura 6.** Vista interna de ovarios de especie peneida en diferentes estadios de madurez.

#### 2.2.4.2. Extracción de Ovarios

Se colocó el animal en agua de mar (4 °C) para disminuir su metabolismo durante 10 minutos. Luego se eliminó la cutícula que cubre la cámara branquial y se cortó la membrana que cubre el corazón, de manera muy superficial se levantó el exoesqueleto hacia adelante, cortando los cordones musculares laterales. Se eliminó el corazón y se localizó los lóbulos del ovario, los mismos que fueron extraídos con cuidado de no forzar el tejido. Para extraer el cordón del ovario de la región abdominal se cortó dorsalmente por el centro del abdomen siguiendo la línea del intestino hasta aproximarse al seccum, se levantó el cordón separando el músculo.

### 2.3. EFECTO DE NEUROPEPTIDOS SOBRE ORGANOS "Y"

#### 2.3.1. Extracción de CNS y neuropéptidos

Para la disección del cerebro se eliminaron el hepatopáncreas y estómago así como el exoesqueleto del cefalotórax y los pedúnculos oculares desde la base, justo debajo de los cuales se encuentra el cerebro. A continuación se extrajo el ganglio torácico por la región ventral del cefalotórax (base de los pleópodos) y el cordón nervioso en el abdomen.

Estos tejidos fueron homogeneizados en una solución metanólica (metanol agua y ácido acético (90:9:1)), sonicados y centrifugados a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante, se resuspendió el pellet y se repitió el proceso. Se juntaron los dos sobrenadantes y se evaporó completamente el metanol en el rotavapor. Luego se transfirió el sobrenadante a tubos de polipropileno y se adicionó un volumen igual de acetato de etilo, se agitó por 5 minutos y centrifugó a 13.000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C. Se eliminó la capa superior dejando la fase acuosa con los neuropéptidos. Se adicionó un volumen igual de *n*-hexano a la capa acuosa restante en el tubo, se centrifugó y recuperó la capa inferior, de la que se extrajo completamente el remanente de *n*-hexano por rotavaporación.

Columnas C18 Varian Mega Bond fueron enjuagadas con 25 ml de solución acetonitrilo al 90% y 0.1% de TFA, posteriormente con 25 ml de agua mili Q y 0.1% TFA, antes de su uso.

Seguidamente se agregó las muestras a las columnas C18 filtrándolas primero por un cartucho milipore 0.5  $\mu\text{m}$  y se dejó pasar a las columnas. No se conservó el efluente. Se realizó un lavado con 25 ml de agua mili Q 0.1% TFA (no recoger efluente). Finalmente se separó los neuropéptidos, enjuagando con 25 ml de solución de acetonitrilo al 50% y 0.1% de TFA, se recolectó el efluente (extracto de SN 50% AcN), y se efectuó un segundo lavado con 25 ml de solución de acetonitrilo al 80% y 0.1% TFA, recolectándose el efluente (extracto de SN 80% AcN) también. Las dos fracciones (50 % AcN y 80% AcN) fueron liofilizadas por separado y almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.2 Cultivo *in vitro* Órganos "Y"**

#### **2.3.2.1. Metodología**

Luego de mantener los tejidos en agua de mar estéril a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante un mínimo de 10 minutos para que el tejido se estabilice luego de la disección, se transfirió a tubos de vidrio con 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo M199 y se incubó por 5 horas a temperatura ambiente en agitación continua. Los tejidos fueron cambiados a nuevos tubos con medio de cultivo fresco cada hora. Se almacenaron las muestras a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.2.2. Efecto de extractos de SNC en órganos "Y"**

Los extractos cerebrales correspondientes a hembras maduras e inmaduras (fracciones de 50 % AcN y 80% AcN) liofilizadas (ver preparación en sección 2.3.1),

fueron resuspendidas en 150  $\mu$ l de agua destilada. Los  $\acute{o}$ rganos Y disectados luego de ser mantenidos en agua de mar a 4  $^{\circ}$ C por 10 minutos, fueron transferidos a tubos de vidrio con 200  $\mu$ l de medio M199 e incubados por una hora. Luego ambos tejidos pasaron a segundos tubos con medio de cultivo fresco, uno de ellos con 7.5  $\mu$ l (5 equivalentes de SN) de extracto de cerebro y el complementario actu $\acute{o}$  como control. Se incub $\acute{o}$  a temperatura ambiente por 2 horas, con ligera agitaci $\acute{o}$ n. Cada par de  $\acute{o}$ rganos fue cambiado a terceros tubos con medio fresco e incubados por una hora m $\acute{a}$ s, despu $\acute{e}$ s de la cual los tejidos fueron retirados y las muestras de medio de cultivo fueron almacenadas a -20  $^{\circ}$ C hasta el an $\acute{a}$ lisis.

Se determin $\acute{o}$  los ecdiesteroides presentes en los medios de cultivo y los resultados fueron expresados como la tasa o relaci $\acute{o}$ n existente entre la pareja de  $\acute{o}$ rganos ( $\acute{o}$ rgano estimulado vs. control) a cada hora y se evalu $\acute{o}$  el efecto de los extractos, relacionando la tasa correspondiente a la producci $\acute{o}$ n durante la tercera hora de cultivo con la tasa de producci $\acute{o}$ n de la primera hora.

## 2.4. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA COMPETITIVA CON ENZIMA LIGADA (ELISA)

### 2.4.1. Curva Estándar

Se utilizaron los ecdiesteroides ecdysone (E) y 20-hydroxyecdysone (20-E) no marcados (SIGMA, St. Louis, MO USA), como estándares. A cada uno se le agregó 1 ml de agua mili Q y 1 ml de etanol (98%). Luego se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 de cada estándar. Posteriormente las diluciones fueron leídas en el espectrofotómetro de absorción u.v. visible (Schimadzu, modelo 1601), estableciéndose la longitud de onda de mayor absorción y las concentraciones de cada solución, por medio de la fórmula  $C = \text{Abs.}/10300$  para 20-E y 11600 para E.

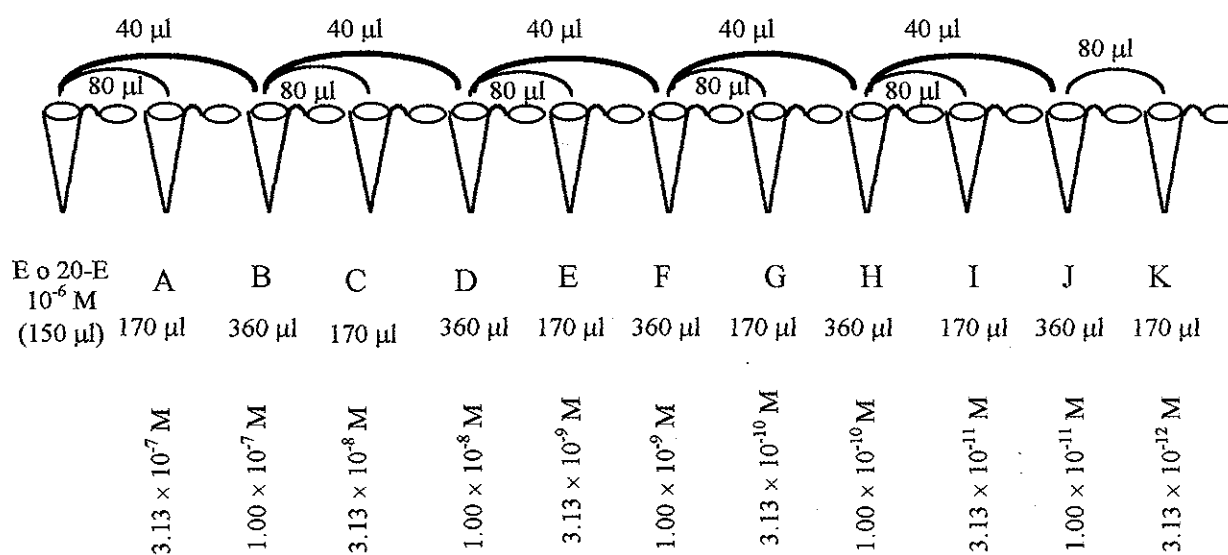
A partir de las diluciones 1:10 de E ( $1.05 \times 10^{-4}$  M) y 20-E ( $1.469 \times 10^{-4}$  M) se prepararon soluciones  $10^{-6}$  M, con tampón de fosfato 0.1 M. Los volúmenes resultantes fueron distribuidos en microtubos eppendorf (150  $\mu\text{l}$  c/u) y almacenados a 0°C.

### 2.4.2. Procedimiento

Para la preparación de la curva estándar se llenó 11 microtubos con tampón de fosfato 0.1 M, o medio de cultivo, 6 de ellos con 170  $\mu\text{l}$ , los 5 restantes con 360  $\mu\text{l}$  y fueron ordenados en forma alternada (Figura 7). Se agregó 80  $\mu\text{l}$  de solución  $10^{-6}$  M



(alícuota) al microtubo A (170  $\mu\text{l}$  de tampón) y 40  $\mu\text{l}$  al microtubo B (360  $\mu\text{l}$  de tampón), luego se sometió a vortex. Los microtubos C y D recibieron 80  $\mu\text{l}$  y 40  $\mu\text{l}$  de la solución del microtubo B, respectivamente. Se repitió el proceso hasta completar los 11 muestras, obteniéndose un rango concentraciones finales de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  M.



**Figura 7.** Diagrama de preparación de curva estándar de ecdiesteroides. Los volúmenes indicados debajo de las letras son las cantidades de solución tampón o medio de cultivo utilizado en las diluciones. Valores indicados en parte inferior son las concentraciones finales del estándar preparado.

#### a) "Coating" de placas ELISA.

Se preparó una solución de recubrimiento para 15 placas con una dilución 1:1000 del primer anticuerpo (GAR, donado por universidad de Leuven, Bélgica) en 15 ml de tampón fosfato 1 M pH 7.4 y 285 ml de agua mili Q. Se distribuyó 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla por celda de las microplacas (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> plate, maxisorp<sup>TM</sup> surface) y

se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Se agregó 100 µl por celda de una solución de BSA (0.45 g en 150 ml agua mili Q) y las microplacas se mantuvieron a 4 °C por lo menos 12 horas antes de su uso.

b) Lavado de microplaca

Se eliminó el contenido de la placa previamente incubada y se lavó 5 veces con 200 µl de solución de lavado (0.01 M de tampón de fosfato con 0.05 % de Tween 20), por celda.

c) Preparación de curva estándar

Se preparó una curva estándar con tampón de fosfato 0.1 M para el análisis de hemolinfa o con medio de cultivo M199 en el caso de la determinación de ecdiesteroides producidos por los órganos Y cultivados *in vitro* (ver sección 2.4.4).

d) Solución de anticuerpo y tracer enzimático

Se empleó tracer (rastreador) enzimático succinyl-20 hidroxyecdysone ligado a la peroxidasa donado por Dr. Jean Paul Delbeque (Dijon, Francia) y anticuerpo anti 20-E de conejo (AS4919) donado por Patrick Porcheron, Universidad Pierre et Marie Curie (París, Francia).

La solución madre de anticuerpo (6 µl) fue diluida 1:100 con tampón de fosfato 0.1 M y distribuida en alícuotas de 100 µl. Se almacenaron a 4 °C.

Al momento del análisis, se preparó una dilución 1:1000 a partir de una alícuota de anticuerpo (5 µl) con tampón de fosfato 0.1 y una solución de tracer (13 µl de stock y 5 ml de tampón). Las diluciones fueron realizadas en tubos de vidrio y almacenadas a 4 °C para uso inmediato.

#### e) Incubación

La celdas de la microplaca se llenaron por duplicado en el siguiente orden: con los estándares, 50 µl cada uno; seguido de las muestras, 50 µl; finalmente dos celdas con 50 µl de tampón (0.1 M) como control de 100% de unión, y dos celdas con 100 µl de tampón (0.1 M) como control de ruido de fondo o blanco. Luego se agregó 50 µl de tracer enzimático y 50 µl por celda de anticuerpo AS4919 a todas las celdas excepto a las correspondientes al blanco.

Para la reacción inmunológica, la microplaca se incubó por 2 horas en agitación continua a 70 r.p.m. (agitador Stuart Scientific) a temperatura ambiente.

#### f) Reacción enzimática

Se lavó nuevamente la microplaca (ver paso b de esta sección), luego se adicionó 200 µl por celda de la mezcla de reactivo de coloración (ver anexo), y se dejó en agitación continua para el desarrollo de la reacción por 50 minutos.

### g) Lectura y análisis

Finalmente se leyó la microplaca en espectrofotómetro BIOCHRAMIT a 620 nm. La información obtenida se transformó utilizando la fórmula  $[S - (B \div Bo)] \times 100$  o  $[M - (B \div Bo)]$ , donde B es igual a la absorbancia del blanco, S es igual a la absorbancia del estándar y Bo es igual a la absorbancia del control de 100% de unión. Se graficó la curva estándar con las concentraciones de ecdiesteroides (logaritmo base 10) en la abscisa versus B/Bo en la ordenada. Los datos fueron linearizados y la fórmula resultante fue utilizada para el procesamiento de los datos de las muestras.

### **2.4.3. Tratamiento de muestras**

- Para determinar la cantidad de ecdiesteroides presentes en los órganos Y, los tejidos fueron homogenizados en metanol (500 µl) dos veces, los dos sobrenadantes juntos fueron liofilizados. Se almacenó a -80 °C hasta su análisis.
- Los ovarios disectados en diferentes estadios de madurez fueron almacenados en tubos de vidrio con metanol (99 %) a -20 °C. Luego se maceraron, homogenizaron y centrifugaron a 4000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en metanol, y se repitió el proceso. De los dos sobrenadantes juntos se eliminó el metanol por liofilización. Las muestras se mantuvieron a -20 °C.
- Por otra parte se analizó muestras de hemolinfa en diferentes estadios de muda. Se comparó varios tratamientos:

- a) Extracción con anticoagulante: Se empleó jeringas con 70  $\mu$ l de citrato de sodio al 10% a 4 °C, se extrajo 200  $\mu$ l de plasma de cada animal, 100  $\mu$ l de plasma fue tratada con metanol (1:4 v.v), dos veces, se separó los sobrenadantes, estos y los 100  $\mu$ l restantes se almacenaron a -20 °C.
- b) Extracción con jeringa con y sin enjuague de anticoagulante: Los plasmas fueron almacenados a -20 °C.

#### **2.4.4. Estandarización de la técnica, detección de los niveles de hormona en el hemolinfa**

Siendo el Análisis de inmunoabsorbancia competitiva de enzima ligada una nueva técnica a usarse, se estableció modificaciones en la metodología con la finalidad de ser aplicable en nuestra investigación.

Se corrieron análisis con los dos estándares de ecdiesteroides (E y 20-E), para determinar el grado de reconocimiento del anticuerpo junto con el tracer de las dos moléculas. Fue necesario definir la longitud de onda a utilizar para la lectura de las placas, debido a que el equipo disponible no posee los rangos de lectura recomendados para la enzima –sustrato empleado. También se tuvo que establecer el tiempo de reacción. Las longitudes de ondas probadas fueron de 620 nm y 690 nm después de 20 y 50 minutos de reacción.

En la gráfica de la curva estándar se restringió el uso de los valores mayores correspondientes a las concentraciones  $1.00 \times 10^{-10}$  M.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Estandarización del análisis de inmunoabsorbancia de enzima ligada**

Se utilizó el análisis de inmunoabsorbancia de enzima ligada a la peroxidasa para cuantificar los ecdiesteroides presentes en hemolinfa, medio de cultivo, órganos Y y ovarios. Debido a que la técnica no estaba implementada en CENAIM al momento, fue necesario implementar la metodología, para lo cual se realizaron algunas modificaciones. El anticuerpo AS4919 junto con el tracer utilizado para el análisis de los ecdiesteroides reconoce moléculas de 20-hidroxiecdisona en mayor grado que de 3-deoxiecdisona y ecdisona ( 200, 700 y 800 fmol respectivamente, fueron necesarios para obtener un 50% de unión anticuerpo-antígeno). El equipo de lectura (espectrofotómetro) no dispone del rango de longitud de onda requerido (660 nm) para el método empleado, para lo cual se realizaron pruebas a 620 y 690 nm, a 30 y 50 minutos de reacción. Se observó mayor reacción enzimática en las lecturas realizadas después de 50 minutos a una longitud de onda de 620 nm, estableciéndose esas condiciones para futuros análisis.

Con respecto al protocolo de preparación de estándares, éstos se prepararon en tampón para lecturas directas de muestras de hemolinfa y muestras liofilizadas resuspendidas en tampón (ovarios y OY), y se diluyó en medio de cultivo M199 para muestras resultantes de cultivos *in vitro*.

### 3.2. Tratamiento de muestras

De acuerdo a las referencias bibliográficas consultadas, existen varias maneras de procesar los diferentes tipos de muestras para la determinación de los ecdiesteroides. Las muestras pueden ser leídas directamente (hemolinfa y medio de cultivo), o realizando una extracción de ecdiesteroides con metanol (hemolinfa, ovarios, medio de cultivo, OY). Para el caso de la hemolinfa, las muestras tomadas con jeringas enjuagadas con citrato de sodio al 10% (no diluidas), centrifugadas a 4 °C al momento, almacenadas a -20 °C y analizadas directamente mostraron mejores resultados que la extracción con metanol, evaporación al vacío y resuspensión en tampón. De manera similar sucedió con los análisis de los medios del cultivo *in vitro* de órganos Y, los cuales se analizaron de manera directa, colocando el medio de cultivo directamente en la placa de análisis. El determinante para esta selección de protocolo fue la pérdida parcial de ecdiesteroides al momento de la extracción y liofilización (datos no mostrados) resultando una disminución del 50% de las concentraciones.

En el caso de determinaciones de ecdiesteroides para órganos es obvia la necesidad de métodos de extracción. La determinación de ecdiesteroides a partir de ovarios se logró con la maceración del tejido en metanol, centrifugación, separación y evaporación del sobrenadante; se procesa de manera total debido a la necesidad de conocer el contenido de ecdiesteroides presentes en un órgano completo.

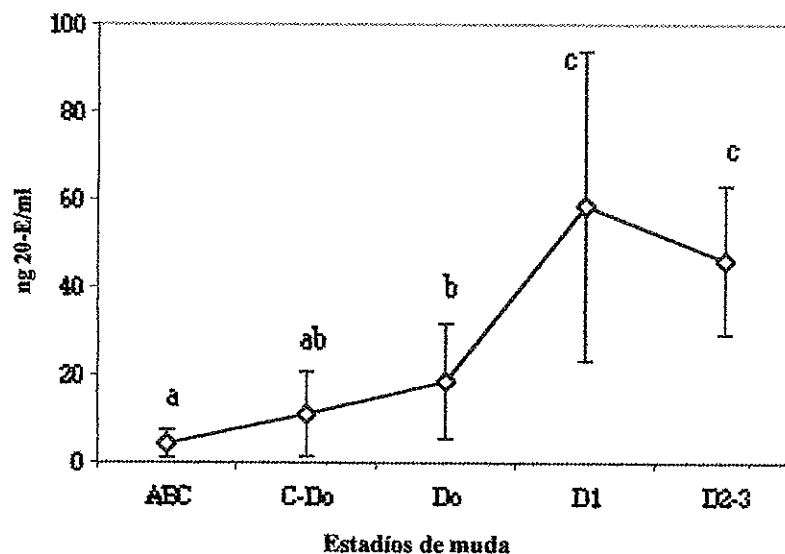
Las cantidades de ecdiesteroides detectadas en las muestras fueron expresadas en  $\eta\text{g}$  equivalentes de 20-hidroxicdisona/ml para hemolinfa y  $\eta\text{g}$  equivalentes de 20-hidroxicdisona/órgano para los ovarios y OY.

### 3.3. Caracterización de ecdiesteroides durante la muda

#### 3.3.1. Niveles de ecdiesteroides en hemolinfa

Con el objetivo de caracterizar las concentraciones de ecdiesteroides durante la muda y como parte de la estandarización del método ELISA para ecdiesteroides, y verificar la eficiencia del método en la identificación de diferentes niveles de ecdiesteroides, se determinaron los niveles de 20-E en diferentes estadios de muda en la hemolinfa de reproductores. Se observó que durante la postmuda (estadios A-B) e intermuda (estadio C) los niveles de 20-E eran bajos ( $4.29 \pm 3.12$  ng 20-E/ml), en comparación con estadios posteriores (Figura 8). Estos niveles comienzan a elevarse en la premuda (estadio D<sub>0</sub>:  $18.56 \pm 13.19$  ng 20-E/ml) hasta alcanzar un máximo en el estadio D<sub>1</sub> ( $58.6 \pm 35.24$  ng 20-E/ml), luego de lo cual se observa una pequeña disminución en los niveles momentos antes de la muda (D<sub>2-3</sub>). De esta manera se confirma que el método de análisis de ecdiesteroides siendo utilizado es eficiente y sensible a cambios fisiológicos durante la muda.





**Figura 8.** Concentraciones de ecdiesteroides en hemolinfa de reproductores machos *P. vannamei* durante el ciclo de muda. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar. Letras similares en parte superior de las barras de desviación estándar indican las diferencias significativas determinadas por la Prueba F Scheffé ( $P < 0.001$ )

### 3.3.2 Producción de ecdiesteroides por órganos Y cultivados *in vitro*

Previo a la determinación de la cinética de producción de ecdiesteroides por parte de los órganos Y cultivados *in vitro*, se evaluó las concentraciones presentes en órganos Y antes del cultivo para cada estadio de muda. Se observó que los órganos Y en intermuda (estadio C) y premuda temprana (estadio D<sub>0</sub>) contenían mayores concentraciones que aquellos en postmuda (estadio A y B) (ver tabla I).

Para establecer la viabilidad del tejido *in vitro*, los órganos complementarios a los utilizados en la extracción anterior, fueron sometidos a un cultivo durante cinco horas, determinándose la cantidad de 20-E producidos a cada hora de incubación. Los órganos

Y en estadio C y D<sub>0</sub> produjeron mayores concentraciones de ecdiesteroides que los órganos en estadio A y B.

Los valores obtenidos para cada hora de cultivo al ser sumados resultaron mayores a los valores obtenidos previo al cultivo, indicando que el órgano es viable en cultivo, es decir capaz de producir ecdiesteroides bajo condiciones de cultivo y no se trata de una liberación de ecdiesteroides presentes en el órgano al momento de la disección.

**Tabla I.** Concentración de 20 hidroxiecdisona por órgano Y, inicial y luego de 5 horas de incubación. Los órganos Y pertenecen a un mismo animal por estadio de muda.

Estadio de muda	Inicial ng 20-E/OY <sup>v</sup>	Cultivo 5 horas ng 20-E/OY
A	0.0189	0.0274
B	0.0360	0.0488
B	0.0144	0.0810
C	0.0531	0.1341
C	0.0381	0.1365
C-Do	0.0590	0.1371
C-Do	0.0449	0.0922
Do	0.0449	0.1896

Teniendo una respuesta positiva de los tejidos en cultivo *in vitro*, órganos Y de reproductores para cada estadio de muda fueron disectados e incubados durante 5 horas en medio M199, a partir del cual se determinó las cantidades de ecdiesteroides sintetizadas. Los órganos cultivados mostraron diferentes patrones de secreción. Los estadios A, B, C y D<sub>0</sub>, postmuda, intermuda y premuda temprana respectivamente, mostraron menor rango de liberación desde el inicio de cultivo (0.27 ng – 0.81 ng/OY). Los órganos de animales en premuda, D<sub>1</sub> y D<sub>2,3</sub> fueron más activos, produciendo un total de 3.52 ng y 6.54 ng/OY respectivamente (Figura 9).

Se pudo observar que las concentraciones de ecdiesteroides en órganos Y complementarios no eran iguales, sin embargo la tendencia de producción si fue similar.

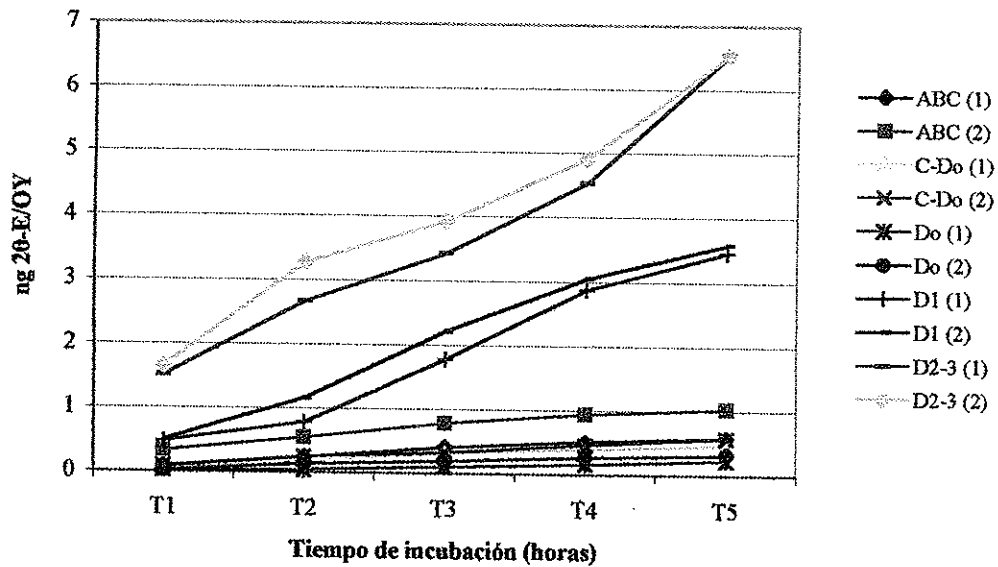
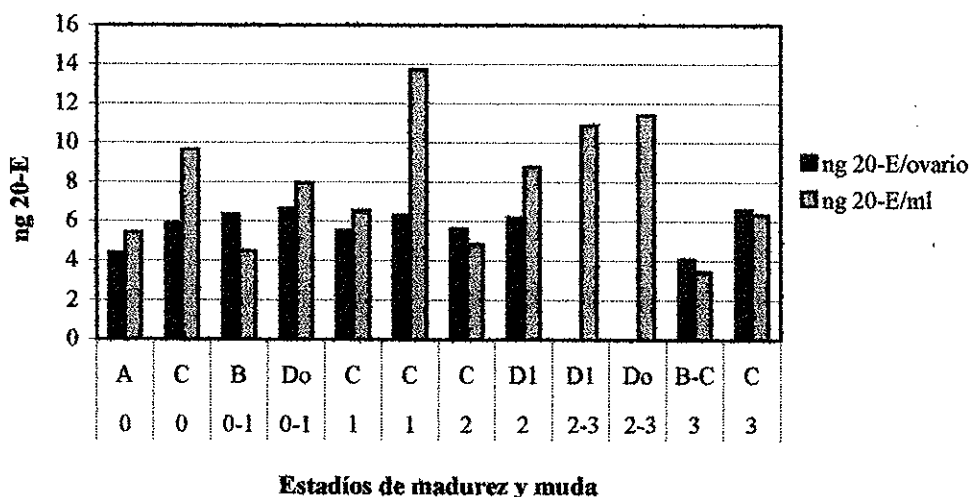


Figura 9. Concentración de 20-E por OY cultivado *in vitro* durante 5 horas en los diferentes estadios de muda. Se indica los valores de los dos órganos por separado (n= 4 a 11 animales utilizados por estadio).

### 3.4. Caracterización de ecdiesteroides durante la maduración

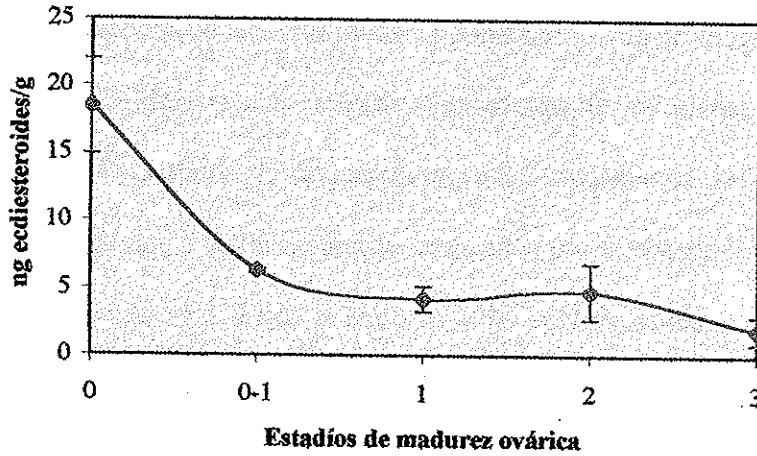
Postulada la hipótesis de que los ecdiesteroides potencialmente juegan un rol dentro del proceso de maduración ovárica en crustáceos, se procedió a caracterizar las concentraciones de ecdiesteroides en hemolinfa y ovarios durante el desarrollo gonadal de hembras *P. vannamei*. Paralelamente para cada estadio de madurez se determinó el estadio de muda, por medio de la visualización de una muestra de urópodo.

Las concentraciones de ecdiesteroides en los ovarios fluctuaron entre 4.08 y 6.6 ng de ecdiesteroides/ovario para estadios 0 a 3; no se reflejó un aumento en las concentraciones de ecdiesteroides en relación con el desarrollo gonadal (Figura 10).



**Figura 10.** Comparación de los niveles de ecdiesteroides en ovarios (ng/ovario) y hemolinfa (ng/ml) en diferentes estadios de madurez. Estadio 0 corresponde a hembras inmaduras, estadio 0-1 hembras vitelogénicas, estadio 1 al 3 para hembras en proceso de vitelogénesis.

Al expresar los valores de ecdiesteroides obtenidos por gramo de ovario se obtiene un máximo de 20.9 ng ecdiesteroides/g en ovarios inmaduros, seguido de una disminución gradual de niveles a medida que avanza el desarrollo gonadal (figura 11).



**Figura 11.** Niveles de ecdiesteroides por gramo de ovario para distintos estadios de madurez ovárica. Se indica el valor promedio y desviación estándar por punto.

Las concentraciones de ecdiesteroides obtenidas para los órganos Y cultivados *in vitro* (Figura 12) al tener en cuenta el estadio de muda en el que se encontraban, presentan un patrón de comportamiento similar a los niveles establecidos previamente para el ciclo de muda y no relacionados con la maduración.

AcN de hembras madura e inmadura. Los extractos de 50% de AcN madura produjeron una estimulación en mayor grado que 50% inmadura en los estadios AB, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>' y D<sub>2-3</sub>, mientras que el extracto 50% inmadura superó al 50% madura en los estadios C y D<sub>1</sub>'. En el estadio D<sub>2-3</sub> el extracto de 80% AcN madura obtuvo una mayor estimulación que los extractos de 50% de hembras maduras e inmaduras. En general, los órganos Y en estadios C, D<sub>0</sub> y D<sub>1</sub> fueron más sensible a la acción de los extractos que los otros estadios de muda. Para encontrar diferencia entre los tratamientos con los extractos, los valores correspondientes a las tasas fueron analizados por la prueba F LSD con una P < 0.05, con lo cual se determinó que el extracto 50% AcN de hembras maduras ocasionó las máximas estimulaciones en los estadios D<sub>0</sub> y D<sub>1</sub>.

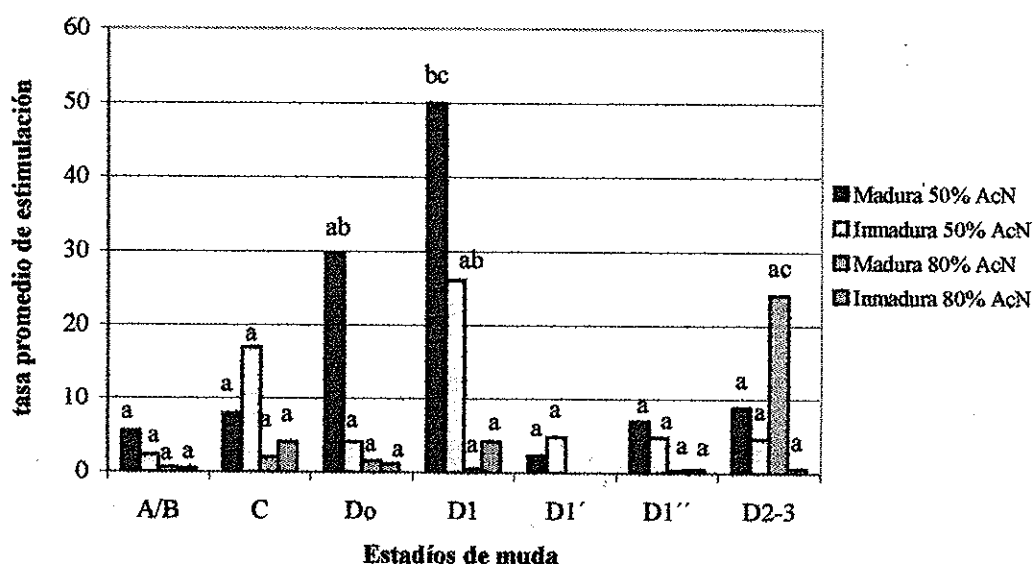


Figura 13. Tasas de estimulación de extractos de hembras maduras e inmaduras en la síntesis de ecdiesteroides producidos por órganos Y en diferentes estadios de muda. Las letras repetidas sobre las barras indican no diferencias significativas por prueba F de LSD con P < 0.05. Estadio A/B: postmuda, estadio C, intermuda; estadio D<sub>0</sub>, premuda temprana, D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>' y D<sub>1</sub>'', premuda y estadio D<sub>2-3</sub>, premuda tardía.

## DISCUSION

Parte de este trabajo tuvo como objetivo la caracterización de ecdiesteroides durante el ciclo de muda, al igual que la determinación de tasa de producción de ecdiesteroides por parte de los órganos Y, con miras a estudios para su eventual regulación.

El ciclo de muda en los crustáceos está caracterizado por diferentes eventos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Dichos eventos son regulados hormonalmente por los ecdiesteroides (Spindler *et al.*, 1980), sintetizados por los órganos Y y liberados en la hemolinfa (Bollenbaher y O' Connor, 1973; Chang y O'Connor, 1977). Se conoce que la ecdisona es uno de los principales productos de secreción de órganos Y pero no el único, éste se encuentra acompañado de otros ecdiesteroides que varían según la especie; se ha detectado la producción de 25-deoxiecdisona en el órgano Y del cangrejo *Carcinus maenas* (Lachaise *et al.*, 1986), la 3- dehidroecdisona en el cangrejo *Cancer antennarius* (Spaziani *et al.*, 1989), en el crayfish *Procambarus clarkii* (Sonobe, *et al.*, 1991) y en el camarón *Penaeus vannamei* (Blais *et al.*, 1993). Estas moléculas al contacto con tejido periférico al órgano Y, como la epidermis (Skinner, 1985) son transformadas en 20-hidroiecdisona, ecdiesteroide de predominante circulación en la hemolinfa y ponasterona A, para luego ser transportadas hasta órganos objetivos a través del sistema circulatorio. En este estudio trabajamos con el anticuerpo AS4919 y la medición de 20-E. Se eligió expresar los resultados equivalentes a 20-E en hemolinfa, por ser el ecdiesteroide predominante en la hemolinfa en la mayoría de los crustáceos estudiados y en OY, puesto que no se podía disectar el órgano Y sin

parte de tejido epidérmico, que es responsable de la transformación de ecdisona a 20-E en el cultivo de órgano Y *in vitro*. Por lo consiguiente se justifica el uso del anticuerpo junto con el tracer, los cuales tienen mayor especificidad por moléculas de 20-E que para otros ecdiesteroides.

Durante el ciclo de muda, se observó que los niveles de 20-E en la hemolinfa comienzan a elevarse durante la premuda (Do:  $18.56 \pm 13.19$  ng de 20-E /ml) hasta alcanzar un máximo en estadio D<sub>1</sub> ( $58.6 \pm 35.24$  ng de 20-E /ml), seguido de un descenso en el estadio D<sub>2-3</sub>; los estadios AB correspondientes a la postmuda fueron agrupados pues mostraron niveles bajos equivalentes, con un promedio de  $4.29 \pm 3.12$  ng 20-E/ml, hasta la intermuda (estadio C). Las concentraciones encontradas en nuestro estudio en adultos son similares a las establecidas en juveniles *P. vannamei* (Blais *et al.*, 1993) durante la intermuda ( $9.2 \pm 2.3$  ng equivalentes de 20-E /ml) y premuda (estadio Do:  $14.9 \pm 2.5$  ng/ml), sin embargo ellos observaron una mayor concentración en el estadio D<sub>1</sub>'' ( $375 \pm 73$  ng equivalentes de 20-E /ml) en comparación con nuestros resultados. Por otra parte, Chan *et al.* (1988), determinó también para juveniles *P. vannamei* aún mayores concentraciones para todos los estadios de muda, pero con la variante de que sus valores fueron expresados en ng equivalentes de ecdisona/ml. Estas diferencias pueden ser debido a que ellos describieron subestadios en el estadio D<sub>1</sub> o porque pueden haber utilizado un anticuerpo que reconoce otros ecdiesteroides, a más de 20-E en el análisis RIA. Los niveles de ecdiesteroides en hemolinfa han sido caracterizados en varias especies de crustáceos como en *P. monodon* (Kuo *et al.*, 1996), en los cangrejos *Gecarcinus lateralis* (MacCarthy *et al.*, 1977) y *Uca pugilator* (Hopkins, 1983), en la langosta



*Homarus americanus* (Chang y Bruce, 1980), en general estas concentraciones describen un aumento durante la premuda (estadio D<sub>0</sub>), un máximo en D<sub>1</sub> y disminuciones previas a la exuviación (estadio D<sub>2-3</sub>), lo cual se ha podido determinar en nuestra investigación. Este incremento en los niveles de ecdiesteroides en D<sub>1</sub> se asocia al inicio de la separación del viejo exoesqueleto, y la intervención de los ecdiesteroides en la síntesis de varias proteínas involucradas en la formación de la nueva epicutícula. Luego las disminuciones en las concentraciones de ecdiesteroides en estadio D<sub>2-3</sub> justo antes de la exuviación pueden ser debido a que concluye la formación de la nueva epidermis, preparando al animal para el desprendimiento del exoesqueleto anterior.

En base a experiencias en el establecimiento de la función del órgano Y en el proceso de muda en otras especies de crustáceos, a través de cultivo *in vitro*, se afirma la estrecha correlación entre la variación de los niveles de ecdiesteroides en la hemolinfa y las concentraciones producidas por los órganos Y (Keller y Schmid, 1979; Sonobe *et al.*, 1991; Blais *et al.*, 1994). Luego de comprobar la viabilidad de los tejidos *in vitro*, comparamos la cinética de producción de ecdiesteroides en cultivo por órganos Y con las concentraciones en la hemolinfa, observándose una variación proporcional en ambos casos durante el ciclo de muda. Por ejemplo, en el estadio D<sub>1</sub> y D<sub>2-3</sub> los niveles en la hemolinfa son elevados, lo que sugiere que los órganos Y están produciendo grandes cantidades de ecdiesteroides, lo que se ve reflejado en las concentraciones en el medio de cultivo en la primera hora de cultivo y los valores acumulados. Estudios citológicos realizados en órganos Y en *Penaeus indicus*, registraron un aumento de tamaño en las células de los órganos Y durante la premuda y una disminución en la postmuda e intermuda, eventos asociados con la

actividad secretora de estos tejidos (Vijayan *et al.*, 1993); a nivel morfológico se determinó que los órganos Y no poseen lugares de almacenamiento, de esta manera la 20-hidroxiecdisona sintetizada es liberada directamente a sistema circulatorio (Spindler *et al.*, 1980), reafirmando el hecho de que las concentraciones y valores máximos en la hemolinfa coinciden con los máximos de producción de órganos Y. Además, debemos indicar que a pesar de que cada par de órganos evaluados en todos los estadios de muda no produjeron cantidades equivalentes, siguieron tendencias similares dentro de cada estadio. Esto se puede atribuir a una posible producción alternada entre los órganos Y de un animal durante su ciclo de muda o a efectos ocasionados por el corte de mayor porción de tejido epidérmico durante la disección de los órganos Y.

En algunas especies de crustáceos se ha asignado a los ecdiesteroides un rol en la maduración, debido a la analogías endocrinológicas demostradas con los insectos (Bownes, 1989), en los cuales los ecdiesteroides intervienen en ambos procesos, muda y reproducción. En estos artrópodos, los ecdiesteroides son sintetizados por la glándula protorácica durante el desarrollo postembrionario para muda. Esta glándula sufre una degeneración, luego de que los animales pasan la metamorfosis a etapa adulta, en donde los ovarios son productores de ecdiesteroides y éstos son metabolizados por los huevos en su proceso de desarrollo (Downer y Laufer, 1983). Con este esquema en mente, se quiso determinar la posible influencia de los ecdiesteroides en la maduración de camarones, para la cual se determinó los niveles de ecdiesteroides en ovarios en diferentes estadios de maduración. Las concentraciones de 20-hidroxiecdisona expresadas en  $\eta\text{g}$  equivalentes por ovario se mantuvieron constante a lo largo del desarrollo gonadal ( $5.76 \pm 0.53 \text{ } \eta\text{g}$  20-E

/ovario) y los niveles en la hemolinfa no aumentaron de acuerdo con la maduración. Esto nos lleva a concluir que los ecdiesteroides no juegan un rol en la maduración *P. vannamei*. Partiendo del hecho que el ciclo de muda de esta especie en su etapa adulta es antagónico al proceso reproductivo, por ser de tético abierto, hembras maduras estarán en intermuda o premuda. Al no registrarse concentraciones de ecdiesteroides mayores en ovarios a las determinadas en la hemolinfa en estos estadios de muda, podría deducirse que éstos son el resultado de una contaminación de los ecdiesteroides circulantes en la hemolinfa, pues coinciden con los niveles correspondientes a los estadios de muda respectivas.

Valores reportados por Chan (1989) también en *P. vannamei* describen niveles bajos ( $7,4 \pm 4,5$  ng equivalentes de ecdisona/ovarios) durante el estadio 1, pero un aumento acelerado en los estadios IV y V, cuando las concentraciones son expresadas por ovario; sin embargo, cuando son representados en término de niveles de proteína total las concentraciones son mayores en ovarios inmaduros. El motivo de la elevada presencia de ecdiesteroides en ovarios maduros (Chan, 1989), que asciende a 0.45 ng/mg proteína en estadios IV y V, podría residir en que el ovario es el origen mismo de los ecdiesteroides. Hasta el momento solo se conoce que el órgano Y es la única fuente de ecdisona. Chan (1989) observó un efecto inhibitorio en la síntesis protéica en los ovarios maduros, al agregar 20-hidroxiecdisona en cultivos *in vitro* de ovario, lo cual no concuerda con sus previas observaciones, pero si corrobora nuestros resultados.

En *Macrobrachium rosenbergii* (Young *et al.*, 1993) se ha demostrado un aumento en los niveles de ecdiesteroides en las gónadas cuando los valores son expresados por ovario, obteniéndose 6.0 ng de 20-OHE/ovario en estadio inmaduro y 28.3 ng de

20-E/ovario en estadio IV. También se ha observado este aumento cuando las concentraciones de ecdiesteroides son expresados por gramo de ovario para la misma especie, donde también fueron establecidas las concentraciones de ecdiesteroides durante la muda de los dos ciclos de muda (somática y reproductiva). Se observó un incremento del 50% de ecdiesteroides en el estadio D<sub>2-3</sub> del ciclo de muda reproductiva comparados con los de la muda normal (Wilder *et al.* 1991). Este aumento en ovarios maduros no concuerdan con los niveles constantes de ecdiesteroides en los estadios de maduración obtenidos en nuestro trabajo, independientemente del estadio de muda de los reproductores.

En el cangrejo araña *Acanthonyx lunulatus* también se reportó una elevación de los niveles de 20-E al inicio de la vitelogenésis en ovarios, evento similar en los insectos, al madurar los oocitos, lo cual probablemente está relacionado con una estimulación en la formación de la capa externa del huevo (Chaix y De Reggi, 1982). En esta especie la oogénesis y embriogénesis son sincronizadas debido a que el embrión se desarrolla fuera del cuerpo de la madre.

Las especies mencionadas en las que los ecdiesteroides tienen un efecto en la maduración, tiene un factor común, son especies que maduran y mudan al mismo tiempo, por lo que el aumento en los niveles de ecdiesteroides durante el último estadio de madurez ovárica es considerado como una fuente de reserva materna necesaria para el inicio del desarrollo embrionario.

En vista de las diferentes trabajos realizados sobre los ecdiesteroides y su relación con la maduración, y a pesar de los resultados obtenidos en la presente investigación no se puede concluir que los ecdiesteroides no desempeñen un papel estimulador en la maduración ovárica en *P. vannamei*. Es necesario continuar con la búsqueda y el

esclarecimiento del papel que desempeñan los ecdiesteroides en la endocrinología de la maduración. Se cree que los ecdiesteroides jueguen un rol en la reactivación de la meiosis durante la vitelogénesis. Quizás en *P. vannamei* los ecdiesteroides no intervengan en este proceso, sino otros esteroides como 17- $\alpha$  hidroxiprogesterona y 17- $\beta$  estradiol.

Está establecido que el ciclo de muda está controlado por los órganos Y, productores de los ecdiesteroides que intervienen en los cambios involucrados con el crecimiento somático en los crustáceos, esta producción está regulada por el péptido denominado hormona inhibidora de la muda (HIM) presente en el pedúnculo ocular. Sin embargo, existe evidencia sobre la presencia de otro factor estimulante relacionado con el control de la muda (Carlisle y Dohrn, 1953; Martin *et al.*, 1980; Sedlmeier *et al.*, 2000).

En nuestro estudio, extractos preparados a partir de sistemas nerviosos de hembras maduras e inmaduras inoculados en medio de cultivo *in vitro* de órganos Y corroboran la presencia de un neuropéptido estimulador de la producción de ecdiesteroides en el sistema nervioso de hembras maduras e inmaduras. Se observó una mayor estimulación con el extracto de 50% AcN de hembras maduras en los estadios de premuda D<sub>0</sub> y D<sub>1</sub>, con respecto a inmaduras. Esperábamos observar un resultado contrario, es decir que los animales inmaduros posean una hormona estimuladora de la muda. Posiblemente este resultado se debe a que adultos *P. vannamei* se reproducen durante la intermuda, cuando los niveles de ecdiesteroides son bajos. Si se considera al sistema nervioso como el origen del factor estimulante adicional en la producción de ecdiesteroides, podría pensarse que el sistema nervioso se encuentra produciendo la hormona estimuladora durante el tiempo necesario para

la maduración de los ovarios, y que el desove o una disminución en la hormona inhibidora de la muda, sean factores que inducen a la liberación de esta sustancia en la hemolinfa para estimular al órgano Y a la producción de ecdiesteroides y continuar con el proceso de muda.

Se ha reportado en juveniles de langosta *Homarus americanus* (Chang and Bruce, 1980; Chang, 1985) y en cangrejos *Uca pugilator* (Hopkins, 1986), que a pesar de haber sido bilateralmente ablacionados, presentaron variaciones en las concentraciones de ecdiesteroides durante la muda, sugiriendo un segundo factor regulador en la síntesis de ecdiesteroides.

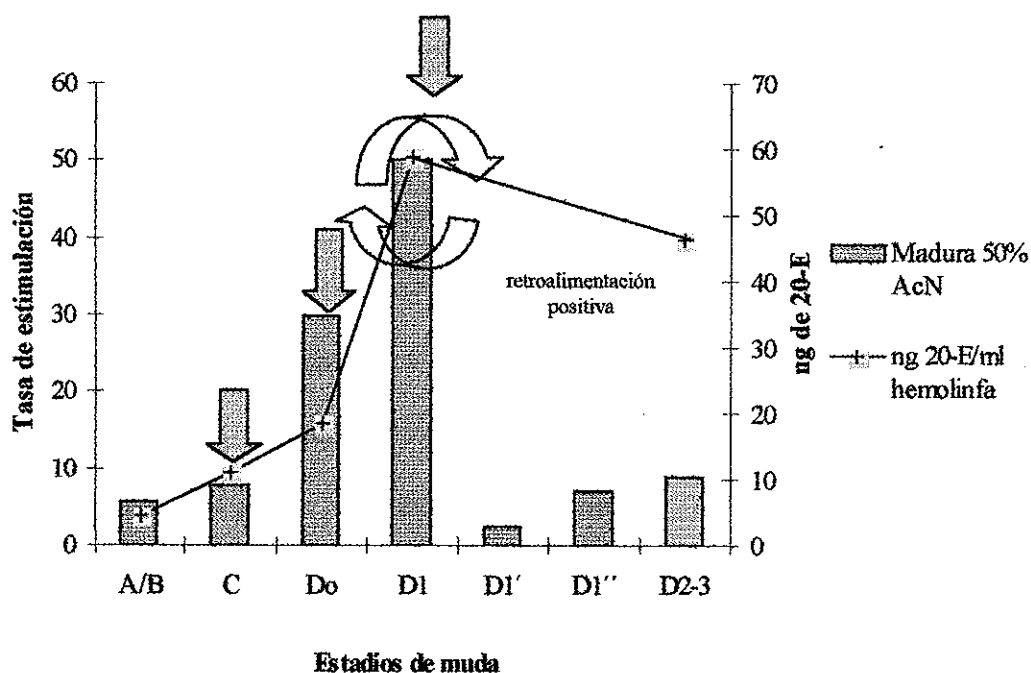
Por otra parte, Sedlmeier *et al* (1999) al evaluar los efectos de cambios intracelulares de calcio en órganos Y en crayfish, sugirieron la existencia de un factor estimulador en la producción de ecdiesteroides, pues al presentarse altos niveles de calcio intracelular, la síntesis de ecdiesteroides *in vitro* aumentó significativamente, proponiéndose la existencia de un factor externo, posiblemente una hormona estimulante de ecdiesteroides que debe usar el calcio como mensajero secundario para la producción de ecdiesteroides. El estudio de Sedlmeier refuerza el modelo descrito por Mattson y Spaziani (1987) para el cangrejo *Cancer antennarius*, donde involucra al calcio como activador de una enzima (fosfodiesterasa) que reduce al adenosin monofosfato cíclico (cAMP) que a su vez es un mensajero secundario que impide la síntesis proteica y de ecdiesteroides a nivel celular en órganos Y (ver capítulo antecedentes).

Debido a la similitud existente entre crustáceos e insectos es posible la existencia de este otro factor de origen neuropeptídico que estimule a órganos Y a la producción de ecdiesteroides, pues la hormona protoraxicotrópica (PTTH) sintetizada por el

cerebro en insectos estimula la producción de ecdiesteroides usando al calcio y cAMP como mecanismo de señal dependiente de transducción (Seinsche y Sedlmeier, 1999), siendo posible que en los crustáceos se siga un modelo similar.

Por otra parte también se propone un terpenoide producto del órgano mandibular, el farnesoato de metilo, como un compuesto estimulante de ecdiesteroides. En el cangrejo *Cancer pagurus*, el farnesoato de metilo estimula la producción *in vitro* de ecdiesteroides por órganos Y en intermuda (Tamone y Chang, 1993). Es posible que el farnesoato de metilo actúe de manera indirecta en la determinación de respuesta de las células de órganos Y a la hormona inhibidora de la muda. Chang *et al.* (1993) también propone al farnesoato de metilo como un estimulador potencial de ecdiesteroides, ellos determinaron la existencia de proteínas de transporte de esta molécula en la hemolinfa durante la muda. Además determinaron un aumento en la síntesis de ecdiesteroides al cultivar *in vitro* órganos Y de *Cancer magister* junto a órganos mandibulares, aunque el tipo de ecdiesteroide no fue identificado.

Nuestro modelo sobre la acción de la hormona estimuladora de la muda de origen nervioso propone que, la hormona estimuladora de la muda actúa solo sobre los estadios de premuda, hasta el inicio de D<sub>1</sub>. Parece ser que justo antes del pico de ecdiesteroides en D<sub>1</sub>, la presencia de los mismos ecdiesteroides estimulan al órgano Y como una retroalimentación positiva y no necesita de un factor que le induzca a producir más ecdiesteroides (Figura 14).



**Figura 14.** Modelo de acción de la hormona estimuladora de la muda. Fechas llenas indican los estadios sobre los cuales la hormona actúa. Fechas redondeadas indican retroalimentación positiva de los mismos ecdiesteroides en su producción.

El establecimiento de los procesos endocrinológicos en crustáceos está en continua investigación. El esclarecimiento del papel que desempeñan los ecdiesteroides en la maduración en crustáceos sería un gran avance y una herramienta de gran utilidad como alternativa en la inducción a la maduración en *P. vannamei* así como la identificación y caracterización del extracto utilizado en el presente estudio, para lograr controlar la muda.



## CONCLUSIONES

- El método ELISA mostró sensibilidad en el análisis de ecdiesteroides en el camarones adultos *Penaeus vannamei*, durante el ciclo de muda y maduración.
- Los niveles de ecdiesteroides, en la hemolinfa del camarón varían durante el ciclo de muda, manteniéndose concentraciones bajas durante la postmuda e intermuda, luego se presenta un incremento en las concentraciones de ecdiesteroides hasta alcanzar su punto máximo en la premuda tardía, para después descender momentos antes de la exuviación.

Esta variación en las concentraciones de ecdiesteroides en los diferentes estadio de muda, pudo ser registrada paralelamente en cultivo de órganos Y *in vitro*, demostrándose la relación directa entre ambos comportamientos.

- No se confirmó la intervención de los ecdiesteroides en el proceso de maduración de camarones, aparentemente según nuestros resultados no la tiene.
- Se comprobó la existencia de un factor estimulante que regula el proceso de muda, por medio de la cinética de producción de ecdiesteroides por parte del OY, presente en el sistema nervioso de hembras en proceso de maduración avanzado y en menor grado en hembras inmaduras.

## RECOMENDACIONES

- Al no haber establecido la intervención de los ecdiesteroides en la maduración, es necesario la realización de más estudios acerca de otros esteroides asociados con la maduración.
- Comprobada la existencia de un factor estimulador de la producción de ecdiesteroides, se necesita la realización de estudios que caractericen dicha sustancia, verifiquen su eficiencia en el control de muda del camarón, y determinen la forma de administrarlo al organismo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGUILAR, M.B., L.S. Quackenbush, D.T. Hunt, J. Shabanowitz y A. Hubermann 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 491-498.
- BELTZ., B. A. 1988. Crustacean neurohormones. In: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. Laufer, H., y Downer, R. G. h. (eds.). New York.: Alan R. Liss, pp. 235-258.
- BLAIS, C. , M. Sefiani, J. Y. Toullec y D. Soyez. 1994. *In vitro* production of ecdysteroides by Y-organs of *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Correlation with hemolymph titers. *Invert. Reprod. Dev.* 26: 3-12
- BOLLENBACHER, W. E Y y J. D. O'Connor. 1973. Production of an ecdysone by crustacean Y-organs *in vitro*. *Am. Zool.* 13: 1274
- BOMIRSKI, A., M. Arendarczyk, E. Kawinska y L. M. Kleinholz. 1981. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *Int. J. Inv. Reprod.*, 3: 213-219.

BRAY, W.A. y A.L. Lawrence. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Editores: A. Fast y L. J. Lester. pp: 114-123, 130-138.

BROWDY, C.1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. Editor: J. Wyban. *World Aquaculture Society*. pp: 26-34.

BOWNES, M. 1989. Vitellogenesis. En "Ecdysone" (J. Koolmand, ed), pp 414-420. Thieme-Verlag, Stuttgart.

BRUCE, M. y E. CHANG. 1984. Demonstration of a molt-inhiting hormone form the sinus gland of the lobster *Homarus americanus*. *Biochem. Physiol.*, 79A. No 3. 421-424.

CARLISLE, D. B. y P. F. R. Dohrn. 1953. Studies on *Lysmata seticaudata* Risoo (Crustacea Decapoda). II Experimental evidence for a growth and moulting – accelerating factor obtainable from eyestalks. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 24: 69-83.

CHAIX, J. C. y M. De Reggi. 1982. Ecdysteroids levels during ovarian development and embryogenesis in the spider crab *Acanthonyx lunulatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47: 7-14

CHAN, S. M., S. M Rankin y L. L. Keeley. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biol. Bull. 175: 185-192.

CHAN, S. M. 1989. Role of ecdysteroids in the molting and reproductive cycles of the white shrimp, *Penaeus vannamei*. Texas A&M University. pp: 11-44, 91-130.

CHANG, E. S. 1984. Ecdysteroids in crustacea: role in reproduction, molting, and larval development, in *Advances in Invertebrate Reproduction*. Vol. 3, Engels, W., Clark, W. H. Fisher, A., Olive, P. J. W., y Went, D. F., Eds. Elsevier Science, Amsterdam, 223.

CHANG, E. S. y M. J. Bruce. 1980. Ecdysteroid titers of juvenile lobsters following molt induction. J. Exp. Zool. 214: 157-160.

CHANG, E. S. y J. D. O'Connor. 1978. *In vitro* secretion and hydroxylation of  $\alpha$ -ecdysone as function of the crustacean molt cycle. Gen Comp. Endocrinol., 36. 151-160.

CHANG, E. S. y J. D. O'Connor. 1977. Secretion of  $\alpha$ -ecdysone by crab Y-organs *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences 74: 615-618

DE REGGI, M., N. Pitoizet, B. Gharib y J. P. Delbecque. 1992. New enzyme immunoassays for ecdysteroids using peroxidase as enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies. Presentes at the 10<sup>th</sup> Ecdysone Workshop, Liverpool.

DOWNER, R. G. y H. Laufer. 1983. Endocrinology of Insects. Alan R. Liss, Inc. New York. pp.75-76

EASTMAN- REKS, S.B. y M. Fingerman. 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol., 79A: 679-684.

FINGERMAN, M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. J. Crust. Biol. 7: 1-27.

GHOSH, D. y A. Ray. 1993. 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: relation to ovarian condition and estrogen treatment. Gen. Comp. Endrocrinol., 89: 248-254.

HINSCH, G.W. y D.C. Bennett. 1979. Vitellogenesis stimulated by thoracic ganglion implants into destalked immature spider crabs, *Libinia emarginata*. Tissue & Cell 11: 345-351.

HOPKINS, P. M. 1986. Ecdysteroids titers and Y-organ activity during late anecdyasis and proecdysis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Gen. Comp. Endocrinol. 63: 362-373.

HOPKINS, P. M. 1983. Patterns of serum ecdysteroids during induced and uninduced proecdysis in the fiddler crab *Uca pugilator*. Gen. Comp. Endocrinol. 63: 362-373.

HUBERMAN, A., M. Aguilar y L. S. Quackenbush. 1998. A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (ortmann). Aquaculture Vol. 135 (1-3): 149-160.

KAWAHIGASHI, D.K. 1992. "State of the art" shrimp maturation: current problems and future trends. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. ESPOL. pp. 61-65

KELLER, R. y E. Schmid. 1979. *In vitro* secretion of ecdysteroids by Y-organs and lack of secretion by mandibular organs of the crayfish following molt induction. J. Comp. Physiol. 130: 347-353

KINGAN, T. 1989. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay: Applications in the assay of peptides, steroids, and cyclic nucleotides. Analytical Biochemistry 183, 283 - 289.

KULKARNI, G.K., R. Nagabhushanam, G. Amaldoss, R.G. y M. Fingerman. 1992. *In vivo* stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), by 5- hydroxytryptamine. *Invert. Reprod. Develop.* 21: 231-240.

KULKARNI, G.K., L. Glade y M. Fingerman. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on *in vitro* synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *J. Crust. Biol.*, 11: 513-522.

KUO, C. y LIN, W. 1996. Changes in morphological characteristics and ecdysteroids during the molting cycle of tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus. *Zoo. Stu.* 35(2): 188pp.

LACHAISE, F., M. Meister, C. Hetru y R. Lafont. 1986. Studies on the biosynthesis of ecdysone by the Y-organs of *Carcinus maenas*. *Molec. cell. Endocrinol.* 45: 253-261.

LACHAISE, F., M. Goudeau, C. Hetru, C. Kappler y J. A. Hoffman. 1981. Ecdysteroids and ovarian development in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362: 521-529.



LAUFER, H., J.B. William y J.S.B. Ahl. 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 111: 113-118.

LAUFER, H., D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C.C. Reuter, L.W. Tsai y D.A. Schooley. 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235: 202-205.

MacCARTHY, J. F. y D. M. Skinner. 1977. Proecdysial changes in serum ecdysone titers, gastrolith formation, and limb regeneration following molt induction by limb autotomy and/or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 278-292.

McLAUGHLIN, P. A. 1983. Internal anatomy. En: *The Biology of Crustacea*. Vol 5. Editores. L. H. Mantel y D. E. Bliss. Academic Press Inc. New York, USA. pp. 38-41.

MARTIN, G., G. Besse y J. P. Moucard. 1980. Contrôle neurohormonal du cycle de mue chez les mâles de l'Oniscoïde *Porcellio dilatatus* Brandt. *Bulletin de la Société Zoologique de France*. 105: 73-81.

MATSON, M. P. y E. Spaziani. 1985. Characterization of molt-inhibiting hormone (MIH) action on crustacean Y-organ segments and dispersed cells in culture and a bioassay for MIH activity. *Exp. Zool.* 236: 93-101.

- MATSON, M. P. y E. Spaziani. 1987. Demonstration of protein kinase C activity in crustaceans Y-organs, and partial definition of its role in regulation of ecdysteroidogenesis. *Molec. Cell. Endocrinol.*, 49: 159-171.
- MOHAMED, K.S. y A.D. Diwam. 1991. Neuroendocrine regulation of ovarian maturation in the indian white prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Aquaculture*, 98: 381-393.
- PALACIOS, E., C. I. Pérez Rostro, J. L. Ramírez, A. M. Ibarra y I. S. Racotta. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth (Abstract). *Acuaculture* 171: 309-321.
- PANOUSE, J. 1943. Influence de l'ablation du pédoncle oculaire sur la croissance de l'ovarie chez la crevette, *Leander serratus*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 217: 553-555.
- PASCUAL, N., X. Bellés, J-P. Delbecque, Y. Hua y J. Koolman. 1995. Quantification of ecdysteroids of immunoassay: Comparison of enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. pp. 862-867.
- PAYEN, G. G. 1980. Endocrine regulation of male and female genital activity in crustaceans. A retrospect and perspectives. *Physiologie de la Reproduction*, Equipe "Neuroendocrinologie des Crustacés", Université Pierre et Marie Curie. Paris.

PORCHERON, P., M. Moriniere, J. Grass y P. Pradelles. 1989. Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochem.* Vol 19 No.2, 117-122.

QUACKENBUSH, L.S. 1989. Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: *in vitro* studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B: 253-261.

QUACKENBUSH, L.S. y L.L. Keeley. 1988. Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Biol. Bull.* 175: 321-331.

QUACKENBUSH, L.S y W.F. Herrnkind. 1983. Partial characterization of eyestalk hormones controlling molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *J. Crustacean Biol.* 3: 34-44.

QUINITIO, E.T., A. Hara, K. Yamauchi y S. Nakao. 1994. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109C: 21-26.

RAO, K. R. 1965. Isolation and partial characterization of the molt-inhibiting hormone of the crustacean eyestalk. *Experientia*, 21: 593-594.

RICHARDSON, H.G, M. Deccaraman y M. Fingerman. 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99C: 53-56.

ROBERTSON, L., B. William, J. Leung-Trujillo y A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquacul. Soc.* Vol. 18, No.3: 180-185.

SAROJINI, R., R. Nagabhushanam y M. Fingerman. 1995. Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: An *in vivo* and *in vitro* study. *J. Exp. Zool.*, 271: 395-400.

SEFIANI, M., J-P. Le Caer y D. Soyez. 1996. Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaid shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103: 41-53.

SELDMEIER, D., S. Dell, H. Devaraj y A. Seince. 1999. The regulation of ecdysteroid production in crayfish Y-organs. In: *Recent developments in Comparative Endocrinology and Neurobiology*. (Roubos, E. W. , Wendelaar Bonga, S. E. W., Vaudry, H y De Loof A.; Eds.) pp. 217-219.

SEINSCHE, A. y D. Sedlmeier. 1999. Ecdysteroids syntehsis in crustacean Y-organs. Role of Ca<sup>2+</sup>. (Abstract). Universität Bonn, Institut für Zoophysiologie, Endenicher Allee 11-13, 53115. Bonn. Germany.

SKINNER, D. M. 1985. Molting and regeneration. In D. E. Bliss, L. H. Mantel, eds. The biology of the crustacea. Vol. 9. New York: Academic Press, pp. 43-146.

SMITH, W. y SEDLMEIER, D. 1990. Neurohormonal control of ecdysone production: Comparison of insects and crustaceans. *Invert. Reprod. Develop.* 18: 77-89.

SONOBE, H., M. Kamba, K. Ohta, M. Ikeda y Y. Naya. 1991. *In vitro* secretion of ecdysteroids by Y-organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Experientia* 47: 948-952.

SOYEZ, D., J.P. Le Caen, P.Y. Noel y J. Rossier. 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides*, 20: 25-32.

SPAZIANI, E., H. H. Rees, W. L. Wang y R. D. Watson. 1989. Evidence that Y-organs of the crab *Cancer antennarius* secrete 3-dehydroecdysone. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 66: 17-25.

SPINDLER, K. D., R. Keller y J. D. O'Connor. 1980. The role of ecdysteroids in the crustacean molting cycle. In "Progress in Ecdysone Research". Vol. 7. North-Holland/Elsevier, Amsterdam. J. A. Hoffman. pp. 247-280.

SUN, P. 1995. Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol. Mar. Biol. Biotech. 4(3), 262-268.

TAKAYANAGI, H., Y. Yamamoto y N. Takeda. 1986. An ovary stimulating factor in the shrimp *Paratya compressa*. J. Exp. Zool. 240: 203-209.

TAMONE, S. L. y E. S. Chang. 1993. Methyl Farnesoate stimulates ecdysteroids secretion from Crab Y-Organs *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 89: 425-432.

TSUKIMURA, B. y I. Kamemoto. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 92: 59-66.

VIJAYAN, K., S. Mohamed y A. F. Diwan. 1993. On the structure and molt controlling function of the Y-organ in the prawn *Penaeus indicus*. J. World Aquacul. Soc. Vol. 124, No.4: 516-521.

WILDER, M. N., T. Okumura y K. Aida. 1991. Accumulation of ovarian ecdysteroids in synchronization with gonadal development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Zool. Sci. 8: 919-927.

YANO, I. y J. A. Wyban. 1992. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by injection of lobster brain extract. Bull. Natl. Res. Inst. Aquac. 21: 1-7.

YANO, I., B. Tsukimura, J.N. Sweeney y J. Wyban. 1988. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. J. World Aquacul. Soc. (19)4: 204-209.

YOUNG, N. J., S. G Webster, y H. Rees. 1993a. Ovarian and hemolymph ecdysteroid titers during vitellogenesis in *Macrobrachium rosenbergii*. Gen. Comp. Endocrinol. 90: 183-191.

YOUNG, N. J., S. G Webster, y H. Rees. 1993b. Ecdysteroid profiles and vitellogenesis in *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). Invertbr. Reprod. Dev.

YOUNG, N.J., P.T. Quinlan y L.J. Goad. 1992. Progesterone metabolism *in vitro* in the decapod crustacean *Penaeus monodon*. Gen. Comp. Endocrinol., 87: 300-311.

## ANEXOS

### ELISA, análisis de ecciesteriodes .-

#### Reactivos:

- BSA, bovine serum albumine (SIGMA A-7888)
- DMSO, dimethylsulfoxide (SIGMA D-5879)
- EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid (E-5134)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxyde (Merck Perhydrol 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ref. # 7209)
- TMB, tetramethylbenzidine (DIGMA T-2885)
- Thimerosal (SIGMA T-5125)
- Tween 20, polyoxyethylenesorbitan monolaurate (SIGMA P-1379)
- Acido cítrico (SIGMA C-7129)
- Citrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, fosfato de potasio dibásico (ANACHEMIA, AC-7720)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, fosfato de potasio monobásico (ANACHEMIA, AC-7718)
- C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, acetato de sodio (SIGMA S-3272)
- Edsysone (SIGMA E-9004) y 20-hydroxyecdysone (SIGMA H-5142).
- Medium 199 modificado (Flow Laboratories)



**Soluciones:****1. Tampón EIA o tampón de fosfato.**

\* Solución Stock (1 M tampón de fosfato pH 7.4) para 250 ml.

- solución A, 35 g.  $K_2HPO_4$  en 200 ml de agua destilada.

- solución B, 7 g.  $KH_2PO_4$  en 50 ml de agua destilada.

- Agregar lentamente la solución B a la solución A hasta alcanzar un pH de 7.4

- Agregar 0.25 g. de Thimerosal (concentración final de 0.1%).

- Alicuotar en fracciones de 50 ml y guardas el stock en el congelador. No almacenar a 4 °C por más de un mes, ni recongelar.

**\* Tampón EIA (0.1 M tampón fosfato, solución diluida) para 500 ml.**

- Tomar 50 ml de solución stock

- Agregar 11.7 g. de NaCl, 0.185 g. de EDTA y 0.5 g. de BSA.

- Completar con agua destilada hasta 500 ml.

Se mantiene a 4 °C, no más de una semana.

**2. Solución de lavado de placas (0.01 M tampón de fosfato)**

- Tomar 2 ml de solución stock (1 M tampón).

- Agregar 100  $\mu$ l de Tween 20

- Llevar a 200 ml con agua destilada.

Mantener en refrigeración para su uso en el mismo día. Volumen para 1 microplaca (10 lavados).

### 3. Solución de revelación a la peroxydasa (para 20 placas).

#### \* Solución de coloración o solución stock TMB.

- Disolver 50 mg. de TMB (tetramethylbenzidine) en 10 ml de DMSO (dimethylsulfoxide).
- Distribuir en alícuotas de 500  $\mu$ l en 20 tubos de polypropylene.

Almacenar a 4 °C en la oscuridad hasta su uso. Válido por varias semanas.

#### \* Solución stock del tampón de revelación

- Preparar una solución de acetato de sodio 1 M (13.6 g. en 100 agua mili Q)
- Llevar a pH 6 con una solución de ácido cítrico 1 M (21 g. en 20 ml de agua mili Q pH 6) o con un tampón de acetato-citrato 1 M pH 6.

Se puede mantener por varias semanas a 4 °C.

#### \* Solución de agua oxigenada al 1%.

- Disolver 200 mg. de Urea Hydrogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 20 ml de agua mili Q. Se mantiene por varias semanas.

#### \* Reactivo de coloración (para una placa) preparar al momento

- Mezclar 2.5 ml de tampón de revelación, 22.5 ml de agua mili Q a temperatura ambiente, un tubo de 500  $\mu$ l de solución TMB (descongelar sin calentar) y 250  $\mu$ l de solución de agua oxigenada.

#### 4. Medio de Cultivo 199 con sales de Hanks.-

- Disolver el medio de cultivo (polvo) en menos de 1 litro de agua desionizada a temperatura ambiente (15 °C - 30 °C).
- Agregar a la solución: 11 g de NaCl, 0.40 g de KCl, 0.90 g de CaCl<sub>2</sub>, 3.30 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.13 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.53 g de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 2.383 g de HEPES, 0.06 g de prolina, 0.16 g de penicilina y 0.10 g de estreptomicina.
- Ajustar el pH a 7 con HCl. Filtrar el medio de cultivo con papel filtro Milipore de 0.22 µm.
- Almacenar a 4 °C.