

639.543
RTV



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

“Identificación de neuropéptidos estimulantes de la muda del camarón *Penaeus vannamei*”

Requisito para optar al grado de

MAGISTER EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD ACUICULTURA MARINA



Leonor Margarita Rivera Intriago



2001



D-27070

CIB

TESIS ELABORADA CON EL SUPORTE DE:



FUNDACION CENAIM-ESPOL



COOPERACION TECNICA BELGA



UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA



UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA



VITA

Leonor Margarita Rivera Intriago, hija de Rogelio Rivera Narváez y Holanda Intriago Cedeño, nació el 1 de Julio de 1971 en la ciudad de Machala, Provincia de El Oro, Ecuador. Ella es ingeniero en Acuicultura, graduada en la Universidad Técnica de Machala, en Septiembre de 1994. Ella fue aceptada en el programa de Maestría en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral en Octubre de 1999, becada por la Cooperación Técnica Belga.

DECLARACION EXPRESA

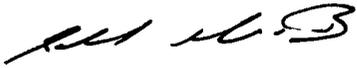
“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

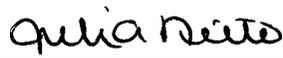


Leonor Margarita Rivera
Intriago.

TRIBUNAL DE TESIS



Ing. Eduardo Cervantes
Presidente del Tribunal



Julia Nieto, Ph.D.
Director de Tesis



Jorge Calderón V., Ph.D.
Miembro del Tribunal



Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal



Liliane Schoofs, Ph.D.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a Dios, ser supremo que siempre me da la luz y valentía para culminar mis metas.

A mis padres por haber inculcado siempre en mí los deseos de superación y porque siempre han estado junto a mí para ayudarme a seguir adelante.

A mis hermanos René, Gina, Holger y Vanessa, que siempre confiaron en mi capacidad.

A mi esposo por la comprensión que me ha brindado al entender que éste paso era muy importante para mí.

A mi tierno y dulce hijo Stalin Eduardo, que siempre estuvo conmigo despertando en mí con sus angelicales gestos y sonrisas, las fuerzas para seguir adelante.

Al Dr. Jorge Calderón, por darme la oportunidad de realizar mi maestría en ésta Prestigiosa Institución como es la ESPOL.

A la Dra. Laurence Massaut por su incondicional apoyo y por creer en mí.

A la Dra. Julia Nieto y a la Dra. Liliane Schoofs por guiar mi trabajo de Tesis.

Al Ing. Corral y al Ing. Campos de la Camaronera EXPOFRUTO, por la donación de los animales utilizados en mi tesis.

A todo el personal de CENAIM, al Ing. Andrés Pedrazoli porque de alguna manera supieron apoyarme cuando lo necesitaba.

A los Departamentos de Nutrición, Ambiental, Cultivo Celular, Maduración y Biblioteca por darme las facilidades para el desarrollo de mi tesis.



A las niñeras de mi hijo: Miriam y Amelia, que supieron cuidar muy bien de mi hijo durante mi maestría.

A la Universidad Técnica de Machala, por auspiciar mi beca, dando la oportunidad de tener una mejor preparación.

A mis amigas de siempre y compañeros de maestría que con su amistad aliviaron éste duro camino.

DEDICATORIA

Mi tesis de Maestría se la quiero dedicar a la persona mas pequeña, pero la mas grande de mi vida como es mi hijo Stalin Eduardo, por que juntos recibimos los estudios de la Maestría, juntos recibimos los golpes y triunfos de la misma, por que tú fuiste la persona que supo escucharme día tras día y aunque aún no puedes hablar estoy segura que en cada mirada tuya me dabas palabras de aliento y, que con tus tiernas caricias me dabas consuelo. A Dios le doy gracias por haber permitido tenerte junto a mí durante mi Maestría y no perder lo maravilloso que es ver como cada día ibas creciendo, motivando mis fuerzas para llegar a la meta.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcN	acetoni
CENAIM	centro nacional de acuicultura e
.....	investigaciones marinas.
EIA	enzyme inmuno assay (ensayo de
.....	innumoenzima)
HIM	hormon a inhibidora de la muda
HPLC	high performance liquid chromatography
.....	(cromatografía líquida de alta resolución)
n	número
ng	nanogramo
OY	órgan 0 Y
PTTH	hormona prothoracicotrópica
rpm	revoluciones por minuto
SNC	sistema nervioso central
t₁	tiempo 1
t₂	tiemp 0 2
t₃	tiempo 3
TFA	ácido trifluor acético
μL	microlitro

LISTA DE CONTENIDOS

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	i
<u>LISTA DE CONTENIDO</u>	ii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	iii
<u>RESUMEN</u>	iv
<u>1. INTRODUCCION</u>	1
<u>2. REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	3
2.1. <u>LA MUDA</u>	3
2.2. <u>CONTROL DE LA MUDA</u>	
2.2.1. <u>Hormona Inhibidora de la Muda</u>	4
2.2.2. <u>Hormona de la Muda</u>	5
2.2.3. <u>Hormona estimulante de ecdiesteroides</u>	6
<u>3. MATERIALES Y METODOS</u>	8
3.1. <u>ANIMALES</u>	8
3.2. <u>PREPARACION DEL EXTRACTO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u> ... 8	
3.2.1. <u>Purificación</u>	9
3.3. <u>BIOENSAYO</u>	11
3.3.1. <u>Diseción del órgano "Y"</u>	11
3.3.2. <u>Cultivos de órganos "y" <i>in vitro</i></u>	11
3.3.3. <u>Determinación de Ecdiesteroides</u>	12
<u>4. RESULTADOS</u>	14
<u>5. DISCUSION</u>	18
<u>6. CONCLUSION</u>	22
<u>7. BIBLIOGRAFIA</u>	23

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Estadios del Ciclo de Muda: Observación microscópica de la separación de la epidermis y la cutícula en urópodos de <i>Penaeus stylirostris</i> y <i>Penaeus setiferus</i>	4
Fig. 2. Ubicación del órgano Y en Peneidos.....	5
Fig. 3. Principales moléculas de ecdiesteroides en crustáceos: a) ecdisona y b) 20-hidroxiecdisona.....	6
Fig. 4. Esquema del sistema nervioso central de <i>Penaeus vannamei</i>	9
Fig. 5. Cromatograma resultante de la primera purificación utilizando la columna Bondapak. Se indica en la figura el programa utilizado y las fracciones positivas resultantes luego de la prueba en el bioensayo.....	15
Fig. 6. Cromatograma resultante de la segunda purificación utilizando una columna S5C1. Se indica el programa utilizado, las fracciones positivas resultantes luego de la prueba en el bioensayo y la fracción seleccionada para la tercera purificación.....	15
Fig. 7. Cromatograma resultante de la tercera purificación utilizando una columna C8. En la figura se indica el programa utilizado y la fracción que obtuvo la mayor estimulación luego de la prueba en el bioensayo.....	16
Fig. 8. Cromatograma resultante de la cuarta purificación utilizando una columna S5C1. Se indica el programa utilizado y las fracciones positivas resultantes luego de la prueba en el bioensayo.....	17

RESUMEN

Se reporta la identificación y purificación de péptidos ecdisiotrópicos en el sistema nervioso central (cerebro, ganglio torácico y cordón nervioso) del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Cuatro mil sistemas nerviosos de juveniles (13-16 g) fueron extraídos en un solvente acidificado, posteriormente se utilizaron cinco pasos de purificación por sistemas de columnas en HPLC, se obtuvo cuatro péptidos. Las fracciones colectadas luego de cada paso fueron probadas sobre órganos "Y" cultivados *in vitro* y se verificó su efecto sobre la producción de ecdiesteroides por medio de un inmunoensayo para ecdiesteroides.

Luego de cada paso de purificación, varias fracciones resultaron positivas en los bioensayos. Se escogió la fracción con mayor estimulación para proseguir con la siguiente purificación. Después de la cuarta purificación cuatro picos ecdisiotrópicos fueron obtenidos. Estos creyéndose puros fueron secuenciados para determinar sus masas **através** de MALDI-TOF-MS. Pero se observó que uno de los picos contenía seis masas (872 Da, 1392 Da, 1598 Da, 1554 Da, 1742 Da y 1100 Da), sugiriendo que el compuesto no era puro y mas bien era una mezcla de 6 compuestos. Los compuestos fueron procesados a través de una quinta columna con el objetivo de separarlos para eventualmente secuenciarlos.



1. INTRODUCCION

La muda es un proceso que ocurre en forma periódica en el camarón, e implica el desprendimiento del tejido conectivo entre la epidermis y la cutícula, permitiendo así su crecimiento (Chang 1991).

Como proceso fisiológico, la muda tiene un impacto en la industria camaronera, pudiendo ser beneficiosa (muda por crecimiento) o presentarse en situaciones problemáticas (estrés y enfermedades).

Es posible que cuando la muda se da en ambientes con animales enfermos la propagación de la enfermedad es más rápida ya que los animales están débiles y las bacterias y/o virus aprovechan estas condiciones. Por otra parte, se ha observado una relación de la muda con ciertas enfermedades (Le Moullac *et al.* 1997), tales como el Síndrome de Taura, la Mancha Blanca e IHHNV, en los cuales los animales muertos presentan como característica exoesqueletos blandos, sugiriendo una relación entre éstos dos procesos.

Por otro lado, Boddeke *et al.* (1978) mencionan que el ciclo de muda debe ser considerado en el manejo del cultivo del camarón a nivel de camaronera, ya que siempre se tienen camarones en diferentes estadios de muda donde un porcentaje de ellos no se alimentan. Aplicar las raciones alimenticias sin considerar dicho aspecto repercutirá en los costos de producción asociados a la alimentación (Molina 2001). Una solución sería la sincronización de la muda, obteniendo así una reducción en la conversión alimenticia y por ende una reducción en gastos de alimento. De igual manera la sincronización de la muda mejoraría las ganancias al tiempo de cosecha, debido a que la condición del exoesqueleto (blando o duro) define el precio de venta del camarón, por lo tanto resultaría conveniente poder inducir la muda a los camarones antes de las cosechas planificadas para así mejorar el precio y calidad del producto.

Adicionalmente, la muda está relacionada con la maduración de hembras en cautiverio. La maduración per se es un proceso de gran demanda energética y está alternada con ciclos de crecimiento (muda-maduración-muda), el cual conlleva a un desgaste físico del animal. Por lo tanto es importante considerar el ciclo de muda al inducir a maduración en cautiverio. A nivel de laboratorio, la ablación del pedúnculo ocular es una práctica común para acelerar la maduración ovárica (Yano 1993). Se sugiere realizar ésta operación en la fase de intermuda con el fin de optimizar la eficiencia de la ablación (Browdy 1992), ya que en la intermuda no se produce una interferencia entre los procesos de muda y de reproducción. Si se procede a operar a los animales en post-muda los camarones por estar blandos tienden a morir por estrés, mientras que en premuda, por conflicto entre los dos procesos tardan en madurar o nunca lo logran (Aquacop 1977; 1979; Browdy 1992).

Por todos los aspectos antes anotados, es evidente que si podemos controlar y sincronizar la muda, podríamos beneficiar a la industria camaronera, mejorando el precio del camarón a la cosecha, reduciendo los costos de alimento y maximizando las técnicas de inducción a maduración. Por último una mejor comprensión del proceso de muda, nos ayudaría a entender su relación con el estrés y las enfermedades.

El presente trabajo propone la búsqueda de una hormona que nos permita controlar la muda. Este estudio pretende identificar una hormona en el sistema nervioso del camarón ***Penaeus vannamei***, que estimule la producción de la hormona de la muda (ecdioesteroides). La existencia de ésta hormona se basa en la analogía de la **endocrinología** de crustáceos e insectos.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. LA MUDA

La muda para los crustáceos representa la posibilidad de llevar a cabo los procesos normales de crecimiento, ocurriendo de forma cíclica cada vez que el organismo está preparado para aumentar de talla y peso (Bliss 1985). El ciclo de muda en **peneidos** ha sido clasificado en varios estadios, basándose en diferentes criterios, tales como cambios externos en el color y textura del exoesqueleto, así como también cambios en el desarrollo de nuevas setas (Robertson *et al.* 1987). Schafer (1968) propuso para ***Penaeus duorarum*** otra clasificación basándose en los cambios morfológicas en los pleópodos, mientras que Huner y Colvin (1979) para ***Penaeus californiensis*** y ***Penaeus stylirostris*** se basaron en cambios morfológicos en los urópodos.

Bajo criterios de la clasificación realizada por Robertson *et al.* (1987) para ***P. stylirostris*** y ***Penaeus setiferus***, la muda presenta cuatro estadios (Fig. 1):

- 1.- Post muda temprana (estadio A) y post muda tardía (estadio B), que comprende el período posterior a la muda. Externamente ésta fase se caracteriza por presentar la cutícula suave y la epidermis transparente con pequeñas pigmentaciones. Microscópicamente es mínima o nula la distancia entre la cutícula y la epidermis.
- 2.- Intermuda (estadio C), es la fase en la cual externamente el exoesqueleto denota su máxima rigidez. Microscópicamente presenta poca distancia entre la cutícula y la epidermis.
- 3.- Premuda (estadio Do), comprende la premuda temprana (Do-D₁) y la premuda tardía (D₂-D₃). En ésta fase el animal se prepara para eliminar el exoesqueleto. Microscópicamente se observa una gradual separación entre la epidermis y la



cutícula. En éste estadio se reabsorbe la cutícula antigua para formar la nueva cutícula.

- 4.- Ecdisis (estadio E), implica el desprendimiento del antiguo exoesqueleto para dar lugar al endurecimiento de un nuevo exoesqueleto.

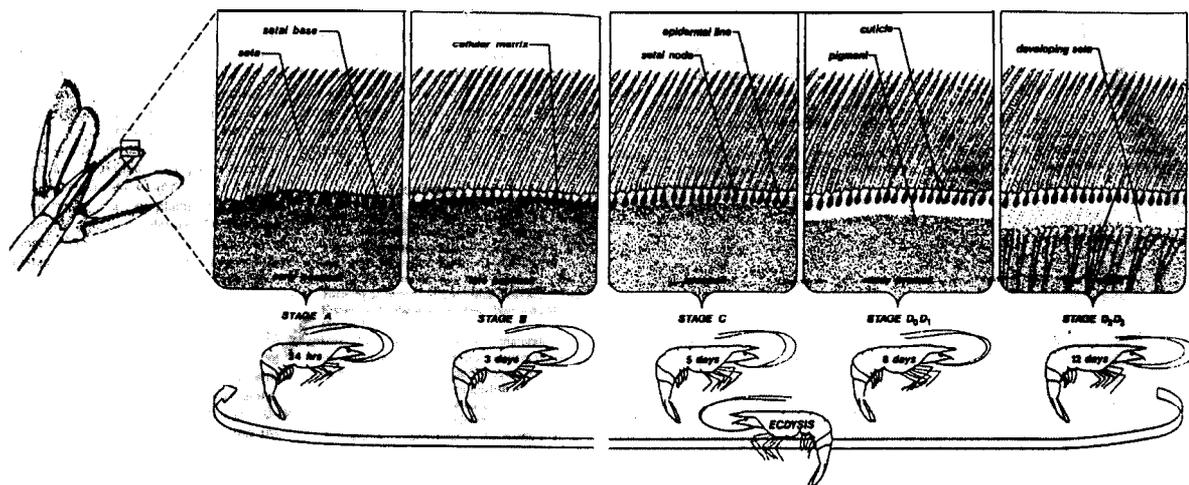


Fig 1. **Estadios** del ciclo de muda : Observación microscópica de la separación de la epidermis y la cutícula en urópodos de *Penaeus stylirostris* y *Penaeus setiferus* (tomado de Robertson *et al.* 1987).

2.2. CONTROL DE LA MUDA

El modelo actual de control hormonal de la muda involucra a la hormona inhibidora de la muda (HIM) y a la hormona de la muda (ecdisona) (Skinner 1985).

2.2.1. Hormona Inhibidora de la Muda

Zeleny en 1905, observó que removiendo los pedúnculos oculares del cangrejo *Uca pugilator* se aceleraba la frecuencia de la muda, lo que sirvió de base para realizar

experimentos similares, en diferentes crustáceos tales como *Callinectes sapidus* (Skinner y Graham 1972), *Eriocheir sinensis* (De Leersnyder 1967), *Gecarcinus lateralis* (Holland y Skinner, 1976), entre otros. Por otro lado Bliss (1951) indicó la existencia en el pedúnculo ocular de la glándula sinusal, donde se produce un factor responsable del control negativo de las tasas de secreción de ecdisona por el órgano "Y". Se llamó a éste factor Hormona Inhibidora de la Muda (Chang 1985). Adicionalmente Yang *et al.* (1995) demostraron mediante cultivos *in vitro* del órgano "Y" de *Penaeus japonicus* conjuntamente con la hormona inhibidora de la muda, que ésta inhibía la producción de ecdiesteroides.

2.2.2. Hormona de la muda

La hormona de la muda es producida y liberada por el órgano "Y" (Fig. 2), el cual es una estructura **endócrina** no neural, situada en la segunda antena o segundo segmento maxilar en cangrejos (Sedlmeier y Fenrich 1993). Adicionalmente, se sabe que el órgano "Y" secreta ecdisona a partir del colesterol; posteriormente la ecdisona es liberada al torrente sanguíneo donde es convertida a 20-hidroxiecdisona por contacto con la epidermis (Lachaise y Lafont 1984).

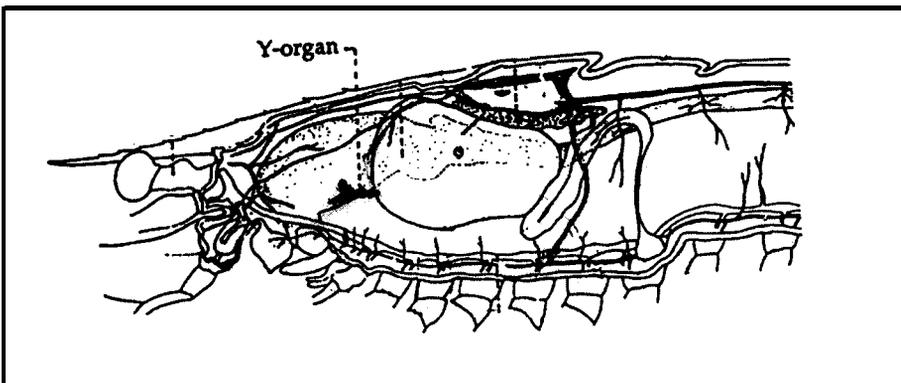


Fig. 2. Ubicación del órgano Y en *Peneidos* (tomado de Séfiani 1996)



Varios trabajos sobre la caracterización de hormonas de muda en artrópodos han sido conducidos sobre insectos y crustáceos, trabajos que han permitido determinar a la 20-hidroxiecdisona (Fig. 3) como la forma activa y circulante de la hormona de la muda (Horn et al 1966; Hampshire y Horn 1966).

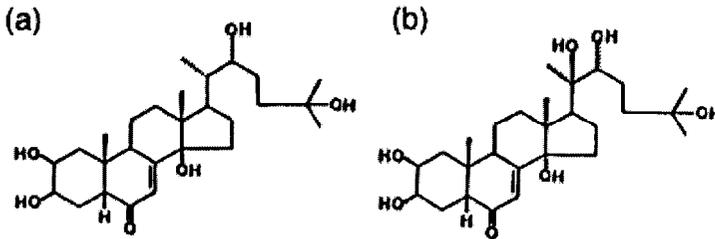


Fig. 3. Principales moléculas de ecdiesteroides en crustáceos: a) ecdisona y b) 20-hidroxiecdisona (Tomado de Huberman 2000)

Se tiene conocimiento que en *P. vannamei*, la circulación de 20-hidroxiecdisona varía a lo largo del ciclo de muda, siendo bajas sus concentraciones durante el período intermuda, produciéndose un incremento dramático durante la premuda para luego disminuir precipitadamente previo a la exuvia (Nieto 2000).

2.2.3. Hormona estimulante de ecdiesteroides

Si bien es cierto que la ecdisona es la hormona de la muda, existen evidencias que soportan la existencia de otra hormona que controla la producción de ecdiesteroides por el órgano Y, una hormona estimuladora de ecdiesteroides (Carlisle y Dohrn 1953; Martin *et al.* 1980). Esto ha sido demostrado en *Homarus americanus* (Chang y Bruce 1980; Chang 1985) y en cangrejos *Uca pugilator*, en ésta última especie se observó que a pesar que sus pedúnculos oculares fueran extirpados se producían variaciones en la concentración de ecdiesteroides durante el ciclo de muda (Hopkins 1983; 1986).

Adicionalmente se ha observado que existe una relación en los efectos de cambios intracelulares de calcio producidos en órganos "Y" del **crayfish**, ya que altos niveles de calcio intracelular incrementan en forma significativa la biosíntesis de ecdiesteroides *in vitro* (Sedlmeier *et al.* 1999).

Nieto (2000) soporta la existencia de un factor estimulador de ecdiesteroides, a la que llama Ecdiesiotropina, la que sería de acción análoga a la hormona Protoracicotrópica (PTTH) producida por el cerebro de insectos (Smith y Sedlmeier 1990; Watson *et al.* 1993) y que estimula a la glándula protorácica para la síntesis de ecdiesteroides.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ANIMALES

Juveniles de *P. vannamei* (13-16 g) fueron cosechados de piscinas camaroneras (EXPROFRUTO) de la Provincia del Guayas. Los animales fueron mantenidos en tanques internos del laboratorio de maduración del CENAIM, donde fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado hasta ser utilizados.

3.2. PREPARACION DEL EXTRACTO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Cuatro mil juveniles *Penaeus vannamei* (13-16 g) fueron **disectados** para la preparación de un extracto del sistema nervioso (cerebro, ganglio toraxico y cordón nervioso) (Fig. 4). Para la disección se eliminó el exoesqueleto del cefalotórax, el hepatopáncreas, el estómago y los pedúnculos oculares desde la base, justo debajo de los cuales se encuentra el cerebro. A continuación se extrajo el ganglio torácico siguiendo por la región ventral del cefalotórax (base de los pleópodos) y el cordón nervioso en el abdómen.

Estos tejidos fueron homogenizados en una solución metanólica (metanol: agua: ácido **acético 90:9:1**), sonicados y centrifugados a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en solución metanólica y se repitió el proceso nuevamente. Se juntaron los dos sobrenadantes y se evaporó el metanol por rotavapor. Se transfirió la fase acuosa a tubos de polipropileno y se adicionó un volumen igual de acetato de etilo, se agitó por 5 minutos y centrifugó a 13. 000 rpm 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, se agitó nuevamente centrifugando y recuperando la capa inferior. Posteriormente se eliminó el remanente de n-hexano por rotaevaporación,

resultando en un extracto acuoso con neuropéptidos.

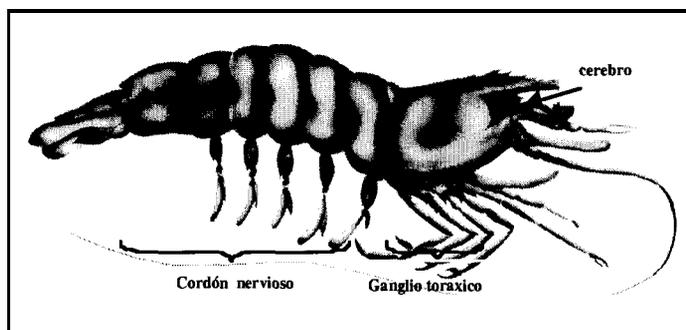


Fig. 4. Esquema del sistema nervioso central de *Penaeus vannamei* (tomado de Bell y Lightner 1988)

Como paso de purificación previo al uso del HPLC se utilizaron columnas preparativas C18 Varian, fueron enjuagadas con 25 mL de solución acetonitrilo (90% AcN y 0,1 % de TFA) y posteriormente con 25 mL de agua miliQ 0,1 % TFA. Seguidamente se filtró el extracto de neuropéptidos por filtros milipore 0,2 μm antes de cargar la columna y se dejó pasar el extracto sin conservar el efluente. Se realizó un lavado con 25 mL de agua mili-Q 0,1 % TFA (sin recoger el efluente). Se eluyó los neuropéptidos adheridos a la columna, realizando un lavado con 25 mL de solución de AcN al 50% y 0,1% de TFA, recolectando el **efluente** (extracto llamado 50 % Acetonitrilo). 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 % Acetonitrilo).

3.2.1. Purificación

Para la purificación se utilizó un HPLC (Schimadzu, modelo LC-6 A). Para la inyección del extracto se eliminó primeramente el AcN del extracto de 50% AcN mediante rotaevaporación, luego se dividió el volumen del extracto en dos partes (A-B) debido a que



la muestra completa representa demasiada carga para la columna, se inyectó la primera parte a la primera columna semipreparativa Bondapak C18 (25 x 100 mm; 3 nm; 15 μm , Waters Corporation). Para la corrida se utilizaron 2 soluciones: A (agua miliQ y 0,1% TFA) y B (50% AcN; 0.1% TFA). El programa de elución fue de: 0-10 min con 100% de A, 10-150 min con un gradiente de 100% A-1 00% B. Se utilizó un flujo de 6 ml/min y se recogió las fracciones cada dos minutos Este proceso fue repetido para la parte B del extracto corriendo el mismo programa.

Las fracciones seleccionadas para la segunda purificación fueron inyectadas de igual manera que en la primera purificación, en dos partes (A y B) a una segunda columna semi analítica S5C1 (4,6 x 250 mm; Waters Corporation). Las soluciones utilizadas para la elución fueron las mismas de la corrida anterior, aplicando un programa de: 0- 10 min con 100% de A; 10-70 min con 0-50% B; 70-100 min con 50-100% B; 100-110 min con 50-100% B y un flujo de 1 ml/min. Los eluentes fueron recogidos de acuerdo a los picos representados en el cromatograma (proceso similar para las purificaciones posteriores).

Para la tercera purificación la fracción escogida del paso anterior fue inyectada a una columna analítica C8 waters Spherisorb (250mm, 5 μm , Waters Corporation). Para ésta corrida se cambió la solución B (60% de AcN : 40 % de agua miliQ: 0,1% TFA). El programa a seguir fue 0-10 min con 0-25%B; 10-30 min con 25-50% B; 30-40 min con 50-50% B; 40-100 min con 50-100% B. Se utilizó un flujo de 1 ml/min.

A la cuarta columna se inyectó la fracción positiva de la purificación anterior, siendo ésta una columna semi analítica S5C 1, cuyas especificaciones se detallaron anteriormente. Las soluciones utilizadas para la elución fueron las mismas de la corrida anterior. El programa a seguir fue 0-5 min con 0-25% de B; 5-65 min con 25-50% B; 65-75 min con 50-50% B; 75-80 min con 50-100%B .

3.3. BIOENSAYO

3.3.1. Disección del Órgano "Y"

Posterior a la identificación del estadio de muda C-Do en los animales (según metodología de Robertson *et al.* 1987), los camarones fueron colocados en agua salada con hielo por 5 minutos, para desacelerar el metabolismo. Luego se realizó un corte longitudinal, separando el cefalotórax del abdomen seguido por un segundo corte desde la región ventral a la dorsal, dividiendo el cefalotórax 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 branchiopodito hasta un nervio que se observa transversalmente. Luego se completó el corte hacia arriba y en los extremos en forma de un rectángulo. Se transfirió cada órgano Y a un microtubo con agua de mar estéril (4°C) por 10 minutos, para su estabilización previa a la incubación en el medio de cultivo.

3.3.2. Cultivo de órganos "Y" *in vitro*

Una vez disectados los órganos "Y" y haberlos mantenido en agua de mar estéril, durante un mínimo de 10 minutos a 4°C, se transfirió cada órgano "Y" a una celda en las cajas microelisa (marca Nunc-ImmunoTM surface) que contenía 200 µL de medio de cultivo M199 (preparación según Blais *et al.* 1994) por el lapso de una hora (ti). Luego de la primera hora de incubación, un órgano "Y" (tratamiento) fue removido a una celda que contenía medio de cultivo fresco y 10 µL de extracto del sistema nervioso, mientras que el



otro órgano "Y" (control) se depositó en una celda con medio de cultivo fresco sin extracto del sistema nervioso. Ambos órganos Y fueron incubados por un lapso de dos horas (t_2). Posteriormente los órganos Y fueron removidos a otra celda con medio de cultivo fresco por una hora más (t_3). Terminado el tercer período de incubación, se desecharon los órganos Y almacenando las muestras de medio de cultivo a una temperatura de -20°C .

3.3.3. Determinación de Ecdiesteroides

La cuantificación de la producción de ecdiesteroides fue realizada por EIA, según la metodología indicada por Blais *et al.* (1994). El anticuerpo 20-hidroxiecdisona (AS4919) fue donado por el Prof. Patrick Porcheron (Universidad de Paris, Francia). El tracer enzimático (20-hidroxiecdisona fijado a la peroxidasa) fue generosamente obsequiado por el Prof. Delbeque (Lyon-Francia). La calibración de la curva fue realizada con 20-hidroxiecdisona (SIGMA H-5 142).

La lectura se realizó en un espectrofotómetro BIOCHRAMIT a 620 nm. La información obtenida (absorbancias) fueron transformadas utilizando la fórmula:

$$\frac{S - B}{Bo - B} \times 100$$

B : es igual a la absorbancia del blanco

S: es igual a la absorbancia del estándar o muestra

Bo: es igual a la absorbancia del control de 100% de unión

Para determinar el grado de estimulación de ecdiesteroides se relacionó la concentración obtenida del t_1 y el t_3 para el tratamiento y el control del proceso de incubación (ver ejemplo).

-Primera hora (t_1)

Concentración de ecdiesteroides del OY-Tratamiento	73,11 ng/mL
Concentración de ecdiesteroides del OY- control	108,0 ng/mL
Tasa de la concentración de ecdiesteroides T_1	$73.11/108 = 0,68$

-Tercera hora (t_3)

Concentración de ecdiesteroides del OY-Tratamiento	0,7 0ng/ml
Concentración de ecdiesteroides del OY- control	0,25 ng/ml
Promedio de la concentración de ecdiesteroides T_3	$0,7/0,25 = 0,36$

-Relación de la tasa de producción t_3/t_1

Tasa del t_1 : 0,68 ng/ml

Tasa del t_3 : 0,36 ng/ml

*Tasa de estimulación: $0,36/0,68 = 0,53$

*Si la tasa de estimulación es >1 : Hubo estimulación en comparación con el control

*Si la tasa de estimulación es < 1 : El tratamiento produjo una inhibición en comparación con el control.

4. RESULTADOS

Cuatro mil sistemas nerviosos de juveniles *P. vannamei* fueron disectados y procesados según se indica en el capítulo de materiales y métodos. De la primera purificación (columna Bondapak) se obtuvo 144 fracciones, las cuales fueron agrupadas en lotes de 5 fracciones consecutivas para determinar su efecto sobre órganos Y cultivados *in vitro*. De la primera columna se obtuvieron 5 pools positivos en el bioensayo, de los cuales se escogió el que tuvo mayor estimulación (6,6 veces mayor que control para ser probado individualmente). Posteriormente se probaron en forma individual las fracciones que comprendieron al pool positivo, resultando estimulantes dos de ellas (fracciones 67 y 68) (Fig. 5) para ambos lotes (A y B). Estas fracciones eluyeron bajo condiciones del 80% del solvente B (es decir a 40% AcN) a 142-146 minutos.

Para la segunda purificación se mezclaron las 2 fracciones positivas de cada lote (67 y 68 del batch A; 67 y 68 del batch B) y se inyectaron a la segunda columna S5C1. Se obtuvieron 56 picos (Fig. 6), resultando positivos en el bioensayo 2 picos (picos 3 y 7) con 25 y 50 veces mayor que t_1 . Los picos 3 del batch A y 7 del batch B eluyeron bajo condiciones del 60% de B (30% AcN) y 34% de B (17% AcN) respectivamente, a un tiempo de 35 min para la fracción 3 y 29 min para el pico 7.

Para la tercera purificación los dos picos (lote A y B) de la segunda purificación que presentaron mayor estimulación fueron inyectados y procesados en la tercera columna (C8), obteniendo 74 picos (Fig. 7), de los cuales 12 fueron positivos luego de la prueba *in vitro*. Se escogió el pico 9 para continuar la siguiente columna de purificación, por haber obtenido la mayor tasa de estimulación (48). Este pico eluyó bajo el 57% de B (28,1% AcN) a un tiempo de 26 min.

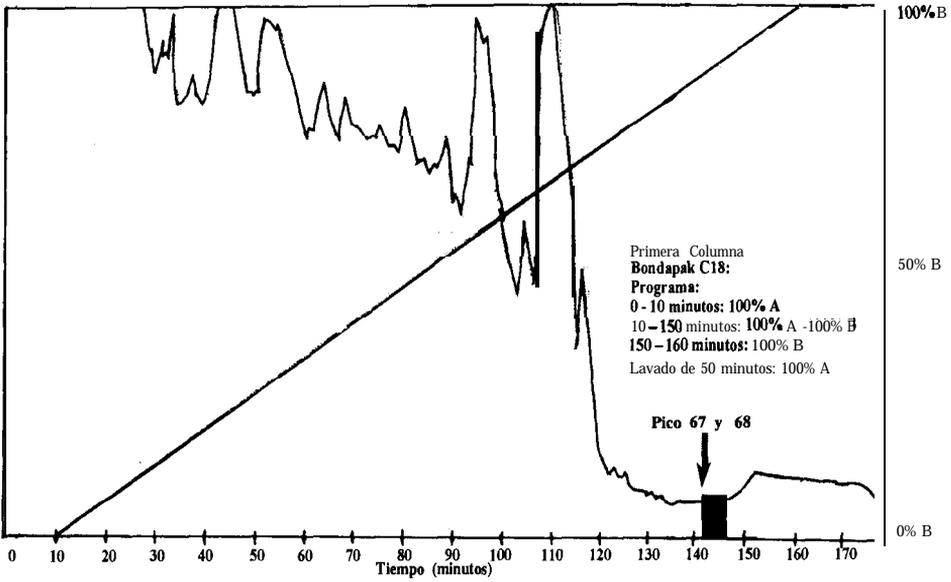


Fig. 5. Cromatograma resultante de la primera purificación utilizando la columna Bondapak. Se indica en la figura el programa utilizado y las fracciones positivas resultantes luego de la prueba en el bioensayo (con una flecha).

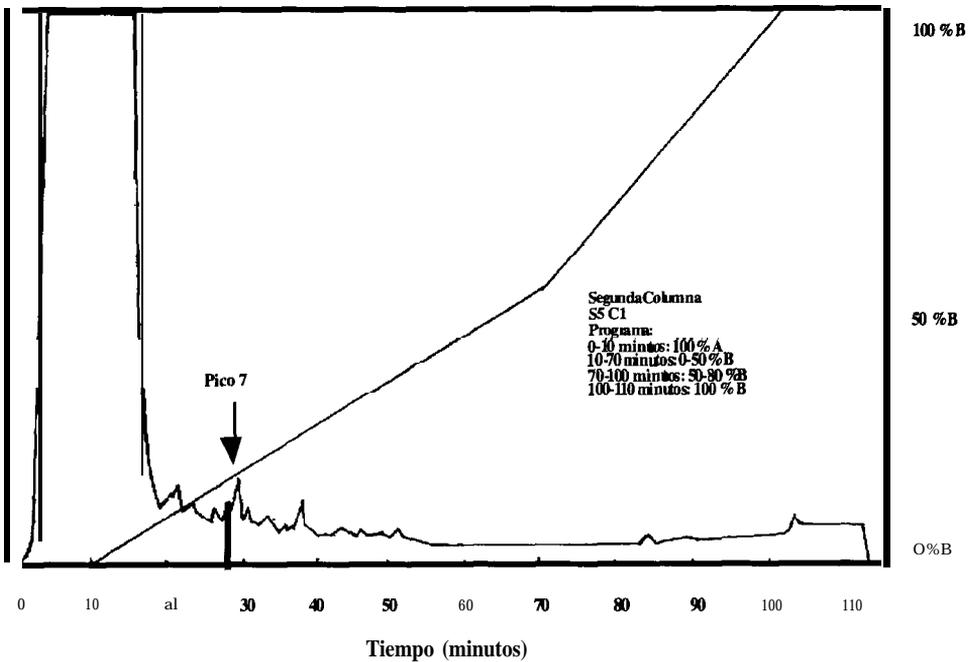


Fig. 6. Cromatograma resultante de la segunda purificación utilizando una columna S5C1. Se indica el programa utilizado, la fracción positiva resultante luego de la prueba en el bioensayo y la fracción seleccionada para la tercera purificación (marcada en la parte inferior)

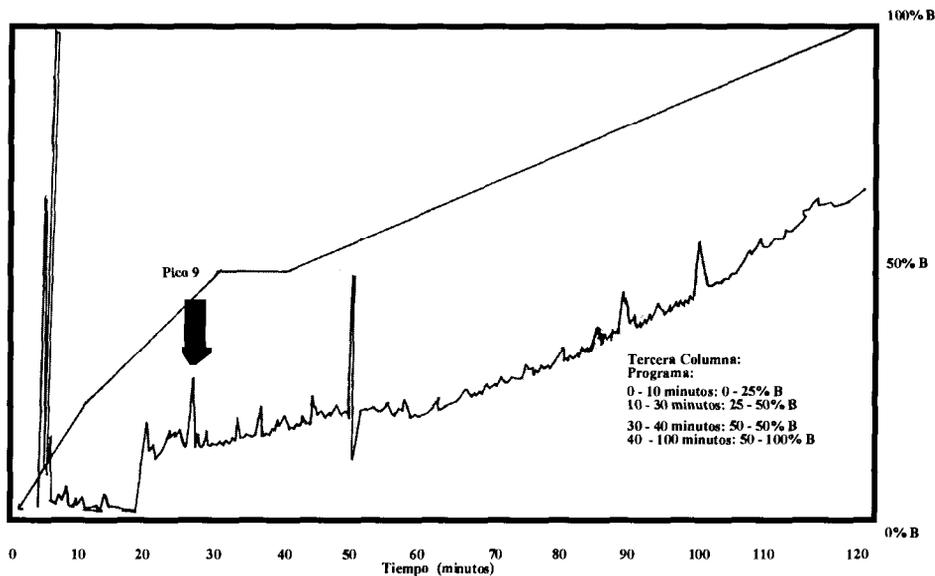


Fig. 7. Cromatograma resultante de la tercera purificación utilizando una columna C8. En la figura se indica el programa utilizado y la fracción que obtuvo la mayor estimulación luego de la prueba en el bioensayo.

El pico positivo resultante de la tercera purificación se inyectó a la cuarta columna S5C1 obteniendo 55 picos (Fig. 8). Luego de probarlos resultaron positivos 16 de ellos. Posteriormente se escogieron los picos que presentaron mayor estimulación: 11, 20, 21, y 47 (con una estimulación de 4, 25, 18 y 5 mayor que t_1). Estos picos eluyeron bajo condiciones de 56%, 70%, 72% y 100%B (es decir 28%, 35%, 36%, 50% de AcN), a un tiempo de 12 min, 27 min, 28 min y 67 min respectivamente. Las muestras mencionadas fueron liofilizadas y enviadas a laboratorio del Instituto de Zoología de la Universidad Católica de Lobaina-Bélgica para determinar su masa y secuenciación.

Se analizaron las masas de los picos seleccionados, de los cuales sólo el pico 21 presentó la suficiente cantidad de material para ser analizados en el lector de masas (MALDI-TOF-MS), detectando que éste pico posee 6 posibles péptidos. Estos 6 picos fueron pasados por una quinta columna para ser separados y poder secuenciarlos en forma individual. Las masas resultantes fueron 872 Da, 1392 Da, 1598 Da, 1554 Da, 1742 Da y 1100 Da.

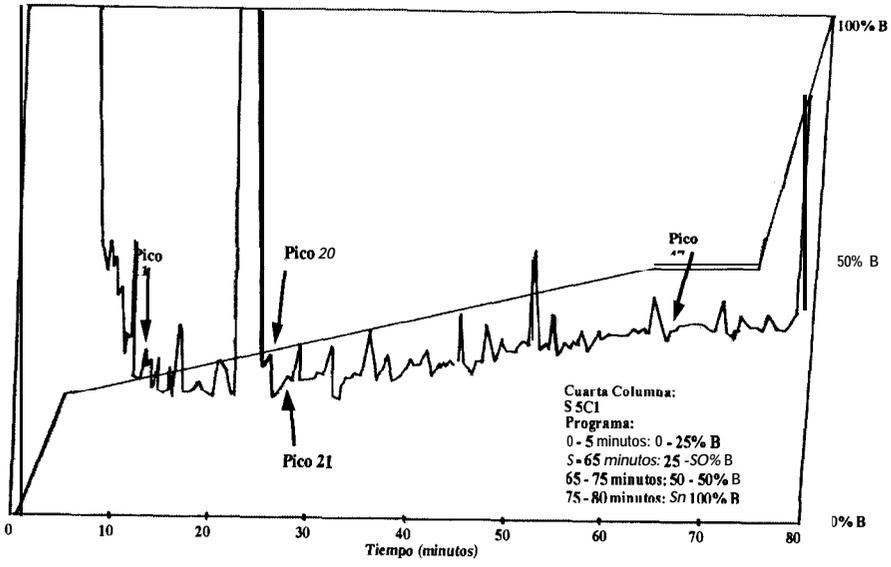


Fig. 8. Cromatograma resultante de la cuarta purificación utilizando una columna S5C1. Se indica el programa utilizado y las fracciones positivas resultantes luego de la prueba en el bioensayo.

5. DISCUSION

En éste trabajo se reporta la identificación y purificación en el sistema nervioso de camarones juveniles *Penaeus vannamei* de varios compuestos que estimulan la producción de ecdiesteroides por parte del órgano "Y".

Tradicionalmente, la **endocrinología** de crustáceos ha aceptado por más de dos décadas el modelo de control de la muda que involucra dos hormonas, la hormona de la muda *per se* (ecdisona) y una hormona inhibidora de la producción de ecdisona, la cual está presente en el pedúnculo ocular, e nhibe directamente al órgano "Y" a producir ecdiesteroides. Durante mucho tiempo éste modelo bihormonal ha sido aceptado, pero en contadas ocasiones se ha sugerido la existencia de una tercera hormona que controlaría positivamente la producción de ecdiesteroides

La idea de la existencia de una hormona estimuladora de la producción de edisteroides en insectos es muy antigua, ya que fue **Kopec** quien en 1922, planteó la hipótesis que el cerebro estaba involucrado en la regulación de la muda. Esta hipótesis fue años más tarde comprobada con el uso de cultivos *in vitro*, a través de los cuales se demostró que en el cerebro de los insectos existían distintas células que sintetizan una neurohormona llamada en aquel entonces hormona del cerebro (Williams 1947) o conocida también como hormona Prothoracicotrópica (PTTH), la misma que está involucrada en la estimulación de la secreción de ecdisona por la glándula prototorácica en insectos (Smith y Sedlmeier. 1990).

Mediante estudios realizados en *Manduca sexta* se purificó la hormona protoracicotrópica (PTTH), identificando dos, una de tamaño relativamente grande (28Kda) y otra pequeña (7 Kda) (Bollenbacher *et al.* 1984). Por otra parte, Hopkins en 1983 y 1986 sugirió la existencia de una hormona similar en crustáceos, basada en el hecho de que al ablacionar bilateralmente a cangrejos *Uca pugilator* estos pudieron modular los niveles de ecdiesteroides sin la acción de la hormona inhibidora que está normalmente presente en el pedúnculo ocular. Más recientemente, *se observó in vitro*, que los órganos "Y" fueron estimulados a producir ecdiesteroides al incrementar el calcio intracelular (mensajero

secundario), lo que sugiere que algún compuesto debe utilizar este incremento en calcio para ejercer una acción sobre el órgano "Y", que en este caso sería una acción estimuladora (Smith y Sedlmeier. 1990).

Basados en éstos conocimientos y en la similaridad de la regulación **endócrina** de la muda de los crustáceos con los insectos, se concibió éste estudio con el sistema nervioso del camarón (cerebro, ganglio torácico y cordón nervioso) *Penaeus vannamei*, probando mediante cultivos *in vitro* la estimulación de producción de ecdiesteroides por el órgano "Y" ante el contacto con el extracto del sistema nervioso central del camarón (SNC).

Durante el transcurso de los diversos pasos de purificación se observó la presencia de varios compuestos que estimulaban en diferente grado la producción de ecdiesteroides. En cada caso, se escogió aquel que tenía mayor estimulación, sin embargo el hecho de que varios compuestos estuvieran presentes resultó sorprendente. Este hecho puede deberse quizás a que éstos son el resultado de diferentes versiones de transcripción de un mismo gen, los cuales varían tan solo en algunos **amino** ácidos, lo cual resultaría en una disminución en la actividad. En crustáceos la familia de la CHH (Hormona Hiperglicemiante) es un claro ejemplo de secuencias similares (isoformas) con diferente grado de actividad y con tiempos de **elución** muy cercanos (Huberman 2000). Desafortunadamente con los resultados con los que se cuenta al momento no podemos confirmar ninguna de estas posibilidades, es necesario primero purificar todos los compuestos que han presentado una actividad a lo largo del proceso de purificación, y verificar si existe una similitud en sus secuencias y confirmar su actividad con versiones sintéticos de los mismos.

Apesar que no se pudo concluir éste trabajo con la secuencia de los compuestos identificados, podemos realizar inferencias con respecto a algunas características que se pudo observar durante su purificación. El programa de purificación utilizado se basó en columnas que seleccionan compuestos dependiendo de su afinidad por el agua. Los péptidos son de carácter hidrofílico, por lo que se espera que eluyan bajo condiciones de

baja concentración de solventes. En el caso de la fracción inicial de purificación (fracción 67 y 68 de la primera columna de purificación – Bondapak) ésta eluyó a una alta concentración de acetonitrilo, casi al límite para un péptido. Es posible que ésta característica sea importante para su funcionabilidad, y que esté definida por su conformación estructural. Con respecto a las masas de los péptidos obtenidos (800 – 1800 daltons), estos corresponderían a compuestos que podrían variar entre 10 hasta 25 amino ácidos. La literatura existente para insectos indica que la hormona protoracicotrópica tiene peso mucho mayor (28,000 y 7,000 daltons), por lo tanto, los péptidos identificados no estarían relacionados. Por otro lado, puede ser que los péptidos identificados **estén** relacionados con la insulina. Nogueira et *al.* (1996) identificaron en *Manduca sexta*, que durante el proceso de metamorfosis, un péptido tipo insulina era evidenciado en células neurosecretoras; con el **fin** de confirmar ésta hipótesis actualmente se **están** realizando pruebas sobre el efecto *in vitro* de insulina sobre la producción de ecdiesteroides con el órgano "Y".

Una vez que se cuente con el(los) péptido(s) puro(s) correspondiente(s) a el(los) factor(es) ecdisiotrópico(s), aún se requiere de varios estudios para poder confirmar y comprender el rol y la utilidad de este(os) péptido(s) para la industria camaronera. Primeramente se deberá confirmar la secuencia del péptido, para lo cual éste deberá ser sintetizado y probado nuevamente en el bioensayo *in vitro* y posteriormente *in vivo*.

La verificación de la acción *in vivo* de un péptido purificado con un bioensayo *in vitro* es vital para la confirmación de la función, Con respecto a estudios fisiológicos, un anticuerpo policlonal puede ser preparado con el fin de contar con un método de detección y cuantificación de éste compuesto para estudios de cinética de producción, momento de síntesis y liberación e identificación de las células productoras.

Para la aplicación del péptido en el control y sincronización de la muda, debe primero conocerse si éste puede ser administrado por vía oral, para lo cual se deberá constatar si el péptido es sensible a la acción de enzimas de digestión y posteriormente si luego de absorbido y circulante en el torrente sanguíneo, éste aún conserva su actividad. Si el

péptido es degradado por enzimas digestivas o en la hemolinfa, se pueden realizar cambios en la secuencia determinando primero cual es la región clave para mantener la actividad y posteriormente se cambian **amino** ácidos no vitales por otros más resistentes, haciendo menos susceptible al péptido, en otras palabras, se produciría un análogo. Finalmente, si no es posible alterar la secuencia para producir un análogo sin comprometer la función del mismo, se puede encapsular el compuesto o realizar implantes, tal como se realiza para peces para inducir a la ovulación utilizando la hormona gonadotropina (Mylonas 1995; 1996; **Berlinsky** 1996).

Es un hecho que estos resultados abren una nueva línea de investigación, la cual tendría como objetivo final, el control del proceso de muda. Es importante tener en cuenta y recordar que **este(os)** péptido(s) estimularían el ciclo de muda, y no el proceso crecimiento (aumento de peso y masa muscular).

6. CONCLUSION

Se ha purificado un péptido del sistema nervioso de camarones juveniles *Penaeus vannamei* que es capaz de estimular *in vitro* la producción de ecdiesteroides (hormona de la muda) por parte del órgano "Y".

7. BIBLIOGRAFIA

- Aquacop. 1977. Observations sur la maturation et la reproduction en captivité des crevettes penaeides en milieu tropical. *Actes du Colloques du CNEXO*. 4: 157-178.
- Aquacop. 1979. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon*, Fabricius in Polynesia. *Journal of the World Aquaculture Society*, 8: 927-945.
- Bell, A y D. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, 114.
- Berlinsky, D y W. King. 1996. Induced Ovulation of Southern Flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasin hormone analogue implants. *Journal of the World Aquaculture Society*, 7 (2): 144-152.
- Blais, C., M. Sefiani., J-Y, Toullec y D. **Soyez**. 1994. *In vitro* production of ecdysteroids by Y-organs of *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Correlación With hemolymph titers. *Invertebrate Reproductive Development*, 26:3-12.
- Bliss, D. 1951. Metabolic effects of sinus gland on eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus Lateralis*. *Anatomy Records*, 11 1: 502-503.
- Bliss, D. 1985. Molting and regeneration. Chapter 2. En: *The biology of crustacea*, vol 9, Integument, Pigmentes and Hormonal Processes. 43-83.
- Browdy, C. 1992. A review of the reproductive biology of penaeid species: Perspective of controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. *Journal of the World Aquaculture Society*. Baton Rouge, LA USA 22-40.
- Boddeke, R., R. Dijkema y M. Siemelink. 1978. The patterned migration of shrimp populations: a comparative study of *Crangron* and *Penaeus brasiliensis*. *FAO Fishieries Report*, 3 1-49.
- Bollenbacher, WE., EJ. Katahira., M. O'Biren., LI. Gilbert., MK. Thomas., N. Agui y AH. Baumhover. 1984. *Science*, 224: 1243-1245.

- Carlisle, DB y PFR, Dohrn. 1953. Studies on *Lysemata seticaudata* Risso (Crustacea Decapoda). II Experimental evidence for a growth and moulting-acceleratin factor obtainable from eyestalks. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 24: 69-83.
- Chang, ES y M. Bruce. 1980. Ecdiesteroid titers of juvenile lobsters following molt induction. *Journal Experimental Zoology* . 2 13, 157- 160.
- Chang, ES. 1985. Hormonal Control of Molting in Decapod Crustacea. *American Zoology*, 25: 179-185.
- Chang, E. 199 1. Crustacean molting hormones: cellular efects, role in reproduction and regulation by molt-inhibiting hormone. In: *Developments in Aquaculture and Fish Science*, P. F. Deloach, W. J. Dougherty and M. A. Davidson. Elsevier, 22, 83-101.
- De Leersnyder, M. 1967. Influence de la salinité et de l'ablation des pédoncules oculaires sur la mue et sur le développement ovarien d' *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards. *Biologie Marine* 8: 421-435.
- Hampshire, R., y S. Horn. 1966. Structure of crustecdysone, a crustacean moulting hormone. *Chemistry Community*, 37-38.
- Holland, CA y DM. Skinner. 1976. Interactions between molting and regeneration in the land crab. *Biological Bulletin*. 150: 222-240.
- Hopkins, PM. 1983. Patterns of serum ecdysteroids during induced and uninduced proecdysis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Genetic Comparative Endocrinology*, 52: 350-356.
- Hopkins, PM. 1986. Ecdysteroid titers and Y-organ activity during late anecdysis and proecdysisi in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Genetic Comparative Endocrinology*, 63: 362-373.
- Horn, DHS., EJ. Middleton., EJ. Wundelich y JA. Hampshire. 1966. Identity of the moulting hormones of insects and crustaceans. *Chemistry Commnunity*: 339-340
- Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191: 191-208
- Huner, J y L. Colvin. 1979. Observations on the molt cycles of two species of juvenile shrimp, *Penaeus californiensis* and *Penaeus stylirostris*.. *Proceeding Shellfish Associety*, 69 : 77-84.

- Kopec, S. 1922. Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biological Bulletin*, 42: 323-342
- Lachaise, F y R. Lafont. 1984. Ecdysteroid metabolism in a crab: *Carcinus maenas* L. *Steroids*, 43: 243-260.
- Le Moullac, G., D. Le Groumellec., S. Ansquer., S. Froissard., Levy Peva y Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 7: 227-232.
- Martin, G., G. Besse y JP. Moucard. 1980. Controle neurohormonal du cycle de mue chez les males de *l'Oniscoide porcellio dilatatus* Brandt. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 105: 73-81.
- Molina, C. 2001. Importancia del ciclo de muda y del horario de alimentación en el cultivo del *Litopenaeus vannamei*. *Panorama Acuícola*, 6: 66-67.
- Mylonas, C., Y. Tabata., R. Langer y Y. Zohar. 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *Journal of Controlled Release*, 35: 23-34.
- Mylonas, C., Y. Magnus., A. Gissis., Y. Klebanov., Y. Zohar. 1996. Application of controlled-release, GnRH α -delivery systems in commercial production of white bass X striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture*, 140: 265-280.
- Nieto, J. 2000. Identification and characterization of neuropeptides in the central nervous system of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral. Universidad De Lobaina- Bélgica.
- Nogueira, B; D. Muehleisen; L. Whisenton; R. Gray; W. Bollenbacher. 1996. Life cycle expression of a Bombyxin-Like neuropeptide in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal Insect Physiology*. Vol. 43, 47-53.
- O'Brien, MA., EJ. Katahira., TR. Flanagan., LW. Arnold., G. Haughton y WE. Bollenbacher. 1988. *Journal Neuroscience*. 8, 3247-3257.

- Robertson, L., W. Bray., JL. Trujillo y A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. Journal of the World Aquaculture Society, 18(3): 180-185.
- Schafer, H. 1968. The determination of some stages of the molting cycle of *Penaeus duorarum* by microscopic examination of the endopodites of pleopods. FAO Fisheries Report, 57: 381-391.
- Sedlmeier, D. y R. Fenrich. 1993. Regulation of ecdysteroid biosynthesis in Crayfish Y organs: I. Role of Cyclic Nucleotides. Journal of Experimental Zoology, 265: 448-453.
- Sedlmeier, D., S. Dell., H. Devaraj y A. Seinsche. 1999. The regulation of Ecdysteroid Production in Crayfish Y-Organs. En: Recent Developments In Comparative Endocrinology & Neurobiology. Eds: EW Roubos, SE Wendelaar Bonga, H Vaudry & A de Loof. Proceedings of the 17th Conference for European Comparative Endocrinologists. Nijmegen 1998.
- Séfiani, M. 1996. Caractérisation de neuropeptides hyperglycémiantes et inhibiteurs de la mue chez la crevette péneïde *Peanaeus vannamei*. These de Doctoral de l'Université Moulay Ismael, Faculté des Sciences, Meknes, Maroc, 123.
- Smith, WA y Sedlmeier. 1990. Neurohormonal control of ecdysone production: comparison of insects and crustaceans. Invertebrate Reproduction Development. 18: 77-90.
- Skinner, DM y DE. Graham. 1972. Loss of limbs as a stimullus to ecdysis in Brachyura (true crabs). Biological Bulletin 143: 222-233.
- Skinner, DM. 1985. Interacting factors in the control of crustacean molt cycle. American Society of Zoology. 25: 275-287.
- Watson, RD., WE. Yeh., DP. Muelhleisen., CJ. Watson y WE. Bollenbacher. 1993. Stimulation of ecdysteroidogenesis by small prothoracicotropic hormone: role of cyclic AMP. Molecular Cell Endocrinology, 92: 221-228.
- Williams, CM. 1947. Physiology of insect diapause. II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm, *Platysamia cecropia*. Biological Bulletin, 93: 89-98.

- Yano, I. 1993. Brain action in the control of ovarian maturation in penaeid Shrimp. *World Aquaculture*. 90: 76.
- Yang, W., K. Aida. y H. nagasawa. 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 135: 205-212.
- Zeleny, C. 1905. Compensatory regulation. *Juornal Experimental Zoological*, 2: 1-1 02.