



UNIVERSIDAD ESTATAL
“ PENÍNSULA DE SANTA ELENA ”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLÓGIA MARINA

“CARACTERIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL CAMARÓN
Penaeus vannamei”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA

LA LIBERTAD - ECUADOR

2006



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“Caracterización de la insulina en el camarón *Penaeus vannamei*”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“Caracterización de la insulina en el camarón *Penaeus vannamei*”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad para los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente y el patrimonio intelectual de la misma, al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM y a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, UPSE.



Francisco Hernán Pozo Miranda.

C. I. 0918330952

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis de grado a mis padres: Sr. Francisco Pozo Borbor y Sra. Cleotilde Bertha Miranda Mateo porque supieron darme de muchas formas, el amor, afecto, estímulo y apoyo en las horas más difíciles de mi vida, me dieron el ánimo necesario para no rendirme y cesar el impetud de mi ideal, por eso de manera especial y afectuosa les agradezco de verdad.

Seria injusto de mi parte, olvidarme de mis hermanos: Wilmer, Selenita, Haidee, Angel, Sandra Pozo Miranda, por brindarme su apoyo en los momentos que los necesite.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, debo agradecer al Dios del cielo, Jehová, por haberme brindado fuerzas para poder lograr cada una de mis metas y a mis Padres por siempre darme sus sabios consejos y apoyo incondicional.

A las autoridades de la Universidad Estatal Península de Santa Elena UPSE, Rector Ab. Xavier Tómalá M., Vice-rector Académico Ec. George Clemente, al Decano de la Unidad Académica Ing Gonzalo Tamayo y al personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

Al director del Cenaim Samuel Stern Ph. D. por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis en el centro de investigación.

Agradecer en particular a Ana Gutiérrez Ph. D. Tutor de tesis del CENAIM porque con sus ideas científicas profesionales orientó el trabajo, cumpliendo de manera eficaz, en lo personal, gracias por ayudarme en el desarrollo de la tesis, pues sin su ayuda no hubiese logrado superar la semana más difícil de mi permanencia en el CENAIM.

A Julia Nieto Ph. D. por haber tenido siempre confianza en mí y por haberme apoyado desde el primer día de la elaboración de mi tesis, demostrándome con su dedicación por su trabajo, que todo en la vida exige dedicación y esmero.

A Enrique Blacio Ms. C. representante de asuntos estudiantiles (CENAIM), por ayudarnos en todo momento que necesitábamos de él.

A José Melena Ph. D. por sus explicaciones, ideas ingeniosas, buen humor y su enorme paciencia; ayudándome en más de una ocasión.

Al Blgo. Fabrizzio Echeverría, por la paciencia y confianza que tuvo al permitirme trabajar en el laboratorio de Inmunología durante las pruebas de ELISA.

Gracias a todos mis compañeros de Pre-grado, por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos, por vuestra ayuda en el trabajo y vuestro apoyo moral en los momentos difíciles: Jorge Malavé, Marcelo Suárez, Yomara de la Cruz, Yessenia Pozo y Martha Borbor.

Gracias a mis amigos que están lejos, pero me apoyaron incondicionalmente, me aconsejaron de manera sincera y honesta y que a pesar de la distancia los tengo siempre presente: Winsor Aguirre Ph. D., Tnlga Anastasia Yela Montes. Candy Suastegui (Samy), Tatiana Torres.

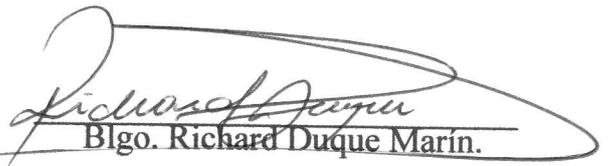
Por último no me queda más que agradecer a todas las personas que me han apoyado durante todo este tiempo, esa gente que ha hecho que mí día a día haya sido mucho más llevadero.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



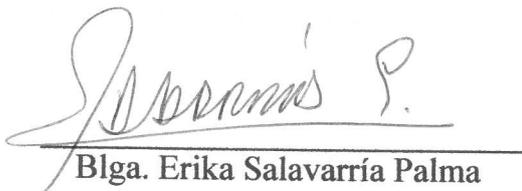
Ing. Gonzalo Tamayo Castañeda.

Decano Facultad de Ciencias del Mar



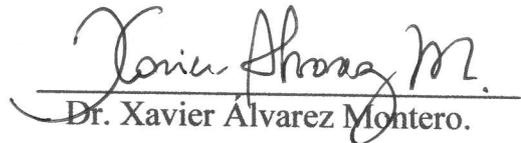
Blgo. Richard Duque Marín.

Director Escuela de Biología Marina



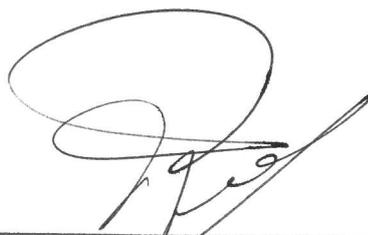
Blga. Erika Salavarría Palma

Tutor.



Dr. Xavier Alvarez Montero.

Docente de área.



Ab. Pedro Reyes Laínez

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

Índice de gráficos.....	XIV
Índice de tablas.....	XVI
Glosario.....	XVIII
Abreviaturas.....	XXIV
Resumen.....	XXVI
Introducción.....	1
Justificación.....	5
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
Hipótesis.....	8

1. ENDOCRINOLOGÍA DE INVERTEBRADOS

1.1. GENERALIDADES DE LA ENDOCRINOLOGÍA.....	9
1.2. SISTEMA ENDOCRINO.....	10
1.2.1. Tipos de Transmisión Química.....	10
1.2.1.1. Transmisión neurocrina.....	11
1.2.1.2. Transmisión endocrina.....	11
1.2.1.3. Transmisión neuroendocrina.....	11
1.2.1.4. Transmisión paracrina.....	11
1.2.1.5. Transmisión autocrina.....	12
1.3. REGULACIÓN DEL METABOLISMO.....	12
1.3.1 Metabolismo hormonal.....	13

1.4. SISTEMA ENDOCRINO DE DECÁPODOS.....	15
1.5. MUDA Y CRECIMIENTO EN DECÁPODOS.....	16
1.5.1. Control de la muda.....	18
1.5.1.1. La Hormona Inhibidora de la muda (HIM).....	18
1.5.1.2. Órgano Y.....	19
1.6. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.....	21
1.6.1. Alteración de los carbohidratos.....	21
1.6.2. Gluconeogénesis.....	21
1.6.3. Reacciones de la gluconeogénesis.....	22
1.6.4. Regulación por los niveles de energía.....	22
1.7. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN CRUSTÁCEOS.....	23
1.7.1. Control hormonal de la glucosa.....	27
1.8. PÉPTIDOS TIPO INSULINA.....	27
1.8.1. Insulina.....	27
1.8.2. Factor de crecimiento tipo insulina (IGF).....	29
1.9. PÉPTIDOS TIPO INSULINA EN ARTRÓPODOS.....	30
1.9.1. Insectos.....	32
1.9.2. Crustáceos.....	33
1.10. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA DE ENZIMA LIGADA (ELISA).....	34
1.10.1. Diferentes Formatos de ELISAs.....	36
1.10.2. ELISA tipo sandwich	36
1.10.3. ELISA del tipo competitivo.....	38

1.10.4. Creación de una curva estándar.....	40
1.10.5. Parámetros de una curva estándar.....	40
1.10.6. Ligado inespecífico.....	40
1.10.7. Ligado máximo.....	40
1.10.8. Componentes básicos.....	41
1.10.9. Valoración de un anticuerpo.....	42
2. PROCEDIMIENTO DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL	
CAMARÓN <i>Penaeus vannamei</i>.	
2.1. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	44
2.1.1. Efecto de insulina / rhIGF-I sobre órganos Y.....	44
2.1.1.1. Insulina.....	44
2.1.1.2. Factor de Crecimiento Tipo Insulina recombinante humana (rhIGF-I).....	44
2.1.1.3. Determinación de Estadío de Muda.....	44
2.1.1.4. Disección del Órgano Y.....	46
2.1.1.5. Cultivo de órganos "Y" <i>in vitro</i>	47
2.1.1.6. Ensayo de inmunoabsorbancia de enzima ligada (elisa).....	49
2.1.1.6.1. Curva estándar.....	49
2.1.1.6.2. Protocolo de la técnica elisa.....	50
2.2. EFECTO DE INYECCIÓN DE INSULINA/rhIGF SOBRE	
METABOLISMO DE LA GLUCOSA.....	54

2.2.1. Administración de las hormonas (Insulina/rhIGF-I).....	54
2.2.2. Extracción de hemolinfa.....	54
2.2.3. Extracción de tejidos.....	55
2.2.3.1. Extracción de hepatopáncreas.....	55
2.2.3.2. Extracción del músculo.....	55
2.2.3.3. Extracción del branquias.....	55
2.2.4. Análisis de Glucosa.....	56
2.2.4.1. Curva estándar de glucosa (Kit Sigma).....	56
2.2.4.2. Protocolo de análisis de glucosa (Kit Sigma).....	57
2.2.4.3. Procesamiento de tejidos (suero enzimático).....	57
2.2.4.3.1. Preparación de suero enzimático.....	57
2.2.4.2. Determinación de glucógeno.....	57
2.2.4.2.1. Preparación de la Curva de calibración.....	57
2.2.4.3. Análisis de la muestra.....	58
2.2.5.1. Diseño experimental.....	59
2.2.5.1.1. Experimento 1.....	59
2.2.5.1.2. Experimento 2.....	60
2.2.5.1.3. Datos evaluados.....	62
3. EFECTOS DE LA INSULINA/rhIGF-I EN LA PRODUCCIÓN DE ECDIESTEROIDES Y NIVELES DE GLUCOSA.	
3.1. EFECTO DE PÉPTIDOS TIPO INSULINA EN LA PRODUCCIÓN DE ECDIESTEROIDES.....	63

3.1.1. Interacción de los estadios de muda con insulina bovina	
en cultivos <i>in vitro</i>	63
3.1.2. Interacción de los estadios de muda con rhIGF-I	
en cultivos <i>in vitro</i>	65
3.2. EFECTO INYECCIÓN PÉPTIDOS TIPO INSULINA SOBRE NIVELES	
DE GLUCOSA	66
3.2.1. Niveles de Glucosa en hemolinfa	66
3.2.2. Niveles de Glucógeno en tejidos	69
3.2.2.1. Hepatopáncreas.....	69
3.2.2.2. Músculo.....	71
3.2.2.3. Branquias.....	72

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1.	Complejo órgano X-glándula sinusal	18
Figura 2.	Ubicación del órgano Y, en Penaeidos	19
Figura 3.	Estructura de ecdiesteroides en crustáceos	20
Figura 4.	Diagrama de la vía de glucólisis y fosfato pentosa	25
Figura 5.	Estructura química de; (a) glucosa, (b) piruvato	26
Figura 6.	Estructura de la insulina	29
Figura 7.	Estructura biológica del IGF	30
Figura.8.	Esquema del análisis de ELISA tipo sandwich.....	37
Figura 9.	Esquema del protocolo del análisis de inmunoabsorbancia de enzima ligada para la determinación de ecdiesteroides.....	39
Figura 10.	Caracterización de estadios de muda	43
Figura 11.	Disección del Órgano "Y":.....	47
Figura 12.	Cultivo de órganos "Y" <i>in Vitro</i>	48
Figura 13.	Curva estándar preparada con medio de cultivo M199 y 20-E....	50
Figura 14.	Curva Standard de glucosa.....	56
Figura 15.	Efectos de concentraciones de insulina sobre ecdiesteroides.....	64
Figura 16.	Efectos de concentraciones de rhIGF-I sobre ecdiesteroides.....	65
Figura 17.	Efectos de Insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucosa en hemolinfa.....	68
Figura 18.	Efectos de concentraciones de insulina/rhIGF-I sobre el nivel	

	de glucógeno por gramo de hepatopáncreas.....	70
Figura 19.	Efectos de concentraciones de insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucógeno por gramo de músculo.....	72
Figura 20.	Efectos de concentraciones de insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucógeno por gramo de branquias.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla # 1.	Diseño factorial del análisis de secreción de ecdiesteroides para insulina/rhIGF.....	60
Tabla # 2.	Diseño factorial del análisis de glucógeno en tejidos para insulina/rhIGF.....	61
Tabla # 3.	Niveles de Glucosa en Hemolinfa.....	66

GLOSARIO

AMINO TERMINAL (N terminal): Final de una cadena polipeptídica que tiene libre el grupo amino.

ANABOLISMO: Sistema celular de reacciones biosintéticas por el cual se construyen grandes moléculas a partir de moléculas más pequeñas.

ANTISUERO: Suero animal que contiene el anticuerpo específico formado como reacción contra un determinado antígeno.

ATP (adenosina 5' trifosfato): Nucleósido trifosfato compuesto de adenina, ribosa y tres grupos fosfatos, son los principales transportadores de energía química en las células, el grupo fosfato terminal es altamente reactivo en el sentido de que su hidrólisis, o transferencia a otra molécula, se produce liberando una gran cantidad de energía libre.

CARBOHIDRATO: Término general utilizado para denominar a los azúcares y compuestos relacionados que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, habitualmente con la fórmula empírica $(CH_2O)_n$.

CARBOXILO TERMINAL (C terminal): Final de una cadena polipeptídica que contiene un grupo carboxilo a libre.

CATABOLISMO: Término general utilizado para reacciones celulares catalizadas por enzimas mediante las cuales, moléculas complejas son degradadas a moléculas más sencillas, con liberación de energía. Habitualmente, los intermediarios de estas reacciones se denominan catabolitos.

CEFALOTÓRAX: En los artrópodos, región del cuerpo formado por la fusión de la cabeza y el tórax.

CISTEÍNAS: Aminoácidos esenciales que se encuentran libres, en asociaciones pépticas y en proteínas.

ECDISIS: Cambio de cutícula que se produce periódicamente en artrópodos, se inicia por la secreción de una hormona, la ecdisona

ENLACE DISULFURO (-S-S-): Unión covalente formada entre dos grupos sulfhidrilos de dos cisteínas. Sistema habitual de unir dos proteínas o diferentes zonas de la misma proteína en el espacio extracelular.

ENLACE FOSFODIÉSTER: Enlace químico covalente formado cuando dos grupos hidroxilos se unen mediante enlaces éster al mismo grupo fosfato.

ENZIMA: Proteína (o RNA) que cataliza una reacción química determinada.

EXUVIA: Conjunto de exocutícula y endocutícula de los artrópodos que se desprende, para ser regenerado de nuevo.

FACTOR DE CRECIMIENTO: Molécula polipeptídica extracelular, señal que estimula una célula a crecer o a proliferar.

GLUCÓGENO: Polisacárido compuesto exclusivamente por unidades de glucosa, utilizado para almacenar energía en las células animales. Forma grandes granos, especialmente en las células del músculo.

GLUCÓLISIS: Vía metabólica ubicua que se produce en el citosol, mediante la cual los azúcares son degradados de forma incompleta y se produce ATP.

GLUCOSA: Azúcar de seis carbonos que juega un papel principal en el metabolismo de las células vivas. Se almacena como polímero en forma de glucógeno en las células animales.

HEMOLINFA: Líquido que llena los espacios lagunares en crustáceos, equivalente a la sangre en humanos.

INSULINA: Hormona polipeptídica segregada por las células del páncreas que interviene en la regulación del metabolismo de la glucosa en los animales.

METABOLISMO: Suma total de los procesos químicos que tienen lugar en las células vivas.

MONOSACÁRIDO: Azúcar sencillo de fórmula general $(CH_2O)_n$, siendo n entre 3 y 7 carbonos.

NADP+ (nicotina adenina dinucleótido fosfato): Coenzima estrechamente relacionada con el NAD+ que se utiliza ampliamente en procesos de biosíntesis, no en procesos catabólicos.

NEUROPEPTIDO: Péptido que actúa como molécula señal, secretado por neuronas tanto en una sinapsis como en otro lugar.

PÉPTIDO SEÑAL: Corta secuencia de aminoácidos que determina la localización final de una proteína en la célula. Un ejemplo lo constituye la secuencia N terminal de unos

20 aminoácidos que dirige las proteínas nacientes de secreción o transmembrana hacia el retículo endoplasmático.

PEROXIDASA: Enzima de oxirreducción que cataliza las reacciones de aceptación de electrones o de hidrógeno por parte de las peroxidasas.

pH : Medida común de la acidez de una solución: "p" se refiere a la potencia de 10, y "H" al hidrógeno. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro (M). Así, pH 3 (10^{-3} M de H^*) es ácido y pH 9 (10^{-9} M de H^*) es alcalino.

POLIPÉPTIDO: Polímero lineal compuesto por múltiples aminoácidos. Las proteínas son polipéptidos de gran tamaño y ambos términos pueden utilizarse de forma indiferente.

PROTEÍNA QUINASA: Enzima que transfiere el fosfato terminal del ATP a un aminoácido determinado de una proteína diana.

PROTEÍNA: Principal constituyente macromolecular de las células. Polímero lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces péptidos, siguiendo una secuencia determinada.

SUBSTRATO: (1) Superficie sólida a la que se adhiere una célula. (2) Molécula sobre la que actúa una enzima.

TAMPÓN: Solución que contiene un ácido débil y una de sus sales, o bien una base débil y una de sus sales por lo que minimizan los cambios de pH cuando se añade un ácido o un álcali.

TIROSINA QUINASA: Enzima que transfiere el fosfato terminal del ATP a un residuo determinado de tirosina de su proteína diana.

TRACER: Molécula o átomo que ha sido marcado química o radiactivamente con la finalidad de poderlo seguir a través de un proceso bioquímico o de localizarlo fácilmente en una célula o en un tejido.

ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza
AS4919	Anticuerpo 4919
ATP	Adenosina trifosfato
B _o	Absorbancia del control
B	Absorvancia del blanco
BSA	Bovine serum albumene (suero de albúmina de bovino)
B/F	Coefficiente de la fracción libre
c/u	Cada uno
CHH	Hormone Hyperglycemic Crustacea (Hormona Hiperglicémica de Crustáceos)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico copia
E	Ecdisona
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Análisis Inmunoabsorbancia con Enzima Ligada)
Fig	Figura
GAR	Goat anti-rabitt (anticonejo)
h	Horas
rhIGF	Recomb human, Insulin-like Growth Factor I (Factor de Crecimiento tipo, recombinante humana insulina I)

IGF I	Insulin-like Growth Factor I (Factor de Crecimiento tipo insulina I)
IGF II	Insulin-like Growth Factor I (Factor de Crecimiento tipo insulina II)
IgG	Inmunoglobulina G
M199	Medio de Cultivo 199
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
OY	Órgano Y
pH	Potencial de hidrógeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
RIA	Radio inmuno assay (radio inmuno ensayo)
®	Marca registrada.
T	Tiempo
% Bo/Bo	Porcentaje de ligado
v/v	Volumen / Volumen
20-E	20-hidroxiecdisona
°C	Grados Celsius.
µg	Microgramo
µM	Micromolar

- μ Microlitro
- \pm Más, menos (error estándar)

RESUMEN

En este estudio se determinó el rol de la insulina y Factor de Crecimiento Tipo Insulina en la síntesis de ecdiesteroides y metabolismo de la glucosa en camarones juveniles *Penaeus vannamei*.

Bajo la evidencia de que los péptidos tipo insulina poseen la habilidad de estimular la producción de ecdiesteroides en insectos, se probó en órganos Y aislados de juveniles *P vannamei*, en diferentes estadíos de muda. Los órganos Y cultivados *in vitro* fueron sometidos a concentraciones de Insulina bovina y rhIGF-I, donde los resultados obtenidos no mostraron efectos significativos ($p > 0.05$) de interacción entre el estadio de muda y las concentraciones a los que fueron sometidos en cultivos *in vitro*.

Posteriormente bajo la hipótesis de que péptidos tipo insulina desempeñan una función en el metabolismo de la glucosa en los crustáceos, se procedió a evaluar el efecto de la Insulina y rhIGF-I en juveniles *P vannamei*, a través de la cuantificación de niveles de glucosa en la hemolinfa a través del tiempo post inyección.

El tratamiento con rhIGF-I tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) comparado al tratamiento con PBS (control), incrementado los niveles de glucosa en la hemolinfa después de 1 hora y luego disminuyéndolos a las cinco horas post inyección, mientras

que el tratamiento con insulina bovina no mostró diferencias significativas en cada uno de los tiempos comparado con el tratamiento control.

Posteriormente se realizó la cuantificación de glucógeno (mg glucógeno/tejido húmedo) en tejidos. En hepatopáncreas los resultados obtenidos de glucógeno después de aplicarse análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento con insulina y el control donde se observó una mayor acumulación de glucógeno con el tratamiento con insulina a la tercera hora post inyección, sin embargo a la quinta hora, los niveles de glucógeno disminuyeron este tejido. Mientras que en el Músculo los tratamientos (Insulina, rhIGF-I y Control) ocasionaron una disminución de glucógeno a través del tiempo siendo el tratamiento con insulina el que ocasionó una disminución de glucógeno altamente significativo ($P < 0.01$) en el tiempo uno y tres. Mientras que el tratamiento con rhIGF-1 sólo mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo tres.

En Branquias la concentración de glucógeno fue significativamente diferente con el tratamiento de insulina incrementando los niveles de glucógeno, después de una hora post inyección, mientras que el tratamiento de rhIGF-I no presentó diferencias significativas frente al control.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón en el Ecuador creció rápidamente, formándose como una industria exportadora en Latinoamérica con un importante impacto social en comunidades costeras.

El Ecuador inició el cultivo de camarón en 1969 a partir de la construcción de la primera piscina comercial y para 1982 el cultivo de penaeidos era ya una de las fuentes de mayor ingreso económico, en producción a nivel mundial (Tobey *et al.*, 1998). En 1995 el camarón ya constaba como el segundo rubro de exportación en el país, representando el 15,6 % del Producto Interno Bruto, PIB (CNA, 2000) consolidando su crecimiento exponencial, como resultado del incremento en el área de producción.

Los mayores volúmenes significativos de camarón son cultivados en solo dos regiones del mundo: Asia que produce aproximadamente el 80 %, y Latinoamérica, que contabiliza el 20 % restante (Tobey *et al.*, 1998).

Pero esta producción de camarón se ha visto mermada a nivel mundial debido a uno de los puntos de control más difíciles en la cría de camarón como el manejo de las enfermedades virales. Las pérdidas más graves ocurrieron entre 1993 y 1999, cuando la epidemia mundial por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) causó la quiebra económica de muchas granjas camaroneras en todo el mundo.

Esta epidemia marcó un período crítico en la industria camaronera (Chamberlain, 2002). En 1999 el Ecuador reportó oficialmente la presencia del WSSV (CNA.2000), disminuyendo de forma drástica su producción, tornando la situación en insostenible, disminuyendo las supervivencias a cifras menores al 10 %, reduciendo los niveles de producción (Bayot *et al.*, 2002), rebasando cualquier expectativa negativa. Estos problemas pueden deberse a una inadecuada práctica de manejo.

Actualmente el WSSV continúa amenazando la sustentabilidad de la industria camaronera, por lo que se ha hecho indispensable el desarrollo de varias estrategias de manejo (Chamberlain, 2002). Bajo estas circunstancias, la solución será contar con una familia resistente a WSSV, lo cual es una solución de mediano a largo plazo.

Una de las alternativas es un cambio en el manejo tradicional optando por el uso de invernaderos como un sistema más eficiente y ambientalmente sostenible y tratar de sacar un mayor número de ciclos por año para aumentar así la rentabilidad. Por lo tanto resulta deseable contar con animales de rápido crecimiento.

El crecimiento se manifiesta como el aumento en longitud, volumen o peso. En los camarones al igual que en todos los crustáceos, el proceso de crecimiento se produce de forma discontinua y cíclica debido al fenómeno de la muda o ecdisis. Cada vez que el organismo está preparado para aumentar de talla y peso, el viejo exoesqueleto es liberado rápidamente y es producida una nueva capa quitinosa que tenderá a endurecerse

por incorporación de sales de calcio que se concentran en la hemolinfa (Stevenson, 1985). Hasta adquirir la consistencia y dureza del exoesqueleto anterior. Durante este proceso el cuerpo del camarón ha absorbido agua y la división celular se ve favorecida provocando el incremento de volumen y peso del animal (Van Wormhoudt y Bellon-Humbert, 1996) Luego de ello, las dimensiones del animal permanecen aproximadamente constantes hasta la próxima muda.

Estudios sobre el crecimiento en insectos muestran la presencia de receptores de péptidos tipo insulina en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. La mutación en estos receptores causa defectos en el crecimiento y desarrollo (Chen *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997). De esta manera la insulina además de desempeñar un papel en el metabolismo de los carbohidratos, se encuentra regulando procesos de crecimiento en insectos basado en un efecto ecdisiotrópico en *Samia cyntia* (Nagasawa *et al.*, 1986).

Péptidos tipo insulina han sido identificados en el cerebro de otras especies de insectos como *Locusta migratoria* (LIRP) (Chan *et al.*, 2000), *Aedes aegyptis* (Riehle *et al.*, 1999), *Drosophila melanogaster* y *Calliphora vomitaria* (Duve *et al.*, 1979).

Sin embargo, algunos investigadores, han demostrado la presencia de insulina o IGF en crustáceos. Por ejemplo, péptidos que interactúan con anticuerpos contra insulina

bovina han sido detectados en tejidos de la langosta *Homarus americanus* (Sanders, 1983b).

JUSTIFICACIÓN

La acuicultura se expandió rápidamente en varios países de Latinoamérica en vías de desarrollo con el afán de incrementar la producción del camarón, pero desde 1999 la industria ha sufrido su más dura crisis debido al impacto sufrido por la enfermedad de la Mancha Blanca (WSSV) (Illingworth, 2001), resultando problemas relacionados al bajo crecimiento y altas mortalidades, reduciendo los niveles de producción. Estos problemas pueden deberse por una inadecuada práctica de manejo. Bajo estas circunstancias, la solución será contar con una familia resistente a WSSV, lo cual es una solución de mediano a largo plazo.

La otra alternativa es un cambio en el manejo tradicional optado por el uso de invernaderos y tratar de sacar un mayor número de ciclos por año para aumentar así la rentabilidad. Resulta deseable contar con animales de rápido crecimiento, al momento se conoce algunos fases de crecimiento que eventualmente podemos utilizar.

Recientes estudios muestran a la insulina como potencial factor de crecimiento en invertebrados. Como los resultados obtenidos en moluscos (Smit *et al.*, 1991), postulando a la Insulina, como una opción para controlar el crecimiento.

Paralelamente, péptidos tipo insulina han sido relacionados con el proceso de muda en artrópodos. La muda o eliminación de la cutícula es la culminación del período del

crecimiento. Este proceso está regulado por las hormonas ecdiesteroides producidas por el órgano Y de crustáceos (Jegla *et al.*, 1990) y la glándula prototorácica en insectos (Nagasawa *et al.*, 1984).

La producción de ecdiesteroides en crustáceos es inhibida por la MIH presente en el pedúnculo ocular (Chang *et al.*, 1989) y en insectos estimulada por la PTTH (Hormona Prototoracicotrópica) en el cerebro (Masura *et al.*, 2000). En insectos ha sido identificado un neuropéptido con función prototoracicotrópica (Ishizaki *et al.*, 1994) con una alta homología con la insulina en su secuencia de aminoácidos (Nagasawa *et al.*, 1984). Recientemente se tiene evidencia de que péptidos presentes en el sistema nervioso estimulan la muda y crecimiento en el camarón (Nieto, 2000; Hatt *et al.*, 1997).

En crustáceos, diversos estudios han demostrado la presencia de un péptido tipo insulina, que regula el metabolismo de la glucosa en algunos tejidos. Dosis de insulina y IGF ocasionaron un incremento en el contenido de la glucosa en el hepatopáncreas y el músculo de Crayfish (Richardson *et al.*, 1996), así como en branquias de cangrejos (Kucharski *et al.*, 1997).

Diversas funciones son atribuidas a la insulina en artrópodos. Debido a la homología entre crustáceos e insectos junto con la información existente sobre la insulina, más la acumulada evidencia que soporta la existencia de péptidos tipo insulina/ rhIGF-I en insectos, hay escasos datos acerca de su importancia funcional a nivel filogenético. Por

lo tanto se justifica la importancia de realizar un estudio de investigación científica en un intento de ganar una percepción clara del papel que desempeñan los péptidos tipo insulina en crustáceos y la similitud que existe entre crustáceos e insectos, evaluar el rol de la insulina en diferentes ensayos, generando información y soluciones respecto al control de la muda y metabolismo a largo plazo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el rol que desempeña la insulina, en la secreción de ecdiesteroides en el proceso de la muda y metabolismo de carbohidratos (glucosa) en camarones juveniles *Penaeus vannamei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la insulina/IGF sobre la síntesis de ecdiesteroides en cultivos *in vitro* de Órganos Y de camarones juveniles, en diferentes estadios de muda.
- Establecer el papel funcional de la insulina en el metabolismo de la glucosa, en varios tejidos de Camarones juveniles después de recibir una dosis de insulina.

HIPÓTESIS

La insulina ejerce un efecto de estimulación en la secreción de ecdiesteroides en los órganos Y, al igual que presenta un efecto en el metabolismo de la glucosa

1. ENDOCRINOLOGÍA DE INVERTEBRADOS

1.1. GENERALIDADES DE LA ENDOCRINOLOGÍA

La endocrinología es un campo de la ciencia que se encarga del estudio de la síntesis, secreción, función hormonal y de los mecanismos de regulación de la secreción hormonal. El sistema endocrino tiene un rol importante, pues interviene regulando los mecanismos necesarios en los procesos de adaptación de las especies a los cambios ambientales. La adaptación es un proceso que se desarrolla entre muchas generaciones y en la cual interviene fundamentalmente el sistema endocrino. Este sistema está sujeto a una serie de cambios que apuntan a mantener la homeostasis del organismo y la capacidad reproductiva. El mantenimiento de la homeostasis implica desarrollar mecanismos adecuados para regular la energía del metabolismo.

De lo anteriormente expuesto podemos decir que la endocrinología puede ser dividida en dos grandes áreas de estudio:

- a.- El metabólico.
- b.- El reproductivo

Otras funciones del sistema endocrino son aquellas referidas a los procesos de diferenciación celular y en el control del sistema inmunológico.

1.2. SISTEMA ENDOCRINO

El sistema endocrino se fundamenta anatómicamente en las glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas. En la definición clásica las glándulas endocrinas típicas están conformadas por células hacinadas en contacto con una red de vasos sanguíneos.

Esta descripción anatómica se ha modificado en los últimos años para dar paso a una clasificación funcional (Gonzalez, 1997(a)) de tal manera que ahora se considera como célula endocrina a toda aquella que secreta una hormona.

La actividad del sistema endocrino es ejecutada por las hormonas, mientras que la del sistema nervioso central es ejecutada por los neurotransmisores. El lugar de acción de un neurotransmisor o de una hormona se denomina órgano blanco o diana. La forma de acción sobre el órgano blanco en el sistema nervioso es directa a través del espacio intersináptico, e indirecta en el sistema endocrino a través de la vía sanguínea (Gonzalez, 1997(b)).

1.2.1. Tipos de Transmisión Química

Las células interactúan unas con otras y modifican su actividad metabólica por acción de sustancias químicas denominadas transmisores. Existen diferentes tipos transmisión química: neurocrina, neuroendocrina, endocrina, paracrina y autocrina (Rosenfeld, 1994).

1.2.1.1. Transmisión neurocrina

Es la que ocurre en el sistema nervioso a través de sustancias químicas denominadas neurotransmisores, las cuales son liberados al espacio intersináptico y se unen a un receptor post-sináptico modificando la actividad metabólica de la célula post-sináptica.

1.2.1.2. Transmisión endocrina

Es la que ocurre en el sistema endocrino a través de la liberación de sustancias químicas denominadas hormonas, que actúan a distancia sobre una célula efectora.

1.2.1.3. Transmisión neuroendocrina

Es la que ocurre por la liberación de sustancias químicas (neurohormonas) en los terminales nerviosos hacia la circulación y actúan a distancia sobre una célula efectora.

1.2.1.4. Transmisión paracrina

Es la transmisión que ocurre entre dos células adyacentes, donde una de las células secreta la sustancia (parahormona) que actúa por difusión sobre la célula vecina modificando su función. Se le conoce también como control local. Bajo este sistema de transmisión se puede regular la acción de una hormona aumentando o disminuyendo su acción.

1.2.1.5 Transmisión autocrina

Es cuando una sustancia química actúa sobre la misma célula que la produce para regular su secreción.

1.3 REGULACIÓN DEL METABOLISMO

El hecho de que células y tejidos mantengan el equilibrio dinámico durante la vida del organismo demuestra con claridad que los procesos metabólicos están sujetos a un control exacto. Células y tejidos mueren continuamente, pero el metabolismo aporta, en un equilibrio casi perfecto, necesarios para reponer, crear y producir células nuevas.

Cada una de las moléculas enzimáticas, que influyen sobre las rutas metabólicas desde sus primeras etapas, tiene un punto específico que se activa con el sustrato o compuesto sobre el cual actúa la enzima y se forma un producto. La precisión con que las enzimas limitadoras de la velocidad y los sustratos se acoplan para iniciar reacciones específicas impide que las reacciones se produzcan de forma indiscriminada dentro de las células, donde hay un continuo flujo de compuestos químicos muy diversos, que pueden inducir cambios profundos en el metabolismo celular.

Una de las formas de controlar las rutas metabólicas es la retroalimentación negativa (Bio-feed-back). Así, cuando una célula ha sintetizado una cantidad equilibrada de un

compuesto, como ATP, la acumulación de dicho producto inhibe a las enzimas que activan su producción.

El metabolismo, sobre todo en los animales superiores, está también regulado por el sistema nervioso, el páncreas, la glándula pituitaria y las glándulas suprarrenales, hormonas que se vierten en el torrente sanguíneo, alcanzan los tejidos diana y en muchos casos modifican la permeabilidad de las membranas celulares; alteran de ese modo las cantidades de sustancias que entran en las células y salen de ellas. Las hormonas, que también afectan al metabolismo vegetal, cambian las rutas metabólicas, para ello modifican los puntos catalíticos de las enzimas limitantes de la velocidad.

1.3.1. Metabolismo hormonal

Las hormonas conocidas pertenecen a tres grupos químicos: proteínas, esteroides y aminas. Aquellas que pertenecen al grupo de las proteínas o polipéptidos incluyen las hormonas producidas por la hipófisis anterior, paratiroides y páncreas. En el grupo de esteroides se encuentran las hormonas de la corteza suprarrenal y las gónadas. Las aminas son producidas por la médula suprarrenal y el tiroides. La síntesis de hormonas tiene lugar en el interior de las células y, en la mayoría de los casos, el producto se almacena en su interior hasta que es liberado en la sangre.

La liberación de las hormonas depende de los niveles en la sangre de otras hormonas y de ciertos productos metabólicos bajo influencia hormonal, como la estimulación nerviosa, por ejemplo cuando hay una cierta cantidad de hormona tiroidea en el torrente sanguíneo, la hipófisis interrumpe la producción de hormona estimulante del tiroides hasta que el nivel de hormona tiroidea descienda. Por lo tanto, los niveles de hormonas circulantes se mantienen en un equilibrio constante. Este mecanismo, que se conoce como homeostasis o realimentación negativa, es similar al sistema de activación de un termostato por la temperatura de una habitación para encender o apagar.

La función endocrina está regulada también por el sistema nervioso, como demuestra la respuesta suprarrenal al estrés. Los distintos órganos endocrinos están sometidos a diversas formas de control nervioso. Se desconoce la forma en que las hormonas ejercen muchos de sus efectos metabólicos y morfológicos. Sin embargo, se piensa que los efectos sobre la función de las células se deben a su acción sobre las membranas celulares o enzimas, mediante la regulación de la expresión de los genes o mediante el control de la liberación de iones u otras moléculas pequeñas. Aunque en apariencia no se consumen o se modifican en el proceso metabólico, las hormonas pueden ser destruidas en gran parte por degradación química.

1.4 SISTEMA ENDOCRINO DE DECÁPODOS

La endocrinología de Crustáceos decápodos está regulada por cuatro tipos de moléculas, clasificadas como hormonas y como neuroreguladores: péptidos, esteroides, aminas y terpenoides. Estos son sintetizados por el sistema endocrino constituido por:

- Neuroreguladores y órganos neurohémicos y,
- Glándulas endocrinas epiteliales de tipo clásico.

Los principales órganos endocrinos son los siguientes:

- El complejo órgano X-glándula sinusal del pedúnculo ocular.
- El órgano postcomisural, que secreta cromatoforinas.
- Órganos pericárdicos, que secretan la hormona cardioaceleradora.
- Los órganos Y (epitelial), que secretan ecdiesteroides.
- La glándula androgénica, propia de los machos.
- El órgano mandibular que secreta el farnesoato de metilo (equivalente a la hormona juvenil).

Cada uno de estos órganos que comprenden el sistema endocrino secretan diferentes tipos de hormonas para regular procesos fisiológicos.

1.5. MUDA Y CRECIMIENTO EN DECÁPODOS

El crecimiento se manifiesta como el aumento en longitud, volumen o peso. Una de las particularidades de la presencia de un exoesqueleto rígido en los crustáceos es entre otros factores, la restricción del crecimiento a períodos bien definidos. Esta característica lleva a la eliminación del antiguo exoesqueleto y la formación de uno nuevo, generalmente de mayor tamaño, siendo el conjunto de estos sucesos conocido como muda. Este fenómeno es cíclico, alternándose fases de relativo reposo externo con otras de intensa actividad (Vega *et al.*, 2000).

Luego de los estudios realizados con los cangrejos *Cancer pagurus* y *Maia squinado* se introdujo el concepto de intermuda, como la secuencia de transformaciones comprendidas entre dos mudas, en cuyo período se cumple un ciclo completo de modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas; responsables del crecimiento (Drach, 1939).

Generalmente el intervalo entre dos mudas sucesivas puede ser dividido en tres etapas: postmuda, intermuda y premuda (Drach, 1939), reconociendo cuatro estadios A, B, C, D (Robertson *et al.*, 1987). Los estadios A y B corresponden a la postmuda; el estadio C a la intermuda; el estadio D a la premuda.

La caracterización de esos estadios puede resumirse del modo siguiente (Robertson *et al.*, 1987):

Estadio A: El animal acaba de abandonar la exuvia, continuando la secreción de la nueva cutícula.

Estadio B: Comienzan a endurecerse las diferentes capas de la nueva cutícula.

Estadio C: Todo el exoesqueleto se engrosa y endurece. Hay crecimiento de tejidos y acumulación de reservas.

Estadio D: Se reabsorben los minerales y materiales orgánicos del exoesqueleto y se deposita parcialmente el nuevo exoesqueleto, debajo del viejo.

Cada uno de estos períodos puede reconocerse, y a su vez dividirse en subestadios, por cambios tegumentarios externos (grado de rigidez, pigmentación) o internos, como la formación de las nuevas setas o setogénesis, que permite seguir el ciclo por observación microscópica directa (Robertson *et al.*, 1987).

1.5.1. Control de la muda

La exuviación, es la manifestación de un complejo proceso. Esencialmente todos los tejidos están involucrados en la preparación de la siguiente muda: hay movilización de reservas, aumento de la división celular y modificación del comportamiento. Como en el resto de los animales, la coordinación de la serie de eventos necesarios para la ecdisis a través del tiempo de la intermuda, se efectúa mediante un sistema hormonal (Chang, 1991). El control de la muda de los crustáceos, se debe a la siguiente interacción:

1.5.1.1. La Hormona Inhibidora de la muda (HIM)

Se origina en el complejo órgano X-glándula sinusal (fig.1), localizado en los pedúnculos oculares (Chang, 1989). La HIM promueve la formación de nuevos tejidos e inhibe la actividad secretora del órgano Y (fig.2) aunque en estadios de intermuda y premuda tardía, el órgano Y es menos susceptible a HIM.

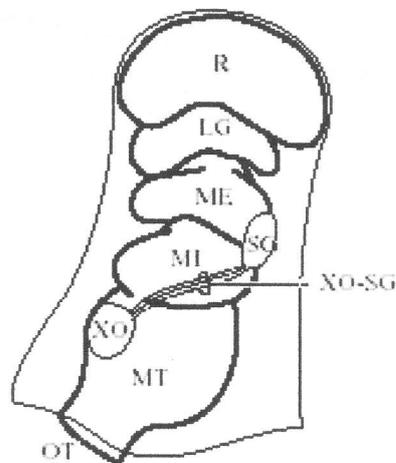


Figura 1. Complejo órgano X-glándula sinusal

1.5.1.2. Órgano Y

Es una glándula epitelial endocrina situada en la pared de la cavidad torácica, justo debajo la cutícula en la cámara prebranquial fue descrito como homólogo a la glándula prototorácica en insectos, como fuente de la hormona de la muda, que inicia la síntesis los ecdiesteroides: ecdisona, 20-OH-ecdisona, 3-Dehidroxiecdisona (Chang, 1989) entre otros (fig.3.).

La ecdisona, es transformado en tejidos periféricos, a su forma activa, la 20hidroxiecdisona que desencadena la preparación a una nueva ecdisis (Skinner, 1985).

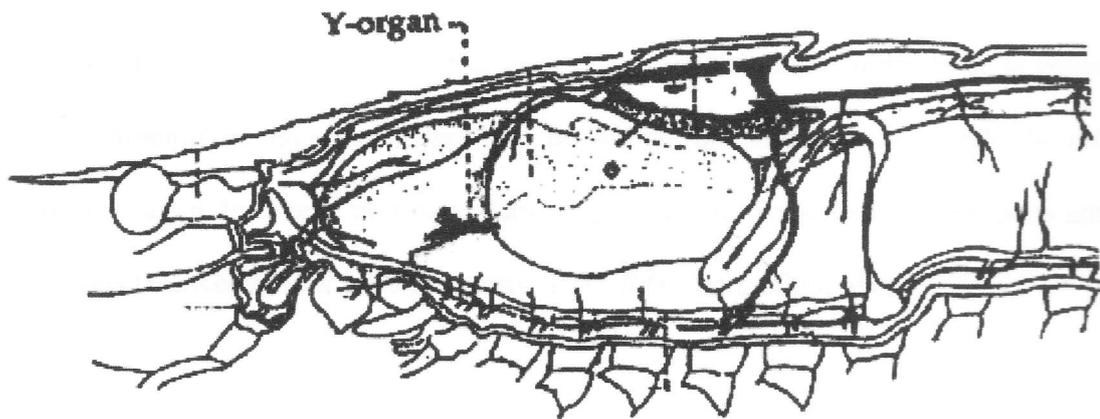


Figura. 2. Ubicación del órgano Y, en Penaeidos

Fuente: tomado de Sefiani, 1996.

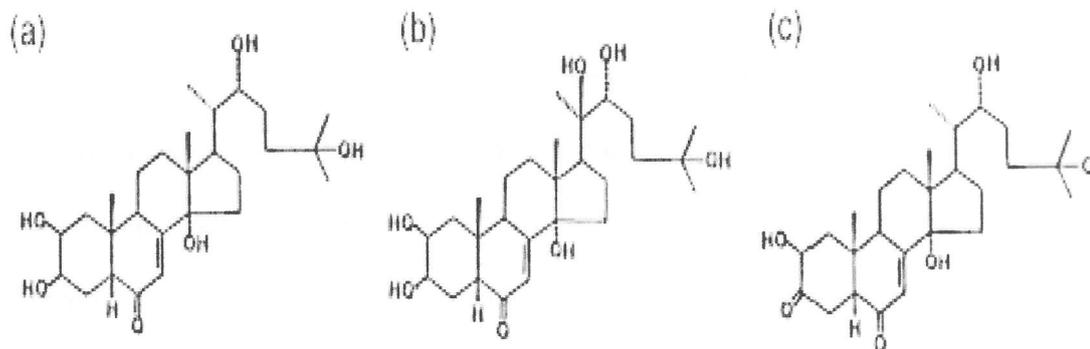


Figura.3. Estructura de ecdiesteroides en crustáceos: (a) ecdisona, (b) 20-OH-ecdisona, (c) 3-Dehidroiecdisona.

Fuente: tomado de Chang, 1997.

La concentración de ecdiesteroides en la hemolinfa varía drásticamente durante el transcurso del ciclo de muda. En la postmuda, inmediatamente después de la ecdisis, su concentración es mínima; luego hay un súbito incremento, alcanzando la máxima concentración durante la premuda, para luego disminuir en forma abrupta, poco antes de la muda (De Reggi *et al* 1975; Dorothy, 1985 *vide* Chan, 2000; Nieto, 2000).

Las alteraciones de la concentración de ecdiesteroides podrían ser reguladas tanto por los cambios en la tasa de síntesis y/o liberación de la hormona como por la tasa de hidroxilación de ecdisona a 20hidroxiecdisona y su degradación en la hemolinfa (Skinner *et al.*, 1985; Lachaise *et al.*, 1993).

1.6. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

Metabolismo, conjunto de reacciones químicas que tienen lugar dentro de las células de los organismos vivos, las cuales transforman energía, conservan su identidad y se reproducen. Todas las formas de vida, desde las algas unicelulares hasta los mamíferos, dependen de la realización simultánea de centenares de reacciones metabólicas reguladas con absoluta precisión, desde el nacimiento y la maduración hasta la muerte. Las células tienen una serie de enzimas o catalizadores específicos que se encargan de activar, controlar y terminar todas estas reacciones, cada una de las cuales está a su vez coordinada con muchas otras que se producen en todo el organismo.

1.6.1. Alteración de los carbohidratos

En condiciones fisiológicas aeróbicas normales, las reacciones glucolíticas son llevadas a cabo a partir del glucógeno, el cual constituye una de las reservas energéticas del organismo. Estas reacciones metabólicas, proveen la glucosa que es oxidada por el Oxígeno proveniente de la sangre, vía ciclo de Krebs, liberando anhídrido carbónico y agua. Además por esta ruta metabólica se obtiene la energía para la fosforilación del ADP con la consecuente formación de ATP.

1.6.2 Gluconeogénesis

Algunos tejidos como el cerebro, los eritrocitos, el riñón y el músculo en condiciones de ejercicio, requieren de un aporte continuo de glucosa como combustible metabólico, el

glucógeno puede mantener estas necesidades por sólo entre 10 y 18 horas en ausencia de carbohidratos en la dieta. Después de este periodo, el almacenamiento de glucosa disminuye drásticamente y es formada a partir de precursores diferentes al glucógeno como el lactato, el piruvato, glicerol (derivado del esqueleto de los triacilglicéridos almacenados en el tejido adiposo) y alfa-cetoácidos (derivados del catabolismo de los aminoácidos). La formación de glucosa no sucede por la simple reversa de la glucólisis, porque el equilibrio global de esta vía favorece fuertemente la formación de piruvato.

1.6.3. Reacciones de la gluconeogénesis

Siete de las reacciones de la glucólisis para la formación de piruvato o lactato, son reversibles y se usan por tanto en la gluconeogénesis, las tres restantes son irreversibles, por tanto en la gluconeogénesis son rodeadas por cuatro reacciones alternativas que favorecen energéticamente la formación de glucosa.

1.6.4. Regulación por los niveles de energía

La fructosa 1,6-bisfosfatasa es inhibida por los niveles elevados de AMP, el cual es señal de un estado energéticamente pobre. Por tanto niveles elevados de ATP y bajas concentraciones de AMP estimulan la gluconeogénesis.

a) Regulación por fructosa 2,6-bisfosfato.

La fructosa 1,6-bisfosfatasa es inhibida por la fructosa 2,6-bisfosfato, un modificador cuya concentración es influenciada por el nivel circulante de glucagon. La fructosa 1,6-bisfosfatasa existe en el hígado y riñones.

b) Defosforilación de la glucosa-6-fosfato.

La hidrólisis de la glucosa-6-fosfato por la glucosa-6-fosfatasa rodea la reacción irreversible catalizada por la hexocinasa y provee de una vía favorable para la formación de glucosa. La glucosa-6-fosfatasa como la piruvato carboxilasa, se encuentran en el hígado y riñón pero no en músculo. Por tanto, el músculo no puede proveer de glucosa al organismo por medio de la gluconeogénesis; de la misma forma, la glucosa-6-fosfato generada por la degradación del glucógeno muscular, no puede ser vertida al torrente sanguíneo.

1.7. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN CRUSTÁCEOS

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que ocurre en el interior de las células para obtener energía y la síntesis de macromoléculas a partir de compuestos sencillos mediante procesos metabólicos.

Varias revisiones han resumido evidencias sobre la existencia de 2 vías para el desdoblamiento de la glucosa en la obtención de energía en crustáceos, como son la glicólisis y la ruta Fosfato pentosa (Chang *et al.*, 1983) (Fig.4).

Así como los productos finales de la glicólisis son bien conocidos, la producción de NADPH a través del metabolismo de la glucosa-6-fosfato y la síntesis de ribosa por medio de la ruta fosfato pentosa, son igual de importantes en la economía energética de los crustáceos. Los nucleótidos reducidos son cofactores requeridos en la biosíntesis de lípidos, mientras que la ribosa es un sustrato en el metabolismo de ácidos nucleicos.

Diversos estudios demuestran que las vías para el metabolismo de la glucosa son diferentes por tejido y por estadio de muda. En el crayfish *Oroconectes virilis*, la glucosa es metabolizada por la vía fosfato pentosa durante la intermuda y en premuda esta actividad se reduce por la activación de la glicólisis (Chang *et al.*, 1983). En contraste con esta información, en el crayfish *Pacifastacus leniusculus*, el metabolismo de la glucosa ocurrió vía glicólisis durante la intermuda (Chang *et al.*, 1983) (Fig.4).

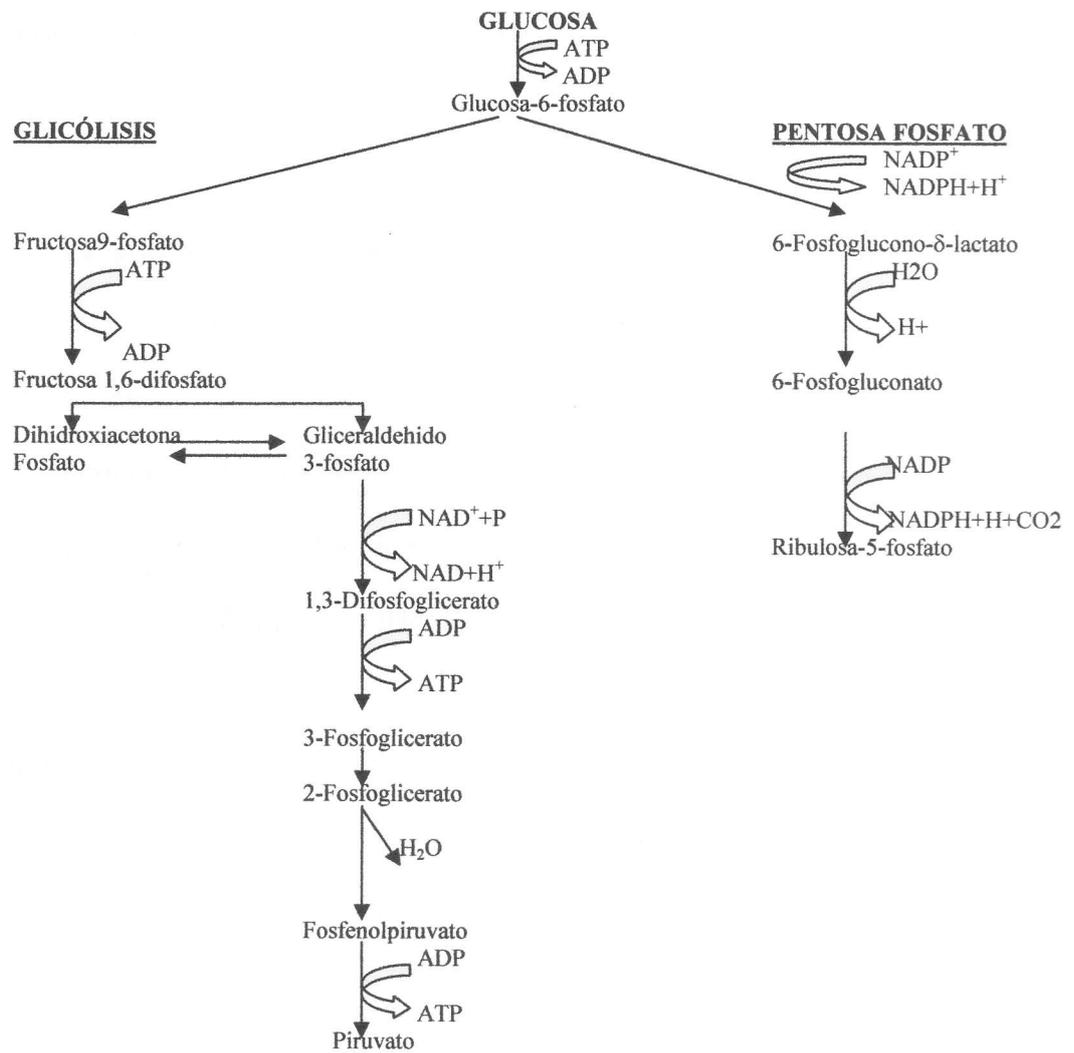


Figura 4. Diagrama de la vía de glucólisis y fosfato pentosa, en el metabolismo de la glucosa.

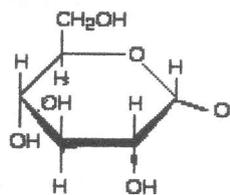
Fuente: tomado de Chang *et al.*, 1983.

Debido a que la literatura existente describe el metabolismo de carbohidratos en diferentes tejidos, de una multiplicidad de especies de crustáceos, es difícil establecer una sola ruta de metabolismo de la glucosa (Fig.5). Sin embargo, la información sugiere algunas generalizaciones:

1. La glicólisis (formación de ácido láctico a partir de glucosa) es la ruta catabólica principal de la glucosa en el músculo de crustáceos.
2. La relación de catabolismo glicolítico y no glicolítico es más baja en las branquias y hepatopáncreas que en otros tejidos.
3. La síntesis y degradación del glicógeno varía de manera definida a través del ciclo de muda y son reguladas por hormonas.

La naturaleza y los niveles de los carbohidratos circulantes en la hemolinfa son afectados por ciertos parámetros como el estadio de muda, estrés (Santos *et al.*, 1996), temperatura, salinidad (Ranferi, 2002) y la hormona hiperglicémica (Chung *et al.*, 2003)

a



glucosa

b

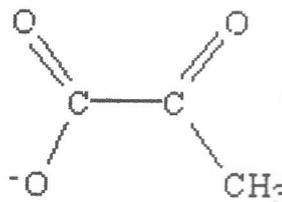


Fig. 5. Estructura química de; (a) glucosa, (b) piruvato.

Fuente: Tomado de Lehninger, 1982.

1.7.1. Control hormonal de la glucosa

En crustáceos la variación de glucosa a lo largo de un ciclo de muda, se debe a un péptido estimulador llamado hormona hiperglicémica de crustáceos (CHH). Esta hormona posee en su estructura: una secuencia de 72 aminoácidos, un piroglutamato unido al N terminal y una amino valina al C terminal.

Las CHHs (CHH-A y CHH-B) son los neuropéptidos más abundantes en la glándula Sinusal (SG) (Cuzon *et al.*, 2000). Esta neurohormona desempeña un rol importante en la regulación de la glicemia, incrementa los niveles de glucosa en la hemolinfa vía movilización de glucosa almacenada en hepatopáncreas y músculo. El decrecimiento del nivel glicémico se debe a la reversión del proceso en la producción de glucosa en tejidos objetivos, hepatopáncreas y músculo (Verry *et al.*, 2001).

1.8. PÉPTIDOS TIPO INSULINA

1.8.1 Insulina

La insulina (Fig.6) es una proteína dimérica unida por puentes disulfuro, la cual es sintetizada como un precursor de cadena simple que primero pierde el péptido señal, y posteriormente pierde un segmento conocido como péptido C, antes de llegar a ser la molécula hormonal madura (Froesch *et al.*, 1985).

En vertebrados, la insulina es producida por un grupo de células endocrinas pancreáticas (células β) y su función es mantener los niveles normales de glucosa en la sangre (Froesch *et al.*, 1985). Los efectos de la insulina sobre tejidos específicos son metabólicos, promueven la captación de glucosa (Ullrich *et al.*, 1997).

El descubrimiento de la insulina representó un gran paso en la medicina clínica, y contribuyó sustancialmente al progreso en el campo molecular y la endocrinología, en el uso de insulina para tratamiento de diabetes, gran interés en esta hormona y consecuentemente se convirtió en un recurso disponible para estudios de caracterización estructural y funcional (Steiner *et al.*, 1967).

La proinsulina e insulina fueron las primeras hormonas proteicas cuya secuencia de aminoácidos fue determinada (Ryle *et al.*, 1955; Steiner *et al.*, 1967; Adam *et al.*, 1996). El cDNA de la insulina fue uno de los primeros en ser clonados por la técnica de ADN recombinante (Chan *et al.*, 2000). A la vez, con el avance en la endocrinología molecular se logró determinar la filogenia y el origen evolutivo de la insulina.

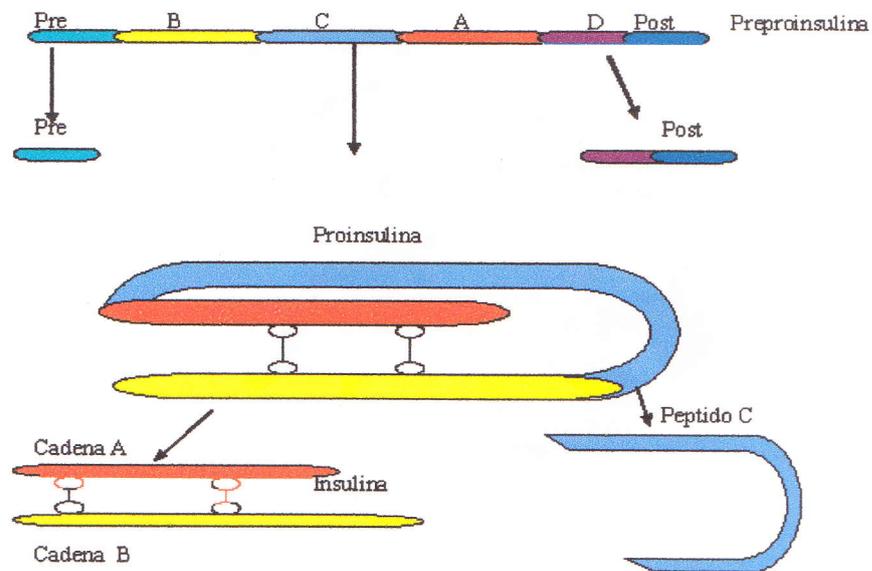


Fig.6. Estructura de la insulina, constituida por 51 aminoácidos. La síntesis de insulina atraviesa diferentes etapas: se fabrica como preproinsulina que luego se transforma en proinsulina al cortarse sus extremos. La mayoría de la proinsulina se separa en dos partes: el "péptido C" (conector) y la insulina, que está constituida por dos cadenas polipeptídicas, una de 21 aminoácidos y otra de 30, unidas por dos puentes disulfuro.

Fuente: www.porquebiotecnología.com.ar.

1.8.2 Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)

Posteriormente al descubrimiento de la insulina, se identificaron a los factores de crecimiento tipo insulina IGF-I y IGF-II, que juntos forman un sólo grupo de polipéptidos, debido a un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos y en la estructura terciaria. fig 7.

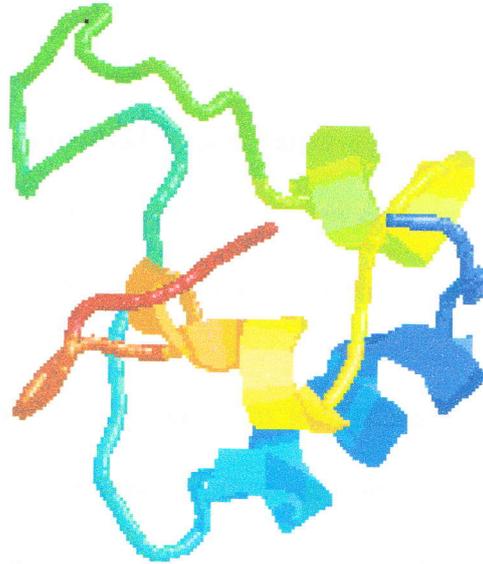


Fig.7. Estructura biológica del IGF, basada en difracción de cristal de rayos-X.

Fuente: Tomado CSIRO, 2004.

Los IGFs son sintetizados por varios tipos de células y tienen efectos autocrinos o paracrinos sobre células objetivo cercanas, así como desempeñar una acción endocrina a través circulación, cuando van acompañados por una proteína enlazante (Sara *et al.*, 1990). Estudios evidencian que los IGFs son un factor esencial de crecimiento, estimulan la mitogénesis y crecimiento celular (Baker *et al.*, 1993).

1.9. PÉPTIDOS TIPO INSULINA EN ARTROPODOS

La existencia de péptidos tipo insulina en artrópodos se reportó por primera vez en 1984, con la identificación estructural de la secuencia de aminoácidos de péptidos aislados (PTTH) del gusano de seda, *Bombyx mori*, capaz de estimular la producción de

ecdiesteroides en otra especie, *Samia cynthia ricini*, esta hormona denominada bombixin (Smit *et al.*, 1998; Riehle *et al.*, 1999), posee gran similitud a la insulina, ambas consisten en dos cadenas, conectadas por varias ligaduras de disulfuro, además comparten igual número de residuos de Cisteínas en cada cadena, y el espacio entre ellos, son exactamente como en insulina (Smit *et al.*, 1998).

Posteriormente, péptidos tipo insulina han sido identificados en el cerebro de otras especies de insectos como la mariposa, *Calliphora vomitaria*; la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y la langosta *Locusta migratoria* (Smit *et al.*, 1998).

Graf *et al.*, (1997), realizó estudios en el mosquito *Aedes aegypti*, mostrando una estimulación directa de insulina bovina en la producción de ecdiesteroides y síntesis de proteínas en ovarios mediante cultivos *in vitro*.

Diversos estudios han demostrado la presencia de un péptido tipo insulina, que regula el metabolismo de la glucosa en algunos tejidos en insectos (Verry *et al.*, 2001).

En contraste a reportes en insectos, estudios en crustáceos evidencian que péptidos tipo insulina (insulina-IGF) incrementan el nivel de glucosa en tejidos (hepatopáncreas, músculo y branquias (Richardson *et al.*, 1997; Kucharski *et al.*, 1997)), demostrando que la insulina actúa en forma antagónica CHH, causando incremento de glucosa en tejidos, es decir cumple una función metabólica en la síntesis de carbohidratos.

1.9.1. Insectos

Poco tiempo después del descubrimiento de la insulina, algunos investigadores pensaron que esta hormona estaba presente solo en mamíferos y aves.

El aislamiento y caracterización de moléculas tipo insulina en invertebrados fue realizado en base a conocimientos de las propiedades de insulina en vertebrados. En esos estudios se evaluó la inmunoreactividad o bioactividad de tipo insulina en extractos de tejidos intestinal en *L. migratoria* sin tener éxito.

El primer péptido tipo insulina caracterizado en insectos fue de *Bombyx mori*, originalmente llamado hormona protoracicotrópica basada en su efecto ecdisiotrópico en *Samia cynthia* (Nagasawa *et al.*, 1986). Luego se denominó bombyxin por que no produjo el mismo efecto en el organismo del cual fue aislada. No obstante, esta molécula afecta al metabolismo de las reservas de carbohidratos en *Bombyx mori* (Satake *et al.*, 1997). La secuencia de Bombyxin así como la insulina está formada por cadenas péptídicas A y B entrelazadas por un puente bisulfuro.

Péptidos tipo insulina han sido identificados en el cerebro de otras especies de insectos como *Locusta migratoria* (LIRP) (Chan *et al.*, 2000), *Aedes aegyptis* (Riehle *et al.*, 1999), *Drosophila melanogaster* y *Calliphora vomitaria* (Duve *et al.*, 1979).

Recientes estudios muestran la presencia de receptores *Drosophila melanogaster* y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. La mutación en estos receptores causa defectos en el crecimiento y desarrollo (Chen *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997). De esta manera la insulina además de desempeñar un papel en el metabolismo de los carbohidratos, se encuentra regulando procesos de crecimiento en insectos.

1.9.2. Crustáceos

La insulina es clásicamente considerada como una hormona secretada por las células β del páncreas en vertebrados. Sin embargo, algunos investigadores han demostrado la presencia de insulina o IGF en crustáceos.

Por ejemplo, péptidos que interactúan específicamente con anticuerpos contra la insulina bovina han sido detectados en hepatopáncreas, intestino y hemolinfa de la langosta *Homarus americanus* (Sanders, 1983b). En el cangrejo *Carcinus maenas* (Davidson *et al.*, 1971) y la langosta *Panulirus argus* (Gallardo *et al.*, 2003), extractos etanólicos de hepatopáncreas mostraron actividad tipo insulina al ser probados en un tejido de ratón o radioinmunoensayos para insulina humana, respectivamente. En el camarón *Penaeus monodon* receptores de insulina han sido caracterizados en hepatopáncreas y músculos (Chuang *et al.*, 1994).

A pesar de la acumulada evidencia que soporta la existencia de péptidos tipo insulina/IGF en crustáceos, hay escasos datos acerca a su importancia funcional a nivel filogenético.

1.10. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA DE ENZIMA LIGADA (ELISA)

La técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) que se podría traducir como “Ensayos complejo enzimático inmunosorbente” se basa en la cuantificación de una reacción enzimática asociada a la formación de complejos inmunes. Esta técnica combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un simple ensayo enzimático, mediante el uso de anticuerpos o antígenos unidos a una enzima fácilmente detectable.

El concepto de usar una reacción específica entre un anticuerpo y un antígeno como método de cuantificar analitos le valió a Rosalyn Yalow el Premio Nobel de Medicina. Su trabajo llevo al desarrollo de los Radio-Inmuno Ensayos (RIAs, usan compuestos marcados radioactivamente) en los 50, lo que permitió la explosión del campo de la Endocrinología en los 60. Esta idea inicial fue modificada por los histólogos quienes desarrollaron la Inmunocitoquímica que se basa en la unión de la peroxidasa a un anticuerpo, usándose el conjugado para localizar antígenos en los tejidos (método cualitativo). La detección es posible gracias a la conversión enzimática de un sustrato en un producto coloreado. Los ELISAs (desarrollados por primera vez en 1971) también

usan un conjugado enzima-anticuerpo y hace posible la detección y cuantificación específica de antígenos o anticuerpos en solución. El ELISA, no es más que una reacción colorimétrica en la que se relaciona la absorbancia del compuesto coloreado formado con la concentración del analito en la muestra.

La técnica ELISA ofrece una serie de ventajas sobre el uso de RIA:

- No usa compuestos radiactivos. Se evita la responsabilidad de producir y almacenar residuos radiactivos.
- Menor equipamiento.
- Puede ser más fácilmente desarrollado y validado para una nueva sustancia.
- Menor coste.

Estas técnicas (tanto RIA como ELISA) se puede desarrollar y usar para cuantificar cualquier molécula capaz de provocar una respuesta inmune específica (hormonas, proteínas, anticuerpos). Su uso está ampliamente extendido: Tests caseros de embarazo, controles antidoping, detección del VIH.

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

1.10.1. Diferentes Formatos de ELISAs

Existen multitud de diseños a la hora de realizar un ELISA para cuantificar cualquier antígeno (nos centramos en antígenos aunque también es aplicable a anticuerpos) pero todos ellos se basan en el mismo concepto: Usando cantidades conocidas de antígeno estándar sin marcar, se genera una curva estándar que relaciona absorbancia (del producto coloreado formado) con la cantidad de antígeno. De esta curva se puede determinar mediante unos cálculos sencillos la cantidad de antígeno en la muestra problema

1.10.2 ELISA tipo sandwich

El anticuerpo primario se adhiere a la placa. El antígeno (presente en las muestras problema o en las muestras de concentración estándar conocida) se incuba, siendo capturado por el revestimiento (Anticuerpo primario) en una cantidad proporcional a la cantidad presente en solución. Después de lavarse el exceso de antígeno (no ha reaccionado), se añade al pocillo el anticuerpo secundario marcado, que se une al antígeno que está unido al anticuerpo primario. Después de una nueva serie de lavados (eliminación del anticuerpo marcado que no ha reaccionado) se añade el sustrato que contiene el compuesto cromógeno, que al reaccionar con la marca del anticuerpo produce un producto coloreado, detectándose la variación en la cantidad de color por espectrofotometría (Lector de microplacas). La cantidad de señal generada en la reacción es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Tiene como ventaja su gran sensibilidad y especificidad (fig.8).

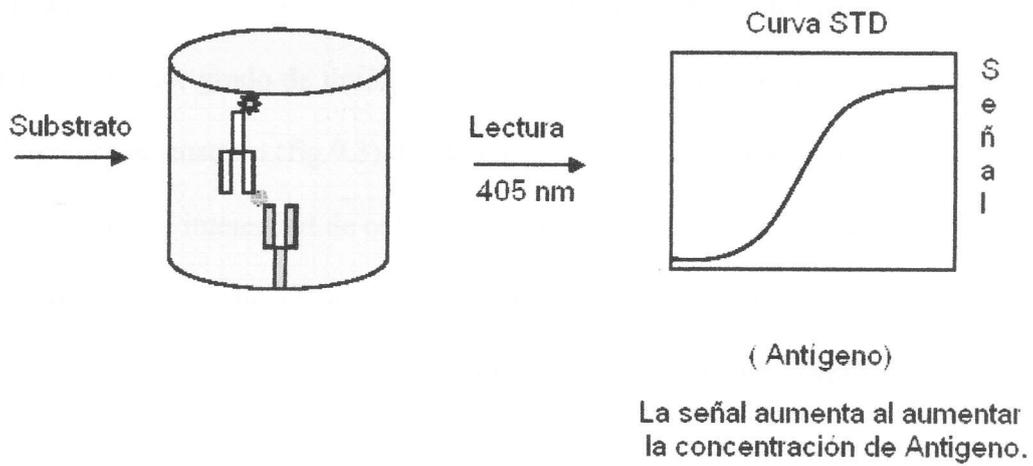
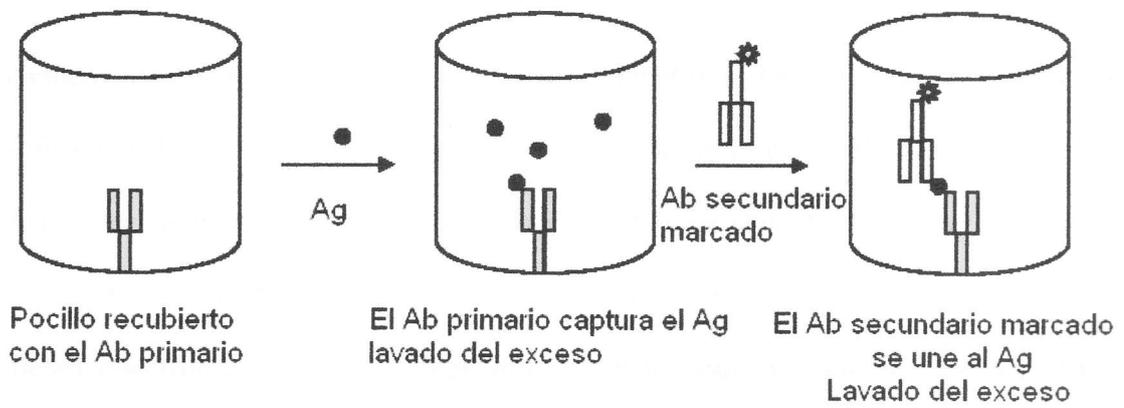
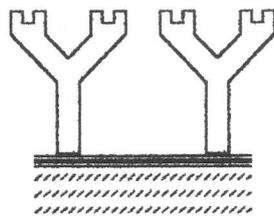


Fig.8. Esquema del análisis de ELISA tipo sandwich .

1.10.3. ELISA del tipo competitivo

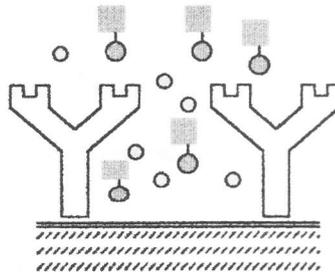
Recientemente el método ELISA del tipo competitivo ha sido diseñado para la cualificación de ecdiesteroides en artrópodos (Porcheron *et al.*, 1989; De Reggi *et al.*, 1992), el cual se resume en el siguiente método de funcionamiento: El primer anticuerpo (IgG) es adherido a una fase sólida (fig.9.1); posteriormente se adiciona el antígeno que se desea cuantificar, luego se agrega otro antígeno marcado con una enzima, estos quedan libres en el medio y se agrega el segundo anticuerpo considerado como un 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 (fig.9.2), lo cual se verá reflejado al agregar un sustrato (fig.9.3) 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 de antígeno presente en la muestra. La intensidad del color es leída en un espectrofómeto, obteniendo resultados en absorbancias (unidades ópticas). Los resultados son interpolados en la curva estándar de 20-hidroxiecdisona, la cual ha sido sujeta al mismo proceso que las muestras. Tiene como ventajas la mayor sencillez por el menor número de pasos aunque la especificidad es menor.

1



Fijación de anticuerpo IgG en la fase sólida exceso se elimina por lavados

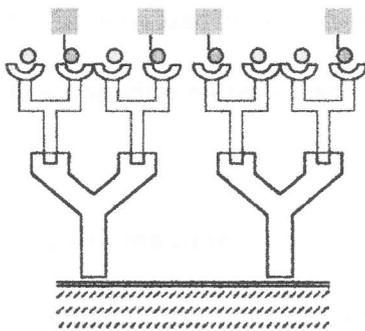
2



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

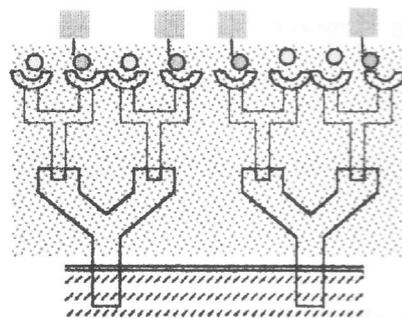


Se agrega el segundo anticuerpo AS4919, el cual será reconocido por el anticuerpo IgG, luego ocurre una competencia de unión entre el antígeno de interés presente en la muestra y el antígeno marcado por la enzima



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

Fig.9. Esquema del protocolo del análisis de inmunoabsorbancia de enzima ligada para la determinación de ecdiesteroides.

Fuente: Tomado de Porcheron *et al.*, 1989.

1.10.8. Componentes básicos

a) Anticuerpo

Es una proteína del suero producida por la serie linfoide, que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y que es sintetizada en respuestas a una sustancia ajena (Ag). Tiene la capacidad de reacción con el Ag o configuración antigénica responsable de su producción. Podemos distinguir:

- Anticuerpos policlonales; sintetizados por múltiples poblaciones de células productoras de Ac y por lo tanto, con ligeras diferencias en sus afinidades y especificidades por el Ag.
- Anticuerpos monoclonales; sintetizados por una población de células idénticas (clon) que, por tanto producen Ac exactamente iguales frente a un Ag. Están dotados de mayor especificidad.

b) Antígeno

Es cualquier sustancia capaz de provocar la producción de anticuerpos. El grupo químico reconocido por el Ac se denomina determinante antigénico o epitopo. Es el analito que va a ser medido.

c) Antígeno marcado

Es un analito esencialmente idéntico al Ag que va a ser medido, y que esta marcado con uno o más átomos de un determinado radionucleido.

1.10.9. Valoración de un anticuerpo

a) Título del anticuerpo

Es aquella dilución del anticuerpo que liga el 50 % del Ag marcado bajo condiciones determinadas. Se calcula haciendo diluciones seriadas del Ac e incubándolas en una cantidad fija de Ag marcado, manteniendo constante el volumen del tampón, la T y el tiempo de incubación; después de la incubación se separan las fases libre/ligada y se realiza el contaje. Se representa el porcentaje de ligada y se realiza el contaje. Se representa el porcentaje de ligado ($\% B_0/B_0$) frente a las diluciones del Ac y se elige aquellas diluciones que ligue entre el 30-50 % o bien un cociente (B/F) o de 0.7 a 1.8.

b) Afinidad del anticuerpo

Es la fuerza con la que el Ac liga al Ag y normalmente se expresa como constante de asociación. Se define la constante de afinidad como la inversa de la concentración molar de Ag que liga o satura el 50 % del Ac.

2. PROCEDIMIENTO DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL CAMARÓN *Penaeus vannamei*.

El siguiente estudio fue realizado en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Marinas y Acuicultura CENAIM-ESPOL. Situado en la comunidad de San Pedro, de la Parroquia Manglaralto en la Provincia del Guayas.

Las muestras biológicas usados en el bioensayo fueron: camarones juveniles *Penaeus vannamei* de $10,31 \pm 0.17$ gramos de peso, de piscinas camaroneras de OPUMARSA (Palmar) y la Estación Experimental de la Fundación CENAIM-ESPOL (Palmar). Los 2 grupos de animales fueron mantenidos en áreas separadas.

Para el primer bioensayo, se utilizó un tanque exterior de 8 toneladas y para el segundo ensayo un tanque de 18 toneladas del departamento de Maduración (CENAIM-ESPOL), ambos tanques se mantuvieron con un recambio de agua (37 ppt) de 100 %. La alimentación se basó en un 5 % de dieta seca comercial, a temperatura ambiente (25 °C).

2.1. MANEJO DEL EXPERIMENTO

2.1.1. Efecto de insulina / rhIGF-I sobre órganos Y

2.1.1.1. Insulina

Se elaboró una solución madre con 57.33 mg de insulina bovina (SIGMA) en 1 ml de solución de ácido acético al 0.7 %, obteniendo una concentración final de 10^{-2} M.

A partir de la solución stock se preparó diluciones 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M, 10^{-8} M y 10^{-10} M utilizando medio de cultivo.

2.1.1.2. Factor de Crecimiento Tipo Insulina recombinante humana (rhIGF-I)

Se preparó una solución madre con 50 μ g de rhIGF-I (SIGMA) en 1 ml de PBS, obteniéndose una concentración de 1.3×10^{-5} M. Posteriormente se realizó una segunda dilución de 1×10^{-8} M. en 1 ml de PBS, que fue utilizada para preparar las diluciones 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M y 10^{-12} M.

2.1.1.3. Determinación de Estadíos de Muda

Los estadíos de Muda fueron establecidos mediante la observación en microscopio de la parte interna del urópodo (Fig.10).

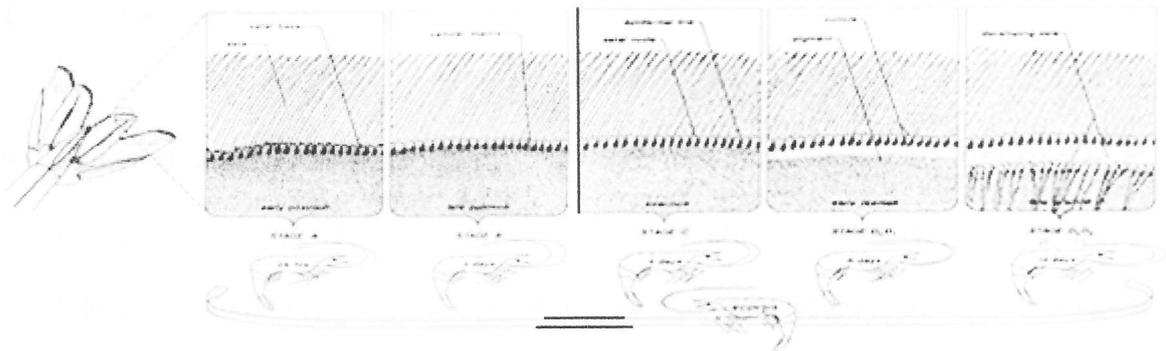


Figura.10. Caracterización de estadíos de muda mediante observación microscópica directa.

Fuente: Robertson *et al.*, 1987.

- **Estadio A:** Inmediatamente después de la Ecdisis, la matriz celular pigmentada llena completamente las base setales, duración dos días.
- **Estadio B:** La matriz celular retraída de la base setal, fácilmente reconocida por el espacio presente ocurrido en la base por retracción, ocurre en el tercer día.
- **Estadio C:** La matriz ausente de la base setal y aparecen pigmentadas desde la línea epidermal hasta la base de las mudas setales, se presenta en el quinto día.
- **Estadio D₁:** El pigmento retraído desde la base de las mudas sobre la vieja cutícula, octavo día.
- **Estadíos D₂ - D₃:** El futuro pigmento retraído y el desarrollo de nuevas setas es observado en el décimo segundo día, luego se produce la ecdisis (muda) al siguiente día (24 horas), se observa el estadio A.

2.1.1.4 Disección del Órgano “Y”

Se colocó al animal en agua salada con hielo por 5 minutos para desacelerar el metabolismo. Una vez inmovilizado el animal, se realizó un corte para separar el cefalotórax del abdomen; luego se realizó un segundo corte longitudinal desde la región dorsal a la ventral del cefalotórax, que lo dividió en dos mitades iguales. Sobre una bandeja pequeña de metal con agua de mar estéril a 4 °C, se fijó a una almohadilla de caucho una de las secciones, colocando la parte del exoesqueleto hacia abajo (fig.11).

A continuación se separó las branquias y apéndices hacia atrás 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. 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 a 4 °C por diez minutos, para su estabilización previa a la incubación en medio de cultivo.



Figura.11 Disección del Órgano "Y" de camarones *Penaeus vannamei*.

2.1.1.5. Cultivo de órganos "Y" *in Vitro*

Una vez disectados los órganos "Y" y estabilizados en agua de mar estéril (anexos # 1), durante 10 minutos a 4 °C, se transfirió cada uno de los tejidos "Y" a celdas de microplacas (96 celdas Nunc-Immuno TM surface) que contenían 200 µl/celda de medio de cultivo M199 (preparación según Blais *et al.*, 1994) y fueron mantenidos por una hora (T1) a temperatura ambiente. Luego de la primera hora de incubación, un órgano Y (tratamiento) fue transferido a una celda que contenía medio de cultivo fresco y la hormona a probar (Insulina o Factor de crecimiento tipo insulina), mientras que el otro órgano Y (control) se depositó en una celda con medio de cultivo fresco sin hormona.

Ambos órganos Y fueron incubados por un lapso de dos horas (T2). Posteriormente los mismos fueron removidos a otra celda con medio de cultivo fresco por una hora más

(T3) (fig.12). Terminado el tercer período de incubación, se desecharon los órganos Y almacenando las muestras de medio de cultivo a -20 °C.

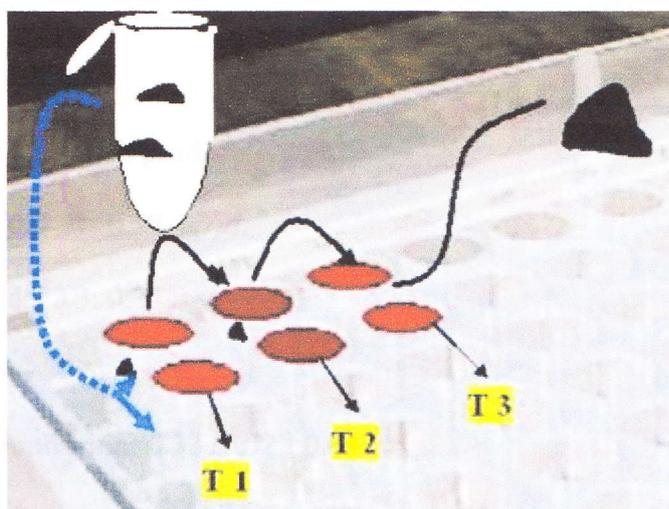


Figura.12. Cultivo de órganos "Y" *in Vitro*, diagrama de incubación del órgano Y.

Para determinar el grado de estimulación de ecdiesteroides se relacionó la concentración obtenida del T1 y el T3 para el tratamiento y el control del proceso de incubación (ver ejemplo).

-Primera hora (T1)

Concentración de ecdiesteroides del OY-Tratamiento (0,017 $ng/\mu l$).

Concentración de ecdiesteroides del OY-control (0,033 $ng/\mu l$).

Tasa de la concentración de ecdiesteroides T1 $0.017 / 0.033=0.52$

-Tercera hora (T3)

Concentración de ecdiesteroides del OY-Control 0.058 (*ng/μl*).

Concentración de ecdiesteroides del OY-Tratamiento (0.019 *ng/μl*).

Promedio de la concentración de ecdiesteroides T3 $0.019/0.058 = 0.33$

-Relación de la tasa de producción t3/t1.

Tasa del T1: 0.52 *ng/μl*.

Tasa del T3: 0.33 *ng/μl*.

*Tasa de estimulación: $0.33 / 0.52 = 0.64$

*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.

2.1.1.6. Ensayo de inmunoabsorbancia de enzima ligada (elisa) (Anexo # 3)

2.1.1.6.1. Curva estándar

Se utilizó 20-Hidroxyecdysone (20-E SIGMA) a una concentración 10^{-6} M, como solución madre.

La curva estándar consistió en diluciones en un rango de 10^{-7} M. a 10^{-11} M, para lo cual se preparó 10 microtubos con medio de cultivo, 5 de ellos con 170 μ l, los otros 5 con

360 μ l y fueron ordenados de forma alternada.

Se agregó 80 μ l de solución 10^{-6} M al microtubo A (170 μ l de M119) y 40 μ l al microtubo B (360 μ l de M119), luego se homogenizó con vortex, los microtubos C y D recibieron 80 μ l y 40 μ l de la solución del microtubo B, respectivamente. Se repitió el proceso hasta completar las 10 muestras (fig.13).

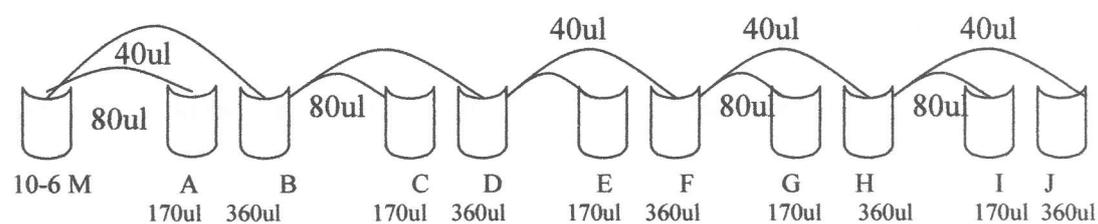


Figura. 13. Curva estándar preparada con medio de cultivo M199 y 20-E.

2.3.1.6.2. Protocolo de la Técnica Elisa (Anexo#.2).

a) Fijación (Coating) de placas ELISA.

Se preparó una solución de recubrimiento para 10 microplacas, con una dilución 1:1000 de anticuerpo (GAR, Bélgica) en 10 ml de tampón de Fosfato 1 M., pH 7,4 y 190 ml de agua miliQ. Se distribuyó 200 μ l de la mezcla/celda de las microplacas y se incubó a temperatura ambiente por 24 horas. Se agregó 100 μ l por celda de una solución de BSA (0,300 g en 100ml de 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 incubado y se lavó 5 veces con 200 μ l por celda de solución de lavado (0,01 M de tampón de Fosfato con 0,05 % de Tween 20).

c) Solución de anticuerpo y tracer enzimático

Se empleó el tracer (rastreador) enzimático succinyl-20 hidroxyecdysone ligado a la peroxidasa donado por el Dr. Delbeque (Universidad Bordean, Francia) y anticuerpo anti 20-E de conejo (AS 4919) donado por el Prof. Patrick Porcheron (Universidad de Paris, Francia).

Se preparó una dilución 1:1000 de anticuerpo y una solución de tracer a una dilución 1:10000 con tampón de fosfato 0.1M.

Las diluciones fueron realizadas en tubos de vidrio y almacenadas a 4 °C para su uso en el momento.

d) Incubación

Las celdas de la microplaca se llenaron por duplicado de forma ordenada con los estándares: 50 μ l cada uno; seguido de las muestras, 50 μ l, finalmente dos celdas con 50 μ l de M119 como control de porcentaje de unión y dos celdas con 100 μ l de M119

como control o blanco, luego se agregó 50 μ l de tracer enzimático y 50 μ l por celda de anticuerpo AS 4919 a todas las celdas excepto a las correspondientes al blanco, con ayuda de una pipeta multicanal.

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

e) Reacción enzimática

Se lavó la microplaca, como en el literal b), luego se adicionó 200 μ l por celda de la mezcla de reactivo de coloración y se dejó en agitación continua, para el desarrollo de la reacción por 50 minutos.

f) Lectura y análisis

Finalmente se leyó la microplaca en espectrofotómetro BIOCHRAMITA a 620 nm. La información obtenida, se transformó utilizando la fórmula:

$$\frac{S-B}{B_0} \times 100$$

B: Es igual a la absorbancia del blanco.

S: Es igual a la absorbancia del estándar o muestra.

B₀: Es igual a la absorbancia del control de 100 % de unión.

Se graficó la curva estándar con los ecdiesteroides (logaritmo base 10) en la abscisa versus B/B₀ en la ordenada. Los datos fueron linearizados y la fórmula resultante fue utilizada para el procesamiento de los datos de las muestra.

2.2. EFECTO DE INYECCIÓN DE INSULINA/rhIGF SOBRE METABOLISMO DE LA GLUCOSA (Anexos.#. 4.)

2.2.1. Administración de las hormonas (Insulina/rhIGF-I)

Fueron seleccionados animales de 10.3 ± 0.17 gramos, que fueron inyectados en diferentes grupos de tratamientos (insulina, factor de crecimiento y PBS), a una concentración de 0.1 ug/g de peso del animal, en un volumen de solución del 1 % del peso del animal (100 ul).

Se inyectó en el primer segmento abdominal, región ventral (membrana artropoidal) del camarón.

2.2.2. Extracción de hemolinfa

Para la extracción de la hemolinfa se utilizaron jeringuillas descartables de 1 ml (Insulin Syringe 26 G 1/2) enjuagadas con anticoagulante (Citrato de Sodio al 10 %) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La hemolinfa fue extraída del primer segmento abdominal, región ventral (membrana artropoidal) del animal. 100 ul de hemolinfa fue transferida a microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) previamente llenados con 300 ul de etanol al 95 %. Los microtubos fueron centrifugados a 4.000 r.p.m. por 5 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se separó el sobrenadante para el respectivo análisis.

2.2.3. Extracción de tejidos

2.2.3.1 Extracción de hepatopáncreas

Los camarones fueron colocados en agua salada, luego se le realizó un corte transversal de la membrana que une el cefalotórax con el abdomen en la región dorsal, seguido por un segundo corte desde la parte posterior a la anterior del cefalotórax, quedando descubierto el hepatopáncreas y finalmente se realizó un corte en el sitio de unión del cordón intestinal.

El hepatopáncreas fue transferido a un microtubo de criopreservación (NUNC®), y almacenado en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

2.2.3.2. Extracción del músculo

En la extracción del músculo, se eliminó el exoesqueleto del abdomen y se cortó transversalmente en el segundo segmento abdominal. El tejido fue transferido a un microtubo de criopreservación (NUNC®) y luego almacenado en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

2.2.3.3. Extracción de branquias

La extracción de las branquias se realizó eliminando el exoesqueleto que cubre la cámara branquial, para luego realizar un corte en la parte basal de las branquias. Luego

se transfirió las branquias a un tubo de criopreservación (NUNC®) y almacenado en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

2.2.4. Análisis de Glucosa

Para análisis de glucosa libre (hemolinfa) se utilizó un Kit (SIGMA) Glucosa, con la modificación del volumen de la muestra a cuantificar y para glucógeno en tejidos se realizó mediante el protocolo de Dubois *et al.*, (1956).

2.2.4.1. Curva estándar de glucosa (Kit Sigma)

Se realizó una curva estándar de glucosa, elaborada en etanol 95 % y agua deionizada (v/v: 3:1) para el análisis de la hemolinfa y en ácido tricloro acético (ATC) para el análisis de tejidos.

A partir de una solución madre de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de glucosa se prepararon diluciones seriadas de 0-5 μg (10 puntos) para un volumen de 120 μl . (Fig. 14).

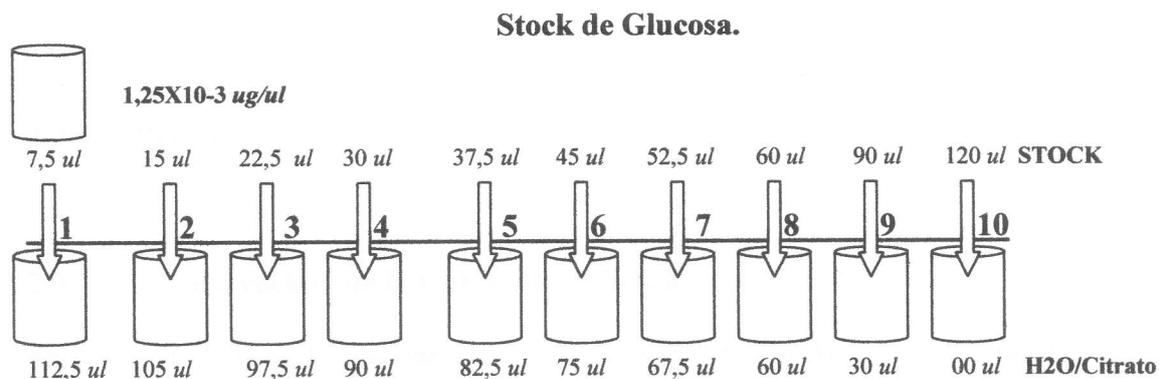


Figura.14. Curva Standard de glucosa, elaborada para corregir los datos de lectura realizadas con el Kit sigma para glucosa.

2.2.4.2. Protocolo de análisis de glucosa (Kit Sigma)

En microtubos se mezcló 80 *ul* de reactivo del kit de glucosa sigma y 40 *ul* de muestra o estándar. Luego se incubó por 15 min. a temperatura ambiente. Las mezclas fueron leídas en el espectrofotómetro (Thermo spectronic-Genesys 20) a 340 nm.

2.2.4.3. Procesamiento de tejidos (suero enzimático)

2.2.4.3.1. Preparación de suero enzimático

Se utilizó un microhomogenizador de tejido (Ultra Turax T₂₅) para macerar el hepatopáncreas en 0,5 ml de agua destilada y enrasado hasta 1,5 ml con la misma calidad de agua. Se usó tubos de microensayos (eppendorf) para mantener el hepatopáncreas homogenizado y sumergido en hielo picado hasta su inmediata centrifugación a 13000 r.p.m. por 5 minutos a 4 °C en centrífuga (KOKUSAN H200B) y congelados en -80 °C, el día anterior, la muestras fueron transferidas a un congelador de -20 °C por 24 horas y posteriormente mantenidos a 0 °C.

2.2.4.2. Determinación de glucógeno

2.2.4.2.1. Preparación de la Curva de calibración

Se disolvió 0,01 g de glucosa en 20 ml de ATC (Ácido Tri-Cloro Acético) al 20 % (solución madre), seguidamente se tomó 2000 *ul* de solución madre y diluir a 10 ml

con ATC al 20 %, obteniéndose una concentración de 100 *ug/ml* (solución de trabajo) y a continuación se procedió a transferir 100, 150, 200, 300, 600, 400, 700 y 800 *ul* de solución de trabajo (100 *ug/ml*) a tubos de ensayos (20 ml) y se llevó hasta 2000 *ul* con agua destilada.

El blanco se prepara sólo con 2000 *ul* de agua destilada.

Se añadió a todos los tubos 500 *ul* de fenol al 80 % y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agitó inmediatamente.

Después de transcurrir 30 minutos se leyó en el espectrofotómetro a 492 nm.

2.2.4.3. Análisis de la muestra

En tubos plásticos de centrifuga de 10 ml, se adicionó 100 *ul* de suero enzimático a 2000 *ul* de ATC al 20 % y se agitó. El precipitado formado se descartó por centrifugación a 3000 r.p.m. por 20 minutos y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifuga con 2000 *ul* de éter de petróleo.

Después de centrifugar a 3000 r.p.m. por 20 minutos se descartó la fase superior que contiene éter y ATC cuidadosamente con ayuda de una pipeta de 5 ml.

A continuación se tomó 500 *ul* de la fase inferior hacia un tubo de ensayo de 20 ml. y se adicionó a todos los tubos 1500 *ul* de agua destilada, 500 *ul* de fenol al 80 % y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, para luego ser agitado.

Después de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 492 nm.

El resultado se expresó en *mg/ glucógeno/g hepatopáncreas*.

2.2.5.1. Diseño experimental

2.2.5.1.1. Experimento 1

El diseño experimental fué realizado para la determinación del efecto de la insulina/rhIGF sobre la síntesis de ecdiesteriodes en cultivos *in vitro* del Órgano Y, en diferentes estadios de muda, mediante arreglo factorial 5X4, con 8 unidades muestrales, comprendiendo un total de 160 muestras en el análisis por cada rhIGF, y para insulina un arreglo factorial 5X6, con 8 réplicas dando un total de 240 unidades muestrales, además de 8 unidades muestrales por estadio como control, como lo muestra la tabla I.

Tabla I. Diseño factorial del análisis de secreción de ecdiesteroides para insulina/rhIGF.

Factor A	Factor B										
Estadios de muda	Tratamientos										
	rhIGF				Insulina						Control
A-B	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	-
C	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	-
D 0	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	-
D 1	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	-
D 2-3	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	-

En el análisis estadístico, se realizó la prueba de Anderson-Darling para establecer la normalidad de los datos y la prueba Levene para homogeneidad de varianza. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante una tabla de contingencia y evaluados mediante "Ji" cuadrado.

2.2.5.1.2. Experimento 2

El diseño experimental consistió en la observación el efecto post inyección de insulina/rhIGF sobre los niveles de glucosa de la hemolinfa y tejidos de camarones juveniles *P vannamei*, después de 1, 3, y 5 horas, mediante un arreglo factorial 3X4

completamente aleatorio, con 10 unidades experimentales por tratamiento, dando un total de 120 unidades experimentales.

En cada unidad experimental se tomó 4 tipos de muestras (hemolinfa, hepatopáncreas, músculo y branquias) para el respectivo análisis de glucosa

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Anderson-Darling para establecer la normalidad de los datos y la prueba Levene para homogeneidad de varianza. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un diseño de Cuadrados Latinos y evaluados por el análisis de varianza (ANOVA). Una vez que se verificaron diferencias significativas ($p < 0.05$) los datos fueron analizados por la prueba de rangos múltiples de LSD, para determinar cual tratamiento fue diferente de otro.

Tabla II. Diseño factorial del análisis de glucógeno en tejidos para insulina/rhIGF.

Factor A	Factor B			
Tratamientos	Tiempos			
Insulina	0 hora	1 hora	3 horas	5 horas
rhIGF	0 hora	1 hora	3 horas	5 horas
Control	0 hora	1 hora	3 horas	5 horas

2.2.5.1.3. Datos evaluados

Ensayo 1

Estadíos de muda.

Insulina/rhIGF.

Producción de ecdiesteroides.

Se evaluó el estadio de muda en cada uno de los animales para poder comparar en que estadio y como fue el comportamiento frente a la hormona (Insulina/rhIGF) cuantificando el nivel de producción de ecdiesteroides.

Ensayo 2

Estadio de muda.

Insulina/rhIGF.

Niveles de glucosa y glucógeno en hemolinfa y tejidos.

Se evaluó el estadio de muda (intermuda) para ver el comportamiento frente a la hormona (Insulina/rhIGF), mediante la cuantificación de niveles de glucosa y glucógeno, en hemolinfa y tejidos.

3. EFECTOS DE LA INSULINA/rhIGF-I EN LA PRODUCCIÓN DE ECDIESTEROIDES Y NIVELES DE GLUCOSA.

3.1 EFECTO DE PÉPTIDOS TIPO INSULINA EN LA PRODUCCIÓN DE ECDIESTEROIDES

La habilidad de péptidos tipo insulina en estimular la producción de ecdiesteroides fue probada en órganos Y aislados de camarones juveniles *P vannamei* en diferentes estadios de muda.

Los órganos Y fueron cultivados *in vitro* durante tres tiempos diferentes.

3.1.1 Interacción de los estadios de muda con insulina bovina en cultivos *in vitro*

Órganos Y de camarones en diferentes estadios de muda, fueron sometidos a seis tipos de concentraciones de Insulina bovina (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M y 10^{-10} M).

Previo al análisis estadístico, los datos fueron asignados en grupos para luego clasificarlos dentro de cada grupo con respecto al nivel de efecto numerado del 1 al 4, para luego ser analizados mediante una tabla de contingencia y posteriormente ver si existen diferencias significativas mediante la prueba de "Ji" (Chi) Cuadrado.

Los resultados obtenidos después de aplicar el análisis de "Ji" Cuadrado no mostró efectos significativos ($p>0.05$) de interacción entre el estadio de muda y las concentraciones de insulina a los que fueron sometidos, como se muestra en la figura 15.

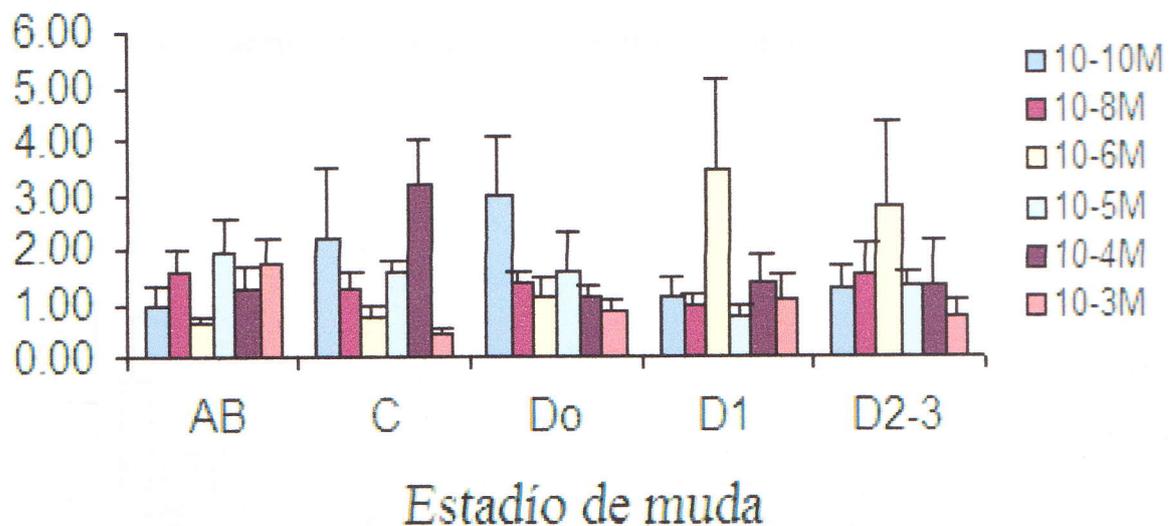


Figura. 15 Efectos de concentraciones de insulina sobre ecdiesteroides cuantificado en ratios, barras verticales indican el error estándar de la media

3.1.2. Interacción de los estadios de muda con rhIGF-I en cultivos *in vitro*

Previo al análisis estadístico, los datos fueron analizados de igual forma que el ensayo anteriormente descrito con insulina bovina en cultivos *in vitro*.

Los resultados obtenidos después de aplicar el análisis de "Ji" Cuadrado no mostró efectos significativos ($p > 0.05$) de interacción entre el estadio de muda y las concentraciones de rhIGF-I a las que fueron sometidas (Fig 16).

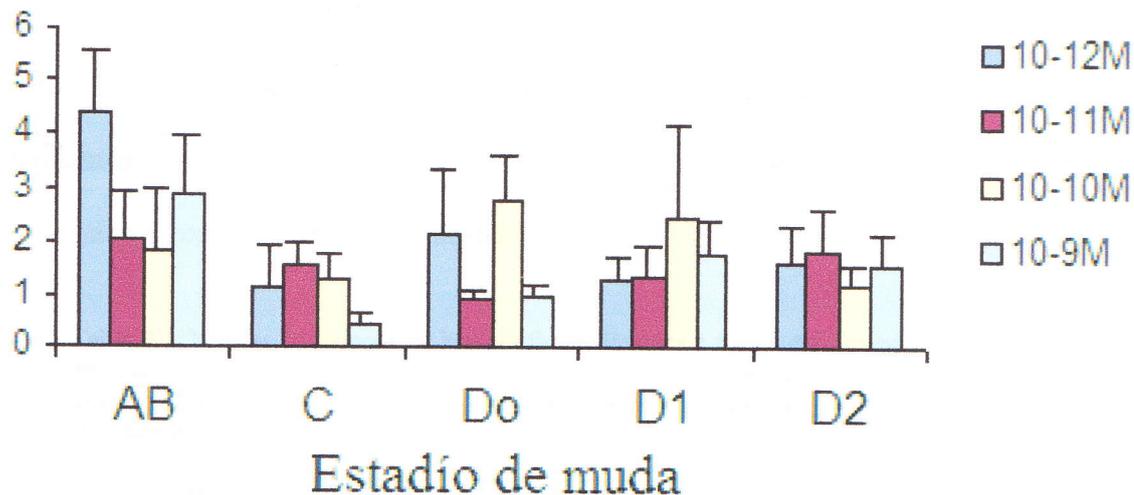


Figura. 16. Efectos de concentraciones de rhIGF-I sobre ecdisteroides cuantificado en ratios, barras verticales indican el error estándar de la media.

3.2. EFECTO INYECCIÓN PEPTIDOS TIPO INSULINA SOBRE NIVELES DE GLUCOSA

3.2.1. Niveles de Glucosa en hemolinfa

Bajo la hipótesis de que péptidos tipo insulina desempeñan una función en el metabolismo de la glucosa en los crustáceos, se procedió a evaluar el efecto de la Insulina y rhIGF-I en camarones juveniles *P. vannamei*, a través de la cuantificación de niveles de glucosa en la hemolinfa, luego de una inyección de insulina bovina o factor de crecimiento tipo insulina.

Los niveles de glucosa fueron expresados en $\mu\text{g/ml}$ de hemolinfa, comparados entre tratamientos y tiempos de muestreo post inyección. Se observó diferencias entre tratamientos y control, como nos muestra la Tabla. I.

Tabla .III. Niveles de glucosa en hemolinfa, mediciones a través del tiempo después de que los animales fueron inyectados con péptidos tipo insulina. Los valores son expresados en μg glucosa/ml hemolinfa, \pm error estándar, * diferencias significativas ($p < 0.05$) y ** diferencias significativas ($p < 0.01$)

TIEMPO	rhIGF-I	INSULINA	CONTROL (PBS-BSA)
0	19.72 \pm 1.58	19.72 \pm 1.58	19.72 \pm 1.58
1	24.57 \pm 2.55**	18.85 \pm 2.42	15.57 \pm 5.68
3	16.85 \pm 5.78	12.81 \pm 1.18	15.24 \pm 5.15
5	18.78 \pm 1.14*	55.42 \pm 13.35	45.06 \pm 8.18

En el comportamiento entre la hormona (Insulina/IrhGF-I) y el nivel de Glucosa en hemolinfa, se pudo observar que después de una hora post inyección existe un

incremento, siendo rhIGF-I altamente significativo en un 37 % ($24.57 \pm 2.55 \text{ ug}^{**}$) que insulina con un 16 % ($18.85 \pm 2.42 \text{ ug}$), respecto al control ($15.57 \pm 5.68 \text{ ug}$), pero presentó una leve disminución de glucosa comparado con el tiempo inicial.

A las tres horas no se ven diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control. Observándose para el rhIGF-I un incremento de 9,6 % ($16.85 \pm 5.78 \text{ ug}$), mientras que el tratamiento con Insulina disminuyó en un 19 % ($12.81 \pm 1.18 \text{ ug}$) referente al Control, pero ambos disminuyeron el nivel de glucosa respecto al tiempo inicial ($T_0 = 19.72 \pm 1.58 \text{ ug}$).

A las cinco horas de la inyección de los tratamientos, se observó un comportamiento inverso al registrado a las 3 horas de la inyección. El tratamiento con rhIGF-I disminuyó significativamente los niveles de glucosa un 58 % ($18.78 \pm 1.14 \text{ ug}^*$), mientras que el tratamiento con Insulina no provocó cambios con respecto al control ($45.06 \pm 8.18 \text{ ug}$), sin embargo insulina y control difieren al tiempo inicial, incrementando los niveles de glucosa (Fig.17).

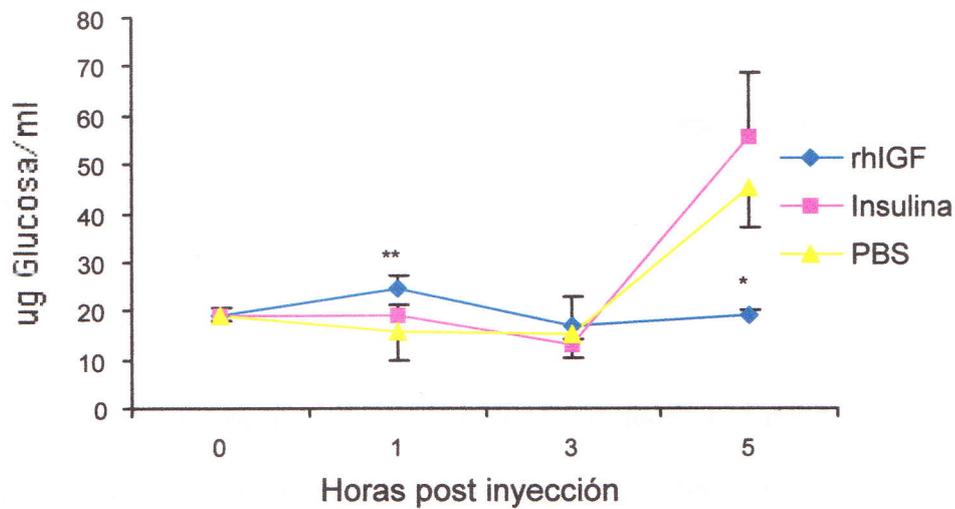


Figura.17. Efectos de Insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucosa en hemolinfa, después de 4 intervalos de tiempos distintos, barras verticales indican el error estándar. El asterisco representa que el valor es significativamente diferente que el control * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

El tratamiento con rhIGF-I tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) comparado al tratamiento con PBS (control), incrementado los niveles de glucosa después de 1 hora y luego disminuyéndolos a las cinco horas post inyección, mientras que el tratamiento con insulina bovina no mostró diferencias significativas en cada uno de los tiempos comparado con el tratamiento control. Sin embargo, ambos tratamientos (insulina y control) difieren en el tiempo 5 respecto al tiempo 1 y 3, incrementando el nivel de glucosa en la hemolinfa, mientras que IGF se mantiene cerca del nivel del tiempo inicial, durante el tiempo de ensayo.

3.2.2. Niveles de Glucógeno en tejidos

Los resultados de glucógeno en tejidos son expresados como mg por gramo de tejido húmedo (*mg/g* tejido),

3.2.2.1. Hepatopáncreas

Los resultados de glucógeno en hepatopáncreas después de aplicar el análisis de varianza de 2 vías mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento con insulina y el control.

En el tiempo 1 no se observó diferencias entre el efecto de las hormonas comparados con el control, no obstante, el efecto de los tratamientos si difirieron con respecto al nivel registrado antes de la inyección (0.2132 ± 0.026 *mg*), observándose una disminución en el nivel de glucógeno.

A las tres horas de la inyección, el tratamiento con insulina ocasionó un incremento en el nivel de glucógeno (0.288 ± 1.015 *mg**) significativamente ($P < 0.05$) superior con respecto al control (0.175 ± 0.017 *mg*). El tratamiento de rhIGF-I no presentó diferencias significativas, observándose un leve incremento en el contenido de glucógeno (0.153 ± 0.017 *mg*) con respecto al tiempo 1 (0.120 ± 0.016 *mg*). Sin embargo, este incremento no fue mayor al nivel de glucógeno registrado en el tiempo inicial ($T_0 = 0.2132 \pm 0.026$ *mg*).

Después de 5 horas de la inyección, el tratamiento con insulina presenta diferencias significativas ($0.169 \pm 0.015 \text{ mg}^*$), notándose una disminución en la cantidad de glucógeno comparado con el control ($0.165 \pm 0.015 \text{ mg}$) y el tiempo cero ($0.2132 \pm 0.026 \text{ mg}$) (Fig 18).

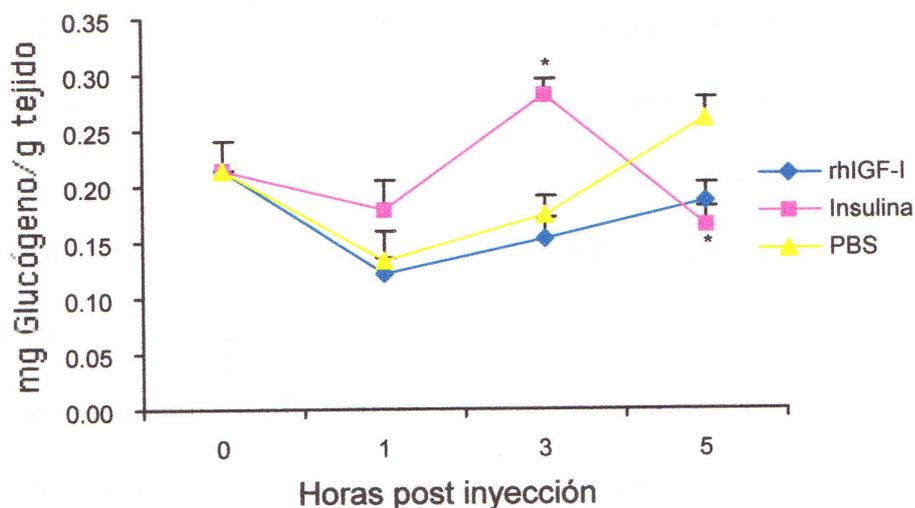


Figura. 18. Efectos de insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucógeno en hepatopáncreas, barras verticales indican el error estándar, barras verticales indican el error estándar. El asterisco indica que el valor es significativamente ($P < 0.05$) diferente del control.

3.2.2.2. Músculo

Después de aplicar ANOVA de 2 vías y encontrar diferencias ($p < 0.05$) se observó una disminución en el contenido de glucógeno ($0.147 \pm 0.017 \text{ mg}^{**}$) con el tratamiento de insulina comparado con el control ($0.785 \pm 0.136 \text{ mg}$). De manera similar, el tratamiento con rhIGF-I ($0.290 \pm 0.018 \text{ mg}$) ocasionó una disminución comparado con el tiempo inicial, sin embargo el efecto no fue significativo con respecto al tratamiento control. En el tiempo 3, el tratamiento con insulina causó una disminución altamente significativa ($0.110 \pm 0.016 \text{ mg}^{**}$) en el nivel de glucógeno comparado con el control ($0.285 \pm 0.017 \text{ mg}$), así como el tratamiento con rhIGF-I presentó diferencia significativa ($0.181 \pm 0.019 \text{ mg}^*$) frente al control ($0.285 \pm 0.017 \text{ mg}$). En el tiempo 5 se registró una leve disminución significativa de glucógeno con el tratamiento de insulina ($0.079 \pm 0.017 \text{ mg}^*$) mientras que rhIGF-I no presentó diferencias significativas ($0.131 \pm 0.018 \text{ mg}$).

Tanto los tratamientos como el control, ocasionaron una disminución de glucógeno a través del tiempo siendo el tratamiento con insulina el que ocasionó disminución de glucógeno en todos los tiempos post inyección medidos, notándose diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en el tiempo 1 y 3. Mientras que el tratamiento con rhIGF-1 solo mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo 3 (Fig. 19).

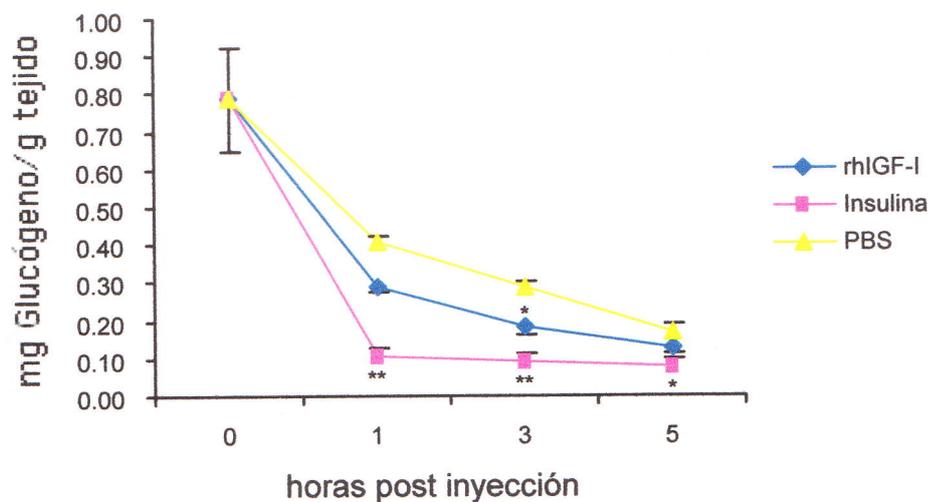


Figura.19. Efectos de concentraciones de insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucógeno en músculo, por gramo de tejido, barras verticales indican el error estándar. El asterisco indica que el valor es significativamente ($P < 0.05$) diferente del control.

3.2.2.3. Branquias

La concentración de glucógeno en branquias fue significativamente diferente con el tratamiento de insulina, después de una hora de la inyección con valores de $0.078 \pm 0.016 \text{ mg}^{**}$, mientras que el tratamiento de rhIGF-I no presentó diferencias significativas ($0.061 \pm 0.016 \text{ mg}$) frente al control ($0.038 \pm 0.017 \text{ mg}$). Ambos tratamientos ocasionaron un ligero incremento en el contenido de glucógeno con respecto al registrado en el tiempo inicial ($0.066 \pm 0.012 \text{ mg}$). En el tiempo 3, el tratamiento de insulina produjo un incremento altamente significativo ($P < 0.01$) en el nivel de glucógeno, mientras que con el tratamiento de rhIGF-I no se observó variaciones respecto al contenido inicial de glucógeno y al control. En el tiempo 5, el tratamiento de insulina se muestra similar al tiempo 3, siendo estadísticamente superior ($P < 0.05$) al control ($0.131 \pm 0.017 \text{ mg}$), mientras que rhIGF-I mostró una disminución en el nivel de

glucógeno (0.079 ± 0.018 mg) comparado al control (0.131 ± 0.017 mg) y al tiempo cero (0.066 ± 0.012 mg) (Fig. 20).

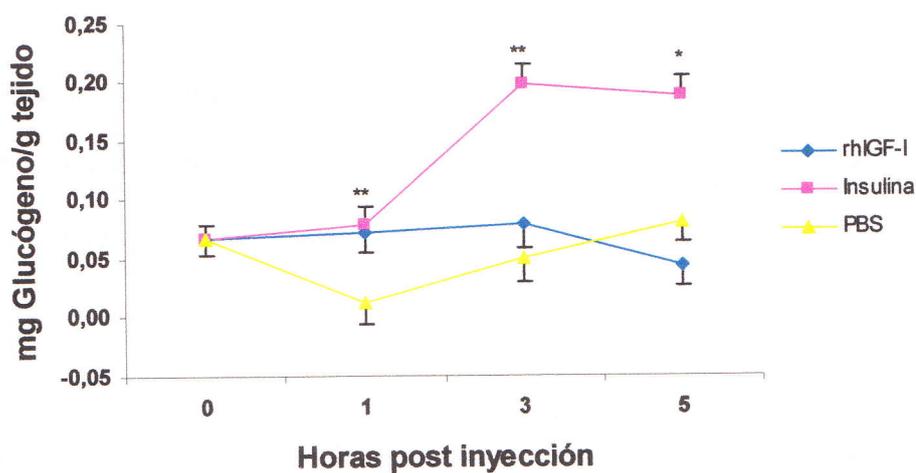


Fig. 20. Efectos de concentraciones de insulina/rhIGF-I sobre el nivel de glucógeno en branquias, por gramo de tejido, barras verticales indican el error estándar, barras verticales indican el error estándar. El asterisco indica que el valor es significativamente ($P < 0.05$) diferente del control.

DISCUSIÓN

IN VITRO

Basados en la evidencia de que los péptidos tipo insulina son capaces de estimular la producción de ecdiesteroides en ciertas especies de insectos, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si la Insulina o el rhIGF-I tienen efectos similares sobre la síntesis de ecdiesteroides en el camarón *P. vannamei*, a través de cultivos *in vitro* de órganos Y durante el ciclo de muda.

Varios estudios han reportado la producción de ecdiesteroides estimulados por péptidos tipo insulina en insectos. Autores como Graf *et al.* (1997), demostraron una inducción en la síntesis de ecdiesteroides por la presencia de insulina porcina y bovina cuya dosis requerida de insulina está en el rango micro molar (Zhang and Roth, 1992. *Fide Graf et al.*, 1997). De manera similar, Riehle *et al.* (1999) observó una producción de ecdiesteroides en ovarios de mosquitos *Aedes aegypti* describiendo una respuesta dosis-dependiente a insulina bovina. Riehle *et al.* (1999), demostraron que concentraciones de insulina bovina menores a 17 M (rango 0.170 nM - 17 M) pueden incrementar la producción de ecdiesteroides comparados con el control, mientras que en concentraciones mayores a 170 M de insulina no ocasionaron estimulación en la producción de ecdiesteroides.

Contrariamente a lo reportado por Graf *et al.* (1997), Riehle *et al.* (1999) y Manière *et al.* (2004), quienes encontraron efectos significativos de la insulina en la producción de ecdiesteroides, en el presente trabajo de tesis de grado no se observan efectos significativos al probar con la hormona insulina, a pesar de utilizar un rango de concentraciones similares (10^{-5} M a 10^{-6} M).

Por otro lado, es conocida la acción de los IGFs como factor de progresión para estimular las células en la fase de síntesis de ADN (Fase S) del ciclo celular. Esta acción mitótica ocurre en unión con factores de competencia, como PDGF (factor de crecimiento de las plaquetas) y FGF (factor de crecimiento de los fibroblastos) que provienen de promotores de crecimiento, los cuales inician el ciclo celular (Sara and Hall, 1990).

Al probar la habilidad de factores de crecimiento tipo insulina (IGFs), Hatt *et al.*, (1997), en estimular el crecimiento de una línea celular de insectos (IAL-PIDA2). Observaron un efecto dosis dependiente entre un rango de concentración de 10-100 pM, definiendo a IGF-I como un factor de progresión más no como un factor de crecimiento, al facilitar rápidamente la síntesis de ADN (Fase S), mediante la incorporación de 5-bromo2'-deoxyUridina (BrdU) y posterior mitosis celular.

En los resultados del presente trabajo de tesis, al probar con concentraciones *nano* y *pico* Molaes (10^{-9} y 10^{-12} M) en órganos Y de *P. vannamei* no se observan efectos

significativos en la producción de 20-E, esto puede deberse a que IGF-I actúa mas como activador de crecimiento en tejidos periféricos incluyendo epidermis (Sara and Hall, 1990; Hatt *et al.*, 1997), como ha sido descrito en *Palaemonetes pugio*, donde se observó un incremento en tallas de las células, no así el número de células epidermales (Okazaki and Freeman, 1993 *fide* Hatt *et al.*, 1997). Además, en el presente estudio, no se incluyó un análisis de los tejidos al término del cultivo o una cuantificación de la cantidad de proteínas producidas en el medio. Generalmente, la acción de IGFs depende de la ubicación y respuesta de sus células objetivos. Si las células están en una fase hiperplástica, los IGFs actúan estimulando una proliferación celular, en cambio si las células están en una fase de crecimiento hipertrófico o en un estado maduro no divisible, se inhibe la proliferación celular (Sara and Hall, 1990).

IN VIVO

HEMOLINFA

Bajo la hipótesis que péptidos tipo insulina desempeñan una función en el metabolismo de la glucosa en los crustáceos, se procedió a evaluar el efecto de la Insulina/rhIGF-I en juveniles *P. vannamei*.

En humanos, la insulina esta relacionada con la regulación del metabolismo de carbohidratos, facilitando la captación de glucosa de la sangre y la síntesis de glucógeno en tejidos objetivos. Una función similar se observa en hemolinfa de insectos con péptidos tipo insulina, aunque en la mayoría de estos insectos la hemolinfa no está mayormente constituida por glucosa, sino que representa menos del 4 % del azúcar total en insectos (Barret and Loughton 1986, Masumura *et al.*, 2000).

A diferencia de los insectos, en crustáceos la glucosa es el mayor componente de carbohidratos en la hemolinfa (Hohnke and Scheer 1970 *fide* Sander 1983c). Contrario a Barret and Loughton 1986, Masumura *et al.*, 2000, los resultados del presente trabajo indican que el tratamiento con insulina bovina no mostró diferencias significativas en los niveles de glucosa de cada uno de los tiempos post inyección comparados con el tratamiento control. Resultados similares fueron obtenidos por Sanders 1983c en *Homarus americanus*, los cuales junto con otros reportes afirman que la insulina de mamíferos no tiene efectos en los niveles de glucosa en hemolinfa en varias especies de crustáceos (Hemmiingsen 1924, Roche and Dumazer 1935, Dleinhatz *et al.*, 1950 *fide*

Sanders 1983c), y sugieren que las funciones de la insulina en una especie depende de la filogenia, fisiología y tipo de tejido en que se encuentra (Sanders, 1983c, Sara and Hall 1990).

Paralelamente en animales sometidos con la hormona rhIGF-I si se observaron cambios significativos en el contenido de glucosa en la hemolinfa. En la primera hora se observó un incremento en el nivel de glucosa y en la quinta hora, el rhIGF-I mantuvo los niveles bajos de glucosa similares a los medidos en el tiempo 3 y tiempo inicial, mostrando un posible rol glucostático. En los animales control el nivel de glucosa se eleva al cabo del último muestreo (fig12), debido a factores como stress (Tildan *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001) y ritmo circadiano (Molina *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001).

El rol glucostático de péptidos tipo insulina en la hemolinfa no es claro. En insectos, animales inyectados con insulina humana se observa hipoglicemia hasta una hora post inyección (debido a la escasa cantidad de glucosa total en insectos) en *Locusta migratoria* (Moreau *et al.*, 1982), *Callifora erythrocephalo* y larvas de *Maduca sexta* (Komesel *et al.*, 1977; Duve, 1978; *fide* Sanders 1983a).

El efecto de los IGFs, según Froesch and Zapf, (1985) y Sara and Hall, (1990), depende del modo de administración; de manera que inyecciones intravenosas e intraperitoneal estimulan el metabolismo en músculos estriados y cardíacos, causando un efecto agudo

tipo insulina, debido a la disponibilidad en exceso de péptidos, induciendo una disminución de glucosa libre e incorporándolo como glucógeno en tejidos.

HEPATOPÁNCREAS

Los resultados obtenidos al término del presente trabajo, determinaron una mayor acumulación de glucógeno con el tratamiento con insulina a la tercera hora post inyección, sin embargo a la quinta hora, los niveles de glucógeno disminuyeron en este tejido (fig 18), evidenciando una relación inversa con los niveles de glucosa en la hemolinfa en los mismos tiempos de lectura (T = 3-5) (fig 17). Al parecer la insulina actúa sobre el hepatopáncreas, captando glucosa a la tercera hora de ensayo, mostrando ser el primer sitio de acumulación de glucosa (Gibson, 1979 *fide* Molina *et al.*, 2000), pero la disminución de glucógeno e incremento de glucosa en hemolinfa a su vez indican una posible degradación del glucógeno en el hepatopáncreas para ser liberado como moléculas de glucosa en la hemolinfa y ser distribuido en tejidos objetivos como músculo y branquias (Glowik *et al.*, 1997: Review; Verry *et al.*, 2001).

Richardson *et al.* (1997), al evaluar la influencia de péptidos tipo insulina (insulina/rhIGF-I) en Crayfish, no encontró efectos significativos de acumulación de glucógeno en presencia de insulina bovina, pero si con rhIGF-I, después de 2 horas post inyección, no obstante nuestros resultados no se demuestran tales efectos con esta hormona (rhIGF-I).

Estudios biológicos, inmunológicos e histológicos demuestran la presencia de células tipo β (productoras de insulina) en hepatopáncreas de dos especies de crustáceos, lo cual sugiere que el hepatopáncreas podría ser el sitio de síntesis de péptidos tipo insulina (Davidson *et al.*, 1971). Por otra parte, Sanders 1983b, observó que el hepatopáncreas contenía el 73 % de inmunoreactividad con la insulina, lo cual también podría explicar la actividad de insulina sobre el hepatopáncreas en la captación de glucosa y acumulación glucógeno desde la primera hora, como muestra los resultados.

MÚSCULO

Los resultados obtenidos de niveles altos de glucógeno en el tiempo inicial (sin inyección) (fig 19) muestra a este tejido ser la principal fuente de reserva de glucógeno, por la capacidad de almacenar glucosa de rápida movilización, que se correlaciona con niveles bajos en el tiempo inicial (T=0) en la hemolinfa (fig 17).

Posterior a este tiempo (T=0), en los tiempos del 1 al 5 se observa un desgaste de glucógeno en camarones sometidos al tratamiento con insulina, mientras que valores de glucosa en hemolinfa se ven incrementados a la quinta hora, lo que nos indicaría que la insulina no incrementa el nivel de glucógeno en este tejido, este descenso en el nivel de glucógeno en el músculo podría deberse a la condición de estrés que fue sometido al animal durante su captura, para la toma de muestra, momento en el cual realiza

constantes contracciones musculares, provocando un continuo desgaste de energía. El aporte de glucosa desde el hepatopáncreas a la hemolinfa en la quinta hora no es suficiente para restablecer y mantener el nivel de glucógeno en el músculo, debido a la condición de ayuno de 24 horas al que fueron sometidos los animales.

Los datos publicados por Sanders (1983c), describen un incremento en la tasa de gluconeogénesis, con la incorporación de insulina, mediante una curva dosis- respuesta (0.21, 0.63 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$), indicando que ésta sería la concentración relativa de la hormona presente y sugiriendo la presencia de receptores de insulina que pueden estimular la gluconeogénesis en *Homarus americanus*.

En contraste a los resultados obtenidos en este estudio, Richardson *et al.*, (1997), encontró en Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) efectos significativos después de 1 hora post inyección en animales tratados con insulina, la cual incrementó el doble del nivel de glucógeno comparados con los otros tratamientos (rhIGF-I - control). Estos niveles de glucógeno en el tejido indican la captación de glucosa en el músculo, después de ayuno un ayuno de 24 horas y aletargamiento previo inyección. Este incremento se debería a los hábitos menos agresivos de Redclaw Crayfish, durante la inyección y toma de muestras, que en especies relacionadas (*P. vannamei*) evitando el continuo desgaste de energía, que permitiría ver la actividad de la insulina en el incremento de glucógeno.

BRANQUIAS

Los resultados obtenidos en branquias tratados con insulina bovina demuestran un aumento significativo en la cantidad de glucógeno desde la primera hora hasta la quinta hora de ensayo, comparado con el control (fig 20). De manera similar Kucharski *et al.*, (2002) describe un incremento significativo en la síntesis de glucógeno en branquias posteriores en cangrejos estuarinos *Chasmagnathua granulata*, cuando se empleó 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de insulina. Kucharski *et al.*, (2002) también propone la existencia de receptores de insulina en este tejido mediante la medición de la actividad tirosina kinasa en las branquias en presencia de insulina bovina. Estos estudios evidencian que la insulina tiene una función metabólica en branquias.

La participación de esta hormona (insulina) en el control de la síntesis de glucógeno puede ocurrir después de la adaptación osmótica, siendo (glucógeno) como un sustrato de energía durante el proceso de osmoregulación como ocurre en los cangrejos *Ericheir sinensis* y *Chasmagnathu granulata* (Welcomme and Devos, 1991; Chitto *et al.*, 2000, *fide* Kucharski *et al.*, 2002). En los procesos de retro alimentación (degradación de glucógeno - producción de lactato) de estos cangrejos, las sustancias endógenas (insulina-rhIGF) están relacionadas en la rápida restauración de niveles de glucógeno en branquias incrementando la captación de glucosa y síntesis de glucógeno.

En vertebrados superiores, la insulina y el factor de crecimiento tipo insulina están relacionados en la regulación de procesos anabólicos y metabólicos, sin embargo, la función significativa de estas hormonas en crustáceos no es clara. Podrían tener diferentes acciones metabólicas en diferentes grupos de animales, de acuerdo con su modo de vida, preservando la respuesta a la señal de la glucosa (Masura *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

- En los resultados obtenidos no se observan efectos significativos en la producción de 20-E al probar con la hormona insulina en cultivos *in vitro* de órganos Y de *P. vannamei*.
- En el ensayo *in vitro* para estimular la proliferación de células con rhIGF-I en concentraciones *nano* y *pico* Molar no se observaron efectos significativos, en la producción de 20-E.
- El tratamiento con insulina bovina no mostró diferencias significativas en los niveles de glucosa en la hemolinfa de cada uno de los tiempos post inyección comparados con el tratamiento control.
- La Hormona rhIGF-I induce cambios significativos en el contenido de glucosa en la hemolinfa, mantuvo los niveles bajos de glucosa en la quinta hora, rhIGF-I como se observó en el tiempo 3 y tiempo inicial, mostrando un posible rol glucostático.
- La insulina desempeña un papel en el metabolismo de la glucosa e incorporación a glucógeno en los tejidos (hepatopáncreas y branquias).

RECOMENDACIONES

- Realizar la extracción y purificación de péptidos tipo insulina, para realizar ensayos *in vitros* sobre la secreción de ecdiesteroides y metabolismo de carbohidratos.
- Realizar ensayos, mediante la inyección de glucosa para determinar péptidos tipo insulina en el metabolismo de carbohidratos.
- Realizar la extracción y purificación de péptidos tipo insulina, para realizar ensayos *in vivo* sobre el metabolismo de carbohidratos.
- Realizar ensayos, mediante el monitoreo del metabolismo de la glucosa, con métodos enzimáticos para poder determinar la existencia de un rol glucostático de rhIGF-I en hemolinfa.
- Complementar la caracterización de estas hormonas; Insulina bovina y rhIGF-I mediante ensayos *in vitro* sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M., T. Blundell, D. Hodgkin, and G. Dodson. 1996. Structure of rhombohedral 2-zinc insulin cristal. *Nature* 224: 491-495.
- Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson and A. Efstratiadis. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and post natal growth. *Cell*. 75:73-82.
- Barret. B. A., and B. G. Loughton. 1987. Hypoglycemic factor from the corpus cardiacum of the American cockroach *Periplaneta americana*. *General and comparative endocrinology*. Vol. 66. Pp.79-84.
- Bayot, B., X. Ochoa., Z. Cisnero., I. Apolo., T. Vera., L. Von Biesen., J. Calderon y M. Cornejo-Gronauer. 2002. Sistema de alerta para la acuicultura del ecuador. *El Mundo Acuícola*, Vol. 8. No.1. pp 9-13.
- C.N.A. 2000. Acuicultura del Ecuador. *Revista de la cámara de Nacional de Acuicultura*. Vol. 30. pp 34-37.
- Chan, S. J., S. F. Donald. 2000. Insulin through the age: Phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Amer. Zool.*, 40:213-222.

Chang E.S .1997 Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In Recent Advances In Marine Biotechnology, Eds M Fingerman, R Nagabhushanan & MF Thompson. New Dehli: Oxford and IBH Publishing Co.pp 163-178.

Chang, E. 1991. Crustacean molting hormones: cellular effects, role in reproduction and regulation by molt. Inhibiting Hormone. *In*: P.F. Deloach, W.J. Dougherty and M.A. Davidson (eds.) Frontiers of shrimp research. Elsevier, Amsterdam, pp. 83-105.

Chamberlain, G. 2002 Cultivo sostenible de camarón: mitos y realidades. INFOFISH. Inter. Pp 5-11.

Chang, E. S. 1989. Endocrinologic regulation of molting in crustacea. *Rev. Aquatic. Sci.* 1: 131-157.

Chen, C., J. Jack, and R. S. Garofalo. 1996. The *Drosophyla* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology.* 137: 846-856.

Chen, C., J. Jack, and R. S. Garofalo. 1996. The *Drosophyla* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology.* 137: 846-856.

- Chuang. N. N. and P.C. Wang. 1994. Characterization of insulin receptor from the muscle of the *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*108:289-297.
- Chung. J. S and S. G. Webster. 2003. Moulting cycle-related changes in biological activity of moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. School of Biological Sciences, University of Wales, Bangor, Gwynedd, Wales, UK *Eur.J.Biochem.*270, 3280-3288 FEBS doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03720.
- CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization). 2004. www.csiro.au/images/general/IGF-1
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. and Van Wormhoudt, A. 2000. Utilization of Carbohydrates By Shrimp. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Davidson. J. K., Falkmer, S., Mehratra, B. K. and S. Wilson. 1971. Insulin assay and light microscopical studies of digestive organs in protostomian and deuterostomian species and coelenterates. *Gen. Comp. Endocrin.* 17:388-401.

- 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. Presents at the 10 th Ecdysone Workshop, Liverpool.
- Drach, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes. Ann. Inst. océanogr. Mónaco, 19: 103391.
- Duve, H., A. Thorpe and R. Lazarus. 1979 Isolation of displaying insulin-like immunological and biological activity from the brain of blowfly *Calliphora vomitoria*. Biochem. J. 184: 221-227.
- Froesch. E. R. and J. Zopf. 1985. Insulin-like growth factor and insulin: Comparative aspects. Diabetologia. Springer-Verlag. 28:485-493.
- Gallardo. N. O. Carrillo., E. moltó., M. Deás., R. González-Suárez., J. M. Carrascosa. M. Ros. and A. Andres. 2003. Isolation and biological characterization of a 6-kDa protein from hepatopancreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. General and comparative endocrinology. Vol. 131. Pp. 284-290.
E-mail. Antonio.Andres@uclm.es
- Glowik. R. M., J. Golowasch., R. Keller and Marder. 1997. D- glucose sensitive neurosecretory cell the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation

of blood glucose level. The Journal of Experimental Biology. Vol. 200. Pp. 1421-1431

González G. F. 1997(a). Fisiología Endocrina y de la Reproducción. Rev. Per. Endocr. Metab. 3: 3-26.

González G. F. 1997(b). Serotonina sanguínea: Regulación y significación endocrina. Rev. Soc Per. Endocrinol. 3:77-94.

Graf. R., S. Neuenschwander, M. R. brown and U. Ackermann. 1997. Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloofeed *Aedes aegypti*. Insect molecular biology. Vol. 6 (2). Pp. 151-163.

Hatt. P. J., C. Liebon. M.morinière. H. Oberlander and P. Porcheron. 1997. Activity of insulin growth factors and shrimp neurosecretory organ extracts on a lepidopteran cell line. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 34:313-328.

http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_49.asp?cuaderno=49

- Ishizaki, H., Suzuki, A. 1994. (Abstract) The brain secretory peptides that control moulting and metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Biol.* 38(2):301-310
- Illingworth, J. 2001. Situación de la Acuicultura en el Ecuador. *Panorama Acuícola.* 6(4):48-49.
- Jegla, T. A., 1990 evidence for ecdysteroids on molting hormone in chelicerata, crustacea and myriapoda morphogenetic hormone of arthropods- discoveries, synthesis, metabolism, evolution, modes of action and technique. A: P: Rutgers University Press, New Brunswick. 1(a):230-270.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu, and G. Ruvkun. 1997. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942-946.
- Kucharski, L. C., M. F. Ribeiro., V. Schein., R. S. Da Silva and Marquez. 1997. Insulin binding sites in gill of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *The journal of experimental zoology.* Vol. 279. Pp. 118-125.
- Kucharski, L. C., V. Schein., E. Capp and R. S. Da Silva. 2002. *In vitro* insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gill of the

estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. General and comparative endocrinology. Vol. 125. Pp. 256-263. E-mail. Kuchars@vortex.ufrgs.br.

Lachaise, F., A. Le Roux, M. Hubert y R. Lafont, R. 1993. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). J. Crust. Biol., 13(2): 198234.

Lehninger. A. L. 1982, Principios de Bioquímica. Universidad John Hopkins school of Medicine. Ediciones Omega, S. A/ Barcelona.

Manière. G., I. Rondot., E. Bullesbach, F. Gautron, E. Vanhems and J. P. Delbecque. 2004. Control of ovarian steroidogenesis by insulin-like peptides in the blowfly (*Phormia regina*). Journal of endocrinology. Vol. 181. Pp 147-156. E-mail: j.p.delbecque@Inr.u-bordeaux1.fr

Masura. M., S. I, Satake., H. Saegusa., and A. Mizoguchi. 2000. Glucose stimulates release of bombyxin, on insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*. General and comparative endocrinology. Vol. 118. Pp 393-399 // www.idealibrary.com.on

Molina, C., Cadena, E., Orellana, F., 2000. Alimentación de Camarones en Relación a la Actividad Enzimática Como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo

de muda. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

Moreau. R., L. Gourdoux., Y. Lequellec., and J. Dutrieu. 1982. Endocrine control of hemolymph carbohydrates in *locusta migratoria*: comparison between effects of two endogenous hormonal extracts and effects of insulin and glucagon. Comp. Biochem. Physiol. Vol 73^a. No. 4. pp 669-673.

Nagasawa, H. H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, A. Mizoguchi, F. Yuko, A. Suzuki, S. Y. Takasshi, and H. Ishizaki. 1986. Amino Acid Sequence of a prothoracicotropic hormone of the Silkworm *Bombyx mori* . Proc. Nat. Acad. Sci. Usa. 83: 5840-5843.

Nagasawa, H., H. Kataoko, Y. Hori, A. Isogai, S. Tamura. A. Suzuki. F. Guo. and M. Jujishta. 1984. Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from the *Bombyx mori*. Gen. Comp. Endocrin. 53:143-152

Nieto, J. 2000. Characterization of an ecdysotropic factor in the central nervous system of adult *Litopenaeus vannamei* female. Ph. D. Thesis, pp.93-94.

- 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.
- Ranferi. G. L. 2002. Calidad nutricional de dos productos a base de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína o aditivo alimentario en alimentos balanceados para juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Universidad Autónoma de Baja California Sur. Área interdisciplinaria de ciencias del mar departamento de biología marina.
- Richarson N., A. Anderson. A. J. and V. R. Sara. 1997. The effect of insulin/IGF on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish. (*Cherax quadricarinatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 105.287-229.
- Riehle. M. A. and M. R. Brown. 1999. Insulin stimulates ecdysterid production though a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology.* Vol. 29. Pp. 855-860. E-mail: mbrown@bugs.ent.uga.edu
- Roberston, L. W. Bray, J. Leung-Trujillo and A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of World Aquaculture Society* 18: 180-185.

- Rosenfeld R. G. 1994. Circulating growth hormone binding proteins. *Horm Res.* 42:129-132.
- Ryle, A., F. Sanger, L. Smith, and R. Kitai. 1955. The disulfide bonds of insulin. *Biochem. J.* 60: 341-356
- Sanders. B. 1983 a. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. I Insulin-like Biological activity. *General and comparative endocrinology*. Vol. 50. Pp. 374-377.
- Sanders. B. 1983 b. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. II Insulin immuno reactivity. *General and comparative endocrinology*. Vol. 50. Pp. 366-373.
- Sanders. B. 1983 c. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. III no glucostatic role. *General and comparative endocrinology*. Vol. 50. Pp. 378-382.
- Santos. E. A. and R. Keller. 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean hiperglicemid hormone (CHH).

Santos. E. A., R. Keller., E. Rodríguez and L. Lopez. 2001. Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decap species. Brazilian journal of Medical and Biological Research. Vol. 34. Pp. 75-80. E-mail. euclides@ceab.octopus.furg.br

Sara. V. R. and K. Hall. 1990. Insulin-like growth factor and their binding proteins. Physiological. Reviews: the American Physiological Society. Vol. 70. No. 3. Pp. 591-605.

Satake, S., Masumura, M., Ishizaki, H., Nagata, N., Kataoka, H., Suzuki, A., Mizoguchi, A., 1997. Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 118B: 349-357.

Séfiani, M. 1996. Caractérisation de neuropeptides hyperglycémiantes et inhibiteurs de la mue chez la crevette péneide *Peanaeus vannamei*. These de Doctoral de l'Université Moulay Ismael, Faculté des Sciences, Meknes, Maroc, 123.

Skinner, D.M. 1985. Molting and regeneration. In: D. Bliss (Ed.). The Biology of Crustacea. Vol. 9. Academic Press, N.Y., pp. 431-466.

Smit. A. B., E. Van Kesteren, K. W. Li, J. Van Minnen, S. Spijker. H. Van Heerikhuizen and W. P. M. Geraerts. 1998. Towards understanding the role of insulin in the brain: lesson from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Preogress in Neurobiology*. Vol. 54. Pp35-54.

Smit. A. B., E. Vreugdenhi, R. H. M. Ebberink, W. P. M. Geraert, J. Klootwijk, and J. Joosse. 1991. Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of the insulin-related peptide. *Nature* 33:535-538.

Steiner, D., D. Cunningham, L. Spiegelman, and B. Ater. 1967. Insulin Biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* 157: 697-699.

Stevenson, J. R. 1985. Dynamics of the integument. *In*: D. Bliss (ed.). *The Biology of Crustacea*. Vol. 9. Academic Press, N.Y., pp. 242. ribia. pp. 237-249.

Tilden. A. S., L. Mcgann., J. Schwartz., A. Bowe and C. Salazar. 2001. Efects of melatonin on hemolinph glucose and lactate levels in the fiddler crab *Uca purgator*. *Journal of experimental zoology*. Vol. 290. Pp. 379-383. E-mail. artilden@colby.edu

- Tobey, J., J. Clay. y P Vergne. 1998. Impacto Económico, Ambiental y social de Cultivo de camarón en Latinoamérica. Medioambiente y Recursos Naturales. Universidad de Rhode Island. Pp 6-27.
- Ullrich, A., J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W. Rutter, and H. Goodman. 1997. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196:1313-1319.
- Van Wormhoudt, A., Bellon-Humbert, C., 1996 Bases biológicas del cultivo de crustáceos: Muda. In: Barnabé, G. (ed.) Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Editorial Ac.
- Vega, F., H. Nolasco., R. Rivera., E. Goytortia y C. Cota. 2000. La Muda del camarón en el cultivo. *Panorama Acuicola*. Vol. 5 No. 5, 58-60.
- Verry, T., A. Mandal, L. Zilli. D. Bossa, P. K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, G. a. Aheren and C. Storelli. 2001. D-Glucose transporting in decap crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 130; 585-606.

ANEXOS

1. Materiales generales en el cultivo *in vitro*.

<u>Nombre Genérico</u>	<u>Nom. Quím/ abrev.</u>
- Cloruro de Sodio	NaCl
- Cloruro de Potasio	KCl
- Cloruro de calcio	CaCl ₂
- Cloruro de Magnesio* 6 Hidratado	MgCl ₂ ·6H ₂ O
- Sulfato de Magnesio * 7 Hidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O
- Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃
- Medio de Cultivo	M199
- HEPES.	
- PROLINA.	
- PENICILINA.	
- ESTREPTOMICINA.	

2. Materiales generales el ensayo de inmunoabsorbancia de enzima ligada (elisa).

- Fosfato de Potasio di básico	K ₂ HPO ₄
- Fosfato de Potasio mono básico	KH ₂ PO ₄
- Cloruro de Sodio	NaCl
- Ácido Etileno Di amino Tetra Acético EDTA	

- Tetrametilbenzidina TMB
- Suero Albúmina bovina BSA
- Anticuerpo anti20-E de conejo AS 4919
- Tween20
- Thimerozal
- Ácido Cítrico
- ÚREA Hidrógeno
- Tracer (Rastreador)

3. Elisa ecdiesteroides.

Tampón de fosfato o de la muestra: 40ml.

Solución stock, 1M pH 7.4 para 250 ml.

* Solución A (80 %), 5.6 gramos K_2HPO_4 (174 FW) en 32 ml de agua destilada.

* Solución B (20 %), 1.12 gramos KH_2PO_4 (136 FW) en 8 ml de agua destilada.

- ⇒ Agregar lentamente solución B a la solución A, hasta alcanzar pH de 7.4.
- ⇒ Agregar 0.04 gramos de thimerosal (concentración final 0.1 %) Utilizar guantes al manipular thimerosal (altamente tóxico).
- ⇒ Distribuir en fracciones de 50 ml y guardar en el congelador. Nunca mantener a 4 °C por más de un mes, nunca re-congelar.

Solución diluida 0.1 M

Nunca mantener a 4 °C por más de una semana. Se utiliza 10 ml por placa (dilución anticuerpos).

Reactivo	Cantidades			
	50 ml	100 ml	250 ml	500 ml
Solución stock (1 M)	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
NaCl	1.17 g	2.34 g	5.85 g	11.7 g
EDTA	0.0185 g	0.037 g	0.0925 g	0.185 g
BSA	0.05 g	0.1 g	0.25 g	0.5 g
Agua destilada(completar hasta)	50 ml	100 ml	250 ml	500 ml

Fijación (Coating) de placas de elisa (10 placas) usando GAR.

Mezclar:	Tampón de fosfato stock	10 ml
	Agua miliQ	190 ml
	GAR (1/1,000)	<u>200 ul</u>
		200 ml

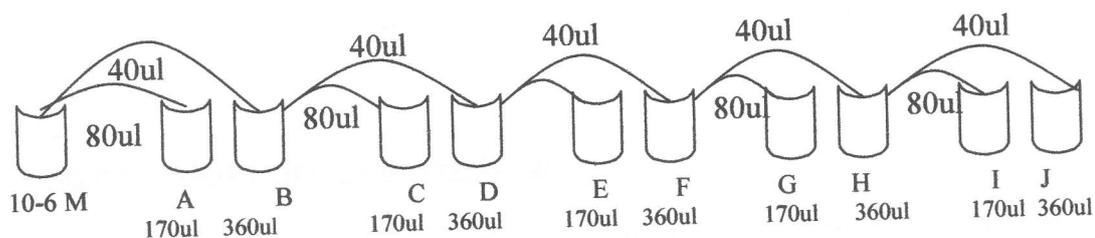
- ⇒ 20 ml de solución por placa. Distribuir con pipeta multi-canal 200 ul por celda en las placas.
- ⇒ Apilar las placas, cubrirlas con papel aluminio formando un paquete.
- ⇒ Dejar a temperatura ambiente por 24 horas.
- ⇒ Preparar solución BSA (3 g/Lt. ó 0.75 g en 250 ml) y agregar 100 ul por celda.
- ⇒ Almacenar en la refrigeradora a 4 °C. No utilizar hasta 12 horas después de haberlas llenado. Las placas deben ser utilizadas antes de 2 a 3 meses.

Solución de lavado de placas.

Uso el mismo día

Reactivo	Cantidades			
	1 placa	2 placas	3 placa	4 placa
Solución stock (1 M)	2.5 ml	5 ml	7.5 ml	10 ml
Tween 20	125 ul	250 ul	375 ul	500 ul
Agua destilada	250 ml	500 ml	750 ml	1000 ml

Estándares de ecdiesteroides (20 hidroxiecdisona)



Dilución anticuerpo anti ecdiesteroides de conejo (AS4919): 1/1000

No. placas/solución	1 placa	2 placas	3 placas	4 placas
Tampón fosfato 0.1M	1.25 ml	10 ml	15 ml	20 ml
AS4919	1.25 ul	10 ul	15 ul	20 ul

Dilución tracer enzimático succinyl, 20 hidroxiecdisona ligado a la peroxidasa:

1/10000

No. placas/solución	1 placa	2 placas	3 placas	4 placas
Tampón fosfato 0.1M	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
Tracer enzimático	0.5 ul	1 ul	1.5 ul	2 ul

Solución de revelación a la peroxydasa (20 placas).

Solución de coloración o stock TMB

- ⇒ Disolver 0.025 g de TMB (tetramethylbenzidine) en 5 ml de DMSO
- ⇒ Distribuir en alícuotas de 500 µl en 10 tubos polypropileno
- ⇒ Almacenar a 4 °C en la oscuridad hasta su uso. Válido por algunas semanas.

Solución stock del tampón de revelación

- ⇒ Preparar una solución de acetato de sodio 1M: 5.44 gramos de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ (136.08 FW) en 40 ml de agua mili Q ó 3.2 gramos de $C_2H_3O_2Na$ (82.03 FW) en 40 ml de agua miliQ
- ⇒ Llevar a pH 6 con una solución de ácido cítrico 1M (4.2 gramos en 20 ml agua mili Q pH 6)
- ⇒ Se mantiene por varias semanas a 4 °C.

Solución de agua oxigenada al 1%

⇒ Dissolver 0.1 gramos de Urea Hidrógeno en 10 ml agua mili Q.

⇒ Se mantiene por varias semanas a 4 °C.

Reactivo de coloración preparar en el momento

Solución	1 placa	2 placas	3 placas	4 placas
Tampón de revelación	2.5 ml	5 ml	7.5 ml	10 ml
Agua miliQ Temp. ambiente	22.5 ml	45 ml	67.5 ml	90 ml
TMB (descongelar sin calentar)	500 ul	1000 ul	1500 ul	2000 ul
Solución de peróxido	250 ul	500 ul	750 ul	1000 ul

4. Materiales generales para la determinación de glucosa-glucógeno.

- ❖ Kit-glucosa (Sigma).
- ❖ Acido sulfúrico
- ❖ Eter de Petróleo.
- ❖ Acido Tri cloro Acético.
- ❖ Fenol (80 %)

Equipos utilizados.

- ❖ Espectrofotómetro
- ❖ Incubadora
- ❖ Cámara de flujo
- ❖ Bomba de vacío
- ❖ Sorbona.
- ❖ Vortex
- ❖ Centrífuga refrigerada.