

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA
FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN
DE LA TESIS DE GRADO



2004



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 HERNAN POZO MIRANDA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2004

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENINSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

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

INFORME DE TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

FRANCISCO HERNAN POZO MIRANDA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2004

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad para los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente y patrimonio intelectual de la misma, al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM .

Francisco Pozo M.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis de grado a mis padres: Sr. Francisco Pozo Borbor y Sra. Cleotilde Bertha Miranda Mateo por que me supieron darme de muchas formas, el amor, afecto, estimulo y apoyo en las horas mas difíciles de mi vida, me dieron el animo necesario para no rendirme y sesar el impetud de mi ideal, por eso de manera en particular y afectuoso 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 lo 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, Rector Ab. Xavier Tómalá M., Vice-rector Ec. George Clemente, al Director de la unidad Académica Ing Gonzalo Tamayo y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

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

Agradecer en particular a Ana Gutiérrez Ph. D(c) 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.

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

A Enrique Blacio Ms. C. encargado de asuntos estudiantiles, por ayudarnos en todo momento que necesitábamos de él.

A José Melena Ph. D(c) por tus explicaciones, tus ideas ingeniosas, tu buen humor y tu enorme paciencia; ayudándome en más de una ocasión.

A Blgo. Fabrizzio Echevería, 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 Malave, Marcelo Suarez, Yomara de la Cruz, Yessenia Pozo y Martha Borbor.

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

Agradecer a todas las personas que me han apoyado durante todo este tiempo, esa gente que ha hecho que mi día a día haya sido mucho más llevadero.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Págs.
ABREVIATURAS	
TABLA DE CONTENIDO	
INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
INTRODUCCIÓN	
1. <u>ANTECEDENTES</u>	4
1.1 <u>GENERALIDADES DE LA ENDOCRINOLOGÍA</u>	4
1.2 <u>SISTEMA ENDOCRINO</u>	5
1.2.1 Tipos de Transmisión Química	6
1.2.2 Transmisión Neurocrina	6
1.2.3 Transmisión Endocrina	6
1.2.4 Transmisión Neuroendocrina	6
1.2.5 Transmisión paracrina	7
1.2.6 Transmisión autocrina	7
1.3 <u>SISTEMA ENDOCRINO DE DECAPODOS</u>	7
1.4 <u>MUDA Y CRECIMIENTO EN DECAPODOS</u>	8
1.4.1 Control de la muda	9
1.4.2 La Hormona Inhibidora de la muda (HIM)	10
1.4.3 Órgano Y	11

1.5 <u>METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN CRUSTÁCEOS</u>	12
1.5.1 Control hormonal de la Glucosa	16
1.6 <u>PÉPTIDOS TIPO INSULINA</u>	17
1.6.1 Insulina	17
1.6.2 Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)	19
1.7 <u>PÉPTIDOS TIPO INSULINA EN ARTROPODOS</u>	20
1.8 <u>ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA DE ENZIMA LIGADA</u> <u>(ELISA)</u>	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 <u>ANIMALES</u>	25
2.2 <u>EFECTO DE INSULINA / IGF SOBRE ÓRGANOS Y</u>	25
2.2.1 Diseño experimental	25
2.2.2 Dilución de Hormonas	26
2.2.2.1 Insulina	26
2.2.2.2 Factor de Crecimiento Tipo Insulina (IGF)	26
2.2.3 Determinación de Estadío de Muda	27
2.2.4 Disección del Órgano Y	28
2.2.5 Cultivo de órganos "Y" <i>in vitro</i>	29
2.2.6 <u>ENSAYO DE INMUNOABSORVANCIA DE ENZIMA LIGADA</u> <u>(ELISA)</u>	31
2.2.6.1 Curva estándar	31

3.1.2 Interacción de los estadios de muda con IGF-I en cultivos <i>in vitro</i>	42
3.2. <u>EFFECTO INYECCIÓN PEPTIDOS TIPO INSULINA SOBRE NIVELES</u>	
<u>DE GLUCOSA</u>	43
3.2.1 Niveles de Glucosa en hemolinfa	43
3.2.2. Niveles de Glucógeno en tejidos	46
3.2.2.1. Hepatopancreas	46
3.2.2.2. Músculo	48
3.2.2.5. Branquias	50

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABREVIATURAS y SIMBOLOGIA

ANOVA	Análisis de varianza
AS4919	Anticuerpo 4919
B 0	Absorbancia del control
B	Absorvancia del blanco
BSA	Bovine serum albumene(suero de albumina de bovino)
c/u	Cada uno.
cDNA	Acido Desoxiribonucleico copia.
E	Ecdysone
ELISA	Enzyme Linked Immunoorbent Assay (Anlisis Inmunoabsorvancia con Enzima Ligada)
Fig	Figura
GAR	Goat anti-rabitt (anticonejo)
h	Horas
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)
L	Litro
M	Molar
M199	Medio de Cultivo 199
mg	Miligramo

ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
OY	Órgano Y
pH	Potencial de hidrogeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
t	Tiempo
v/v	Volumen / Volumen
20-E	20-hidroxyecdisona
°C	Grados Celsius.
μg	Microgramo
~M	Micromolar
~l	Microlitro

INDICE DE CUADROS

Contenido.	Pag.
Tabla # 1. Niveles de Glucosa en Hemolinfa	44

ÍNDICE DE GRAFICOS

Figura 1. Ubicación del órgano Y, en Penaeidos	11
Figura 2. Estructura de ecdiesteroides en crustáceos	12
Figura 3. Diagrama de la vía de glucólisis y fosfato pentosa, en el metabolismo de la glucosa	14
Figura 4. Estructura química de; (a) Glucosa, (b) piruvato.	16
Figura 5. Diagrama de la estructura de la insulina.	19
Figura 6. Estructura biológica del IGF	20
Figura 7. Esquema del protocolo del análisis de inmunoabsorbancia de enzima ligada para la determinación de ecdiesteroides	24
Figura 8. Caracterización de estadios de muda mediante observación microscópica directa	27
Figura 9. Curva Standard de glucosa	38
Figura 10. Efectos de concentraciones de insulina sobre ecdiesteroides	42
Figura 11. Efectos de concentraciones de IGF-I sobre ecdiesteroides	43
Figura 12. Efectos de Insulina/IGF-I sobre el nivel de Glucosa en hemolinfa	45
Figura 13. Efectos de insulina/IGF-I sobre el nivel de glucógeno	

Hepatopancreas	48
Figura 14. Efectos de concentraciones de insulina/IGF-I sobre el nivel de glucógeno en músculo.	49
Figura 15. Efectos de concentraciones de insulina/IGF-I sobre el nivel de glucógeno en branquias.	51

INTRODUCCIÓN

La acuicultura se expandió rápidamente en varios países de Latinoamérica en vías de desarrollo con el afán de incrementar la producción del camarón, pero el año 2000, ha sido el más difícil en la historia de la industria camaronera en el Ecuador debido al impacto sufrido por la enfermedad de la Mancha Blanca(WSSV), el cual rebasó cualquier expectativa negativa.

Actualmente la industria camaronera en el Ecuador, producto del ataque agresivo de este virus, aun enfrenta problemas relacionados al bajo crecimiento y altas mortalidades lo cual ha reducido el nivel de producción. Estos problemas pueden deberse a una inadecuada practica de manejo.

Esta situación evidencia que es necesario estudios fisiológicos para desarrollar estrategias de manejos adecuadas a la capacidad del animal y así incrementar la producción. Sin embargo, estudios relacionados a los factores (ambientales, nutricional, hormonales) que controlan el crecimiento en camarón son escasos.

Recientes estudios muestran a la insulina como potencial factor de crecimiento en invertebrados. En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nemátodo *C. elegans*, ha sido demostrado la presencia de receptores de insulina cuya mutación causa defectos en el crecimiento y desarrollo (Chen *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997).

Resultados similares fueron obtenidos en moluscos(Smit et al., 1991). Así, se considera el estudio con Insulina, como la opción mas clara 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 periodo del crecimiento. Este proceso esta regulado por las hormonas ecdiesteroides producidas por el órgano Y de crustáceos (Jegla *et al.*, 1990) y la glándula prototoracica en insectos (Nagasawa *et al.*, 1984).

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

Indicios sobre la existencia de péptidos tipo insulina en camarones penaeidos han surgido a partir de estudios inmunohistoquímicos de post larva (Gutiérrez, comunicación personal).

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, fue nuestro objetivo determinar la función que desempeña la insulina en la secreción de ecdiesteroides y el metabolismo de carbohidratos en camarones juveniles *L. vannamei*.

1. ANTECEDENTES

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 regula 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 el 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 acinares 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 de transmisión química: neurocrina, neuroendocrina, endocrina, paracrina y autocrina (Rosenfeld, 1994).

1.2.2 Transmisión Neurocrina

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

1.2.3 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.

1.2.4 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.

1.2.5 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.

1.2.6 Transmisión autocrina

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

1.3 SISTEMA ENDOCRINO DE DECÁPODOS

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

- a) neuroreguladores y órganos neurohémicos y,
- b) glándulas endócrinas epiteliales de tipo clásico.

Los principales órganos endócrinos son los siguientes:

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

1.4 MUDA Y CRECIMIENTO EN DECAPODOS

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 y 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 (Aiken, 1973; Reaka, 1975; Dexter, 1981; Robertson *et al.*, 1987).

1.4.1 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:

1.4.2 La Hormona Inhibidora de la muda (HIM), que se origina en el complejo órgano X-glándula sinusal localizado en los pedúnculos oculares (Chang, 1989). La HIM promueve la formación de nuevos tejidos e inhibe la actividad secretora del órgano Y (Fig.1)

1.4.3 Órgano Y, es un par de glándulas epiteliales endocrinas localizadas cerca del músculo aductor mandíbular, en la cámara prebranquial. Fue descrito como homólogo a la glándula prototorácica en insectos, como fuente de las hormonas de la muda o ecdiesteroides : ecdisona, 20-OH-ecdisona, 3-Dehidroiecdisona (Chang, 1989) entre otros (Fig.2).

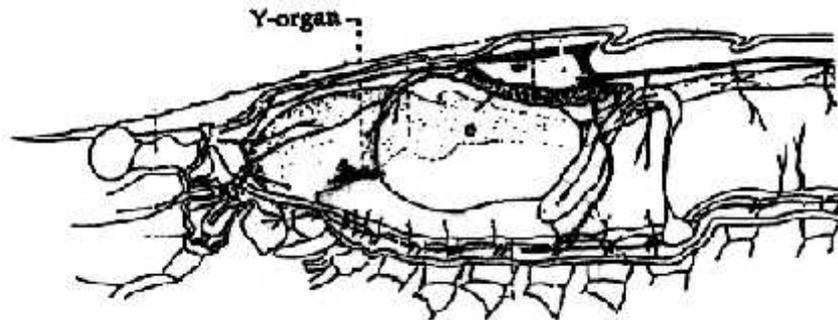


Fig.1. Ubicación del organo Y, en Penaeidos (Sefiani, 1996).

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

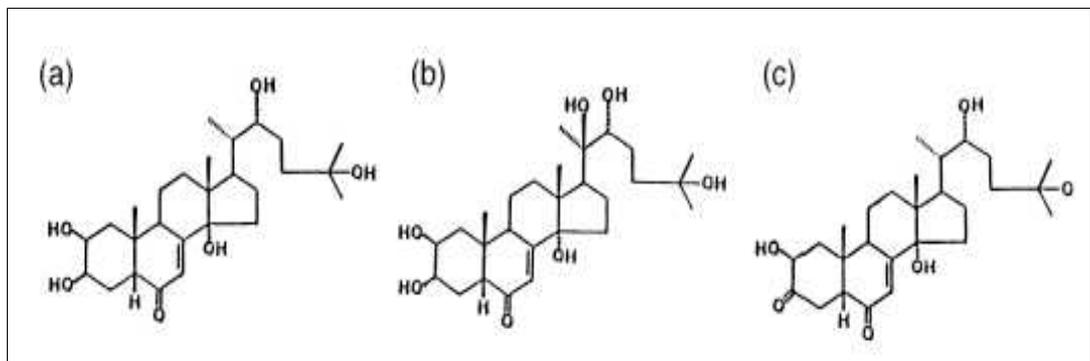


Fig.2. Estructura de ecdiesteroides en crustáceos: (a) ecdisona, (b) 20-OH-ecdisona, (c) 3-Dehidroxiecdisona. (tomado de Chang, 1997).

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 muda, para luego disminuir en forma abrupta, poco antes de la muda (De Reggi *et al* 1975: Dorothy, 1985: Chan, 2000: Nieto, 2000).

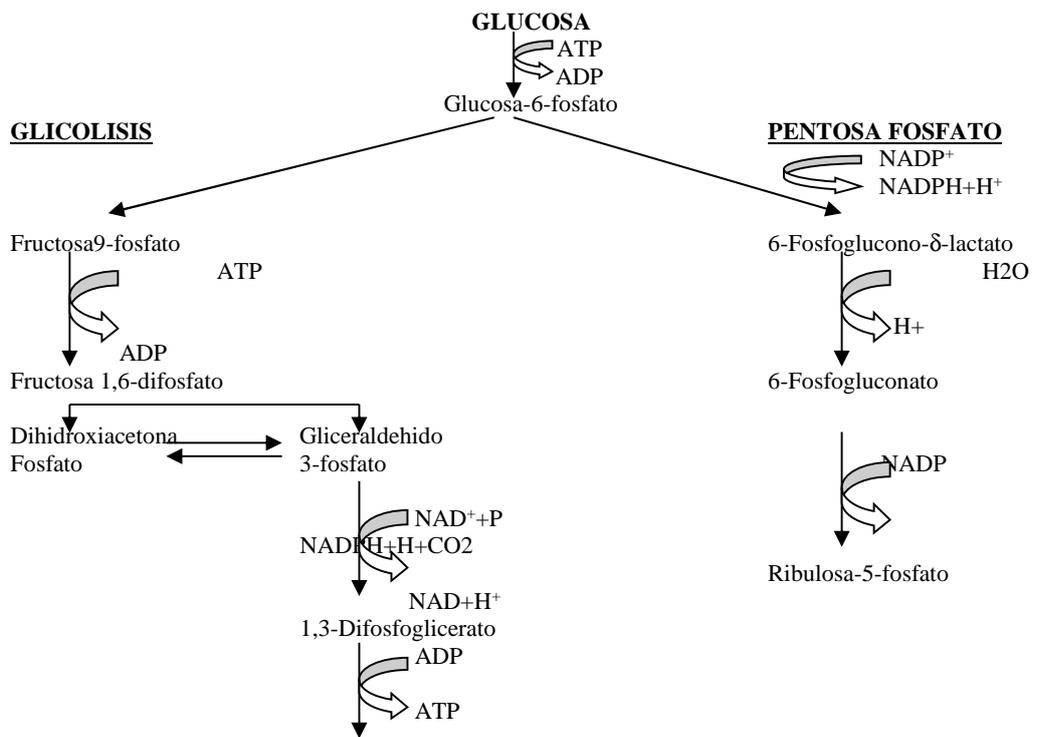
Las alteraciones de la concentración ecdiesteroides podrían ser reguladas tanto por los cambios en la tasa de síntesis y/o liberación de la hormona como por la tasa de hidroxilación de ecdisona a 20-hidroxiecdisona y su degradación en la hemolinfa (Skinner *et al.*, 1985; Lachaise *et al.*, 1993).

1.5 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 síntesis de macromoléculas a partir de compuestos sencillos mediante procesos metabólicos.

s.

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.3).



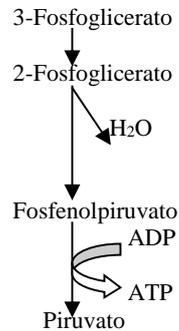


Figura 3. Diagrama de la vía de glucólisis y fosfato pentosa, en el metabolismo de la glucosa.

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.3).

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.4). 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 (Sanders. 1983), temperatura, salinidad (Ranferi. 2002) y la hormona hiperglicémica (Chung *et al.*, 2003)

a

b

QuickTime™ and a
GIF decompressor
are needed to see this picture.

Fig:4. Estructura química de; (a) Glucosa, (b) piruvato. (tomado de Lehninger, 1982).

1.5.1 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 terminal amino y una amino valina al terminal carboxilo.

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 *D-glucosa* en la hemolinfa vía movilización de *D-glucosa* almacenada en hepatopáncreas y músculo. El decrecimiento del nivel glicémico se debe a la reversión del proceso en la producción de D-glucosa en tejidos objetivos, hepatopáncreas y músculo (Verry *et al.* 2001).

1.6 PÉPTIDOS TIPO INSULINA

1.6.1 Insulina

La insulina (Fig.5) 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 endócrinas 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 sus tejidos blanco, 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 endocrinología comparativa. La importancia del uso de insulina para tratamiento de diabetes trajo 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 protéicas 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.

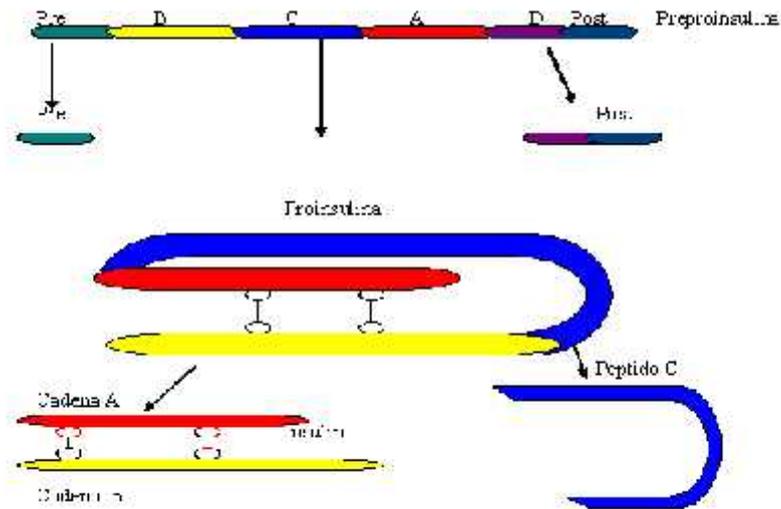


Fig.5. Diagrama de la estructura de la insulina, constituida por 51 aminoácidos. La síntesis de insulina atraviesa diferentes etapas: se fabrica como preproinsulina que luego se transforma en proinsulina al cortarse sus extremos. La mayoría de la proinsulina se separa en dos partes: el "péptido C" (conector) 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.porquebiotecnologia.com.ar)

1.6.2 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 solo grupo de polipéptidos, debido un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos y en la estructura terciaria (Fig .6).



Fig.6. Estructura biológica del IGF, basada en difracción de cristal de rayos-X. (Tomado CSIRO, 2004).

Los IGFs son sintetizados por varios tipos de células y tienen efectos autócrinos o parácrinos sobre células objetivo cercanas, así como desempeñar acción endocrina a través de la circulación, cuando van acompañados por una proteína enlazante (Sara *et al.*, 1990).

1.7 PEPTIDOS TIPO INSULINA EN ARTROPODOS

La existencia de péptidos tipo insulina en artrópodos se reportó por primera vez en 1984, con la identificación estructural de un péptido aislado 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 varios puentes de disulfuro, comparten igual número de residuos de Cisteínas así como el espacio entre ellos en cada cadena. (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, *Drosophila melanogaste*, y el saltamontes *Locusta migratoria* (Smit *et al.*, 1998) con función ecdisotrópica.

Similar efecto ecdisiotrópico se ha observado en cultivos *in vitro* de ovarios del mosquito *Aedes aegypti* con insulina bovina (Graf *et al.*, 1997).

Además de función ecdisiotrópica y promotor de crecimiento, estudios han demostrado que péptidos tipo insulina regulan el metabolismo de la glucosa en algunos tejidos en insectos (Verry *et al.* 2001).

En contraste a reportes en insectos, estudios en crustáceos demuestran que péptidos tipo insulina cumplen una función metabólica. Como lo describe Richardson *et al.*, (1997) donde dosis de insulina y IGF ocasionaron un incremento en el contenido de la glucosa en el hepatopáncreas y el músculo de Crayfish, así como en branquias de cangrejos (Kucharski *et al.*, 1997), demostrando que los péptidos tipo insulina actúan en forma antagónica a la CHH, causando incremento de glucosa en tejidos.

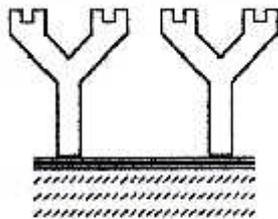
1.8 ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA DE ENZIMA LIGADA (ELISA)

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.

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

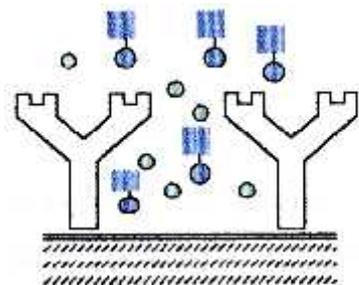
El método ELISA del tipo competitivo ha sido diseñado para la cualificación de ecdisteroides en artrópodos (Porcheron *et al.*, 1989; De Reggi *et al.* 1992), el cual se resume en el siguiente método de funcionamiento: El primer anticuerpo (IgG) es adherido a una fase sólida(fig.6.1); posteriormente 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 identificara a los antígenos de interés. Este antisuero reconocerá ambos antígenos, la abundancia del antígeno de interés indicara mayor o menor grado de unión del antígeno marcado(fig.6.2), lo cual se verá reflejado al agregar un sustrato(fig.6.3) 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 espectrofotómetro, obteniendo resultados en absorbancias (unidades ópticas). Los resultados son interpolados en la curva estándar de 20-hidroxicdisona, la cual ha sido sujeta al mismo proceso que las muestras.

1



"Coating" de anticuerpo IgG en la fase s6lida. El exceso se elimina por lavados.

2



Adici3n de los diferentes grupos de ant6genos. El material no es reconocido por el anticuerpo IgG, la reacci3n ocurre despu6s de agregar el segundo anticuerpo.

-  tr6cer succinil 20-E ligado a peroxidasa
-  est6ndar o mol6cula de ecclisteride presente en la muestra

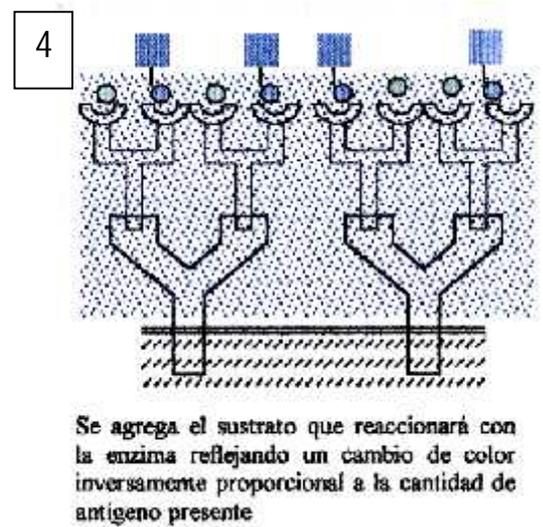
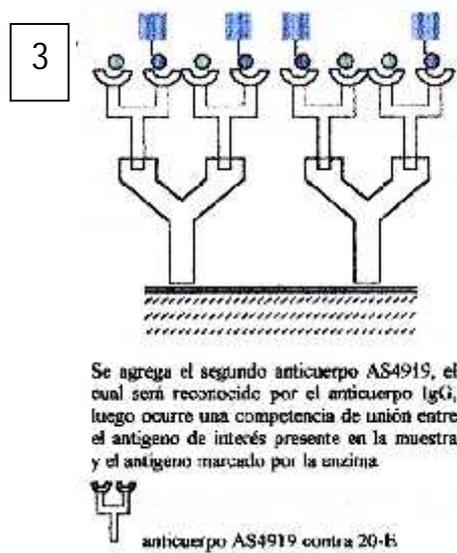


Fig.7. esquema del protocolo del analisis de inmunoabsorvancia de enzima ligada para la determinación de ecdiesteroides(Porcheron *et al.*, 1989).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ANIMALES

Se utilizaron camarones juveniles *Penaeus vannamei* de $10,31 \pm 0.17$ gramos de peso, de piscinas camaroneras de LONETGO (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 fueron mantenidos con un recambio de agua de 100%. La alimentación se basó en un 5% de dieta seca comercial (ABA-Empagran).

2.2. EFECTO DE INSULINA / IGF SOBRE ÓRGANOS Y

2.2.1 Diseño experimental.

El diseño experimental se realizó para la determinación del efecto de la insulina/IGF sobre la síntesis de ecdiesteriodes en cultivos *in vitro* de Organos Y, en diferentes estadios de muda, mediante arreglo factorial 2^{4-5} : donde el factor uno (Insulina/IGF) posee cuatro niveles (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M), mientras que el factor dos (estadio de muda) tiene cinco niveles (A-B, C, D 0, D1, D2-3).

Se seleccionaron animales en diferentes estadios de muda (Setogenesis), tomados de manera aleatoria de un tanque exterior de la Fundación CENAIM-ESPOL, para la disección del órgano objetivo.

2.2.2 Dilución de Hormonas.

2.2.2.1 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} utilizando medio de cultivo.

2.2.2.2 Factor de Crecimiento Tipo Insulina (IGF)

Se preparó una solución madre con 50 ug de hr-IGF I (SIGMA) en 1 ml de PBS filtrado ($0.22 \mu\text{m}$), 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.

2.2.3 Determinación de Estadío de Muda.

Los estadíos de Muda, fueron establecidos según Robertson (1987), mediante n observación en microscopio de la parte interna del urópodo(Fig.7).

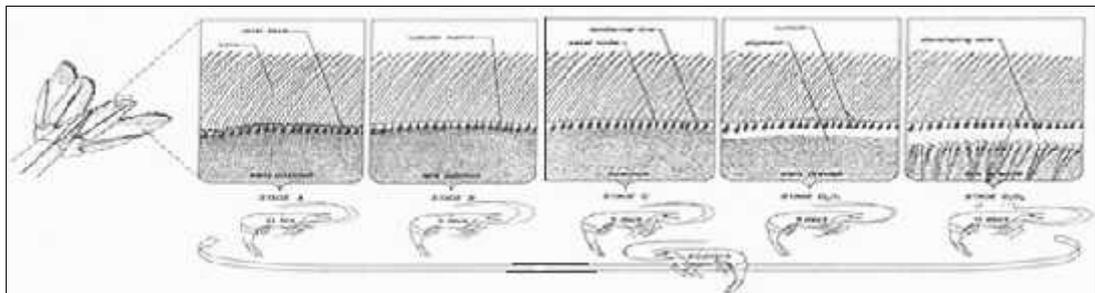


Fig.8. Caracterización de estadios de muda mediante observación microscópica directa, según Robertson *et al.*, 1987.

- Estadío A: inmediatamente después de la Ecdisis, la matriz celular pigmentada llena completamente las base setales, duración dos días.
- Estadío 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.
- Estadío C: 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.
- Estadío D1: 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.

2.2.4 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.

A continuación se separó las branquias y apéndices hacia atrás y se sujetó con agujas a la almohadilla ambos lados, de manera que quedo 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 bránquiopodito 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.

2.2.5 Cultivo de órganos "Y" *in vitro*

Una vez disectados los órganos "Y" y estabilizados en agua de mar estéril, durante 10 minutos a 4 °C, se transfirió cada uno de los tejidos 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 órganos Y fueron removidos a otra celda con medio de cultivo fresco por una hora más (T3). Terminado el tercer período de incubación, se desecharon los órganos Y almacenando las muestras de medio de cultivo a -20 °C.

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/μl).

Concentración de ecdiesteroides del OY-control (0,033 ng/μl).

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.

2.2.6 ENSAYO DE INMUNOABSORVANCIA DE ENZIMA LIGADA (ELISA).

2.2.6.1 Curva estándar.

Se utilizó 20-Hydroxyecdysone (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 (170ul de M119) y 40 μ l al microtubo B (360ul 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.

2.2.6.2 Protocolo De La Técnica Elisa.

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 100 ml de agua de miliQ), 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 empleo el tracer (rastreador) enzimático succinyl-20 hidroxyecdysone ligado a la peroxidasa donado por el Dr. Delbeque (Universidad Bordoux I, 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 1:10,000 con tampón de fosfato 0.1M.

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

d) Incubación.

Las celdas de la microplaca se llenaron por duplicado en el siguiente orden: con los estándares: 50 µL cada uno; seguido de las muestras, 50µL, finalmente dos celdas con 50 µL de M119 como control de porcentaje de unión, y dos celdas con 100 µL de M119 como control o blanco, luego se agregó 50 µL de tracer enzimático y 50 µL 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 rpm en una bandeja de agitación (Stuart Scientific) a temperatura ambiente.

e) Reacción enzimática.

Se lavo la microplaca, como literal b, luego se adicionó 200 µL 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 observancia del blanco.

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

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

Se gráfico 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 muestras.

2.3 EFECTO DE INYECCIÓN DE INSULINA/IGF SOBRE METABOLISMO DE LA GLUCOSA

2.3.1 Diseño experimental.

Se desarrolló un diseño experimental con el objetivo de observar el efecto post inyección de insulina/IGF sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa y tejidos de camarones juveniles *P vannamei*, después de 1, 3, y 5 horas. El diseño consistió en un arreglo factorial 2X4 completamente aleatorio.

Se seleccionaron animales en estadio C (intermuda) los cuales fueron aclimatados a temperatura ambiente (26 °C) en el set experimental # 21, 3 días antes del ensayo. Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria e individual en recipientes de vidrio (1,5 litros), asignados previamente en 10 bandejas.

La alimentación consistió en una dieta comercial(ABA-empagran), la cual fue suspendida 24 horas antes del ensayo.

2.3.2 Extracción de hemolinfa

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

2.3.3 Extracción de tejidos

2.3.4 Extracción de hepatopáncreas.

Los camarones fueron colocados en agua salada, luego se les realizó un corte transversal de la membrana que une el cefalotorax 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.

2.3.5 Extracción del músculo.

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.

2.3.6 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.

2.3.7 Análisis de Glucosa.

Para análisis de glucosa se utilizó un Kit de análisis de Glucosa (SIGMA), con la modificación del volumen de la muestra a cuantificar.

2.3.7.1 Curva estándar de glucosa(Kit Sigma).

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

A partir de una solución madre de 0,1ug/ul de glucosa se prepararon diluciones seriadas de 0-5 ug (10 puntos) para un volumen de 120 ul.(Fig. 8).

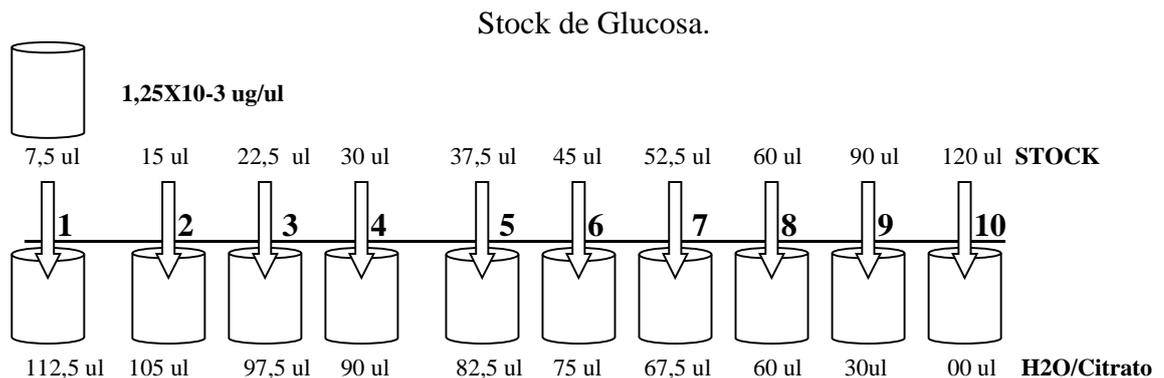


Fig.9. Curva Standard de glucosa, Elaborada para corregir los datos de lectura realizadas con el kit Sigma para glucosa.

2.3.7.2 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 incubo por 15 min. a temperatura ambiente. Las mezclas fueron leídas en el espectrofotometro(Thermo spectronic-Genesys 20) a 340nm.

2.3.8 Determinación de glucógeno.

2.3.8.1 Preparación de suero enzimático.

Se utilizo un microhomogenizador de tejido (Ultra Turax T 25) para macerar el hepatopaneas en 0,5 ml de agua destilada y enrasado hasta 1,5 ml con la misma calidad de agua.

Se uso tubos de microensayos (eppendorf) para mantener el hepatopaneas homogenizado y sumergido en hielo picado hasta su inmediata centrifugación a 13000 rpm por 12 minutos a 4 °C en centrifuga (KOKUSAN H200B) y congelados en – 80° C y luego fueron transferidas a un congelador de – 20°C hasta el momento de su análisis.

2.3.8.2 Preparación Curva de calibración (5-40 ug).

Se disolvió 0,01 g de glucosa en 20 ml de ATC (ácido tricloro acético) al 20 %, como solucion madre.

Se Tomó 2000 ul de la solucion madre y se diluyo en 10 ml de ATC al 20 % obteniéndose una concentración de 100 ug/ml como solución de trabajo y se procedió a transferir 100, 200, 300,

400, 500, 600, 700, 800 ul de solución de trabajo (100 ug/ ml) a tubos de vidrio y se llevo hasta 2 ml con agua destilada.

El blanco se preparo con 2 ml de agua destilada.

Se Añadir a todos los tubos 0,5 ml de fenol al 80% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado e inmediatamente se Agito. Después de 30 minutos se tomo 200 ul y se coloco en una placa de elisa para ser leído en el espectrofotometro a 492 nm.

2.3.8.3 Análisis de la muestra.

Se coloco 0,1 ml de suero enzimático en de centrifuga y se adiciono 2 ml de ATC 20% seguidamente se agito.

Se centrifugo a 3000 rpm por 20 minutos y el sobrenadante fue transferido a otro tubo de centrifuga y se adiciono 2 ml de éter de petróleo para seguidamente ser centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, luego se descartar la fase superior que contiene éter y ATC cuidadosamente con ayuda de una micropipeta pasteur.

Se tomo 2 alícuotas de 0,5 ml de la fase inferior del tubo de centrifuga y se coloco en tubos de vidrio y se llevo a 2 ml con agua destilada, se adiciono 0,5 ml de fenol al 80 % y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Seguidamente se agito.

Transcurrido 30 minutos tomo 200 ul y se coloco en una placa elisa para medir la absorvancia en un espectrofotometro a 492 nm.

El resultado se expreso en mg/ glicogeno/g hepatopaneas/ml.

3. RESULTADOS.

3.1 EFECTO DE PEPTIDOS TIPO INSULINA EN LA PRODUCCIÓN DE ECDIESTEROIDES.

La habilidad de peptidos tipo insulina en estimular la producción de ecdiesteroides fue probada en órganos Y aislados de 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} , 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 10.

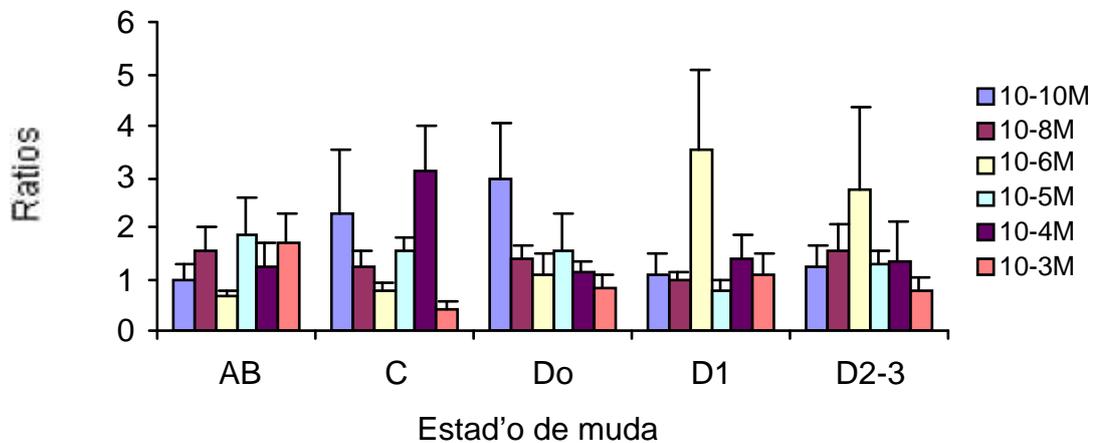


Fig. 10 Efectos de concentraciones de insulina sobre ecdiesteroides cuantificado en ratios, barras verticales indican el error estándar de la media.

3.1.2 Interacción de los estadios de muda con IGF-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 IGF-I a las que fueron sometidas (Fig 11).

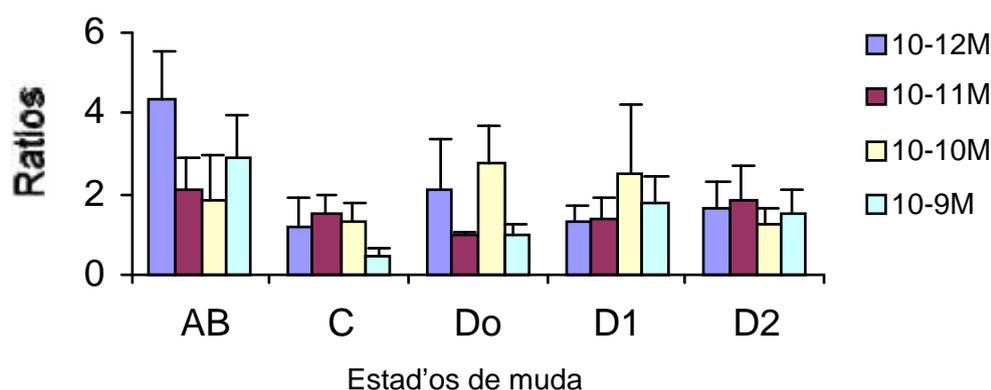


Fig. 11 Efectos de concentraciones de IGF-I sobre ecdiesteroides cuantificado en ratios, barras verticales indican el error estándar de la media.

3.2. EFECTO INYECCIÓN PEPTIDOS TIPO INSULINA SOBRE NIVELES DE GLUCOSA.

3.2.1 Niveles de Glucosa en hemolinfa.

Bajo la hipótesis de que peptidos tipo insulina desempeñan una función en el metabolismo de la glucosa en los crustáceos, se procedió a evaluar el efecto de la Insulina y IGF-I en 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 *ug* glucosa/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 .I. Niveles de Glucosa en Hemolinfa, Mediciones a través del tiempo después de que los animales fueron inyectados con peptidos tipo insulina. Los valores son expresado en *ug* glucosa/ml, \pm error estándar, * diferencias significativas ($p < 0.05$) y ** diferencias significativas ($p < 0.01$)

TIEMPO	IGF-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/IGF-I) y el nivel de Glucosa en hemolinfa, se pudo observar que después de una hora post inyección existe un incremento, siendo IGF-I altamente significativo en un 37% (24.57 \pm 2.55 *ug****) que insulina con un 16% (18.85 \pm 2.42 *ug*), respecto al control (15.57 \pm 5.68 *ug*), pero presento una leve disminución de glucosa comparado con el tiempo inicial.

A las tres horas no se ven diferencia significativa de los tratamientos con respecto al control.

Observándose para el IGF-I un incremento de 9,6 % (16.85 \pm 5.78 *ug*), mientras que el

tratamiento con Insulina disminuyo en un 19% (12.81 ± 1.18 ug) referente al Control, pero ambos disminuyeron el nivel de glucosa respecto al tiempo inicial($T_0 = 19.72 \pm 1.58$).

A las cinco horas de la inyeccion de los tratamientos, se observo un comportamiento inverso al registrado a las 3 horas de la inyección. El tratamiento con IGF-I disminuyo significativamente los niveles de glucosa un 58% (18.78 ± 1.14 ug.*), mientras que el tratamiento con Insulina no provoco cambios con respecto al control (45.06 ± 8.18 ug), sin embrago insulina y control difieren al tiempo inicial, incrementando los niveles de glucosa (Fig.12).

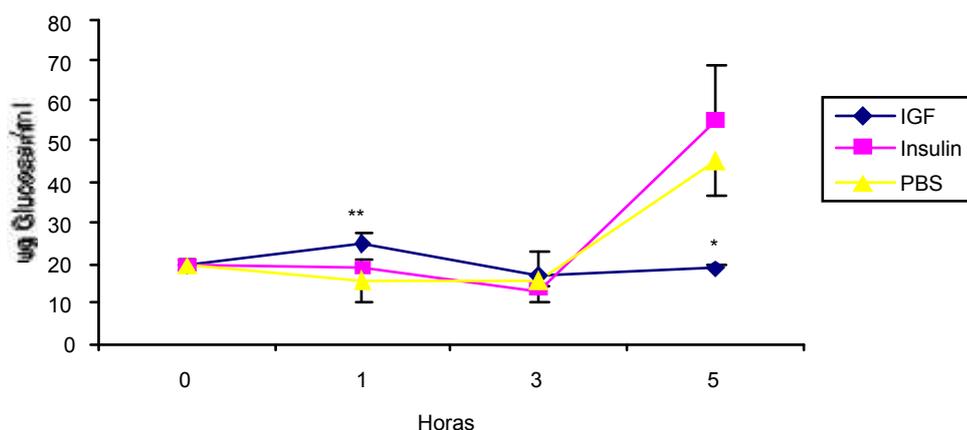


Fig.12. Efectos de Insulina/IGF-I sobre el nivel de Glucosa en hemolinfa, después de 4 intervalos de tiempos distintos. barras verticales indican el error estándar. El asterisco representa que el valor es significativamente diferente que el control * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

El tratamiento con IGF-I tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) comparado al tratamiento con PBS (control), incrementado los niveles de glucosa despues de 1 hora y luego disminuyendolos 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 cinco 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 de glucógeno por gramo de tejido húmedos (mg glucógeno/g tejido),

3.2.2.1. Hepatopancreas.

Los resultados de glucógeno en hepatopancreas después de aplicarse 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 ocasiono un incremento en el nivel de glucógeno ($0.288 \pm 1.015 \text{mg}^*$) significativamente ($P < 0.05$) superior con respecto al control (0.175 ± 0.017 mg). El tratamiento de IGF-I no presento 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 significativa (0.169 ± 0.015 mg*), notándose una disminución en la cantidad de glucógeno comparado con el control (0.165 ± 0.015 mg) y el tiempo cero (0.2132 ± 0.026 mg) (Fig 13).

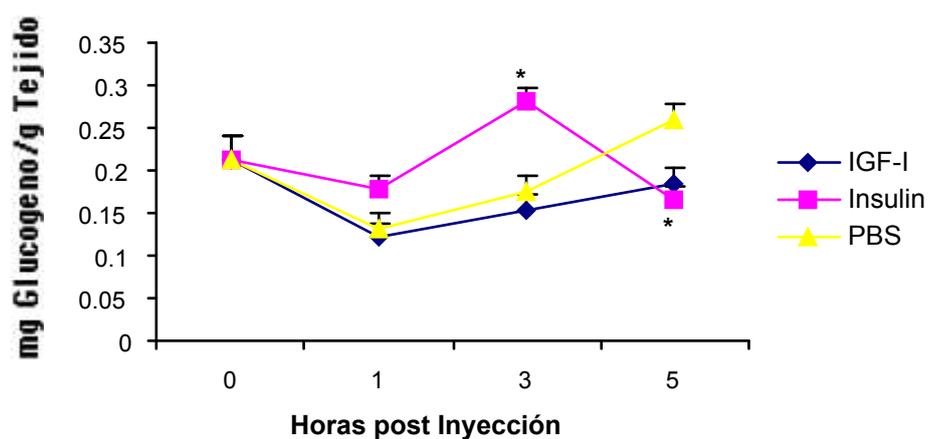


Fig. 13. Efectos de insulina/IGF-I sobre el nivel de glucógeno en Hepatopancreas, barras verticales indican el error estándar, barras verticales indican el error estandar. El asterisco indica que el valor es significativamente ($P < 0.05$) diferente del control.

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 ± 0.017 mg **) con el tratamiento de insulina comparado con el control (0.785 ± 0.136 mg). De manera similar, el tratamiento con IGF-I (0.290 ± 0.018 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 ± 0.016 mg **) en el nivel de glucógeno comparado con el control (0.285 ± 0.017 mg), así como el tratamiento con IGF-I presentó diferencia significativa (0.181 ± 0.019 mg*) frente al control (0.285 ± 0.017 mg). En el tiempo cinco se registró una leve disminución significativa de glucógeno con el tratamiento de insulina (0.079 ± 0.017 mg*) mientras que IGF -I no presentó diferencias significativas (0.131 ± 0.018 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 significativo ($P < 0.01$) en el tiempo uno y tres. Mientras que el tratamiento con IGF-1 solo mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo tres (Fig. 14).

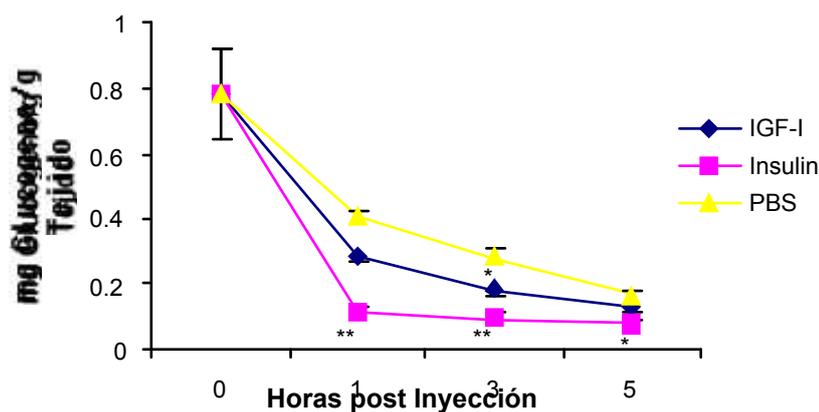


Fig. 14. Efectos de concentraciones de insulina/IGF-I sobre el nivel de glucógeno en músculo, por gramo de tejido, barras verticales indican el error estándar. El asterisco indica que el valor es significativamente ($P < 0.05$) diferente del control.

3.2.2.5. 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 ± 0.016 mg**, mientras que el tratamiento de IGF -I no presento diferencias significativas (0.061 ± 0.016 mg) frente al control (0.038 ± 0.017 mg). Ambos tratamientos ocasionaron un ligero incremento en el contenido de glucógeno con respecto al registrado en el tiempo inicial (0.066 ± 0.012 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 IGF-I no se observo 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 ± 0.017 mg), mientras que IGF-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. 15).

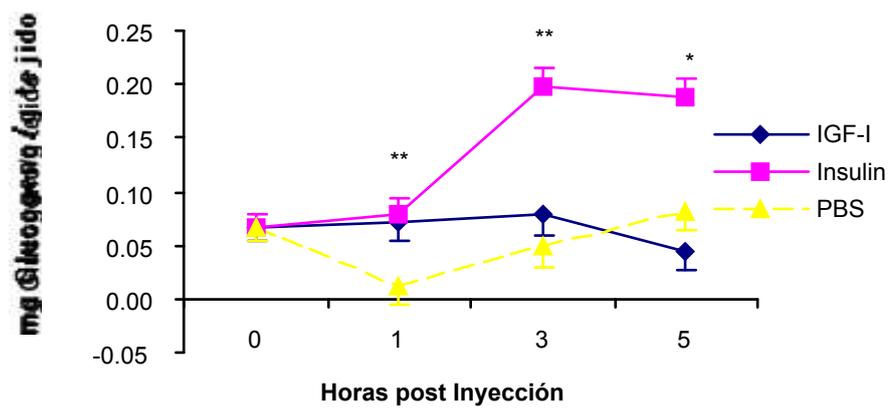


Fig. 15. Efectos de concentraciones de insulina/IGF-I sobre el nivel de glucógeno en branquias, por gramo de tejido, barras verticales indican el error estándar, barras verticales indican el error estándar. El asterisco indica que el valor es significativamente ($P < 0.05$) diferente del control.

BIBLIOGRAFIA.

AIKEN, D.E. 1973. Proecdysis, setal development, and molt prediction in the American lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Board Canada, 30(9): 1337-1344.

ADAMS, M., T. Blundell, D. Hodgkin, and G. Dodson. 1996. Estructure of rhombohedral 2-zinc insulin cristal. Nature 224: 491-495.

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. 1989. Endocrinologic regulation of molting in crustacea. Rev. Aquatic. Sci. 1: 131-157.

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.

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.

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.

DE REGGI, M. I., Hirim, M. H., and Delaage, M. A. 1975. Radioimmunoassay of
ecdysone and application to *Drosophyla* larvae and pupae. *Biochem. Biophys. Res.*
Commun. 66, 1307-1315.

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

DEXTER, B.L. 1981. Setogenesis and molting in planktonic crustaceans. *J. Plankton*
Res., 3(1): 113.

DRACH, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes. Ann. Inst. océanogr. Mónaco, 19: 103391.

DOROTHY, E. and M. Skinner. 1985. Molting and Regeneration, Integument, pigment, and hormonal processes, the biology crustacea, Vol 9, 43-99.

FROESCH. E. R. and J. Zopf. 1985. Insulin-like growth factor and insulin: Comparative aspects. Diabetologia. Springer-Verlag. 28:485-493.

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

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

GRAF. R, S. Neuenschwander, S. Brow, M. R. Ackermann. U. 1997. Insulin mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 151-163.

KUCHARSKI, L. C. M. Ribeiro, V. Schein, R. DaSilva and M. Marques. 1997. Insulin Binding sites in of the estuarine Crab *Chasmagnathus granulata*. J. Exp. Zoo. 279:118-125.

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.

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

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.

REAKA, M. L. 1975. Molting in stomatopod crustaceans. I. Stages of the molt cycle and morphology. J. Morphol., 146: 5580.

RIEHLE, M. A. and M. R. Brown. 1999. Insulin stimulates ecdiesteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect. Biochemistry and molecular Biology*. 29: 855-860.

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

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.

ROSAS, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M. and Van Wormhoudt, A. 2000. El Metabolismo de los Carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. 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.

ROSENFELD RG. 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

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.

SARA. V. R. and K. Hall. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiological Reviews*. The American Physiological Society. 70(3):591-613.

SÉFIANI, M. 1996. Caractérisation de neuropeptides hyperglycémisants et inhibiteurs de la mue chez la crevette pénéide *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.
Progress in Neurobiology. Vol. 54. Pp35-54.

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

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.

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.

SANDERS. B. 1983. Insulin-Pepides in the Lobster *Homarus americanus* III. No
Glucostatic Role. General comparative endocrinology . 50, 378-382

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.