



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**"Métodos de selección de anticuerpos monoclonales contra
compuestos presentes en el cerebro y ganglio torácico de
hembras maduras *Penaeus vannamei*."**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de
ACUICULTOR

Presentada por
Ernesto Valenzuela Domínguez

GUAYAQUIL - ECUADOR
1996

DEDICATORIA

He querido dedicar este trabajo a quienes más cerca de mí me han sabido dar grandes ejemplos de amor y fuerza ante la vida.

A tí Mami Yayi, por tu coraje y extraordinaria valentía.

A tí Mami Rosita, por tu inagotable comprensión y esa capacidad tan grande de saber dar amor.

A tí Mayo, por tu brillante creatividad.

A tí Carlitos, por tu calidad como persona.

A mi tía Olga, por toda su generosidad y preocupación por los que menos tienen.

Y a tí Via por tu fe y amor a DIOS, y tu gran deseo de superarte.

A todos ustedes, me honra muchísimo dedicarles este trabajo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS Padre, por esta oportunidad de vivir que me regaló.

Esta tesis que representa para mí el terminar mi carrera universitaria, ha sido fruto del amor y amistad de muchísimas personas, a las cuales les debo bastante, y nunca podré expresarles toda la admiración y afecto que siento por ellos.

Gracias Mami Yayi por tus cuidados, amor y ese ejemplo de vencer las dificultades que me has regalado, y a tí Mami Rosita, por tu amor, amistad y confianza en todo lo que he hecho. Solo podré pagarles tratando de ser con mis hijos, algo de lo maravillosas que han sido conmigo. A mis hermanos, Mario y Carlos, por sus consejos que son guía en mi vida, por su amistad y por su apoyo. Gracias Papá por haber estado cuando realmente te necesité. A mi tía Olga, por su amor. A tí niña VIVI, mi amor, en este momento no estuviera agradeciendo ésto, si no fueras ese motor en mi vida y esa motivación de ser alguien. No puedo definir la confianza, el respeto y amor que me has regalado, solo te puedo decir "Gracias por ser tú".

Agradezco al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). A su Director Dr. Jorge Calderón, por la oportunidad brindada y su ejemplo de perseverancia. Al Dr. Eric Mialhe, por su confianza y ánimo. A la Dra. Lucía Carrera, por ese ejemplo de trabajo y lucha que nos legó.

A Luis Gómez, Sonnya Mendoza, Edward Donoso, Virna Cedeño y al Dr. Olivier Condamines, por su valiosísima ayuda en la resolución de esta tesis.

A mis amigos, Javier De la Paz, quien ha sido como mi hermano mayor; a Eduardo Alava, por su extraordinaria paciencia, sabios consejos, ánimo constante, y su para mí, preciada amistad; a Byron, por su seriedad; a Alejandro Barros y a su familia, por su cariño y estima. A Javier Velasco, por su gran amistad y aprecio. A Giovanni Dueñas, por sus consejos, fuerza y soporte. Gracias Mara, una lotería tu amistad.

Al Ing. Cervantes y al Ing. Cevallos, por creer en mí. A Lucrecia y a las Dras. Ann Van Hauwaert, Sandra Jara, Elsa Abarca. Gracias Philippe, por enseñarme a sentir más la vida, te extraño.

A mis compañeros Berenice Borja, César Bedoya, Fernando Tapia, Isabel Tomalá, Mario Fajardo, Rubén Gómez y Winston Mero, por esas horas de estudio compartido.

A Yela Paredes y Mercedes Ponce, por su cariño cuando llegué al CENAIM. Gracias a Eduardo Cavezas, Marcelo, Gabriel, Lorena Schwarz, Manolo, Gianella, Eduardo Zambrano, a mis compañeros tesisistas. GRACIAS CENAIM.

Gran parte de este trabajo, sino todo, se lo debo a alguien que no solo en lo académico, sino también en lo humano, fue mi Directora, Gracias Julie, "correcto".

A todos ustedes de corazón, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

DECLARACION EXPRESA

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

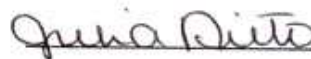
(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Ernesto Valenzuela D.'.

Ernesto A. Valenzuela Domínguez.



Eduardo Cervantes, Ing.
Presidente del Tribunal.



Julia Nieto, Ac.
Directora de Tesis.



Jorge Calderón, Ph.D.
Miembro del Tribunal.



Jerry Landivar, Msc.
Miembro del Tribunal.



Tamara Borodulina, Msc.
Miembro del Tribunal.

RESUMEN

El control del proceso de maduración es una prioridad para el cultivo del camarón, a fin de no depender del medio ambiente. Hasta ahora, la técnica de ablación del pedúnculo ocular, el cual contiene factores inhibidores de la maduración, es regularmente aplicada para inducirla. Sin embargo, este método presenta desventajas debido a que afecta la fisiología de la hembra, cuya utilización es por tanto limitada a algunos desoves.

El conocimiento del proceso de maduración a nivel molecular y celular del animal permitiría optimizar los parámetros ambientales y nutricionales de inducción, así como también obtener y utilizar las moléculas inductoras netamente por biología molecular

Dentro de este doble objetivo, se emprendió la preparación de anticuerpos monoclonales específicos de factores de maduración secretados en el cerebro y/o en el ganglio torácico de *Penaeus vannamei*. Se inmunizaron ratones Balb/c con extractos de estos órganos, a fin de realizar dos operaciones de hibridación linfocitaria. Se desarrollaron y evaluaron diversas pruebas inmunológicas para seleccionar los hibridomas que producen anticuerpos de interés.

En lo que respecta a la operación de selección de hibridomas específicos de factores producidos por el cerebro de hembras maduras, se consideraron dos técnicas inmunoenzimáticas y la inmunofluorescencia, con extractos y con improntas de cerebro respectivamente. La inmunofluorescencia fue escogida debido a su gran sensibilidad y especificidad, lo que permitió detectar y reconocer, con seguridad, la presencia de complejos antígenos-anticuerpos. La fusión permitió obtener solo un pequeño número de hibridomas de los cuales ninguno se mostró específico de antígenos cerebrales.

La selección de hibridomas secretores de anticuerpos específicos de factores producidos por el ganglio torácico se basó en una prueba inmunoenzimática de tipo ELISA (Ensayo inmunosorbente de enzima ligada) en microplacas. Esta prueba se mostró adecuada, ya que se seleccionaron 13 hibridomas productores de anticuerpos que reaccionaban contra extractos del ganglio torácico. Dos de estos hibridomas (6F9 y 10F5) reconocieron específicamente compuestos presentes en el ganglio torácico.

Los anticuerpos producidos por estos hibridomas constituyen reactivos para estudiar los factores reconocidos en términos de purificación, caracterización bioquímica y genética, así como, síntesis y regulación.

ABREVIATURAS

Ac	: Anticuerpo
ACF	: Adjuvante completo de Freud
Ag	: Antígeno
BCIP	: 5-bromo-4- cloro-3-indolylfosfato en dimethylformamida
Csus	: Control sin primero ni segundo anticuerpo
C2a	: Control sin primer anticuerpo
D.M.S.O.	: Dimetil sulfóxido.
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E.D.T.A.	: Etilén diamino tetra-acético.
E.L.I.S.A.	: Ensayo inmunosorbente de enzima ligada.
FM	: Farnesoato de metilo
GT	: Extracto de ganglio torácico
HAT	: Hipoxantina aminopterina timidina
HCPR	: Hormona concentradora del pigmento rojo
HEG	: Hormona estimuladora de la gónada
HEM MAD	: Hemocitos de hembra madura
HHC	: Hormona hiperglicémica de los crustáceos
HIG	: Hormona inhibidora de la gónada
HL IN	: Plasma de hemolinfa de hembra inmadura
HL MAD	: Plasma de hemolinfa de hembra madura
HIM	: Hormona inhibidora de la muda
HM	: Hormona de la muda
HT	: Hipoxantina timidina
IFI	: Inmunofluorescencia indirecta
Ig.G.	: Inmunoglobulina G.
Musc	: Extracto de músculo

NBT	: Nitro blue tetrazolium
Ov	: Extracto de ovario
P.B.S.	: Tampón fosfato salino sin Ca^{++} y Mg^{++} .
PEG	: Polyethylene glycol
R	: Reproducción
Rc	: Suero del ratón no inmunizado
Rh	: Suero del ratón hembra inmunizado con extracto de ganglio torácico
Rm:	: Suero del ratón macho inmunizado con extracto de ganglio torácico
R1	: Suero del ratón 1 inmunizado con extracto de cerebro
R2	: Suero del ratón 2 inmunizado con extracto de cerebro
R3	: Suero del ratón 3 inmunizado con extracto de cerebro
R4	: Suero del ratón 4 inmunizado con extracto de cerebro
Sn1	: Extracto de cerebro
Sn2	: Extracto de cerebro
SVF	: Suero fetal bovino
t(0)	: sueros extraídos antes de la inmunización
t(3)	: sueros extraídos después de la tercera inmunización
t(F)	: suero extraído el día de la fusión
t(AF)	: sueros extraídos antes de la fusión
TA	: Temperatura ambiente
Tween 20	: Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate.
2C9	: Anticuerpo monoclonal contra <i>Vibrio harveyi</i>

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1. Disección de órganos (hembras maduras de <i>P. vannameti</i>)	
cerebro, ganglio torácico, ovario.....	37
2.2. Preparación de antígenos e inmunógenos.....	37
2.2.1. Inmunógenos.....	37
2.2.1.1. Sobrenadante 1.....	37
2.2.1.2. Sobrenadante 2.....	38
2.2.1.3. Ganglio torácico.....	38
2.2.2. Antígenos.....	38
2.2.2.1. Músculo.....	38
2.2.2.2. Ovario.....	39
2.2.2.3. Hemolinfa.....	39
2.2.2.4. <i>Escherichia coli</i>	39
2.3. Preparación de controles negativos	
(Suero Rc y 2C9).....	39
2.3.1. Suero del ratón control (Rc).....	39
2.3.2. 2C9 (líquido ascítico).....	40
2.4. Inmunización de ratones.....	40
2.4.1. Inmunización con Sn1 y Sn2.....	40
2.4.2. Inmunización con GT.....	41
2.5. Preparación de los inmunosueros.....	41
2.5.1. Preparación de los sueros R1, R2, R3, R4	
de ratones inmunizados con Sn1 y Sn2.....	41
2.5.2. Preparación de los sueros Rm y Rh	
de ratones inmunizados con GT.....	42
2.6. Producción de anticuerpos monoclonales.....	42
2.6.1. Medios de cultivo.....	42
2.6.1.1. Medio de cultivo celular básico.....	42

2.6.1.2. Medio de cultivo para mielomas.....	43
2.6.1.3. Medio selectivo HAT.....	43
2.6.1.4. Medio selectivo HT.....	43
2.6.1.5. Medio de cultivo para hibridomas.....	43
2.6.2. Hibridación linfocitaria.....	44
2.6.2.1. Preparación del polyethylene glycol.....	44
2.6.2.2. Preparación de macrófagos.....	44
2.6.2.3. Preparación de mielomas.....	45
2.6.2.4. Obtención de linfocitos.....	45
2.6.2.5. Fusión celular.....	46
2.6.3. Criopreservación y descongelación de células.....	47
2.7. Dot blot.....	48
2.7.1. Protocolo dot blot (CENAIM).....	48
2.7.2. Tratamientos con formol y temperatura para eliminar la reacción específica.....	49
2.8. ELISA indirecto.....	49
2.8.1. Protocolo de ELISA indirecto.....	49
2.9. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	50
2.9.1. Citocentrifugación.....	50
2.9.1.1. Disgregación de células.....	50
2.9.1.1.1. Disgregación por maceración.....	50
2.9.1.1.2. Corte y disgregación con pronasa.....	51
2.9.2. Preparación de improntas.....	51
2.9.3. Protocolo de primocultivos de hemocitos.....	52
2.9.4. Protocolo de inmunofluorescencia indirecta (CENAIM).....	52

2.9.5. Protocolo de inmunofluorescencia indirecta (optimizado).....	53
3. RESULTADOS.....	54
3.1. Desarrollo, optimización y evaluación de inmuno-pruebas para la selección de hibridomas secretores de anticuerpos contra compuestos del cerebro.....	54
3.1.1. Análisis de la técnica de dot-blot mediante anticuerpos policlonales.....	54
3.1.2. Análisis de la técnica ELISA en microplacas mediante anticuerpos policlonales.....	59
3.1.3. Análisis de la técnica de inmunofluorescencia mediante anticuerpos policlonales.....	63
3.2. Fusión celular para la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos contra compuestos del cerebro.....	67
3.3. Desarrollo, optimización y evaluación de inmuno-pruebas para la selección de hibridomas secretores de anticuerpos contra compuestos del ganglio torácico.....	68
3.3.1. Análisis de la técnica de Dot blot mediante anticuerpos policlonales.....	68
3.3.2. Análisis de la técnica ELISA en microplacas mediante anticuerpos policlonales.....	69
3.4. Fusión celular para la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos contra compuestos del ganglio torácico.....	71
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.: Órganos que conforman el sistema neurosecretor en el camarón.....	15
Figura 2: Vista dorsal del sistema nervioso en reproductores <i>P. vannamei</i>	17
Figura 3: Gráfico mostrando los posibles títulos de HIM, HM, HIG, y HEG en la hemolinfa durante la reproducción R dentro del ciclo de muda.....	18
Figura 4: Vías envueltas en el control de la muda y la reproducción de especies peneidos	20
Figura 5: Producción de anticuerpos policlonales.....	22
Figura 6: Producción de anticuerpos monoclonales.....	24
Figura 7: Principio de la hibridación linfocitaria.....	25
Figura 8: Método de selección de los hibridomas.....	26
Figura 9: Principio de ELISA directo, indirecto, e inmunocaptura (sanduche).....	28
Figura 10: Principio de dot-blot.....	30
Figura 11: Principio de Western blot.....	31
Figura 12: Principio de inmunofluorescencia directa e indirecta.....	33
Figura 13: Principio de inmunoperoxidasa.....	34
Figura 14: Evaluación por ELISA del estado inmunitario de los ratones R1-R2-R3-R4 contra SN1.....	61
Figura 15: Evaluación por ELISA del estado inmunitario de los ratones R1-R2-R3-R4 contra Sn2.....	61
Figura 16: Evaluación por ELISA del estado inmunitario de los ratones R1-R2-R3-R4 contra antígeno músculo (control).....	62

Figura 17: Curva del desarrollo de la respuesta inmunitaria de los ratones R1-R2-R3-R4, inmunizados con Sn1 y Sn2.....	63
Figura 18: Disgregación de células de cerebro de <i>P. vannamei</i> por maceración (Hemacolor) (1000 X).....	64
Figura 19: Disgregación de células de cerebro de <i>P. vannamei</i> con pronasa (Hemacolor) (1000 X).....	65
Figura 20: Impronta de células de cerebro de <i>P.vannamei</i> Hemacolor) (1000 X).....	65
Figura 21: Inmunofluorescencia negativa (1000 X).....	68
Figura 22: Estado de inmunización de los ratones (Rh, Rm)	70
Figura 23: Curva de inmunización de los ratones (Rh, Rm) inyectados con un extracto de ganglio torácico de hembras maduras <i>P.vannamei</i>	71
Figura 24: Resultados de la selección de hibridomas por ELISA.....	73
Figura 25: Resultados de la prueba de ELISA con los hibridomas seleccionados sobre diferentes tejidos.....	74
Figura 26: Inmunofluorescencia. Célula nerviosa negativa (1000 X) (Control 2C9).	75
Figura 27: Inmunofluorescencia. Célula nerviosa positiva 1000 X) (6F9).....	76
Figura 28: Inmunofluorescencia. Célula nerviosa positiva (1000 X) (10 F5).....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Ejemplos de aplicaciones de anticuerpos en endocrinología humana y animal.....	35
Tabla II. Ejemplos de aplicaciones de anticuerpos en endocrinología de crustáceos.....	36
Tabla III. Esquema de inmunización con Sn1 y Sn2 (cerebro).....	40
Tabla IV. Esquema de inmunización con GT (ganglio torácico).....	41
Tabla V. Evaluación por dot blot del estado de inmunización de los ratones inyectados con Sn1 y Sn2 (cerebro), utilizando diferentes diluciones de los sueros policlonales.....	55
Tabla VI. Evaluación por dot blot de los sueros de los ratones R2 y R3 con Sn1, hemolinfa de hembra madura (Hl mad), hemolinfa de hembra inmadura (Hl inmad), músculo (Músc), ovario de hembra madura (Ov mad), y ganglio torácico (GT).....	57
Tabla VII. Tratamientos de formol y temperatura para eliminar la reacción del Sn1 con el sustrato.....	58
Tabla VIII. Prueba para observar el efecto del formol y la temperatura sobre la reacción antígeno-anticuerpo.....	59
Tabla IX. Evaluación por dot blot de los títulos de los inmunosueros de los ratones (Rh, Rm).....	69
Tabla X. Resultados de inmunofluorescencia de los hibridomas seleccionados sobre improntas de cerebros de hembras maduras e inmaduras.....	75

INTRODUCCIÓN

A comienzos de la década de los 80, la industria camaronera ecuatoriana, registró un considerable aumento de las hectáreas de producción. Este aumento ocasionó, que sea insuficiente la cantidad de larvas colectadas del medio natural (larva silvestre). Para poder suplir esta demanda, se construyeron laboratorios de producción de larvas (larva de laboratorio) que dependen de hembras grávidas del medio natural. Sin embargo, el no conocer con certeza las áreas y épocas de desove de estas hembras en el medio, hizo necesario implementar sistemas de maduración en cautiverio (cópula natural e inseminación), con el fin de eliminar la dependencia de hembras grávidas del medio natural.

La implementación de los sistemas de maduración, se logró desarrollando técnicas que incluyen el control de variables ambientales (fotoperíodo, tipo e intensidad de luz, ruido, tamaño y color del tanque, recambio de agua, temperatura y salinidad), la utilización de dietas naturales-artificiales, y la ablación unilateral del pedúnculo ocular de las hembras, lo que tiene por consecuencia el desencadenar del proceso de maduración de los ovarios. La eficiencia de este método reside en el hecho de que el pedúnculo contiene hormonas de inhibición de la maduración y que luego de la ablación la concentración de estas hormonas disminuye repentinamente a la mitad, induciendo a la maduración.

La ablación unilateral del pedúnculo ocular tiene un cierto número de desventajas, siendo la más importante la alteración general de las funciones endocrinas, que se traducen en una reducción de la capacidad reproductiva de las hembras, una baja calidad y cantidad de huevos y eventualmente de larvas. Además parecería que la ablación puede inducir anomalías del sistema inmunitario y una estimulación de la replicación de ciertos virus susceptibles de ser transmitidos verticalmente. Por otra parte, este método impone el renovar permanentemente el plantel de hembras mantenidas en los laboratorios ya que pueden ser utilizadas solamente

durante un período estimado de 90 días, lo que es un inconveniente mayor para los trabajos de selección genética.

El control del proceso de la maduración constituye, por lo tanto, una prioridad para el cultivo del camarón, lo que implica, estudiar las bases moleculares a fin de poder optimizar protocolos basados en una mejor adecuación de los parámetros ambientales y nutricionales, pero también evolucionar hacia un dominio del sistema endocrino si los efectores pueden ser caracterizados y producidos mediante diversas biotecnologías.

Por referencia al conocimiento adquirido y a las tecnologías desarrolladas en endocrinología de vertebrados, y en menor grado de los invertebrados, parece que la preparación de anticuerpos específicos de factores de maduración podría constituir la base de una estrategia eficaz para purificar y caracterizar estos factores, y para analizar sus mecanismos de acción y de regulación espacio-temporal al nivel del animal, así como a los niveles celulares y moleculares.

La preparación de anticuerpos monoclonales está basada clásicamente en la tecnología de hibridación linfocitaria, la que consiste en fusionar células tumorales con linfocitos. Las células híbridas, llamadas hibridomas, tienen las características de las células madres, es decir, inmortales y productoras de anticuerpos respectivamente. Esta fusión celular conduce a la obtención de un gran número de hibridomas de los cuales solo algunos producen anticuerpos de interés, en este caso específicos de factores de maduración. Una fase capital del proceso de hibridación linfocitaria consiste en la selección de estos hibridomas, lo que requiere de elaborar pruebas adecuadas.

En el contexto del trabajo de esta tesis de grado se establecieron pruebas para poder seleccionar hibridomas secretores de anticuerpos específicos de factores de maduración secretados por el cerebro y el ganglio torácico del camarón *Penaeus vannamei*.

1. ANTECEDENTES

1.1. MADURACIÓN DE CAMARÓN EN CAUTIVERIO

En Ecuador, la implementación de la maduración de *Penaeus vannamei* en cautiverio consistió en la adaptación de técnicas desarrolladas para otras especies de peneidos en diferentes países.

El proceso de maduración está basado en la aclimatación de las hembras durante un período de 6-10 días antes de realizar la ablación unilateral del pedúnculo ocular. La nutrición está basada en el suministro de dietas frescas congeladas (poliquetos, artemia, calamar, ostra, mejillón) y balanceados comerciales, a un máximo del 20% del peso de la biomasa. Entre los otros parámetros considerados hay que anotar el recambio de agua (200%), el fotoperíodo (natural o artificial con 14:10 de luz:oscuridad), la temperatura (28°C), la salinidad (35ppt) y la densidad (alrededor de 4 animales/m²). (Chamberlain, 1985, Gómez y Arellano, 1990, Bray y Lawrence, 1992, Browdy, 1992).

Bajo estas condiciones de manejo se puede obtener un promedio de 140.000 nauplios/hembra. La mortalidad ocasionada por la ablación está comprendida entre el 1 y 3%, siendo eficaz la inducción solamente en alrededor del 30% de las hembras ablacionadas. Estas son renovadas aproximadamente cada 90 días (L. Gómez, com.pers., J. Macías, com.pers.).

La ablación, que es actualmente la única técnica eficaz para inducir la maduración, conlleva sin embargo efectos negativos sobre la fisiología del camarón debido al hecho de que el pedúnculo ocular es un órgano complejo desde el punto de vista de neurosecreción. Procesos tales como la muda, las pulsaciones del corazón, el metabolismo de proteínas y del azúcar, la pigmentación y el balance de agua son perturbados por la ablación (Beltz, 1988).

Esto provoca el deterioro de la capacidad reproductiva de la hembra, disminución en calidad y número de nauplios y la necesidad de renovación del plantel de animales luego de cierto tiempo (90 días).

1.2. SISTEMA ENDOCRINO DE LOS DECÁPODOS

Diferentes elementos conforman el sistema endocrino de los decápodos.

a) El sistema neurosecretor, formado por el complejo órgano X-glándula sinusal (pedúnculo ocular), las células neurosecretoras del cerebro y sistema nervioso central, los órganos post-comisurales y pericardios (figura 1)

b) El órgano Y, responsable de la secreción de ecdisteroides involucrados en el proceso de muda.

c) La glándula androgénica presente solo en machos.

d) El ovario cuya función endocrina no está bien dilucidada pero que podría estar involucrado en la diferenciación de los caracteres femeninos secundarios.

e) El órgano mandibular que secreta el farnesoato de metilo que es equivalente a la hormona juvenil de los insectos (Adiyodi, 1985, Huberman, com. pers.).

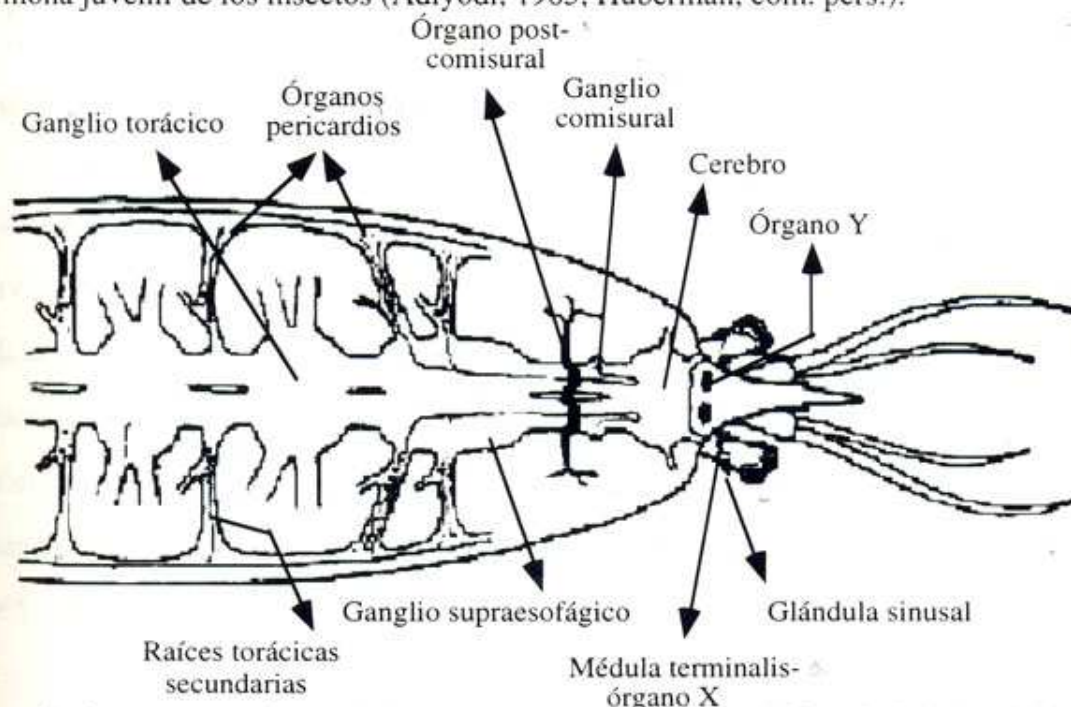


Figura 1. Organos que conforman el sistema neurosecretor en el camarón. Tomado de Beltz, 1988.

1.2.1. Células neurosecretoras

Las células neurosecretoras son neuronas con axones terminales que muestran especialización y localización para la liberación de sustancias a la hemolinfa llamadas neurohormonas (Cooke y Sullivan, 1982).

1.2.2. Neurohormonas

Se denomina hormona a la sustancia secretada por células especializadas que actúa a bajas concentraciones regulando la actividad de células blanco, siendo las neurohormonas producidas y almacenadas en células neurosecretoras (Atwood, 1982).

Las neurohormonas controlan gran parte de las respuestas fisiológicas del animal a cambios en las condiciones ambientales, por ejemplo, flujo de hemolinfa, latidos del corazón, contracciones musculares, reproducción (Cooke, 1977; Battelle y Kravitz, 1978; Kravitz *et al.*, 1980). La liberación neurohormonal es controlada de manera compleja en el sistema nervioso central (Scharrer y Scharrer, 1945; Knowles, 1974; Kravitz *et al.*, 1980).

1.3. Sistema nervioso central

El sistema nervioso de los crustáceos básicamente está constituido por el cerebro y un cordón nervioso ventral con un par de ganglios correspondientes a cada somito embrionario (McLaughlin, 1983). El cerebro es bilobulado y está conectado a los nervios de los pedúnculos oculares, antenas y cordón nervioso ventral por medio de nervios que se extienden a los segmentos y apéndices. Los ganglios del cerebro y cordón nervioso ventral están unidos longitudinalmente por conectivos y transversalmente por comisuras (Horridhge, 1965). Ver figura 2.

El cerebro está compuesto de tres partes:

- a) El protocerebro que inerva típicamente el ojo naupliar o los ojos compuestos, los órganos frontales, la glándula sinusal y los músculos de la cabeza.
- b) El deutocerebro que inerva las antenas.
- c) El tritocerebro que inerva las antenas y la parte anterior del estómago (Hanström, 1947; Horridge, 1965).



Figura 2. Vista dorsal del sistema nervioso en reproductores *P. vannamei*. (a: cerebro, b: ganglio torácico, c: ganglio abdominal)

1.4. Regulación hormonal de la reproducción

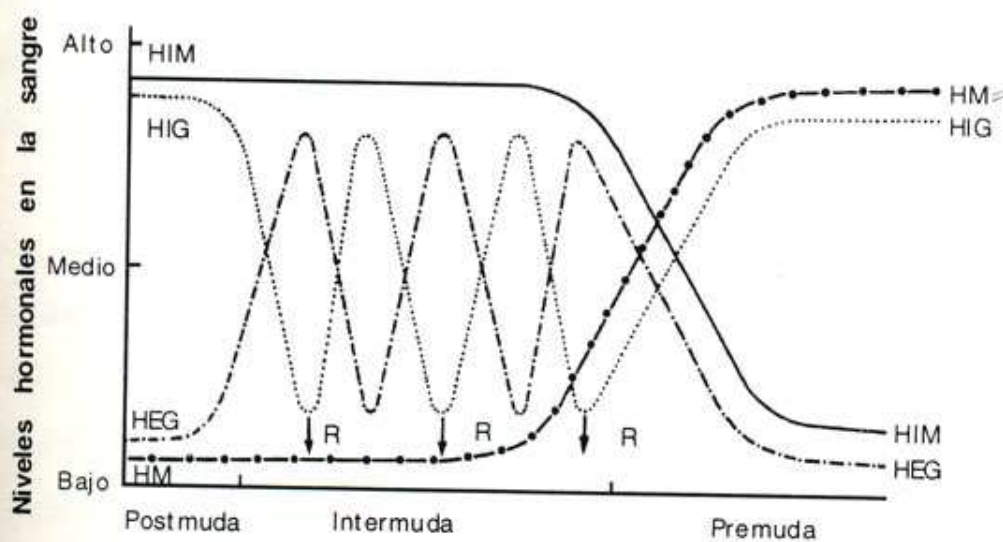
En los crustáceos el control endocrino de la reproducción, en términos de cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, ha sido estudiado por varias décadas (Adiyodi y Adiyodi, 1970, Fingerman, 1970, Kleinholz y Keller, 1979, Cooke y Sullivan, 1982, Charniaux-Cotton, 1985, Quackenbush, 1986, Fingerman, 1987).

En 1943 Panouse demostró que hembras de camarones ablacionadas alcanzaban un desarrollo precoz del ovario. La ablación unilateral del pedúnculo ocular, realizada en la fase de intermuda, induce a la maduración, debido a la eliminación del complejo órgano X-

glándula sinusal que es el sitio de producción y liberación de la hormona inhibidora de la gonada (HIG) (Borminsky *et al.*, 1981; Quackenbush y Hernkind, 1983; Charniaux-Cotton, 1985; Meusy *et al.*, 1987; Keller 1992). En el pedúnculo ocular son secretadas y liberadas también la hormona inhibidora de la muda (HIM) (Chang, 1985), la hormona concentradora del pigmento rojo (HCPR) (Kleinholz *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1985; Fingerman, 1987), y la hormona hiperglicémica de los crustáceos (HHC) (Keller, 1992).

En *Penaeus vannamei* (especie de tético abierto), los procesos de muda y maduración son alternados. Adiyodi y Adiyodi en 1970 propusieron que la muda es inducida cuando los niveles de HIM y hormona estimuladora de la gonada (HEG) son bajos mientras que son altos los niveles de HIG y hormona de la muda (HM), la cual es secretada en el órgano Y. Figura 3.

La hormona concentradora del pigmento rojo (HCPR) interviene en la maduración como un neurotransmisor para la liberación de HEG de los tejidos neurosecretores (Kleinholz, 1985). A la hormona hiperglicémica (HHC) se la atribuye como un factor estimulante en la regulación de la maduración (figura 4).



Estadíos en el ciclo de muda

Figura 3. Gráfico mostrando los posibles títulos de HIM, HM, HIG, y HEG en la hemolinfa durante la reproducción R dentro del ciclo de muda. Tomado de K.G.Adiyodi y R. G. Adiyodi, 1970.

El ovario, según investigaciones realizadas *in vitro*, puede ser su propia fuente de una hormona estimuladora de la vitelogenina ovariana (HEVO) (Blanchet-Tournier, 1982; Meusy y Charniaux-Cotton, 1984) (figura 4).

El farnesoato de metilo, precursor de la hormona juvenil, es secretado por el órgano mandibular y parece un estimulador potencial de la reproducción (Laufer *et al.*, 1989; Landau *et al.*, 1988; Vogel y Borst, 1989; Tsukimura y Borst, 1992) (figura 4).

El cerebro y el ganglio torácico podrían producir y liberar una hormona estimuladora de la maduración (HEG) (Hinsch y Bennett, 1979; Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Adiyodi, 1985; Mohamed y Diwan 1991) lo que fue demostrado en hembras en proceso de maduración (Otsu, 1960; Oyama, 1968; Takayanagi *et al.*, 1986) (Figura 4).

Ganglios torácicos tomados de hembras maduras de langosta pudieron, luego de ser implantados en *P. vannamei*, inducir y acelerar la maduración (Yano y Tsukimura, 1988). Inyecciones de extractos de ganglios torácicos de hembras maduras también inducen la maduración gonadal (Yano *et al.*, 1988). Por lo tanto, el desarrollo gonadal puede ser inducido por una hormona estimuladora, secretada por el ganglio torácico de hembras maduras y no específica entre camarón y langosta.

En lo que concierne al cerebro de hembras maduras se reportó que una fracción peptídica (1000-2000 daltons) puede inducir la vitelogénesis en *P. japonicus* (Yano, 1990). La maduración de *P. vannamei* en tanques puede ser inducida y acelerada mediante la inyección de extractos de cerebro de hembras maduras de otras especies mientras que implantes de cerebro de hembras con ovarios inmaduros no son eficaces, lo que indica que el cerebro de hembras maduras tiene una sustancia que estimula el desarrollo ovárico. (Yano y Wyban, 1992).

El ganglio torácico ha demostrado tener más actividad de tipo HEG que el cerebro en base a pruebas *in vitro* con ovarios/cerebro/ganglio torácico, pudiendo el cerebro estimular al ganglio torácico en hembras maduras (Sarojini *et al.*, 1995; Yano y Wyban, 1992)

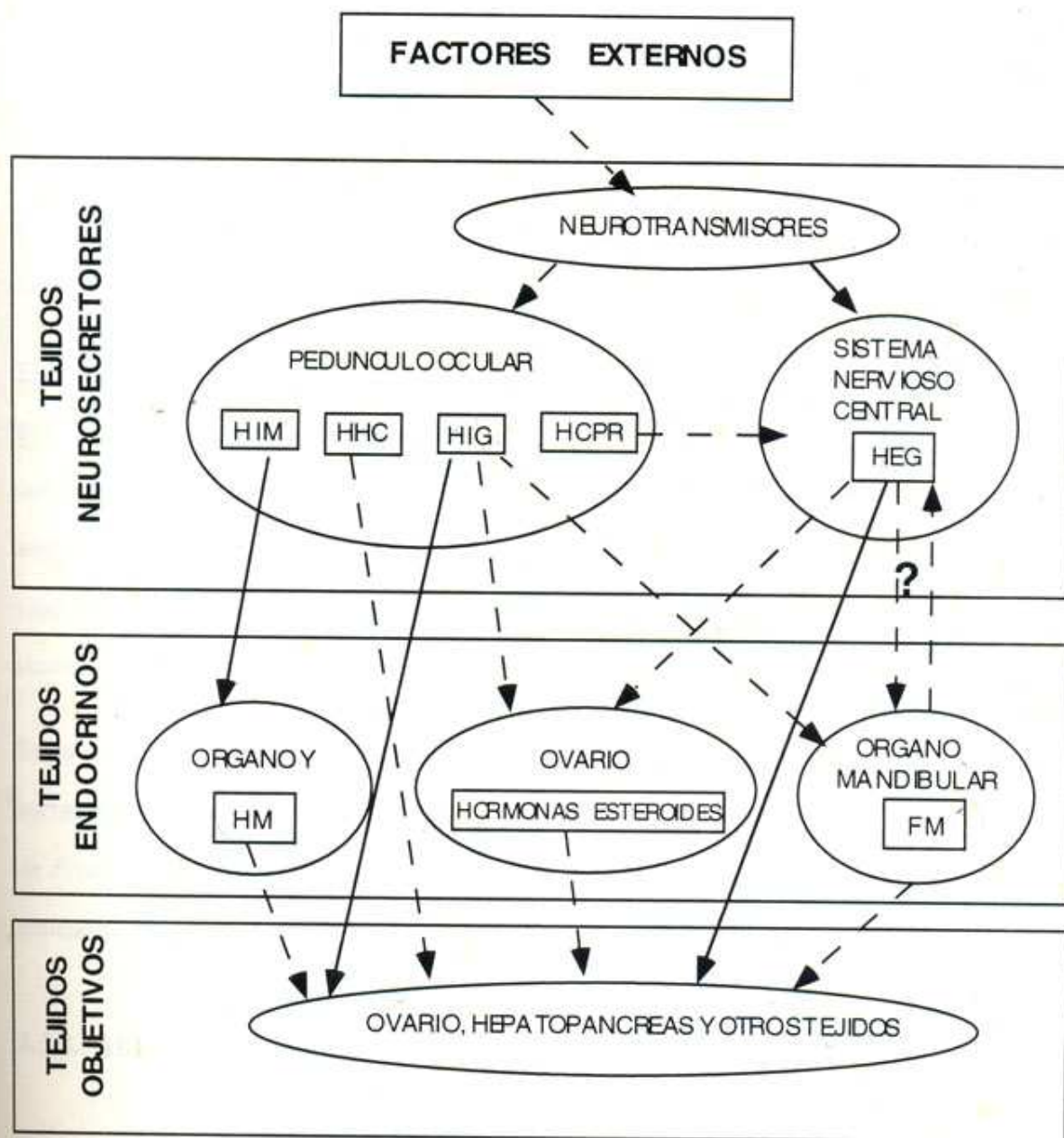


Figura 4. Vías envueltas en el control de la muda y la reproducción de especies peneidas (Las líneas continuas indican las vías confirmadas por experimentos *in vitro*). HIM, hormona inhibidora de la muda. HIG, hormona inhibidora de las gónadas. HEG, hormona estimuladora de las gónadas. HM, hormona de la muda. FM, Farnesoato de metilo. HCPR, hormona concentradora del pigmento rojo. HHC, hormona hiperglicémica de los crustáceos. Según Browdy, 1992.

1.5. ANTICUERPOS E INMUNOTECNOLOGIA

1.5.1. Anticuerpos y antígenos

Los anticuerpos constituyen un medio de defensa utilizado por el sistema inmunitario de los vertebrados superiores (reacción inmunitaria de tipo humoral), para luchar contra la presencia de moléculas extrañas (denominadas antígenos) dentro del organismo. La reacción humoral está caracterizada por la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos), secretadas por los linfocitos B y específicamente dirigidas contra los antígenos correspondientes.

El reconocimiento específico de un anticuerpo (especificidad) por el antígeno que provocó su producción, y su capacidad de ligarse fuertemente a este antígeno (afinidad) para formar el complejo antígeno-anticuerpo, son dos propiedades que caracterizan a la reacción antígeno-anticuerpo (Padlan, 1977). Estas dos propiedades importantes de los anticuerpos, especificidad y afinidad, permiten que sean utilizados, para la producción de herramientas de reconocimiento específico.

Estas herramientas de reconocimiento pueden permitir la detección y la cuantificación de varias moléculas (antígenos), por ejemplo, los factores implicados en la maduración ovárica de *P.vannamei*. Según su técnica de preparación se obtienen: anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales.

1.5.2. Anticuerpos policlonales

Después de una serie de inyecciones del antígeno de interés o inmunógeno (por ejemplo una hormona) a un animal de laboratorio (proceso de inmunización), es posible por simple recuperación del suero, disponer de una preparación de anticuerpos específicos contra el inmunógeno. Este inmunosuero o suero policlonal es la mezcla de diferentes anticuerpos de diferente especificidad, resultantes de la heterogénea respuesta humoral del animal (Figura

5.). Luego de la inmunización, diferentes linfocitos B capaces de reconocer los diferentes epitopes presentes en la superficie del inmunógeno son activados. Cada uno de estos linfocitos activados (plasmocitos) secretan anticuerpos de especificidad dada, los cuáles se encontrarán mezclados a un nivel del suero del animal.

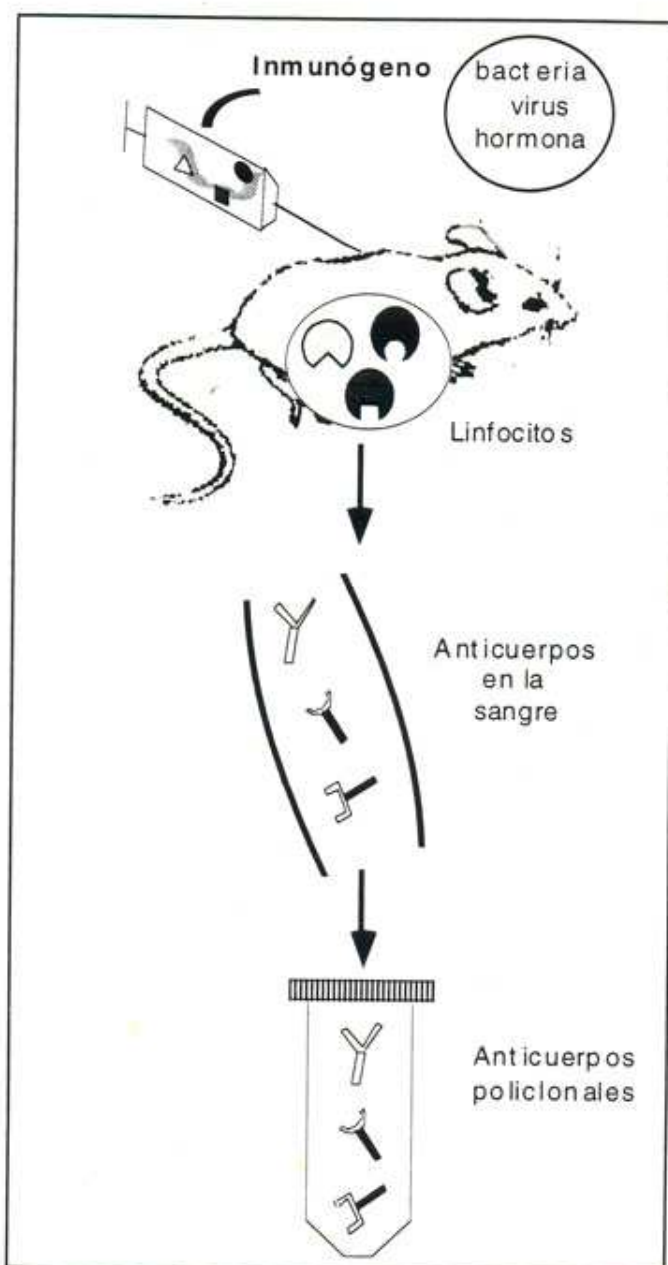


Figura 5. Producción de anticuerpos policlonales. Respuesta heterogénea: Diferentes partes del antígeno son reconocidas por el sistema inmunitario del ratón. Como consecuencia se encuentran a nivel del suero varios anticuerpos de especificidades diferentes. Este suero se denomina suero policlonal o anticuerpos policlonales.

La ventaja de los anticuerpos policlonales es que son reactivos poliespecíficos de preparación simple. Varios estudios han demostrado su eficiencia, cuando el inmunógeno utilizado había sido previamente purificado (Lewis, 1986; Mialhe *et al.*, 1988; Mialhe, 1992).

Las principales limitaciones de los anticuerpos policlonales están relacionadas a su heterogeneidad, y a la incapacidad de ser producidos en cantidades ilimitadas.

1.5.3. Anticuerpos monoclonales

La tecnología de hibridación linfocitaria (Kohler y Milstein, 1975) es la mas frecuentemente utilizada para obtener anticuerpos monoclonales. Estos son producidos por células provenientes de un solo clon (debido a lo cual son denominados anticuerpos monoclonales). Contrariamente a los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales son químicamente homogéneos, y capaces de reconocer con una afinidad constante característica, un solo epítopo de una molécula dada (figura 6).

La producción de anticuerpos monoclonales se basa en la inmortalización y clonación de linfocitos B secretores de anticuerpos de interés. La inmortalización es generalmente realizada por hibridación linfocitaria (fig. 7), siendo los linfocitos B productores de anticuerpos, fusionados con mielomas (células cancerígenas) de multiplicación ilimitada. Las células hijas resultantes llamadas hibridomas, presentan los caracteres parenterales: secreción de anticuerpos e inmortalidad.

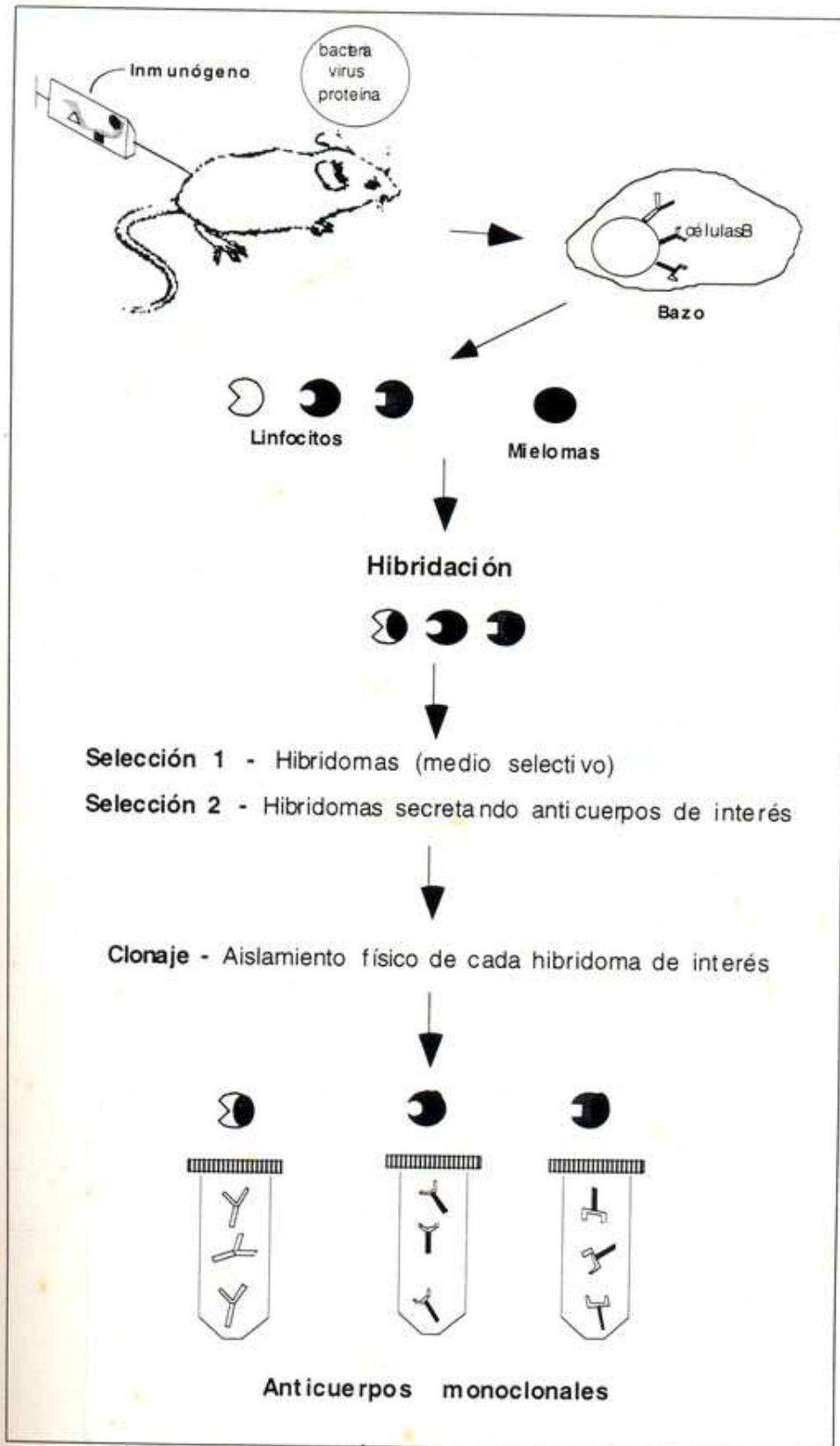


Figura 6. Producción de anticuerpos monoclonales

Después de la fusión, la selección de hibridomas se basa en la utilización de un medio selectivo que contiene aminopterina (figura 8) que bloquea la vía primaria de síntesis de nucleótidos. En estas condiciones, los mielomas no pueden multiplicarse y son suplantados por los hibridomas, los cuales poseen la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), interviniendo en la vía secundaria de la síntesis de nucleótidos. De esta forma se logra desarrollar en cultivo únicamente los hibridomas. Debido a que la frecuencia de obtención de hibridomas es relativamente alta, una etapa primordial consiste en seleccionar aquellos que producen anticuerpos específicos del antígeno considerado. Esta etapa necesita el desarrollo de una prueba de selección que permita analizar rápidamente un gran número de cultivos de hibridomas.

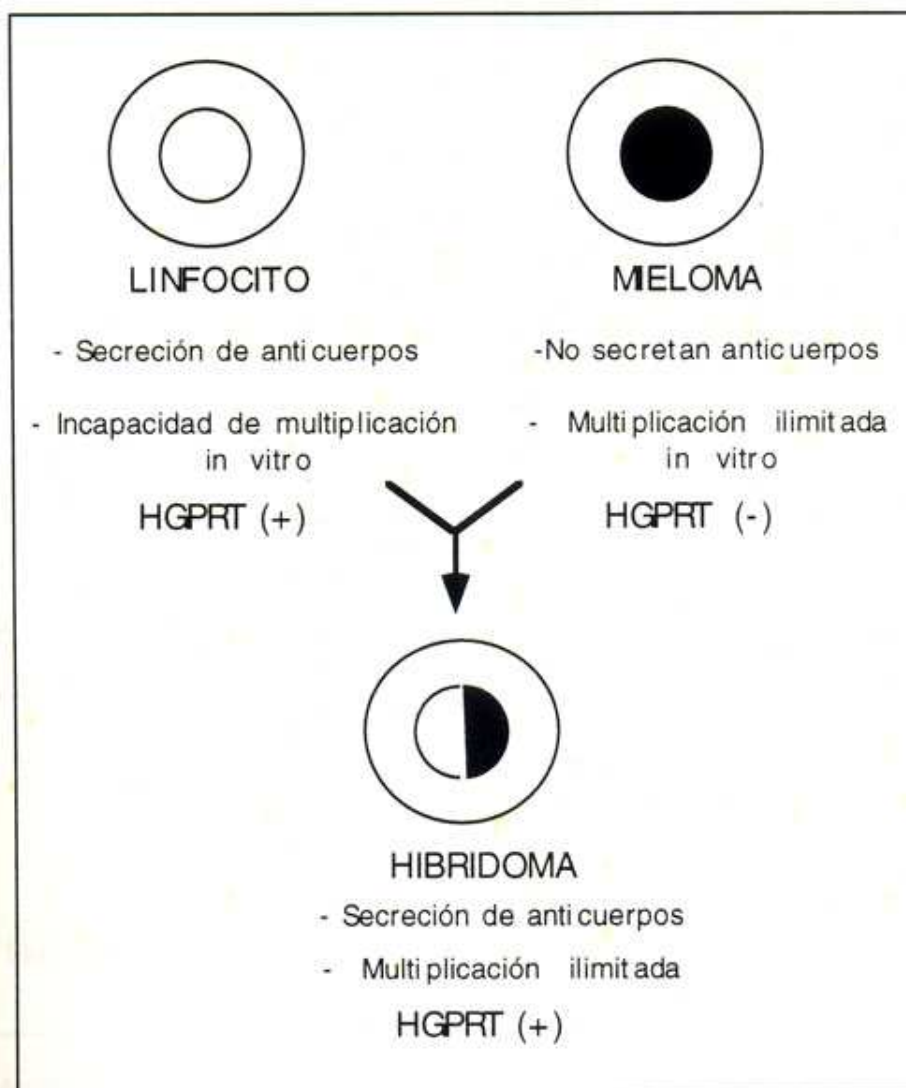


FIGURA 7. Principio de la hibridación linfocitaria (Donoso, datos no publicados)

Esta segunda fase de selección de hibridomas específicos es seguida de una etapa de clonación, que consiste en diluciones sucesivas para garantizar la obtención de células aisladas de hibridomas de interés a partir de los cuales se obtiene un clon puro. Estos hibridomas así clonados pueden entonces ser congelados en nitrógeno líquido.

Los anticuerpos monoclonales se caracterizan por su homogeneidad y la posibilidad de tenerlos en una concentración determinada y eventualmente elevada. Desde el punto de vista de la preparación no existen limitaciones teóricas.




CULTIVO	Medio HAT	EXPLICACION
 MIELOMA	M U E R E N	No tienen la posibilidad enzimática de metabolizar Hipoxantina/Timidina Además la Aminoptericina inhibe su crecimiento
 LINFOCITO	M U E R E N	No pueden crecer en cultivos in vitro
 HIBRIDOMA	C R E C E N	Crecen correctamente y Producen anticuerpos

FIGURA 8. Método de selección de los hibridomas (Donoso, datos no publicados)

1.5.4. Inmunodetección e Inmunocuantificación

Con la ayuda de los anticuerpos es posible desarrollar métodos de detección o de cuantificación del antígeno. El principio general de estos métodos consiste en inmovilizar el antígeno sobre una fase sólida (poliestireno, nitrocelulosa, corte histológico) y después del depósito de los anticuerpos específicos revelar la reacción antígeno-anticuerpo con la ayuda de un marcador (enzima, fluorocromo, etc.) cualquiera, ya sea fijado sobre el primer anticuerpo (método directo), o ya sea utilizando un segundo anticuerpo que lleva el marcador y que reconoce específicamente al primer anticuerpo (método indirecto). Mientras que el anticuerpo permite detectar el antígeno, el marcador permite cuantificar el complejo antígeno-anticuerpo.

1.5.5. Inmunotecnología

La inmunotecnología cuenta hoy en día con varias técnicas, que permiten caracterizar, purificar, y localizar un antígeno determinado. Teniendo cada técnica un espectro de aplicación referencial, como por ejemplo: ELISA directo e indirecto, Inmunocaptura, Dot blot, Western blot, Inmunofluorescencia e Inmunohistología.

1.5.5.1. ELISA directo e indirecto en microplacas

En este tipo de pruebas la muestra susceptible de contener el antígeno es directamente fijada sobre la pared de los pozos de una microplaca.

Es un método inmunoenzimático cuya mayor ventaja es la detección de antígenos y su cuantificación objetiva mediante espectrofotometría de anticuerpos. Además es un método particularmente bien adaptado para series grandes de análisis, debido a que las diferentes etapas de la prueba pueden ser automatizadas. Figura 9: a), b).

1.5.5.2. Inmuncaptura

En esta prueba, comúnmente denominada ELISA "sánduche", el concepto de inmuncaptura consiste en fijar primeramente un anticuerpo específico en la pared de los pozos de una microplaca. Este anticuerpo va a retener a su antígeno si este está presente en muestras introducidas en los pozos. Luego de la eliminación de la muestra y su lavado, los complejos antígeno-anticuerpo retenidos en la pared son detectados y cuantificados con un anticuerpo marcado.

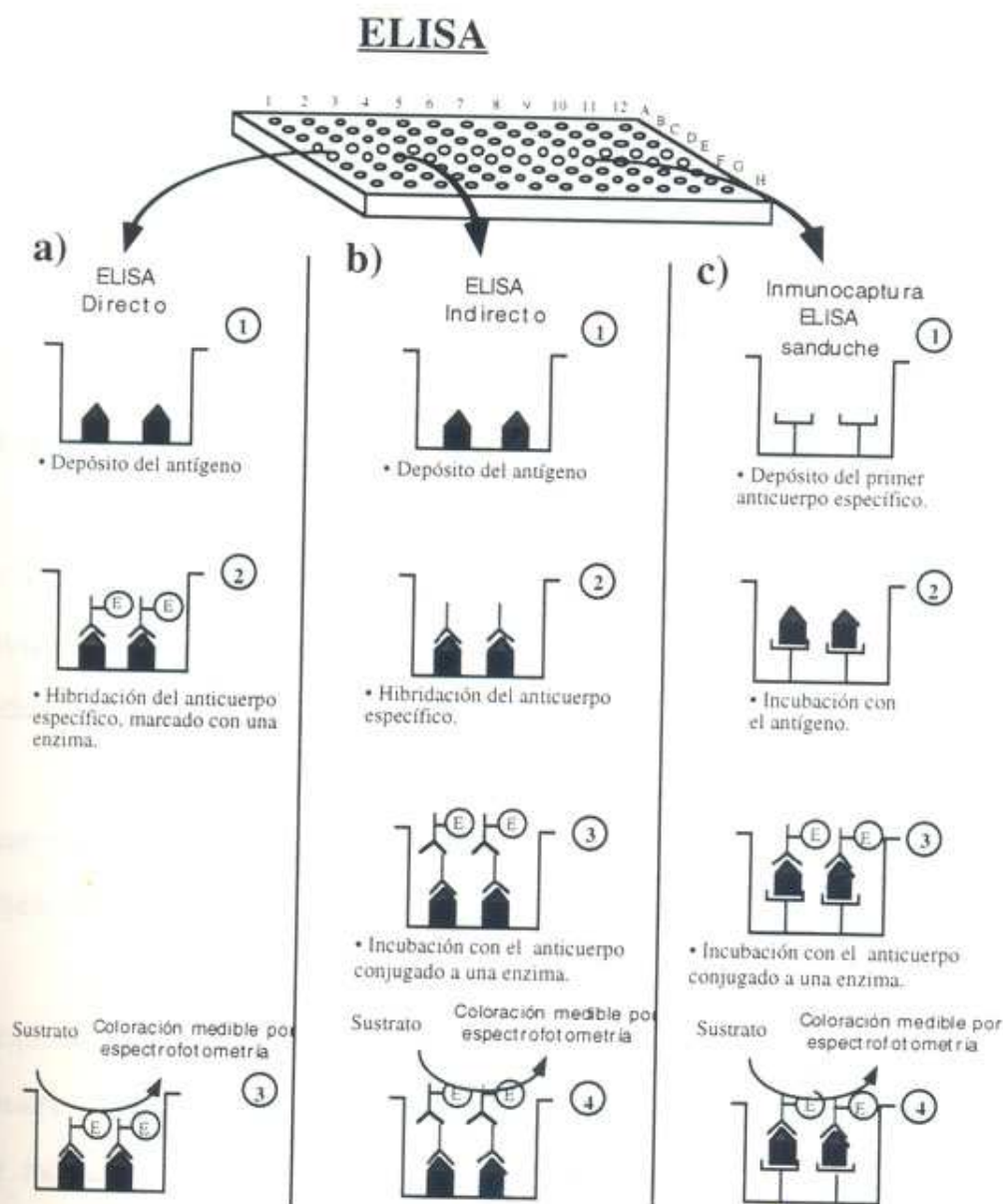


Figura 9. Principio de ELISA directo, indirecto, e inmuncaptura (sánduche).

Las mayores ventajas de esta técnica son que el antígeno no necesita ser purificado antes de su uso, y además que el ensayo es muy específico. Su desventaja es que se necesita tener dos anticuerpos que reconozcan sitios diferentes de un mismo antígeno. Figura 9 c).

1.5.5.3. Dot blot

La técnica dot-blot consiste en detectar antígenos de interés previamente fijados sobre una membrana de nitrocelulosa, ya sea por simple depósito, ó por aspiración de la muestra con vacío a través de la membrana, lo que permite fijar volúmenes de muestra que van desde algunos microlitros hasta centenas de microlitros respectivamente. Este método, bastante simple de poner en marcha permite obtener cuantificaciones aproximadas por referencia a estándares. Figura 10.

1.5.5.4. Western-blot

En la prueba de tipo western-blot, la muestra es primeramente sometida a una electroforesis y las proteínas separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa sea por simple capilaridad o por electrotransferencia.

Esta técnica similar a dot-blot, es esencialmente utilizada para determinar el peso molecular del antígeno, como uno de los primeros elementos de su caracterización.

El principio de western blot es: 1) Separar por electroforesis las proteínas componentes de una muestra. 2) Transferir cada proteína separada a una membrana de nitrocelulosa. 3) Revelar mediante el uso de una enzima, la(s) proteína(s) reconocida(s) por el anticuerpo específico. Figura 11.

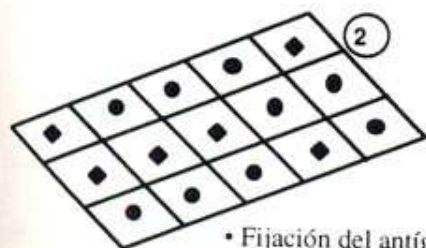
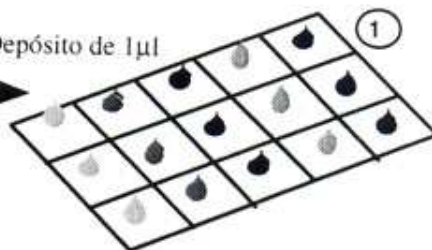
Dot-blot

Macerado de tejido

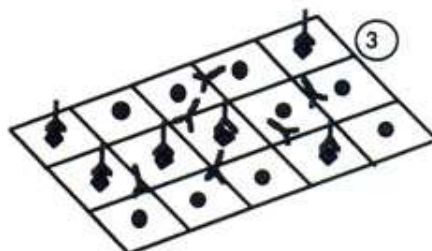
- cerebro
- ganglio torácico
- ovario
- músculo
- hemolinfa



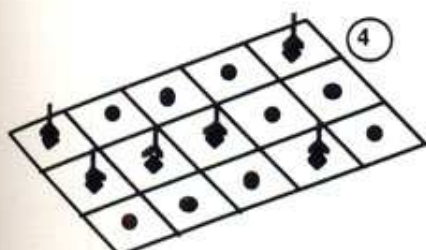
Depósito de 1µl



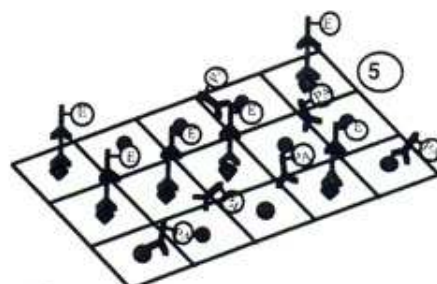
- Fijación del antígeno
- Bloqueo de la membrana



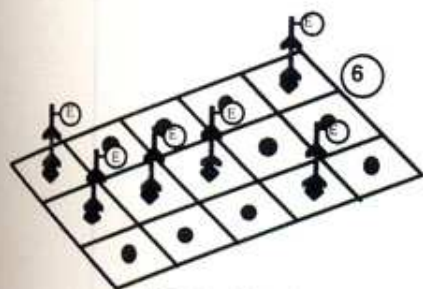
- Incubación con el anticuerpo específico



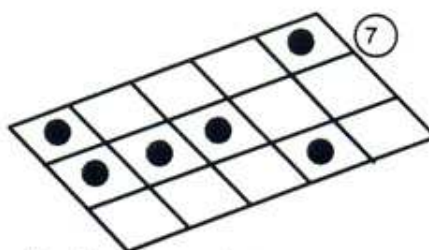
- Eliminación del exceso de anticuerpos.



- Incubación con el anticuerpo conjugado a una enzima.



- Eliminación del exceso de anticuerpos.



- Incubación con el sustrato (NBT y BCIP)

● = Diagnóstico Positivo

Figura 10. Principio de dot-blot

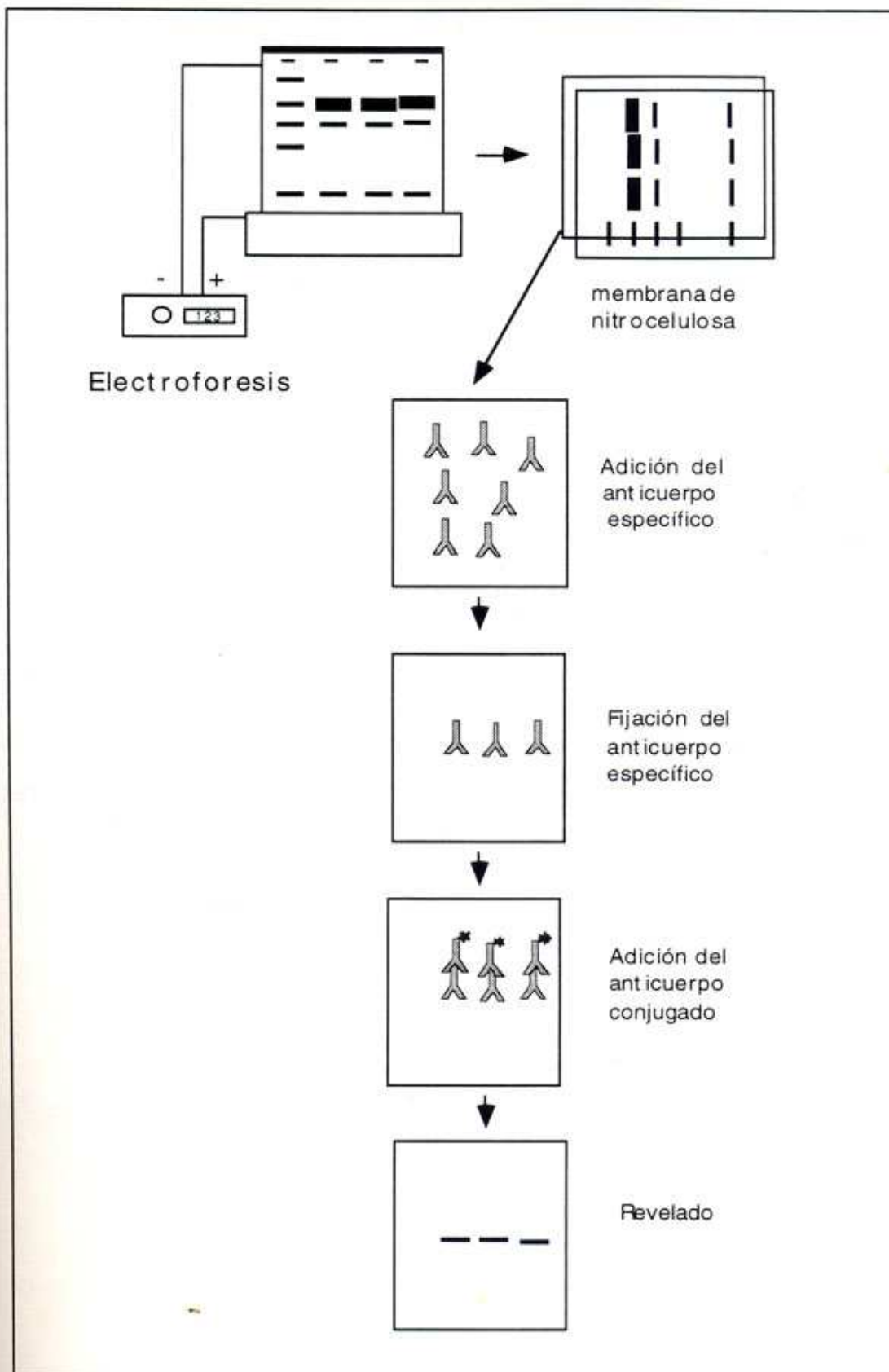


Figura 11. Principio de Western blot

1.5.5.5. Inmunohistología

La inmunofluorescencia es una de las técnicas básicas de inmunohistología que permite visualizar directamente un antígeno en una muestra y subsecuentemente determinar su localización. Consiste en utilizar anticuerpos marcados con fluoresceína, que emiten una luz visible (verde fluorescente) cuando se exponen a luz UV.

Esta técnica es muy sensible ya que un antígeno presente en una pequeña cantidad en algunas células puede ser reconocido con seguridad. La cuantificación del antígeno es subjetiva, el exámen con el microscopio puede ser más o menos largo en función del antígeno, lo que puede conferir un carácter tedioso para analizar series grandes de muestras como en el caso de la operación de selección de hibridomas. Figura 12.

Técnicas de inmunohistología pueden ser practicadas en improntas o cortes histológicos. En el primer caso, clásicamente se prefiere la inmunofluorescencia, mientras que la peroxidasa es utilizada en el segundo caso. Figura 13.

IMMUNOHISTOLOGIA:

Immunofluorescencia en improntas

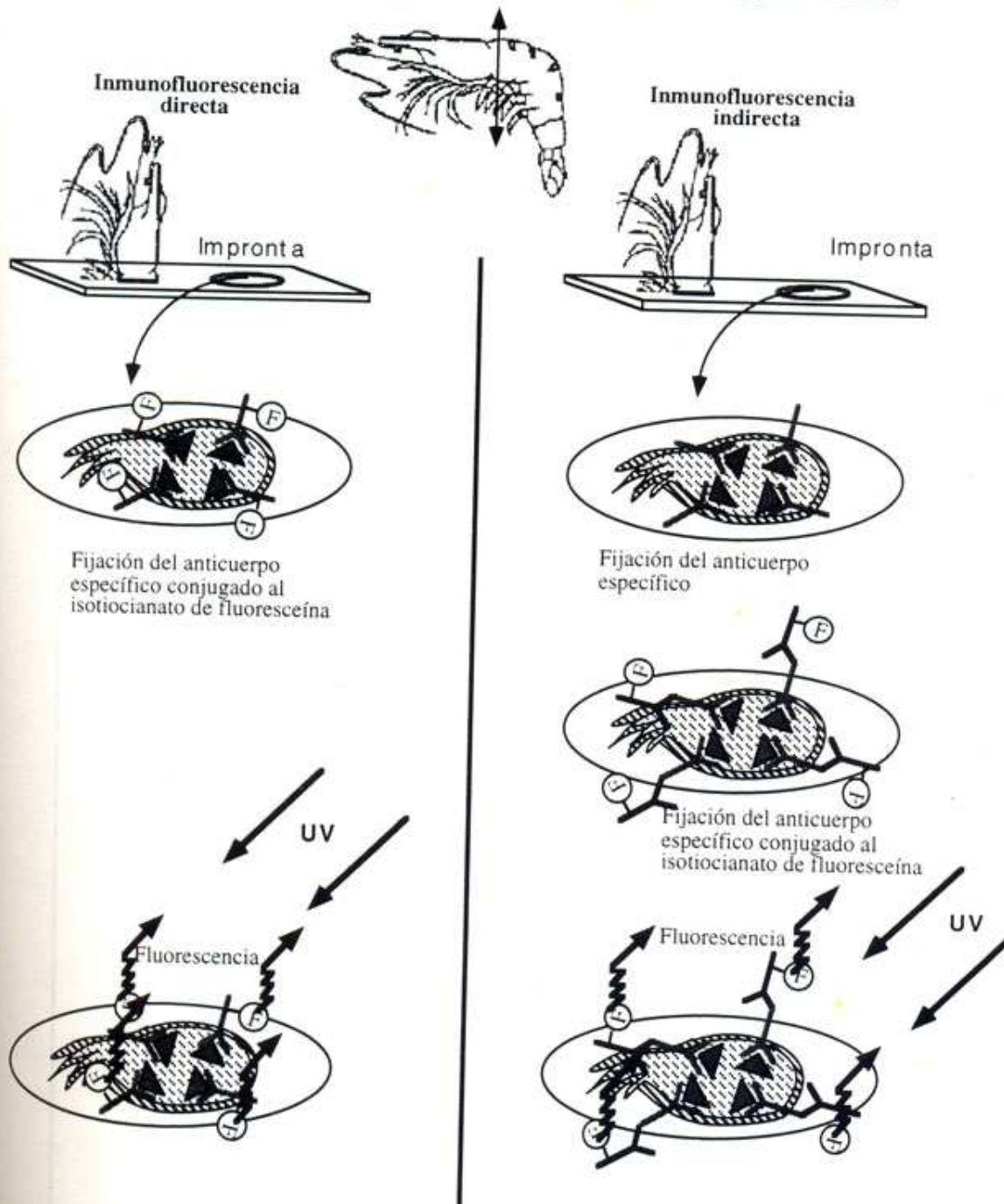


Figura 12. Principio de inmunofluorescencia directa e indirecta.

INMUNOHISTOLOGIA: Inmunoperoxidasa en cortes

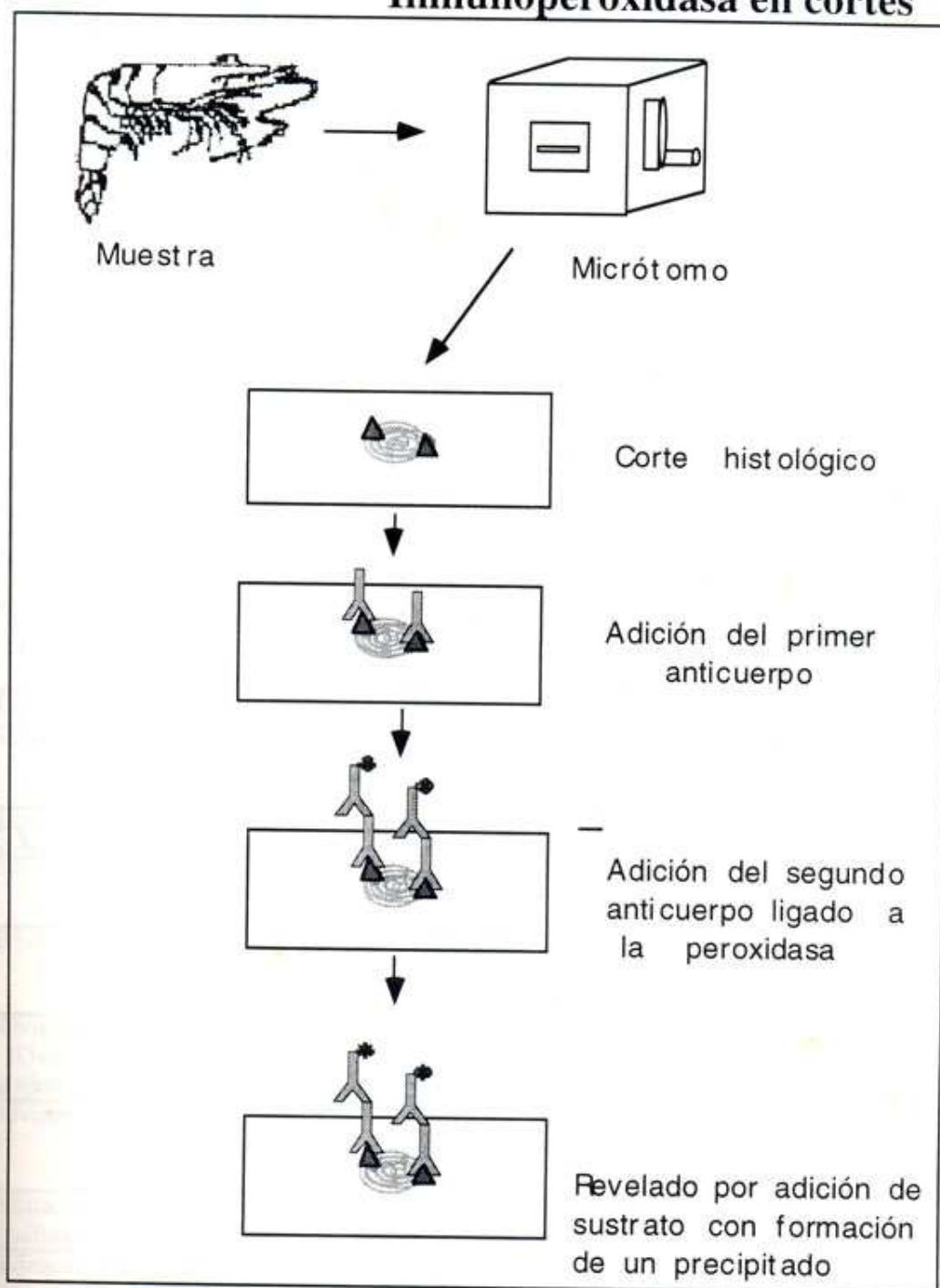


Figura 13. Principio de inmunoperoxidasa

1.5.6. Aplicación de la inmunotecnología en endocrinología.

La inmunotecnología es ampliamente utilizada en endocrinología fundamental y aplicada en los vertebrados debido a la disponibilidad de una gran colección de anticuerpos. Las diversas técnicas previamente descritas han sido utilizadas para caracterizar bioquímicamente numerosas hormonas, describir con detalle su localización a nivel estructural y ultraestructural, analizar con precisión su cinética y su regulación espacio-temporal (tabla I).

TABLA I. Ejemplos de aplicaciones de anticuerpos en endocrinología humana y animal.

Especie	Antígeno	Objetivos del estudio	Referencias
Salud humana	Espermatozoide (epítopes SP-10, PH-20 y PH-30)	-Inmunococepción -Vacuna contraceptiva -Diagnóstico de infertilidad inmune	Kerr, 1995
Salud humana	Gonadotropina coriónica humana	Estudio estructural de un epítape implicado en la actividad de la hormona	Venkatesh <i>et al.</i> , 1995
Equinos (caballo)	- Oestradiol-17 beta - Progesterona	Diagnóstico de la ovulación. Optimización de la reproducción	Allen <i>et al.</i> , 1995
Equinos (Llama)	Hormona Luteneizante (HL)	Estimulación de la ovulación por dosaje de la HL	Aba, Forsberg, 1995
Equinos (Llama)	B Proteína específica del embarazo.	Estudio de la factibilidad de una prueba de embarazo (estrategia heteróloga)	Drew <i>et al.</i> , 1995
Bovinos	Bovino CD2 molécula	Prueba de embarazo	Yoshioka <i>et al.</i> , 1995
Ovinos (Ovis canadensis)	Pregnanediol-3-glucuronide	Prueba de embarazo	Borjesson <i>et al.</i> , 1996
Ovinos	- Progesterona - Oestradiol 17-beta	Estimulación de la ovulación	Martemucci <i>et al.</i> , 1995
Gallinaceas (gallina)	Ovotransferina	Relación estructura/actividad	Mason <i>et al.</i> , 1995
Gallinaceas (pavo)	Receptor beta-adrenérgico	-Immunopurificación	Luxembourg, 1995
Salmónidos	Gonadotropina	-Caracterización epitópica - Estudio de la distribución	Ikeuchi <i>et al.</i> , 1995

Desde el punto de vista aplicado, se detectan y eventualmente se tratan enfermedades endocrinas gracias a inmunopruebas. En la actualidad este tipo de estudios están todavía poco desarrollados en el campo de la endocrinología de peneidos (tabla II).

Tabla II. Ejemplos de aplicaciones de anticuerpos en endocrinología de crustáceos.

Especie	Antígeno	Objetivos del estudio	Referencias
<i>Penaeus vannamei</i>	vitelina	Determinación de concentración durante la maduración Inmunolectroforesis	Tom <i>et al.</i> , 1992
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Ecdisteroides	Radioinmunoensayo para determinar los niveles durante la embriogénesis	Wilder <i>et al.</i> , 1990
<i>Orconectes limulus</i>	PDH	Inmunocitoquímica	Kleijn <i>et al.</i> , 1993
<i>Pacifastacus lenisculus</i> <i>Homarus americanus</i>	Histamidina	Inmunocitoquímica para hacer un mapeo del ganglio segmental y estomacogástrico	Mulloney, Hall, 1991
<i>Uca pugilator</i>	beta-PDH	Caracterización de la distribución por el sistema nervioso inmunohistoquímica	Mortin, Marder, 1991
<i>Palaemon serratus</i>	FMRFamide	Inmunohistoquímica sobre el ganglio estomacogástrico	Meyrand, Marder, 1991
<i>Procambarus clarkii</i>	FMRFamide	Inmunoreactividad del sistema nervioso central	Marcier <i>et al.</i> , 1991
Crayfish	RPCH	Inmunolocalización en el sistema nervioso	Sherff, Mulloney, 1991
<i>Procambarus clarkii</i>	Serotonina (5-HT)	Inmunohistoquímica sobre el cordón abdominal y torácico	Real, Czernasty, 1990
<i>Metapenaeus affinis</i>	vitelina y vitelogenina	Producción de anticuerpos y estudios de reacciones cruzadas por ELISA	Longyant <i>et al.</i> , 1994
<i>Callinectes sapidus</i>	Vitelina	Variaciones espacio-temporales en la hemolinfa y otros tejidos	Lee <i>et al.</i> , 1996
<i>Cancer borealis</i>	Neuro moduladores	Inmunocitoquímica de neuromoduladores del sistema nervioso	Christi <i>et al.</i> , 1995
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	17- β -hidroxi-esteroide	Radioinmunoensayo en la hemolinfa y el ovario	Ghosh, Ray, 1993
<i>Oniscus asellus</i>	CCAP y ecdisteroides	Cinética de CCAP durante el período de la muda (ELISA)	Johnen <i>et al.</i> , 1995

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. DISECCIÓN DE ÓRGANOS (HEMBRAS MADURAS *P. vannamei*)

CEREBRO, GANGLIO TORÁCICO, OVARIO

Durante la disección, el animal se encuentra en una cama de hielo con agua de mar.

- Se elimina la cutícula que cubre la cavidad branquial.
- Se debe cortar la membrana (haemocoel) que encierra al corazón, y se levanta el caparazón hacia adelante cortando los cordones musculares laterales que sujetan al exoesqueleto.
- Se retira la parte superior del ovario que cubre al hepatopáncreas.
- El corazón, hepatopáncreas, y estómago son disecados (en ese orden).
- Se extrae la porción posterior del ovario que corre a lo largo del abdomen.
- Se recorta el músculo delante del estómago, quedando una cavidad que alojaba a los órganos.
- El ganglio torácico se encuentra en el piso de esta cavidad. Una vez localizado, se procede a disecarlo.
- Para acceder al cerebro, se elimina el músculo que cubre el cerebro. Para identificarlo con rapidez, se busca los cordones que salen de cada pedúnculo ocular.
- El cerebro se encuentra en la base del rostrum, y es el punto de unión de los tractos provenientes de los pedúnculos oculares, antenas y ganglio torácico. Cuando se ha eliminado la capa muscular que lo recubre es disecado.

2.2. PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS E INMUNÓGENOS

2.2.1. Inmunógenos

2.2.1.1. Sobrenadante 1

Se utilizó como inmunógeno cerebro de hembras maduras de *P. vannamei*. Para la preparación de la suspensión fueron disecados 105 cerebros, diluidos en 5 ml de agua

destilada y colocados dentro de un homogenizador de tejidos de tipo DOUNCE con pistón de punta de vidrio. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 50 minutos en microtubos Eppendorf. Los 3.7 ml de sobrenadante obtenido se los denominó Sobrenadante 1 (Sn 1).

2.2.1.2. Sobrenadante 2

El pellet 1 fue diluído en 1,5 ml de agua destilada y centrifugado a 13.000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante obtenido se lo denominó Sobrenadante 2 (Sn2).

2.2.1.3. Ganglio torácico

Para la preparación del inmunógeno ganglio torácico para la segunda fusión, fueron disecados 80 ganglios torácicos de hembras maduras de *P. vannamei* ; diluídos en 3 ml de PBS 800 miliOsm (solución en que fueron mantenidos), y 2 ml de agua destilada.

Se procedió a colocar la preparación en un homogenizador de tejidos ULTRATURRAX, y luego dentro de un homogenizador de tejidos de tipo DOUNCE con pistón de punta de vidrio. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 50 minutos en microtubos Eppendorf. El sobrenadante obtenido se lo denominó ganglio torácico (GT).

2.2.2. Antígenos

2.2.2.1. Músculo

Se utilizó 1 gramo de músculo diluído en 7 ml de carbonato de sodio, y homogenizado en el ULTRATURRAX. La solución fue centrifugada a 3.000 rpm durante 5 minutos en microtubos Eppendorf. El sobrenadante obtenido se lo denominó antígeno músculo (Musc).

2.2.2.2. Ovario

Se utilizó un ovario de hembra madura (1,2 gramos) diluido en 2 ml de carbonato de sodio, y homogenizado en el ULTRATURRAX. La solución fue centrifugada a 4.000 rpm durante 10 minutos en microtubos Eppendorf. El sobrenadante obtenido se lo denominó antígeno ovario (Ov).

2.2.2.3. Hemolinfa

La muestra de hemolinfa es extraída del seno del primer segmento abdominal de la región ventral. Se toma con una jeringuilla aproximadamente 100 ul, y se coloca rápidamente en un pedazo de parafilm. Los 100 ul son diluidos en 900 ul de carbonato de sodio 0,1 M. La solución obtenida se denomina antígeno hemolinfa.

2.2.2.4. Escherichia coli

Cepa bacteriana perteneciente al Departamento de Bacteriología del CENAIM. La cepa se encuentra guardada a -80° C, y previo a su uso como antígeno fue necesario inocularla en medio de cultivo líquido a 28° C por 6 horas para reactivarla.

2.3. PREPARACIÓN DE CONTROLES NEGATIVOS (SUERO RC Y 2C9)

2.3.1. Suero del ratón control (Rc)

Se procedió a extraerle sangre a un ratón no inmunizado (Rc) por sangrado de la cola. La sangre fue colectada en microtubos Eppendorf, y se centrifugó a 10.00 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue denominado Suero ratón control (Rc).

2.3.2. 2C9 (líquido ascítico)

El hibridoma 2C9 produce anticuerpos específicos contra *V. harveyi*. Este hibridoma pertenece al Departamento de Inmunodiagnóstico del CENAIM. Fue producido en líquido ascítico.

2.4. INMUNIZACIÓN DE RATONES

2.4.1 Inmunización con Sn1 y Sn2

Cuatro ratones Balb/c fueron inmunizados. El esquema de inmunización se detalla en la tabla siguiente.

Inmunizaciones				
Ratón	Primera (día 0)	Segunda (día 10)	Tercera (día 20)	Refuerzo
R1	Sn1+ Adj Completo	Sn1+ Adj Completo	Sn1+ Adj Completo	†
R2	Sn1	Sn1	Sn1	†
R3	Sn1	Sn1	Sn1	Sn1
R4	Sn2	Sn2	Sn2	†

Las inyecciones fueron inoculadas vía intraperitoneal.

- Sn1 : 150 ul de Sn1 + 250 ul de H2O
- Sn2 : 100 ul de Sn2 + 300 ul de H2O
- Sn1 + Adj. Completo : 100 ul de Sn1 + 50 ul de H2O + 150 ul de adjuvante completo de Freud ACF.

2.4.2. Inmunización con GT

Dos ratones Balb/c fueron inmunizados. El esquema de inmunización se detalla en la tabla siguiente.

Tabla IV. Esquema de inmunización con GT (ganglio torácico)

Ratón	Inmunizaciones			
	Primera (día 0)	Segunda (día 10)	Tercera (día 20)	Refuerzo
Rm	GT+ Adj Completo	GT	GT	GT
Rh	GT+ Adj Completo	GT	GT	†

* Rm= Ratón macho. Rh= Ratón hembra.

Las inyecciones fueron inoculadas vía intraperitoneal.

GT : 150 ul de GT + 250 ul de H₂O

GT + Adj. Completo : 100 ul de GT + 50 ul de H₂O + 150 ul de adjuvante completo de Freud ACF.

2.5. PREPARACIÓN DE LOS INMUNOSUEROS

2.5.1. Preparación de los sueros R1, R2, R3, R4, de ratones inmunizados con Sn1 Y Sn2

Después de realizarse la tercera inmunización, se procedió a extraerles sangre a los ratones R1, R2, R3 y R4, por sangrado de la cola. La sangre fue colectada en microtubos Eppendorf y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se los denominó inmunosuero : R1, R2, R3 y R4.

2.5.2. Preparación de los sueros Rm y Rh, de ratones inmunizados con GT

Después de realizarse la tercera inmunización, se procedió a extraerles sangre a los ratones Rm y Rh, por sangrado de la cola. La sangre fue colectada en microtubos Eppendorf y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se los denominó inmunosuero: Rm y Rh.

2.6. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.6.1. Medios de cultivo

2.6.1.1. Medio de cultivo celular básico

Medio RPMI 1640	5,2 g
L-Glutamina	150 mg
Estreptomicina	100 mg
Penicilina	100.000 UI
Hepes (PM 260 g)	2,6 g
Agua destilada	500 ml (volumen final)

El pH es ajustado a 7,4 y el medio es filtrado a través de una membrana de 0,22 mm. Este medio es colocado en frascos de 250 ml por 48 horas a 37°C para probar si hay o no contaminación para luego almacenarlo a 4°C.

A este medio se coloca suero fetal bovino (SVF) de complementado 30 minutos, a 56°C en un porcentaje del 10 al 15% (v • v⁻¹) según el tipo de medio que se va a preparar.

2.6.1.2. Medio de cultivo para mielomas

Medio básico	500 ml
8 Azaguanina	10 mg
SVF	50 ml (10%)

2.6.1.3. Medio selectivo HAT

Medio básico	500 ml
Hipoxantina	6,8 mg
Aminopterina	88 mg
Timidina	1,95 mg
SVF	75 ml (15%)

2.6.1.4. Medio selectivo HT

La preparación es igual al medio selectivo HAT, con la diferencia, que no posee aminopterina.

2.6.1.5. Medio de cultivo para hibridomas

Medio básico	500 ml
SVF	75 ml (15%)

2.6.2. Hibridación linfocitaria

La producción de anticuerpos monoclonales se realizó según el método descrito inicialmente por Köhler y Milstein (1975) y modificado por French et al. (1986).

2.6.2.1. Preparación del Polyethylene glycol

El Polyethylene glycol (PEG) de peso molecular 1540 es usado al 40% ($v \cdot v^{-1}$). Dos gramos de PEG son calentados en un baño de maría a 60°C, hasta que el PEG se torne líquido. Tres mililitros de medio básico son adicionados. Esta mezcla es esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 mm.

El PEG es preparado un día antes de la fusión y es mantenido 24 horas a 37°C dentro del incubador de CO₂ (5%).

2.6.2.2. Preparación de macrófagos

Los macrófagos presentes dentro de los pozos de cultivo tienen un doble rol, por una parte, de fagocitar las células muertas y los microorganismos eventualmente presentes, y por otra, de secretar factores de crecimiento para las células. Ellos son introducidos dentro de los pozos de cultivo 24 horas antes de la fusión celular.

Los ratones son sacrificados por elongación y ruptura de la columna vertebral. Luego la piel de su abdomen es abierta sin romper el peritóneo para inyectar dentro de la cavidad abdominal 5 ml de medio para hibridomas. La cavidad abdominal es enjuagada por el medio que luego es aspirado teniendo la precaución de no perforar los intestinos. El medio recuperado es centrifugado (250 g, 10 minutos) y el sobrenadante es eliminado. Las

células son luego resuspendidas en 10 ml de medio para hibridoma y contadas en una cámara de contaje Neubauer.

De un ratón es posible obtener entre $1,5$ a 3×10^6 macrófagos. Luego las células son repartidas en las placas de cultivo de 96 hoyos a razón de 10.000 a 20.000 células por pozo; para mantenerlas en incubación a 37°C dentro de la incubadora de CO_2 (5%), 24 horas antes de la fusión. Después de este tiempo los macrófagos son activados y adheridos al fondo de los pozos.

2.6.2.3. Preparación de mielomas

Dos líneas de mielomas fueron utilizadas: SP2/O y P3X63Ag8-653.

Los mielomas son cultivados a razón de 100.000 células totales en medio de cultivo para mielomas a 37°C dentro de la incubadora de CO_2 (5%). El tiempo de duplicación de las células es de 18 horas aproximadamente. Un día antes de la fusión es necesario tener una concentración de 50.000 células por ml para que estén situados dentro de la fase exponencial de cultivo celular. El medio es renovado regularmente por aspiración del sobrenadante (según el tiempo de renovación de las células).

2.6.2.4. Obtención de linfocitos

El ratón inmunizado, y con una mejor respuesta inmunitaria en los ensayos (ELISA y dot blot), es sacrificado mediante el corte de su cabeza, para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. El abdomen del ratón es abierto asépticamente para extraer el bazo de su cavidad peritoneal, El bazo debe ahora colocarse dentro de un homogenizador de tejidos de tipo Dounce con 5 ml de medio base. Todas las manipulaciones deben ser realizadas en

condiciones estériles y en hielo para mantener los tubos con el homogenizado a 4°C aproximadamente. El homogenizado es filtrado por una gasa estéril y el líquido obtenido centrifugado a 150 g durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de la eliminación del sobrenadante, el precipitado es resuspendido en 10 ml de medio básico.

El conteo de los linfocitos se lo realiza en una cámara Neubauer, previo la dilución de una alícuota con azul de tripano para distinguir las células viables (los linfocitos de mayor talla no deben ser confundidos con los glóbulos rojos).

2.6.2.5. Fusión celular

Una vez que tenemos el número de células totales calculamos el número de linfocitos y mielomas que debemos mezclar para obtener una relación de 4 linfocitos por 1 célula mieloma. Esta mezcla de suspensiones es centrifugada (200 g, 10 min, TA). El sobrenadante es eliminado y al precipitado se le agrega 1 ml de Polyethylene glycol 1540 a 37 °C gota a gota. Colocando el cronómetro en 0'00'' las etapas que deben ser rigurosamente seguidas son:

t=0'00'' Agregar las 10 primeras gotas de PEG durante 30 segundos (1 gota cada 3 segundos) y el exceso de una sola vez al final de los 30 segundos. Cerrar el tubo.

t=0'30'' Colocar el tubo en baño de María a 37 °C.

t=1'30'' Centrifugar (200 g) a temperatura ambiente.

t=3'00'' Parar la centrifugación.

t=4'30'' Colocar el tubo en baño de María 37 °C.

t=6'30'' Agregar 6 ml de medio completo (medio básico más SVF 10%) a razón de una gota cada 5 segundos mas 9 ml de medio completo de una sola vez.

Esta suspensión es centrifugada (150 g, 10 minutos, T.A.).

El precipitado es resuspendido en 10 ml de medio para hibridomas. Las células son luego repartidas en las placas conteniendo los macrófagos preparados el día anterior a la fusión. Cien microlitros de la suspensión (mielomas/linfocitos) son distribuidos a razón de 100.000, 50.000 y 25.000 células por pozo. Las placas son mantenidas a 37°C dentro de una incubadora de CO₂ (5%).

Un día después de la fusión, el medio HAT es adicionado a fin de permitir sólo el crecimiento de las células híbridas. En cada pozo de cultivo se adiciona 100 ml de medio selectivo HAT (2X) a los 100 ml iniciales para obtener una concentración final de HAT (1X).

Cinco días después de la fusión, 100 ml de sobrenadante de cultivo son reemplazados por el mismo volumen de medio selectivo HAT 1X.

Diez días después de la fusión, 100 ml de sobrenadante de cultivo son reemplazados por el mismo volumen de medio selectivo HT.

2.6.3. Criopreservación y descongelación de células

Las células (hibridomas y/o mielomas) a ser congeladas deben ser centrifugadas (250 g, 10 minutos, T.A.) y resuspendidas en SVF conteniendo 7,5% de DMSO ($v \cdot v^{-1}$), a razón de 5×10^6 células por ml. Esta suspensión celular es repartida en ampollas que son colocadas dentro de un recipiente isotérmico en el interior de un congelador a -80°C, con el propósito de hacer una congelación progresiva de 48 horas, luego las células son introducidas y conservadas en nitrógeno líquido (-180°C).

La descongelación de las células se realiza colocando directamente las ampollas a 37°C y evitando la descongelación total de las células ya que el DMSO es tóxico a esta temperatura. La suspensión de células es entonces inmediatamente depositada dentro de 15 ml de medio básico y centrifugado (250 g, 10 minutos, T.A.) para eliminar el DMSO. El precipitado de

las células es resuspendido en 5 ml de medio adecuado (dependiendo si se descongela mielomas o hibridomas) y colocado en pozos de cultivo de 5 ml conteniendo macrófagos.

2.7. DOT BLOT

2.7.1. Protocolo dot blot (CENAIM)

- Dos microlitros de la suspensión antígeno es depositada en membranas de nitrocelulosa. Las membranas son secadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Incubar con PBS-leche descremada 5% (p • v⁻¹) agitando suavemente por 60 minutos, T.A.
- Realizar 3 lavados de 3 minutos c/u con PBS-Tween 20 (0,1%) tampón PBS (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 2,5 mM, Na₂HPO₄ 8,5 mM, pH 7,2)
- Depositar el primer anticuerpo (suero policlonal dilución 1/100 en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5% ó sobrenadante de cultivo sin diluir) e incubar por 60 minutos, T.A..
- Realizar 3 lavados de 3 minutos con PBS-Tween 20 (0,1%)
- Depositar el anticuerpo conjugado (a la fosfatasa alcalina) e incubar por 45 minutos: dilución empleada del anticuerpo 1/10.000 en PBS-Tween-0,1%-Leche 0,5 %.
- Realizar 3 lavados de 3 minutos con PBS-Tween 20 (0,1%)
- Incubar con la solución sustrato recientemente preparada:
 - BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato en 0,5 ml de dimethylformamida).....33 ul.
 - NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada).....66 ul.
 - Tampón Fosfatasa Alcalina (Na Cl 5,84 gl⁻¹, Mg Cl₂ 0,5 gl⁻¹, Tris base 12,11 gl⁻¹, pH 9,5).....10 ml.

Nota: Cuando las manchas alcanzan la intensidad deseada, la reacción enzimática es detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM (50 ul de EDTA 0,5 M diluído en 25 ml de PBS).

2.7.2. Tratamientos con formol y temperatura para eliminar la reacción específica

Se utilizó el antígeno Sn1 puro y se realizaron tratamientos con formol y temperatura. El tratamiento de formol fue realizado por inmersión de las pastillas de nitrocelulosa en una solución de formol diluída 1/10 en PBS ($v \cdot v^{-1}$), durante 30 segundos, 1 minuto ó 5 minutos. El tratamiento con temperatura fue realizado a 70° C durante 15 minutos ó 30 minutos. No se utilizó suero policlonal, ni segundo anticuerpo, solo el sustrato revelador. Los tratamientos fueron realizados manipulando individualmente las membranas de nitrocelulosa.

2.8. ELISA INDIRECTO

2.8.1. Protocolo de ELISA indirecto (CENAIM).

- Colocar 100 microlitros del antígeno (previamente diluído en carbonato de sodio a la dilución que se vaya a emplear) en cada pozo de la microplaca de ELISA 96 pozos durante una noche a 4°C.
- Lavar 3 veces con un tampón PBS (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 2,5 mM, Na₂HPO₄ 8,5 mM, pH 7,2) conteniendo 0,1 % ($v \cdot v^{-1}$) de Tween 20. Se colocan 200 ul por pozo por 3 minutos cada lavado.
- Las placas son saturadas con 200 ul por pozo de una solución bloqueadora (PBS conteniendo 5% ($p \cdot v^{-1}$) de leche descremada. Se deja incubar por 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-Tween 0,1 % colocando 200 ul en cada pozo por 3 minutos.
- Poner 100 ul por pozo del primer anticuerpo (suero de ratón inmunizado, sobrenadante de cultivo de hibridomas, líquido ascítico) diluído en PBS-T-leche 0,5% ($p \cdot v^{-1}$). Se deja incubar por 2 horas a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-Tween 0,1 % colocando 200 ul en cada pozo por 3 minutos.

- Colocar 100 μ l del segundo anticuerpo (anticuerpo anti Ig de ratón conjugado a la fosfatasa alcalina), a una dilución 1/10.000 en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5% ($p \cdot v^{-1}$). Se deja incubar por 1 hora a 37°C.

- Lavar 3 veces con PBS-Tween 0,1 % colocando 200 μ l en cada pozo por 3 minutos.

- Colocar el sustrato: Nitrofenilfosfato (NPP) 1 mg \cdot ml⁻¹ de tampón de dietanolamina a razón de 100 μ l por pozo.

Incubar a 37°C por 1 hora 30 minutos.

- Leer en la máquina Multiskan a una longitud de onda de 414 nm.

Preparación de sustrato

- Tampón: 10 ml de agua destilada + 0,5 ml de Diethanolamine. Ajustar ph 9.8

- sustrato: añadir 2 pastillas de p-NPP (c/u 5 mg, ref Sigma N-9389).

2.9. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

2.9.1. Citocentrifugación

2.9.1.1. Disgregación de células

2.9.1.1.1. Disgregación por Maceración

Se disecó cerebros de hembras maduras los cuales fueron colocados en tubos eppendorf a razón de 1 o 2 cerebros por tubo. Se homogenizaron en 500 μ l de solución de Hanks hasta adquirir fluidez. Se centrifugó para eliminar los trozos grandes de tejido y el sobrenadante con 10% de formaldehido fue colocado en los contenedores de citocentrifugación. Se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. Se procede a desmontar y teñir la placa con Eosina y Hematoxilina, para su evaluación al microscopio.

2.9.1.1.2. Corte y disgregación con Pronasa

Se disecó cerebros de hembras maduras, los cuales fueron cortados en secciones grandes y colocados en medio de cultivo L15 con pronasa ($1/100 \text{ v} \cdot \text{v}^{-1}$) e incubado durante dos horas a 28°C con agitación. Luego se colecta el medio con el tejido, se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se resuspende el pellet en solución de Hanks y se coloca en el contenedor de citocentrifugación. Se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. Se procede a desmontar y teñir la placa con Eosina y Hematoxilina, para su evaluación al microscopio.

2.9.2. Preparación de improntas

- Una vez disecado el cerebro, se lo sumerge en agua destilada, para eliminar cristales formados por las sales.
- Se procede a cortar longitudinalmente el cerebro, y secar completamente en papel toalla hasta no dejar rastro húmedo.
- Con cada mitad se realizan 15 improntas, 30 improntas por cerebro.
- Se dejan secar las placas por 10 minutos.
- Se fija la impronta por inmersión en acetona por 5 minutos.
- Se dejan secar las placas por 5 minutos.

Las placas son guardados en el congelador de -80°C .

2.9.3. Protocolo de Primocultivos de hemocitos

El protocolo de primocultivos consiste en alicuotar la hemolinfa total (plasma y células) en placas portaobjeto, luego un volumen igual del medio de cultivo (solución salina modificada de Hank's) es añadido para reactivar los procesos celulares, diluyendo la concentración del anticoagulante (Citrato de sodio al 10%). Se deja incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

2.9.4. Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta (CENAIM)

- Colocar el primer anticuerpo (anticuerpo monoclonal diluido 1/500 con PBS-plasmión 5%). Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween 0,1% (v • v⁻¹).
- Aplicar el segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado) e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween 0,1% (v • v⁻¹).
- Montar con glicerol al 65% en PBS.
- Observar al microscopio de epifluorescencia.

Nota :Las placas no deben secarse entre las aplicaciones.

Preparación del segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado al isotiocianato de fluoresceína):

Dilución del anticuerpo a la concentración indicada por el fabricante

Evans blue 1/100, en

Plasmión 5%

Ejemplo para 1 ml:

10 ul de Ac. (1/100)

10 ul de Evans blue

50 ul de Plasmión

930 ul de PBS

2.9.5. Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta optimizado

-Las placas una vez retiradas del congelador de -80°C , son dejadas a temperatura ambiente por 10 minutos.

-Las placas son colocadas en una cámara húmeda, y se procede a bloquear con leche descremada 5% en PBS ($\text{p} \cdot \text{v}^{-1}$) por 30 minutos.

-Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween 0,1% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$).

-Se colocan 50 μl del primer anticuerpo (suero policlonal o medio de cultivo de hibridomas) por pozo o muestra, puro (si es medio de cultivo) o diluído (1/100 en PBS Tween 0,1% leche descremada 0,5%) en el caso de sueros policlonales. Se deja incubando durante 30 minutos en la cámara húmeda a temperatura ambiente.

-Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween 0,1% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$).

-Se adicionan 50 μl del segundo anticuerpo (anticuerpo anti-ratón conjugado a fluoresceína) por pozo o muestra (Ver preparación de segundo anticuerpo). Se deja incubando durante 30 minutos.

-Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween 0,1% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$).

-Se procede a montar las placas con glicerol 65% en PBS ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$). Antes de colocar la placa cubreobjeto, se lava la placa con la solución de montaje para eliminar el remanente de la solución de lavado. La placa no debe quedar seca durante ningún paso del proceso.

-Se sellan los bordes de la placa con esmalte y se observa al microscopio.

Preparación del segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado al isotiocianato de fluoresceína)

Anticuerpo 1/100

Evans blue 1/100, en

PBS Tween 0,1 % lechê 0,5%

3. RESULTADOS

3.1. DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE INMUNO-PRUEBAS PARA LA SELECCIÓN DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS CONTRA COMPUESTOS DEL CEREBRO

3.1.1. Análisis de la técnica de dot-blot mediante anticuerpos policlonales

Debido a su simplicidad, se consideró a la técnica de dot-blot como inmunopueba de selección de hibridomas secretores de anticuerpos específicos contra compuestos del cerebro.

Esta técnica fue desarrollada, optimizada y evaluada antes de la operación de hibridación linfocitaria utilizando los sueros de ratones inmunizados como fuentes de anticuerpos. La especificidad de la técnica fue analizada considerando otros antígenos a más de los extractos de cerebro. Las pruebas debieron tomar en cuenta la existencia en los extractos de cerebro de actividad fosfatasa endógena que corresponde también a marcadores utilizados con los anticuerpos de detección.

Para analizar la utilidad de la técnica dot blot, se utilizaron los sueros de los cuatro ratones inmunizados con extractos de cerebros de hembras maduras (Sn1 y Sn2) (Ver Materiales y métodos 2.2.1.1, 2.2.1.2.), a fin de determinar los títulos en anticuerpos específicos.

Se utilizaron como antígenos: Sn1, Sn2, *E.coli*, y músculo. Los sueros de los ratones R1-R2-R3-R4, fueron probados en diluciones: 1/100, 1/300, 1/1.000, 1/3.000, 1/10.000. Se utilizó un control del segundo anticuerpo (sin primer anticuerpo), controles no específicos (antígenos diferentes: músculo y *E. coli*) y control negativo (suero ratón no inmunizado).

Los resultados se resumen en la tabla V.

TABLA V. Evaluación por dot blot del estado de inmunización de los ratones inyectados con Sn1 y Sn2 (cerebro), utilizando diferentes diluciones de los sueros policlonales, y como controles no específicos: antígenos (*E.coli* y músculo) y sin primer anticuerpo. (+++ reactividad fuerte; ++ reactividad media; + baja reactividad; - reactividad nula).

Suero Ratón 1

	Sin 1° anticuerpo	Suero 1/100	Suero 1/300	Suero 1/1.000	Suero 1/3.000	Suero 1/10.000
Sn 1	++	+++	+++	+++	+++	+++
Sn2	+	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-
Musc.	-	+	+	-	-	-

Suero Ratón 2

	Sin 1° anticuerpo	Suero 1/100	Suero 1/300	Suero 1/1.000	Suero 1/3.000	Suero 1/10.000
Sn 1	++	+++	+++	+++	++	++
Sn2	+	++	++	++	++	++
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-
Musc.	-	+	+	+	-	-

Suero Ratón 3

	Sin 1° anticuerpo	Suero 1/100	Suero 1/300	Suero 1/1.000	Suero 1/3.000	Suero 1/10.000
Sn 1	++	+++	+++	+++	+++	++
Sn2	+	++	++	++	++	++
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-
Musc.	-	+	+	+	-	-

Suero Ratón 4

	Sin 1° anticuerpo	Suero 1/100	Suero 1/300	Suero 1/1.000	Suero 1/3.000	Suero 1/10.000
Sn 1	++	+++	+++	+++	+++	+++
Sn2	+	++	++	++	++	++
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-
Musc.	-	+	+	-	-	-

Control negativo

	Sn1	Sn2	<i>E.coli</i>	Músculo
Rcontrol	+	+	-	-

Los cuatro inmunosueros probados actuaron contra los dos antígenos (Sn1 y Sn2). Los ratones R1 y R4 tuvieron los títulos más elevados, como lo muestra la dilución 1/10.000. En ausencia de los inmunosueros se observó una reacción positiva no específica, más fuerte en el extracto Sn1 que en el Sn2, lo que sugiere una fijación no específica del anticuerpo conjugado sobre compuestos del extracto o una actividad endógena de tipo fosfatasa del extracto. Esto es confirmado por la incubación con un suero de ratón no inmunizado. Por otra parte, solo los inmunosueros tuvieron una ligera reactividad frente a compuestos presentes en el extracto de músculo. Estos compuestos pueden lógicamente corresponder a proteínas constitutivas presentes en todos los tejidos.

Mientras que los ratones R1 y R4 murieron presumiblemente a causa de parasitosis, los inmunosueros de los ratones R2 y R3 fueron analizados según la misma técnica de dot-blot, considerando su especificidad para diferentes órganos (Los resultados se detallan en la tabla VI). Esto permitió evaluar la técnica para comparar la reactividad de hibridomas frente a diferentes extractos de tejidos y así poder seleccionar aquellos estrictamente específicos de hembras maduras.

Estos análisis en dot-blot sugirieron que los extractos de cerebro tienen una actividad endógena de tipo fosfatasa alcalina. Sin embargo, se observó una reacción específica, en particular del inmunosuero R3 con los extractos de cerebro, de ovarios maduros y de ganglios torácicos.

Estos resultados muestran la importancia de la técnica dot-blot para analizar anticuerpos policlonales actuando, probablemente frente a una mayoría de antígenos fuertemente representados en los extractos. Sin embargo, es posible que para un antígeno menos reconocido por un anticuerpo monoclonal estrictamente específico, la técnica dot-blot no permita obtener una señal detectable.

TABLA VI. Evaluación por dot blot de los sueros de los ratones R2 y R3 con Sn1 (extracto de cerebro), hemolinfa de hembra madura (HI mad), hemolinfa de hembra inmadura (HI inmad), músculo (Músc), ovario de hembra madura (Ov mad), y ganglio notático (GT). Corroboración de la reacción del Sn1 con el segundo anticuerpo o sustrato. Los controles utilizados son: control negativo (Rc = ratón control), control del segundo anticuerpo, control del sustrato y control de la membrana. (+++ reactividad fuerte; ++ reactividad media; + baja reactividad; - reactividad nula).

ANTIGENOS (1/100)									Sin antígeno
Sueros	HI mad	HI inmad	Músc	Ov mad	GT	Sn1	Sn1 Sin 1	Sn1 Sin 1-2	
R2	-	-	-	+	-	+++	++	+	-
R3	-	-	-	+	+	+++	++	++	-
Rc	-	-	-	-	-	++	+	+	-

Esta observación es incluso más valedera cuando parece existir un problema de ruido de fondo enlazado a una actividad endógena que puede perturbar el reconocimiento de una señal específica muy débil. Es por ello que se emprendieron pruebas para intentar eliminar este ruido de fondo, tratando de inhibir la actividad endógena del extracto de cerebro.

Se utilizó el extracto de cerebro puro (Sn1) y se realizaron tratamientos con formol y temperatura. El tratamiento con formol fue realizado por inmersión de las pastillas de nitrocelulosa en una solución de formol. El formol fue diluido 1/10 en PBS ($v \cdot v^{-1}$), fue probado durante 30 segundos, 1 minuto o 5 minutos (tabla VII). El tratamiento con temperatura fue realizado a 70° C durante 15 minutos o 30 minutos. Luego de cada tratamiento las pastillas fueron puestas en contacto con la solución BCIP/NBT.

TABLA VII. Tratamientos de formol y temperatura para eliminar la reacción del Sn1 con el sustrato. (++) reactividad media; + baja reactividad; - reactividad nula).

Antígeno	TRATAMIENTOS					
	Sin tratamiento	Formol 30 s	Formol 1 min	Formol 5 min	70°C 15 min	70°C 30 min
Sn1	++	+	+	+	+	+

Los resultados muestran que ningún tratamiento es capaz de inhibir completamente la actividad endógena, pero en todos los tratamientos hubo una neta disminución de la señal, atribuida a una actividad fosfatasa alcalina endógena.

En base a estos resultados se analizó el efecto sobre la reactividad de los anticuerpos de un tratamiento, ya sea con formol durante 5 minutos o a una temperatura de 70° C durante 1 hora. El inmunosuero R3 fue probado a la dilución 1/100, paralelamente a un Sn1 puro. Los resultados se detallan en la tabla VIII.

En concordancia con los resultados anteriores, los tratamientos disminuyeron la actividad endógena, siendo la reactividad específica de los anticuerpos fácilmente identificable por la diferencia de intensidad en el dot-blot.

En conclusión se consideró que la técnica de dot-blot, no era un método óptimo para seleccionar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales específicos de moléculas de tipo hormonal, presentes a priori, en bajas cantidades en el cerebro.

TABLA VIII. Prueba para observar el efecto del formol y la temperatura sobre la reacción antígeno-anticuerpo. (+++ reactividad fuerte; ++ reactividad media; + baja reactividad; - reactividad nula).

Antígeno	1° Anticuerpo	2° Anticuerpo	Sustrato	Resultado
Sin tratamiento				
SN1 puro	R3 1/100	dilución 1/10.000	BCIP/NBT	+++
SN1 puro		dilución 1/10.000	BCIP/NBT	++
SN1 puro			BCIP/NBT	++
SN1 puro	Rc	dilución 1/10.000	BCIP/NBT	+
Tratamiento con formol por 5 minutos				
SN1 puro	R3 1/100	dilución 1/10.000	BCIP/NBT	++
SN1 puro		dilución 1/10.000	BCIP/NBT	+
SN1 puro			BCIP/NBT	+
SN1 puro	Rc	dilución 1/10.000	BCIP/NBT	+
Tratamiento con temperatura a 70 °C por 1 hora				
SN1 puro	R3 1/100	dilución 1/10.000	BCIP/NBT	++
SN1 puro		dilución 1/10.000	BCIP/NBT	+
SN1 puro			BCIP/NBT	+
SN1 puro	Rc	dilución 1/10.000	BCIP/NBT	+

3.1.2. Análisis de la técnica ELISA en microplacas mediante anticuerpos policlonales

Se consideró la técnica ELISA en microplacas para seleccionar hibridomas secretores de anticuerpos específicos de compuestos del cerebro debido a las diferentes características y ventajas de esta técnica, a saber: la automatización que permite analizar muchas muestras, la

cuantificación por espectrofotometría que permite comparar diferentes hibridomas, y la gran sensibilidad.

En este punto cabe indicar, que es posible fijar en la pared de cada pozo los antígenos a partir de volúmenes grandes de muestra, hasta 300 microlitros comparados con los 1 o 2 microlitros depositados sobre la membrana de nitrocelulosa en la técnica de dot-blot. Sin embargo, hay que señalar que los parámetros de ELISA en microplacas son un poco más complejos a estandarizar que aquellos de dot-blot.

Inicialmente la ELISA en microplacas fue explorada evaluando los títulos de los sueros de ratones previamente analizados por dot-blot. A fin de poder comparar estas 2 técnicas fueron escogidas las mismas condiciones experimentales.

El análisis de las figuras 14, 15, y 16 muestra que a partir de diluciones superiores a 1/1.000 todos los inmunosueros reaccionaban específicamente frente a los antígenos presentes en los extractos de cerebro (sn1 y Sn2), La reacción frente a un antígeno muscular fue nula.

La cuantificación por ELISA permite considerar los inmunosueros R1 y R4 como los mejores, lo que corrobora los resultados de dot-blot.

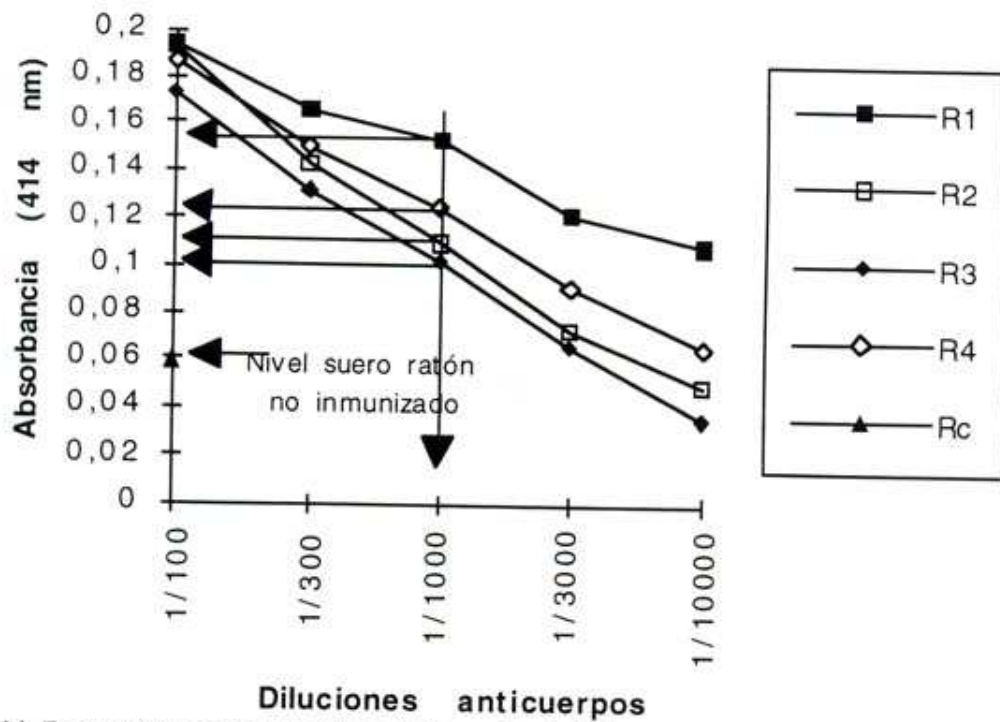


Figura 14. Evaluación por ELISA del estado inmunitario de los ratones R1-R2-R3-R4 contra Sn1.

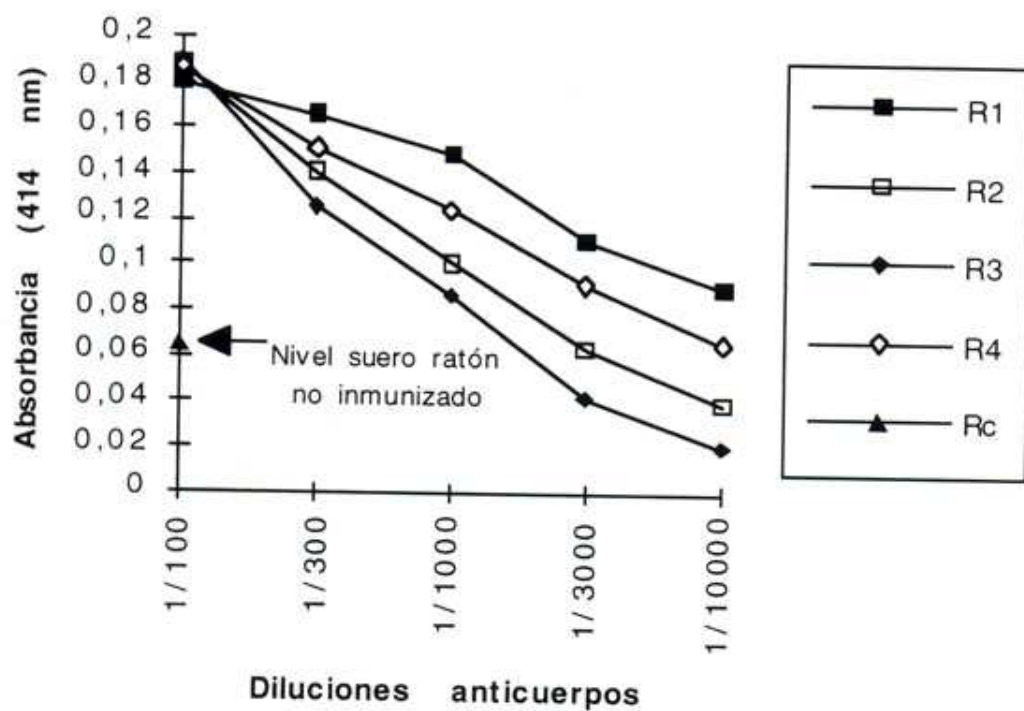


Figura 15. Evaluación por ELISA del estado inmunitario de los ratones R1-R2-R3-R4 contra Sn2.

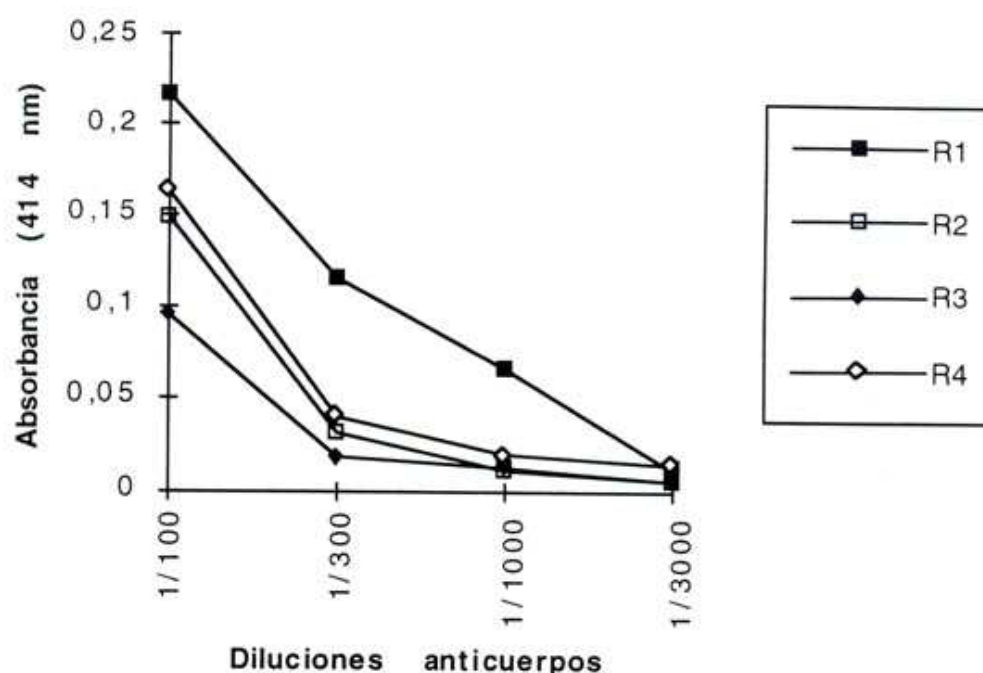


Figura 16. Evaluación por ELISA del estado inmunitario de los ratones R1-R2-R3-R4 contra antígeno músculo (control).

Debido a que la señal correspondiente al conjunto de complejos antígeno-anticuerpo es relativamente débil, la señal de la reacción entre los anticuerpos monoclonales producidos por un hibridoma y el conjunto de los mismos epítopes presentes en un pozo, aparentemente no podrían producir una señal diferenciable del ruido de fondo.

En base a estos resultados la técnica ELISA no pareció suficientemente eficaz para permitir seleccionar con seguridad hibridomas específicos de moléculas de tipo hormonal presentes en el cerebro del camarón. Sin embargo, esta técnica fue utilizada una última vez para evaluar los títulos de los ratones durante el proceso de inmunización hasta el día de la fusión (figura 17)

FUSION CEREBRO Curva de Inmunización

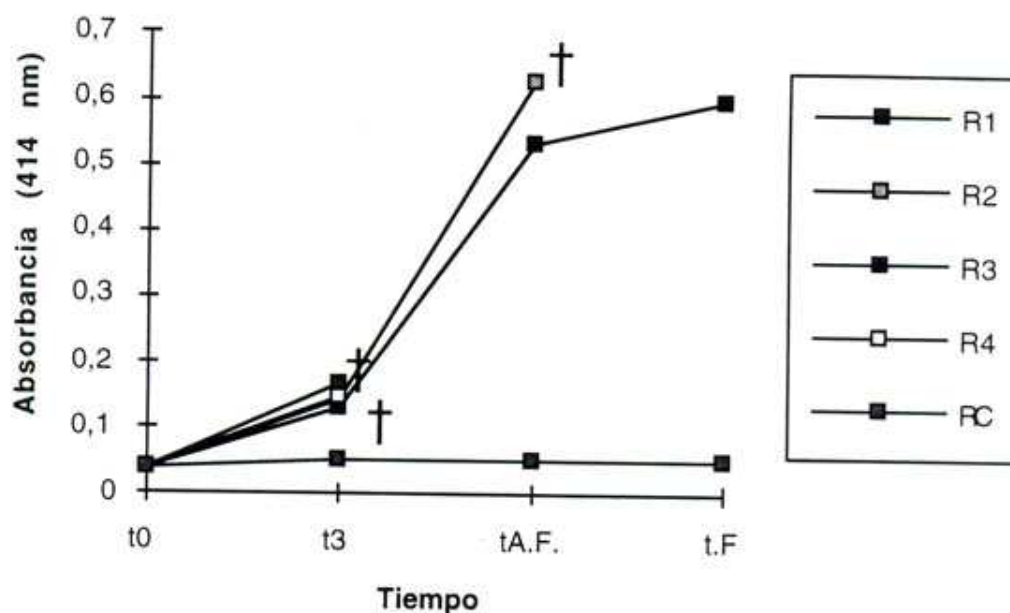


Figura 17. Curva del desarrollo de la respuesta inmunitaria de los ratones R1, R2, R3, y R4, inmunizados con Sn1 y Sn2. (t 0 : antes de la inmunización, t 3 : después de la tercera inmunización, t A.F.: antes de la fusión, tF.: día de la fusión).

3.1.3. Análisis de la técnica de inmunofluorescencia mediante anticuerpos policlonales

La inmunofluorescencia fue considerada como una técnica de selección para analizar la reactividad de los hibridomas, debido a la posibilidad de visualizar directamente complejos antígeno-anticuerpo, a pesar de estar presentes en muy baja cantidad. Esta técnica permite también la localización del antígeno a nivel subcelular, lo que es particularmente importante en la perspectiva de seleccionar anticuerpos específicos de hormonas presentes en células neurosecretoras.

Con el objetivo de desarrollar y evaluar la técnica de inmunofluorescencia se prepararon 2 tipos de muestras susceptibles de contener células neurosecretoras de gran talla que han estado implicadas en la producción de factores de maduración.

El primer tipo fue el de improntas a partir de cerebro previamente seccionado, y el otro consistió en la suspensión de células disociadas mecánica o enzimáticamente y subsecuentemente citocentrifugadas.

El examen, con el microscopio fotónico, de suspensiones celulares citocentrifugadas muestran una mejor calidad de células disociadas enzimáticamente (figura 19), comparadas a aquellas disociadas mecánicamente (figura 18). No obstante, es difícil reconocer células neurosecretoras intactas.

La preparación de suspensiones celulares y de preparaciones histológicas consumen mucho tiempo y requieren mucho material biológico (prácticamente un cerebro por placa). Al contrario, las improntas fueron fáciles de preparar y permiten la obtención de células neurosecretoras y células gigantes adecuadamente fijadas (figura 20) y su rendimiento por cerebro es de 30-40 placas. Esto determinó que se escogieran a las improntas para aplicar la técnica de inmunofluorescencia, como técnica de selección de hibridomas.

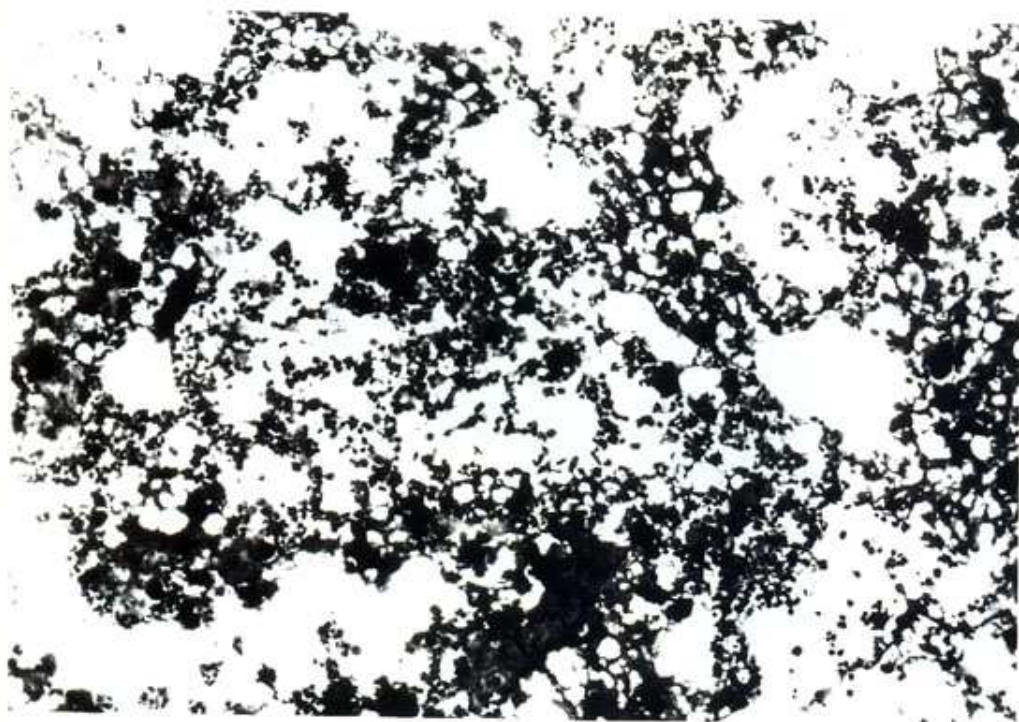


Figura 18. Disgregación de células de cerebro de *P. vannamei*, por maceración (Hemacolor) (1000 X).

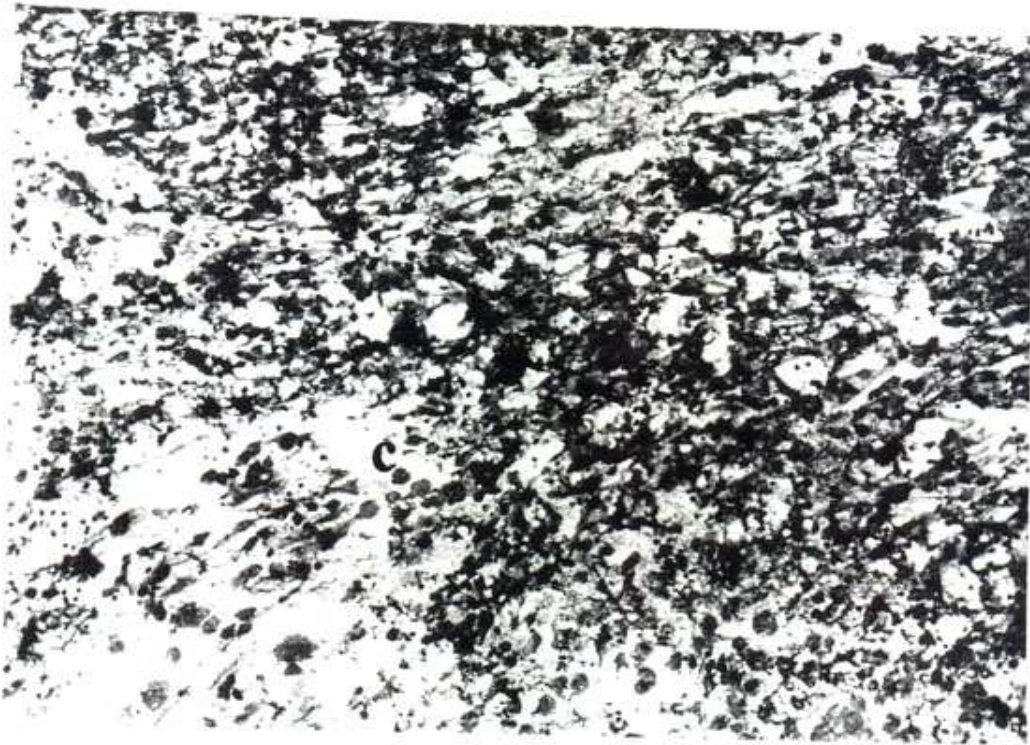


Figura 19. Disgregación de células de cerebro de *P. vannamei* con pronasa (Hemacolor) (1000 X).
c: Célula neurosecretora.

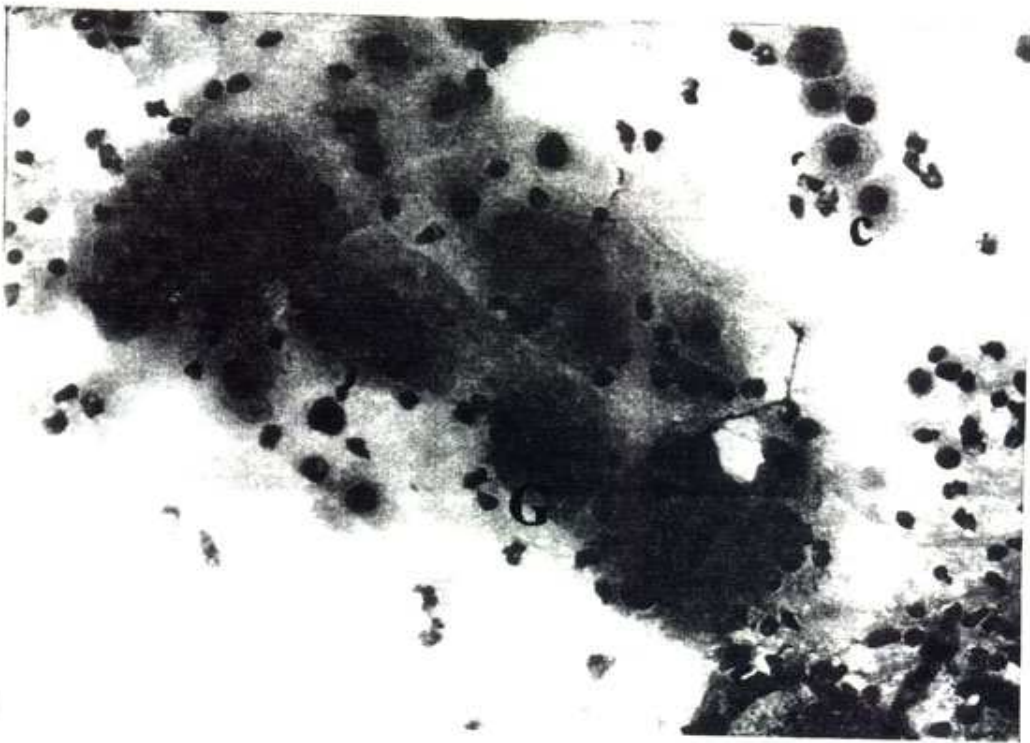


Figura 20. Impronta de células de cerebro de *P. vannamei* (Hemacolor) (1000 X). G: Célula gigante,
c: Célula neurosecretora.

Posteriormente se procedió a probar el protocolo base de inmunofluorescencia para ser adaptado a la selección de hibridomas contra compuestos presentes en el cerebro. Con este objetivo fueron utilizadas improntas preparadas a partir de cerebros de machos, juveniles, hembras inmaduras y maduras. Se usaron en paralelo los inmunosueros de los ratones R1, R2, R3, y R4, después de la tercera inmunización (t3), a las diluciones 1/100, 1/1.000, y 1/10.000; y el segundo anticuerpo a una dilución 1/100. Se utilizó control sin primer anticuerpo, control del sustrato, y control no específico (suero de ratón no inmunizado).

Los sueros policlonales reconocieron específicamente las improntas a la dilución 1/100. No se apreció diferencias en el reconocimiento entre los inmunosueros.

La técnica de Inmunofluorescencia fue seguidamente evaluada en paralelo con improntas de cerebro y cultivo primario de hemocitos incubados o no previamente con extractos de cerebro (Sn1 y Sn2). Esta prueba tenía como objetivo evaluar la especificidad del inmunosuero R3 y determinar si los hemocitos pueden fijar compuestos del cerebro (neurosecreciones).

El ensayo consistió en utilizar placas con cultivo primario de hemocitos (Materiales y Métodos 2.9.3) incubado con Sn1, placas con cultivo primario de hemocitos incubado con Sn2, placas con cultivo primario de hemocitos, e improntas de cerebro. Se utilizó el inmunosuero en diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000; el segundo anticuerpo a una dilución 1/100.

Los resultados determinaron que el inmunosuero reconocía las improntas de cerebro a la dilución 1/100, y también la membrana de los hemocitos, incubados o no con Sn1 y Sn2.

Debido a que la Inmunofluorescencia apareció efectivamente como la técnica más adecuada para detectar directamente neurosecreciones dentro de las células en improntas, y una vez que fue superada con éxito la fase de implantación de la técnica, se eligió este método para seleccionar los eventuales hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales contra compuestos presentes en el cerebro.

3.2. FUSIÓN CELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS CONTRA COMPUESTOS DEL CEREBRO

A partir del bazo del ratón seleccionado (R3) para la operación de hibridación linfocitaria, se obtuvieron 5×10^7 linfocitos que fueron fusionados con 10^7 células mielomatosas. Este número particularmente bajo de linfocitos, pudo deberse al mal estado de salud del ratón al momento de la fusión (enfermo), sabiendo que los otros 3 ratones murieron poco tiempo antes. El medio selectivo HAT (Materiales y Métodos 2.6.1.3) fue adicionado el mismo día de la fusión.

Después de 10 días de cultivo, tiempo normal de aparición de hibridomas, no se observó ningún hibridoma en los cultivos, y solamente 4 hibridomas fueron finalmente obtenidos después de 6 semanas de cultivo..

Estos 4 hibridomas (5E4, 5E5, 5C5, 5G10) no reconocieron ninguna célula o compuesto en las improntas de cerebro de hembras maduras (figura 21).

El bajo número de hibridomas producidos reveló un fracaso en la operación de hibridación linfocitaria enfocada a la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos contra compuestos presentes en el cerebro

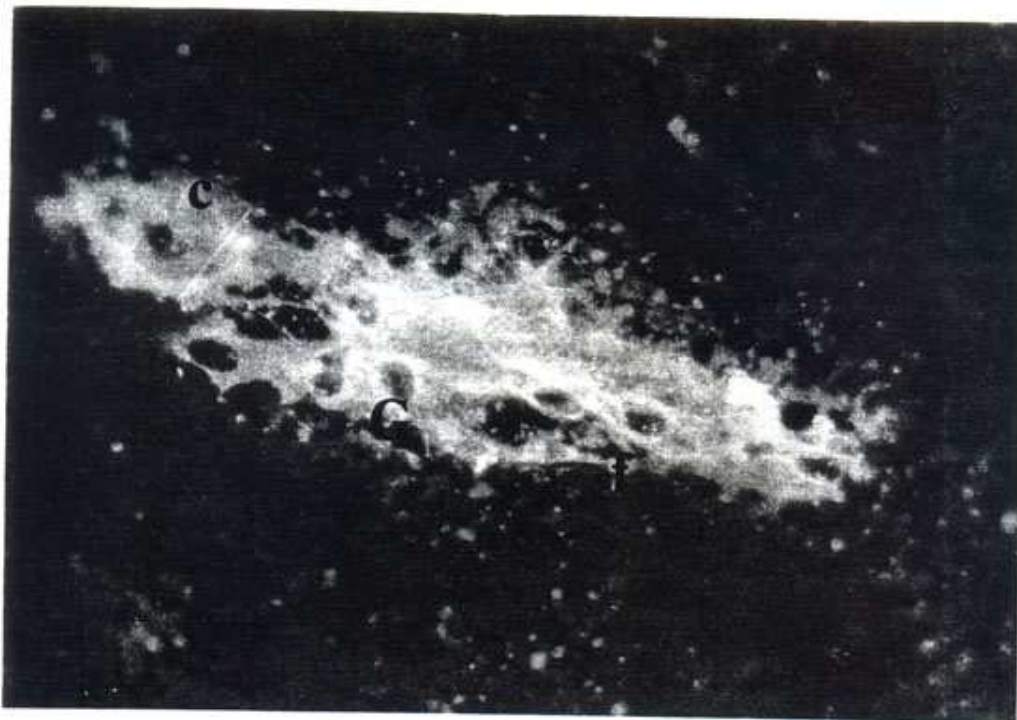


Figura 21. Inmunofluorescencia negativa (1000 X). G: Célula gigante, e: Célula neurosecretora, E: Fibra nerviosa.

3.3. DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE INMUNO-PRUEBAS PARA LA SELECCIÓN DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS CONTRA COMPUESTOS DEL GANGLIO TORÁCICO

El fracaso de la fusión previa, la disponibilidad de ganglios torácicos congelados durante las operaciones de disección del cerebro y sobretodo la demostración experimental de la implicación del ganglio torácico dentro del proceso de maduración condujeron a emprender una fusión a partir de ratones inmunizados contra este ganglio.

3.3.1. Análisis de la técnica de Dot blot mediante anticuerpos policlonales

La técnica dot blot, como técnica de selección de anticuepos contra compuestos presentes en el ganglio torácico, fue evaluada con los inmunosueros de los dos ratones (Rh,Rm) inmunizados con extracto de ganglio torácico de hembras maduras de *P. vannamci*. (Tabla IX).

Tabla IX. Evaluación por dot blot de los títulos de los inmunosueros de los ratones (Rh, Rm). GT, ganglio torácico (1/10, 1/100); Músc, músculo (1/10, 1/100); HI mad, hemolinfa de hembra madura (1/100). Los controles utilizados fueron: controles negativos (Rc = ratón control) y 2C9, control del segundo anticuerpo (C2a), control del sustrato (Csus), y control sin antígeno (Ag). (+++ reactividad fuerte, ++ reactividad media, + baja reactividad, - reactividad nula).

Suero	Suero Rh			Suero Rm			Controles				
	1/10	1/100	1/1.000	1/10	1/100	1/1.000	2C9	Rc	C 2a	C sus	Ag
GT 1/10	+++	++	+	++	++	-	-	-	-	-	-
GT 1/100	+++	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-
Musc 1/10	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Musc 1/100	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HI mad	++	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-

Los dos inmunosueros reconocieron al extracto de ganglio torácico. La reacción del inmunosuero del ratón Rh fue más sensible, para las diferentes diluciones del anticuerpo y del extracto de ganglio torácico. En cuanto al reconocimiento de otros tejidos, las reacciones fueron similares pero con menor intensidad, lo que indicó que los inmunosueros tienen anticuerpos que reconocen antígenos comunes a todos los tipos de células.

3.3.2. Análisis de la técnica ELISA en microplacas mediante anticuerpos policlonales

Paralelamente al dot-blot, la técnica ELISA en microplacas fue evaluada en condiciones similares (fig 22), lo que mostró que esta prueba tiene la misma sensibilidad (Rh 1/1.000) que el dot-blot, pero con la ventaja de poder cuantificar la señal.

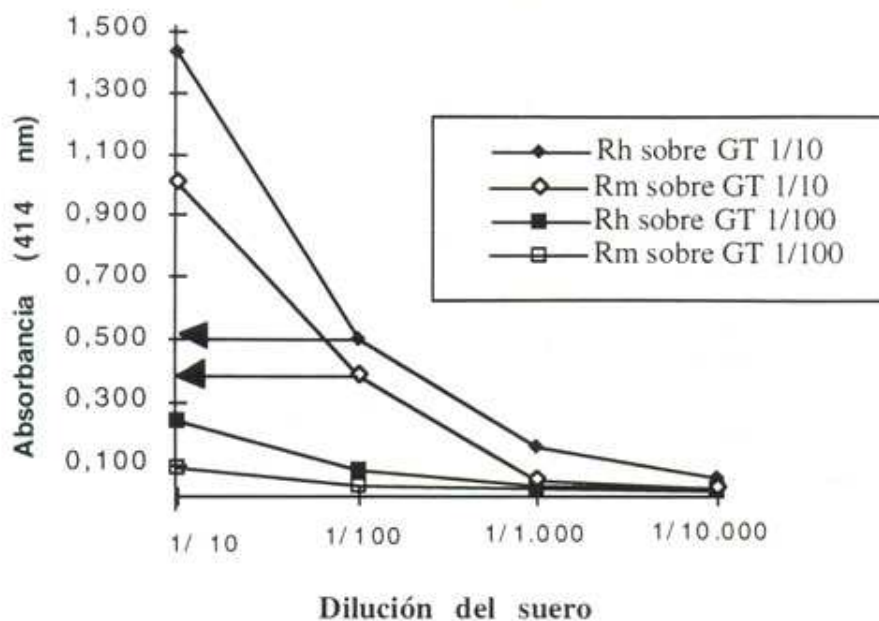


Figura 22. Estado de inmunización de los ratones (Rh, Rm) utilizando el inmunógeno extracto de ganglio torácico diluido 1/10 y 1/100. El inmunosuero fue probado a las diluciones 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.

El ELISA fue utilizado para determinar los títulos de los ratones (Rm y Rh) antes de la primera inmunización, luego de la tercera inmunización, y el día de la fusión. Con los inmunosueros a una dilución 1/100 y el extracto de ganglio torácico diluido 1/10, se formó una curva que refleja el desarrollo de la respuesta inmunitaria de los ratones durante la fase de inmunización (figura 23). El ratón Rm fue utilizado para la fusión debido a que el otro murió.

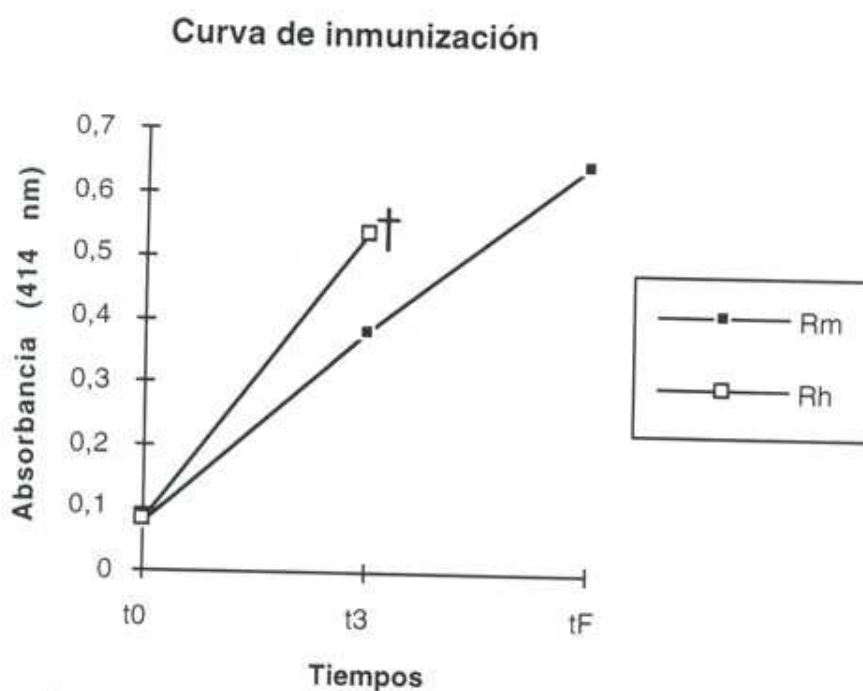


Figura 23. Curva de inmunización de los ratones (Rh, Rm) inyectados con un extracto de ganglio torácico de hembras maduras *P. vannamei*. t₀ antes de la inmunización; t₃ después de la tercera inmunización; t_F día de la fusión. † ratón muerto.

3.4. FUSIÓN CELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS CONTRA COMPUESTOS DEL GANGLIO TORÁCICO

A partir de la disección del bazo del ratón seleccionado se obtuvieron 80×10^6 linfocitos que fueron fusionados con 16×10^6 células mielomatosas (relacion 5 linfocitos/1 mieloma).

Las células fueron colocadas en las placas a una concentración de 60.000 por pozo. La adición del medio selectivo HAT (Materiales y Métodos 2.6.1.3) se realizó 24 horas después de la fusión. Al día 4 y 8 el medio fue cambiado.

Se obtuvieron 124 hibridomas para esta fusión, los cuales fueron probados por el método de ELISA.

En estas pruebas de selección de hibridomas se utilizó como antígeno el extracto de ganglio torácico a una dilución de 1/5. Se realizaron controles negativos con un anticuerpo monoclonal contra una bacteria (2C9), control sin anticuerpo específico, y sin ningún anticuerpo. El control positivo correspondió al inmunosuero del ratón Rm colectado el día de la fusión (RMF).

Los hibridomas fueron probados por ELISA de 2-6 veces. Se consideró como positivos los hibridomas que tenían una respuesta ligeramente mayor a la señal de los controles. Fueron seleccionados 13 hibridomas. Figura 24.

A fin de evitar perder algún hibridoma interesante, se decidió conservar todos los hibridomas correspondientes a una señal apenas superior a la del control. Así, con la señal de los controles igual a 0,070 (absorbancia 414 nm), se obtuvieron 8 hibridomas con una señal de 0,080 a 0,100 y 5 hibridomas con una señal superior a 0,100.

La especificidad de los 13 hibridomas previamente seleccionados fue analizada contra diferentes tejidos: ganglio torácico de hembra y macho (1/100), plasma de hembra madura (1/100), plasma de hembra inmadura (1/10), hemocitos de hembra madura (1/10) y músculo (1/10). Los mismos controles fueron utilizados (figura 25).

Hibridomas seleccionados por ELISA

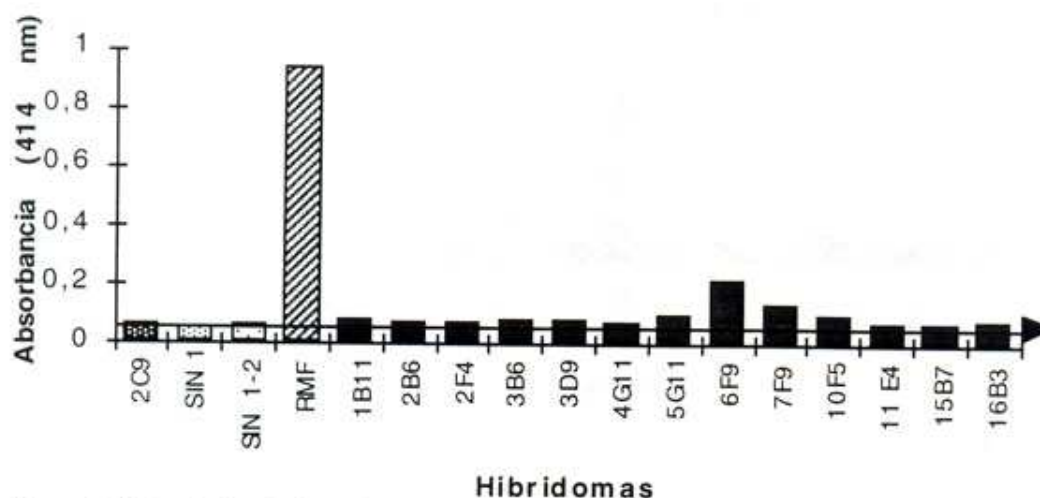


Figura 24. Resultados de la selección de hibridomas por ELISA. Controles positivo inmunosuero del Rm el día de la fusión (RMF), control no específico (2C9 contra *Vibrio harveyi*), control sin primer anticuerpo, control sin primer ni segundo anticuerpo.

Estos resultados confirmaron la reactividad de 3 de los 5 hibridomas previamente identificados. El anticuerpo monoclonal 6F9 reconoce un compuesto presente en el ganglio torácico, ya sea de hembra o macho. El anticuerpo monoclonal 3B6 reconoce un compuesto presente en el plasma de de hembra maduras. El anticuerpo monoclonal 10F5 reconoce un compuesto presente en baja concentración en los diferentes tejidos.

Mediante la prueba de dot blot solo el hibridoma 6F9 reconoció específicamente al extracto del ganglio torácico, lo que confirmó los resultados de ELISA.

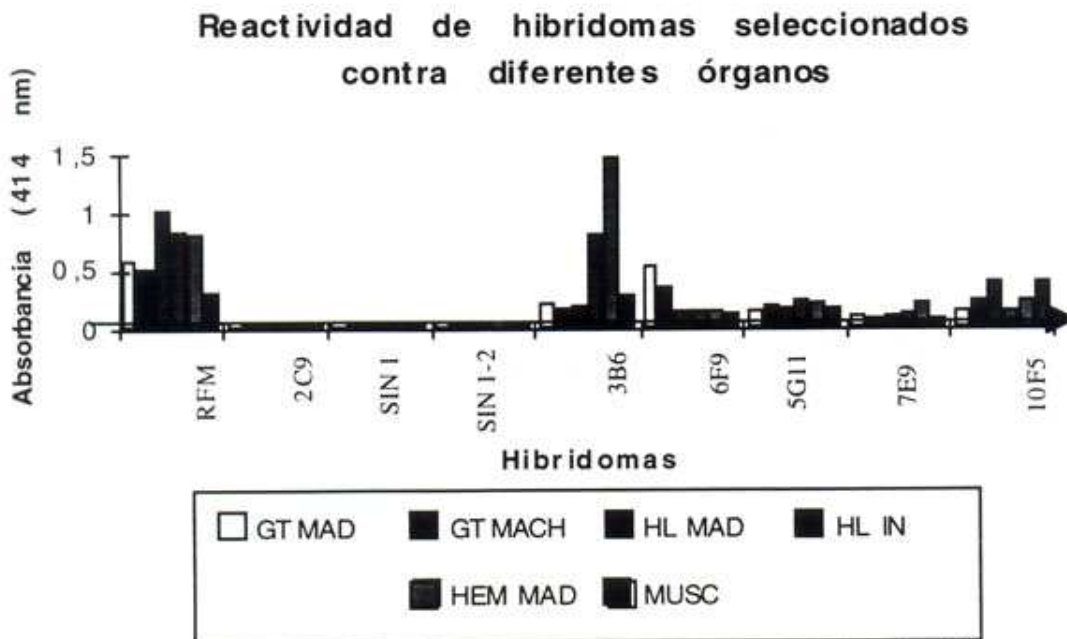


Figura 25. Resultados de la prueba de ELISA con los hibridomas seleccionados sobre diferentes tejidos (GT MAD ganglio torácico de hembras maduras, GT MACH ganglio torácico de macho, HL MAD plasma hembra madura, HL IN plasma hembra inmadura, HEM MAD hemocitos hembra madura, MUSC músculo). Controles positivo suero policlonal macho fusión, control no específico (2C9 contra *Vibrio harveyi*), control del segundo anticuerpo (sin primer anticuerpo), control del sustrato (sin primer ni segundo anticuerpo).

Con el objetivo de caracterizar más los hibridomas seleccionados, y determinar la localización de los epitopes se realizó una inmunofluorescencia sobre improntas del cerebro de hembras maduras e inmaduras. Se siguió el protocolo optimizado (Materiales y Métodos 2.9.5). Se utilizó como control positivo el suero policlonal del macho (1/100), control del segundo anticuerpo, control del sustrato y control no específico.

Los controles se presentaron sin fluorescencia no específica, y solo los anticuerpos 6F9 y 10F5 mostraron imagen de fluorescencia a nivel de las neuronas, con un claro reconocimiento del citoplasma (fuertemente fluorescente) mientras los núcleos aparecieron negativos (Tabla X)

Tabla VIII. Resultados de inmunofluorescencia de los hibridomas seleccionados sobre improntas de cerebros de hembras maduras e inmaduras. (+ IF positivo, - IF negativo).

Hibridomas	Inmadura	Madura	Observaciones
RMF	+	+	dendritas, membrana celular
2C9	-	-	todo negativo
6F9	+	+	dendritas, membrana celular
10F5	+	+	dendritas, membrana celular
1B1	-	-	todo negativo
2B6	-	-	todo negativo
2F4	-	-	todo negativo
3B6	-	-	todo negativo
3D9	-	-	todo negativo
4G11	-	-	todo negativo
5G11	-	-	todo negativo
7F9	-	-	todo negativo
3B6	-	-	todo negativo
11E4	-	-	todo negativo
15B7	-	-	todo negativo
16B3	-	-	todo negativo

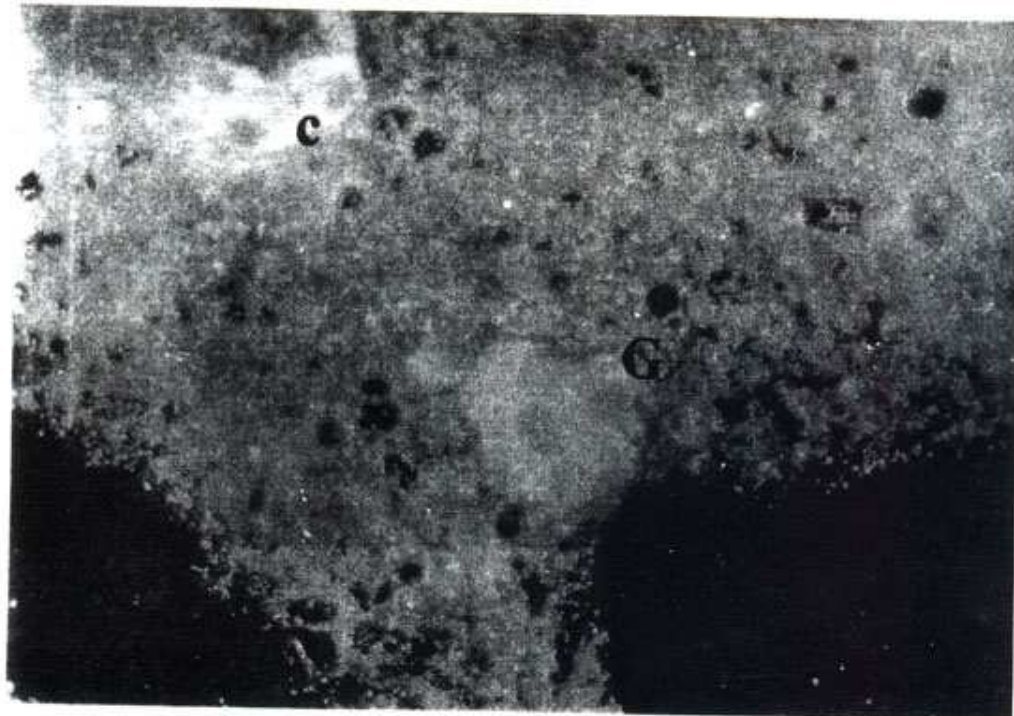


Figura 26. Inmunofluorescencia. Célula nerviosa negativa (1000 X) (Control 2C9). G: Célula gigante. c: Célula neurosecretora.

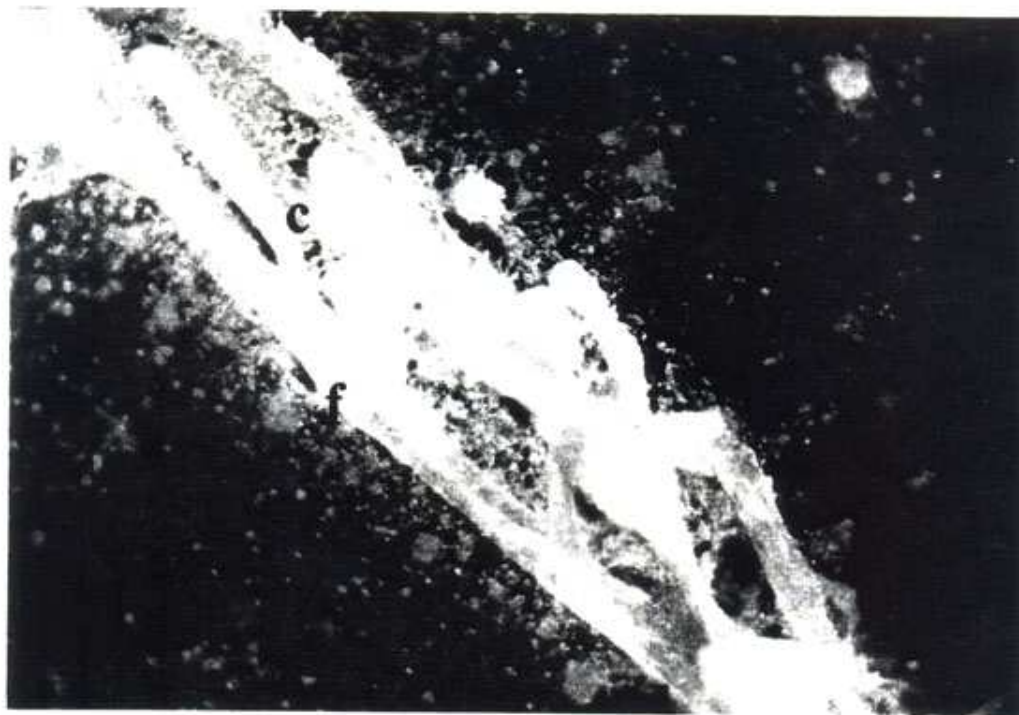


Figura 27. Inmunofluorescencia. Célula nerviosa positiva (1000 X) (6F9). c: Célula neurosecretora. f: Fibra nerviosa.

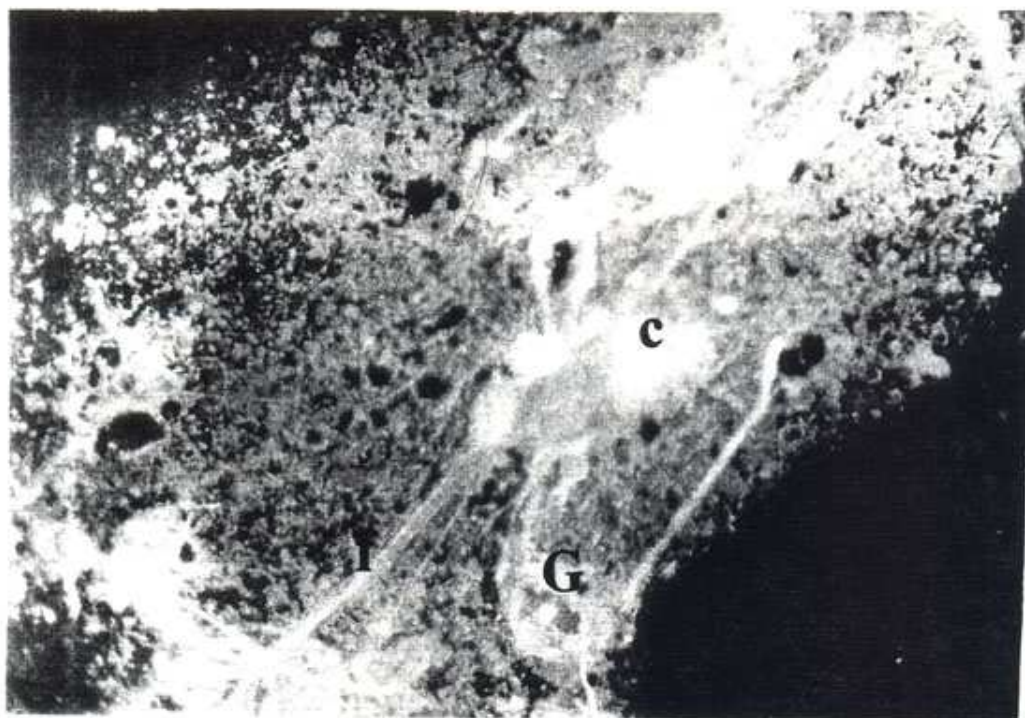


Figura 28. Inmunofluorescencia. Célula nerviosa positiva (1000 X) (10 F5). G: Célula gigante. c: Célula neurosecretora. f: Fibra nerviosa.

DISCUSIÓN

Dentro del marco de investigación desarrollado en endocrinología de camarones, la prioridad ha sido dada a factores de maduración y eventualmente la utilización de hormonas purificadas, con el fin de optimizar los procesos en los laboratorios.

La estrategia que fue diseñada en CENAIM, reposa en la obtención de anticuerpos monoclonales específicos de factores de maduración que han sido puestos en evidencia en el cerebro y ganglio torácico.

El presente trabajo fue focalizado en la concepción, la elaboración y la evaluación de pruebas, lo mejor adaptadas posibles, para la selección de hibridomas obtenidos por hibridación linfocitaria.

Es importante subrayar el carácter exploratorio de estas hibridaciones, ya que ningún factor hormonal ha sido hasta la fecha purificado. Por referencias a trabajos relacionados al ganglio cerebral del mejillón (Kellner-Cousin, 1993), las inmunizaciones fueron realizadas simplemente con extractos de cerebro y ganglio torácico, siendo estos disecados de animales maduros a fin de poder reconocer anticuerpos específicos de factores de maduración.

La primera operación de hibridación linfocitaria estuvo relacionada a factores del cerebro y se consideraron 3 tipos de inmunopuebas (dot-blot, ELISA, IFI). Se necesitó de la realización de una inmunopueba comparativa entre cerebro de hembra madura e inmadura.

El método dot-blot fue considerado y evaluado en razón de, la simplicidad de su puesta en marcha y su carácter semicuantitativo. Este método fue posteriormente descartado debido a su limitada sensibilidad y la presencia de una actividad fosfatasa alcalina endógena.

La técnica ELISA en microplacas no se reveló más sensible que el dot-blot, y fue considerada igualmente no apta para poder poner en evidencia complejos antígeno-anticuerpo, considerando que se trata de anticuerpos monoclonales específicos de factores presentes a priori en muy baja cantidad.

La técnica de inmunofluorescencia fue optimizada y finalmente escogida, ya que permitió reconocer a nivel subcelular, la presencia de complejos antígeno-anticuerpo, incluso si estos se encuentran en bajas cantidades. Según este método se logró seleccionar los anticuerpos monoclonales específicos de factores inmunitarios del camarón y del mejillón (Noel, 1992), así como de factores endocrinos del mejillón (Kellner-Cousin, 1993).

Desafortunadamente la operación de hibridación linfocitaria fue un fracaso, siendo la baja tasa de fusión difícil de explicar.

La misma estrategia fue la base de la segunda operación de fusión, con ganglios torácicos. sin embargo, la inmunofluorescencia no pudo ser considerada porque solo se contaba con tejido congelado, lo que impide la preparación de improntas.

En estas condiciones se escogió preferencialmente la técnica ELISA sobre el dot-blot, no por un criterio de sensibilidad sino por la capacidad de cuantificar la señal y consecuentemente poder identificar hibridomas cuya señal difería solo muy ligeramente del control. Este procedimiento se mostró efectivo ya que finalmente se logró seleccionar 2 hibridomas en base de su secreción de anticuerpos, actuando contra factores presentes en el ganglio torácico de hembras maduras y también en machos maduros, revelándose la presencia de estos epitopes por inmunofluorescencia en el cerebro.

La caracterización y el estudio de los epítopes respectivos constituye la futura etapa del trabajo. En esta perspectiva es interesante anotar que el ELISA en microplacas va a ser ciertamente muy útil para estudiar la cinética de expresión y regulación de estos factores, mientras que la IFI va a servir de base para los trabajos de inmunohistología necesarios para localizar con precisión los epítopes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es un enfoque nuevo en el estudio de los procesos endocrinos en los crustáceos. Se ha logrado obtener anticuerpos de interés para la endocrinología (6F9 y 10F5). Un anticuerpo de interés para la inmunología (3B6).

Las perspectivas de utilización del anticuerpo 6F9 son:

Determinar el peso molecular de los factores reconocidos por los anticuerpos 6F9 y 10F5, mediante la técnica de western-blot. El conocimiento de este criterio puede facilitar la purificación.

Purificar por electroforesis/western-blot, cromatografía de afinidad o HPLC/ELISA, los factores, lo que permitirá determinar la secuencia de aminoácidos.

Localizar a nivel celular y ultraestructural los factores mediante la técnica de inmunogold.

Analizar la cinética y la regulación de expresión de los factores mediante inmunopuebas de tipo ELISA, a fin de establecer relaciones con los factores de maduración.

Analizar el efecto de los factores purificados sobre la fisiología/maduración del camarón.

Clonar los genes de los factores, en caso de su interés fisiológico, mediante la preparación de un banco de cADN en vectores de expresión, que será analizada ya sea preferencialmente con la ayuda de los anticuerpos monoclonales 6F9 y 10F5, o de oligonucleótidos sintéticos cuyas secuencias serían deducidas de la secuencia de aminoácidos del factor.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aba MA., M. Forsberg.** 1995. Heterologous radioimmunoassay for llama and alpaca luteinizing hormone with a monoclonal antibody, an equine standard and a human tracer. *Acta Vet. Scand.* 36. 367-375.
- Allen W.R., S. Mathias, S.N. Lennard, R.E. Greenwood.** 1995. Serial measurement of peripheral oestrogen and progesterone concentrations in oestrous mares to determine optimum mating time and diagnose ovulation. *Equine Vet. J.* 27. 460-464.
- Atwood H.L.** 1982. Synapses and Neurotransmitters. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 3. Editores: H.L. Atwood, D.C. Dandeman y D.E. BLISS. Academic Press Inc., New York, USA. 105-141.
- Adiyodi K.G., R. Adiyodi.** 1970. Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol. rev.* 45: 121-165.
- Adiyodi R.G.** 1985. Reproduction and its control. En: *The Biology of crustacea*, Vol 9. Integument, Pigments and Hormonal Processes. Editores: D.E. Bliss y L.H. Mantel. Academic Press Inc., New York, USA. 147-215
- Aiken D.E.** 1969. Photoperiod, Endocrinology and the Crustacean Molt cycle. *Science.* 149-154.
- Akamine Yasuhico.** 1992. Historia del cultivo de larvas de camarón en el Ecuador y su futuro. En: *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*. Editores: Jorge Calderón y Verónica Sandoval. ESPOL -CENAIM, Ecuador. 75-80.
- Battelle B.A., E.A. Kravitz.** 1978. Targets of octamine action in the lobster: Cyclic nucleotide change and physiological effects in hemolymph, heart, and exoskeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205:438-448.
- Beltz B.S.** 1988. Crustacean Neurohormones. En: *Endocrinology of Selected Invertebrates Types*. Alan R. Liss. Inc. 27-35.
- Blanchet-Tournier M.** 1982. Quelques aspects des interactions hormonales entre la mue et la vitellogenese chez le crustacé Amphipoda *Orchestia gammarellus (Pallas)*. *Reproduction Nutrition Development* 22. 325-344.
- Bomirsky A., M. Arendarczyk, E. Kawinska, L.H. Kleinholz.** 1981. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *Intern. J. Invert. Reprod.* 3:213-219.
- Borjesson D.L., W.M. Boyce, I.A. Gardner, J. Deforge, B. Lasley.** 1996. Pregnancy detection in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. *J. Wildlife Dis.*, 32. 67-74.
- Bray W.A., A.L. Lawrence.** 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Editores: A. Fast y L.J. Lester. 93-170.

- Browdy Craig.** 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. En: Proceedings of the special session on shrimp farming. Editor: J. Wyban. World Aquaculture Society. 22-51
- Chamberlain G.W.** 1985. Biology and control of shrimp reproduction. Editores: M.B.Haby, and R.J. Miget. Texas Shrimp Farming Manual: an Update on Current Technology. Texas Agricultural Extension Service, Texas A & M University, Corpus Christi, Tx, USA.
- Chang, E.S.** 1985. Hormonal control of molting in decapod crustaceans. *Amer. Zool.* 25:179-185.
- Charniaux-Cotton H.** 1985. Vitellogenesis and its control in malacostraca Crustacea. *Amer. Zool.* 2: 197-206.
- Christie A.E., P. Skiebe, E. Marder.** 1995. Matrix of neuromodulators in neurosecretory structures of the crab *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.* 198:12 2431-2439.
- Cooke I.M.** 1977. Electrical activity of neurosecretory terminals and control of peptide hormone release. En: Peptides in Neurobiology. Editor: H. Gainer. Plenum, New York. 345-374.
- Cooke I.M., R.E. Sullivan.** 1982. Hormones and Neurosecretion. En: The Biology of Crustacea. Vol. 3. Editores: D.C. Sandeman y D.E. Bliss. Academic Press Inc., New York, USA. 206-278
- Drew M.L., B.M. Alexander, R.G. Sasser.** 1995. Pregnancy determination by use of pregnancy-specific protein B radioimmunoassay in llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207. 217-219.
- Eastman-Reks S., M. Fingerman.** 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic amp on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 79: 679-684.
- Fingerman M.** 1970. Perspectives in crustacean endocrinology. *Scientia* 105: 1-23.
- Fingerman M.** 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. *J. Crust. Biol.* 7:1-24.
- Ghosh D., A.K. Ray.** 1993. 17- β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: relation to ovarian condition and estrogen treatment. *Gen. Comp. Endocr.* 89: 248-254.
- Gómez L., E. Arellano.** 1990. Guías prácticas preliminares para la maduración y desove en cautiverio del camarón penaeido en el Ecuador. ESPOL, Ecuador. 1-45.
- Hanström B.** 1947. The brain, the sense organs, and the incretory organs of the head in the Crustacea Malacostraca. *Lunds Univ. Arssk.* 43:3-44.
- Hinsch G.W., D.C. Bennett.** 1979. Vitellogenesis stimulated by thoracic ganglion implants into destalked immature spider crabs, *Libinia emarginata*. *Tissue and Cell* 11: 345-351.
- Horridge G.A.** 1965. Arthropoda. En: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Editores: T.H. Bullock y G.A. Horridge. Academic Press Inc., New York, USA. 1166-1189.

- Johnen C., U. Vongliscynski, y H. Dircksen.** 1995. Changes in haemolymph ecdysteroid levels and CNS contents of crustacean cardioactive peptide immunoreactivity during the moult cycle of the isopod *Oniscus asellus*. *Tissue and Cell* 45: 39-61.
- Ikeuchi T., K. Mochida, K. Ura, S. Adachi, K. Yamauchi.** 1995. Specific antibodies against synthetic peptides of salmonid GTH I and II beta subunits. *Zool. Sci.*, 12, 317-323.
- Keller R.** 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. Review. *Experiencia* 48. 439-447.
- Kellner-Cousin,** 1993. Contribution à l'étude du système neuroendocrine de la moule *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia). Tesis de Doctorado de la Universidad de Caen. Instituto de Bioquímica y Biología aplicada.
- Kerr L.E.** 1995. Sperm antigens and immunocontraception. *Reprod. Fertility. Develop.*, 7: 4. 825-830.
- Kleinholz L.H., R. Keller.** 1979. Endocrine regulation in crustacea. En: *Hormones and evolution*. Editor: J. Barrington. Academic Press Inc., New York, USA. 159-213.
- Kleinholz L.H., K. Ranga Rao, J.P. Rihem, G.E. Tarr, L. Johnson, S. Norton.** 1986. Isolation and sequence analysis of a pigment dispersing hormone from the crab *Cancer magister*. *Biol. Bull.* 170:135-143.
- Knowles F.** 1974. Twenty years of neurosecretion. En: *Neurosecretion the final neuroendocrine pathway*. Editores: F. Knowles y L. Vollrath. 3-11.
- Köhler G., C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Kravitz E.A., S. Glusman, R.M. Harris-Warrick, M.S. Livingstone, T. Schwartz, M.F. Goy.** 1980. Amines and a peptide as neurohormones in lobsters: Actions on neuromuscular preparation and preliminary behavioral studies. *J. Exp. Biol.* 89:159-175.
- Landau M., H. Laufer, E. Homola.** 1989. Control of methyl farnesoate in the mandibular organ of the crayfish *Procambarus clarkii*: Evidence for peptide neurohormones with dual functions. *Invert. Reprod. Develop.* 16: 165-168.
- Laufer H., D. Borst., F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C.C. Reuter, L.W. Tsai., D.A. Schooley.** 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science*. 235. 202-205.
- Lee C.Y., H.R. Umphrey, R.D. Watson.** 1996. Developmental changes in the level of vitellin-immunoreactive proteins in hemolymph and tissues of the blue crab *Callinectes sapidus*: relation to vitellogenesis. *J. Crust. Biol.* 16:1-9
- Lewis D.H.** 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* Sp. *Proceedings of the 4th Annual Workshop World Mariculture Society*. 333-338.
- Longyant S., W. Sithigorngul, N. Boon-ingpirdpong, y Sithigorngul.** 1994. Production of antibody against vitellin and vitellogenin in shrimp, *Metapenaeus affinis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68. 364-375.

- Luxembourg A.** 1995. Anti-peptide monoclonal antibodies to the beta-adrenergic receptor: Use in purification of beta receptor. *Hybridoma*, 14. 261-264.
- Marcier A.J., I. Ochard, V. TeBrugge.** 1991. FMRFamide-like immunoreactivity in the crayfish nervous system. *J. Exp. Biol.* 156. 519-538.
- Mason AB., C.J. Kenney, M.K. Miller, R.C. Woodworth, K.J. Patel, R.W. Evans.** 1995. Monoclonal antibodies to chicken ovotransferrin: Epitopic and phylogenetic analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 112. 347-354.
- Martemucci G., A. Dalessandro, F. Toteda, A.M. Facciolongo, M. Gambacorta.** 1995. Embryo production and endocrine response in ewes superovulated with PMSG, with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. *Theriogenology* 44. 691-703.
- McLaughlin P.A.** 1983. Internal anatomy. En: *The Biology of Crustacea*, Vol. 5. Editores. L.H.Mantel y D.E.Bliss. Academic Press Inc., New York, USA. 1-52.
- Meusy J-J., H. Charniaux-Cotton.** 1984. Endocrine control of vitellogenesis in malacostraca crustaceans. En: *Advances in invertebrate reproduction*. Editor: V. Engels. Elsevier Science Publishers, North Holland. 231-241.
- Meusy J-J., G. Martin, D. Soyez, J.E. Van Deijnen, J-M Gallo.** 1987. Immunochemical and immunocytochemical studies of the crustacean Vitellogenesis-Inhibiting Hormone (VIH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 67: 333-341.
- Mialhe E., V. Boulo, H. Grizelo.** 1988. Monoclonal antibodies: a tool for molluscan pathology. *American Fisheries Society special publication.* 18: 304-310.
- Mialhe E., V. Boulo, E. Bachere, D. Hervio, K. Cousin, D. Noel, M. Ohresser, R.M. Le Deuff, B. Despres, S. Gendreau.** 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture* 107:155-164.
- Mohamed K.S., y A.D. Diwan.** 1991. Neuroendocrine regulation of ovarian maturation in the Indian white prawn *Penaeus californiensis* in captivity. *Proceedings of the World Mariculture Society* 5: 415-447.
- Mortin L., E. Marder.** 1991. Differential distribution of beta-pigment-dispersing hormone (beta-PDH)-like immunoreactivity in the stomatogastric nervous system of five species of decapod crustaceans. *Cell Tissue Res.* 265. 19-33.
- Mulloney B., W.M. Hall.** 1991. Neurons with histamine-like immunoreactivity in the segmental and stomatogastric nervous system of the crayfish *Pacifastacus lenisculus* and the lobster *Homarus americanus*. *Cell Tissue Res.* 266. 197-207
- Noel D.,** 1992. Etude des hemocytes et d'une neoplasie hemocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). Tesis de Dostorado de la Universidad de Bordeaux II.
- Otsu T.** 1960. Precocious development of the ovaries in the crab, *Potamon dehaani*, following implantation of the thoracic ganglion. *Annotationes Zoologicae Japonenses.* 33: 90-96.

- Oyama S.N.** 1968. Neuroendocrine effects on ovarian development in the crab *Thalamita crenata*. Latreille studied *in vitro*. Doctoral dissertation. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA.
- Padlan E.A.** 1977. Structural basis for the specificity of antibody-antigen reactions and structural mechanisms for the diversification of antigen-binding specificities. *PER. Biophys.* 10-35.
- Panouse M.J.** 1943. Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovarie chez la crevette *Leander serratus*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 217: 553-555.
- Quackenbush L.S., W.F. Herrnkind.** 1983. Partial characterization of eyestalk hormones controlling molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus argus*. *J. Crustac. Biol.* 3, 34-44.
- Quackenbush L.S.** 1986. Crustacean endocrinology, a review. *Canad. J. Fish. Aquatic Sciences* 43: 2271-2282.
- Rao K. Ranga, J.P. Riehm, C.A. Zahnaw, L.H. Kleinholz, G.E. Tarr, L. Johnson, S. Norton, M. Landau, O.J. Semmes, R.M. Attelberg, W.H. Jorenby, M.F. Hintz.** 1985. Characterization of a pigment-dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natl. Acad., USA* 82:5319-5322.
- Real D., G. Cztermasty.** 1990. Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the ventral nerve cord of crayfish. *Brain Res* 521. 203-212.
- Sarojini R., R. Nagabhushanam, M. Fingerman.** 1995. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive brain and toracic ganglion secretions in the shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Biol.* 198. 1253-1257.
- Scharrer E., B. Scharrer.** 1945. Neurosecretion. *Physiol. Rev.* 25:171-181.
- Sherf C.M., B. Mulloney.** 1991. Red Pigment concentrating hormone is a modulator of the crayfish swimmeret system. *J. Exp. Biol.* 155:21-35.
- Takayanagi H., Y. Yamamoto y N. Takeda.** 1986. An ovary stimulating factor in the shrimp, *Paratya compressa*. *J. Exp. Zool.* 240:203-209.
- Tom M., M. Fingerman, T. Hayes, V. Johnson, B. Kerner, E. Lubzens.** 1992. A comparative study of the ovarian proteins from two penaeid shrimps, *Penaeus semisulcatus* de Haan and *Penaeus vannamei* (Boone). *Comp. Biochem. Physiol.* 102. 483-490.
- Tsukimura B., D.W. Borst.** 1992. Regulation of Methyl Farnesol in the hemolymph and mandibular organ of the lobster, *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86: 297-303.
- Van Herp F.** 1992. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. *Inv. Reprod. Develop.* 22. 21-30.
- Venkatesh N., G. Nagaraja, G.S. Murthy.** 1995. Analysis of a conformation-specific epitope of the alpha subunit of human chorionic gonadotropin: Study using monoclonal antibody probes. *Current Science* 69. 48-56

- Vogel M.M., y D.W. Borst.** 1989. Spider crab yolk protein: Molecular characterization and the effect of methyl farnesoate (MF) on its hemolymph level. *Am. Zool.* 29. 65-69.
- Wilder M.N., T. Okumura, K. Aida, I. Hanyu.** 1990. Ecdysteroid Fluctuations during embryogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen Comp. Endocr.* 80. 93-100.
- Yano I., B. Tsukimura, J. Sweeny, J. Wyban.** 1988. Induced ovarian maturation of *P. vannamei* by implantation of lobster ganglion. *Journal of the World Aquaculture Society.* 19:204-209.
- Yano I., R.A. Kanna, R.N. Oyama, y J. Wyban.** 1988. Induced ovarian maturation of *P. vannamei* by injection of lobster ganglion extract. *Marine Biology* 97:171-175.
- Yano I.** 1990. Brain action in the control of ovarian maturation in penaeid shrimp. *World aquaculture* 90. 76-80.
- Yano I., y J.A. Wyban.** 1992. Induced ovarian maturation of *P.vannamei* by injection of lobster brain extract. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 21, 1-7.
- Yoshioka K., Iwamura S., Kamomae H.** 1995. Application of anti-bovine CD2 monoclonal antibody to the rosette inhibition test for detection of early pregnancy factor in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 57. 721-725.