



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y
CIENCIAS DEL MAR

ACUICULTURA



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

“La prueba de ELISA como técnica para
el estudio de la fisiología de la
reproducción en crustáceos”

TESIS DE GRADO
Previa obtención del Título de:
Acuicultor

Presentada por:
JULIA NIETO WIGBY

GUAYAQUIL - ECUADOR
1995

AGRADECIMIENTO



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Deseo hacer extensivo mi agradecimiento al M.Sc. Yoram Soroka y Prof. Yoram Milner del Departamento de Bioquímica de la Universidad Hebrea de Jerusalen (Israel) y al Dr. Amir Sagi de la Universidad Ben-Gurion (Israel) por el tiempo y aporte dedicado a esta tesis.

Igualmente quisiera agradecer al Dr. Jorge Calderón, director de mi tesis, quien durante el desarrollo de la misma me demostró que frente a los problemas uno no debe desalentarse sino más bien fortalecerse; y quién como profesor me ha enseñado mucho más de lo que se puede aprender en un salón de clases.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas le debo la oportunidad de haber podido realizar un entrenamiento en la Universidad Hebrea de Jerusalen donde se desarrolló gran parte de mi tesis.

y finalmente, a mis padres, quienes siempre incentivaron en mí la búsqueda de la verdad y me apoyaron en alcanzar mis ideales.

DEDICATORIA



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

A mis padres

DECLARATORIA EXPRESA



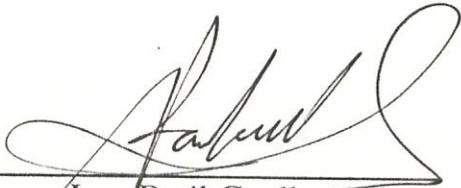
BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

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

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

Julia Nieto Wigby

Julia Nieto Wigby



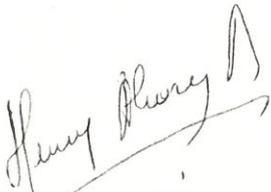
Ing. Raúl Coello
Presidente Tribunal



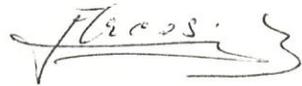
Dr. Jorge Calderón
Director Tesis



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA



Ae. Henry Alvarez
Miembro Principal



M.Sc. Fernando Arcos
Miembro Principal

RESUMEN



Con el fin de determinar el potencial uso de la prueba del Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) en el estudio de la reproducción de crustáceos, se estableció la técnica y probó su eficiencia.

Se produjo un anticuerpo policlonal contra vitelogenina (vt)165 de *Macrobrachium rosenbergii*. Se probó la especificidad del anticuerpo ((vt)) en ovarios y hemolinfa de hembras, y en hemolinfa de machos *Macrobrachium rosenbergii*, mediante la técnica de inmunoblot. Posteriormente, se establecieron los niveles de vitelogenina en la hemolinfa durante el ciclo de maduración, estandarizando el método de ELISA.

Primeramente, el ELISA fue utilizado para determinar la variación en los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras *Macrobrachium rosenbergii* pre-vitelogénicas en un periodo de 48 horas. Los niveles de vitelogenina se mantuvieron dentro de los niveles considerados pre-vitelogénicos (2.500 - 4.000 $\mu\text{g/ml}$).

La eficiencia del ELISA en la determinación del estado de madurez fue comparado con la observación macroscópica. El 21,4% de los casos determinados macroscópicamente mostraron niveles superiores a 4.000 μg de vitelogenina/ml, los cuales son considerados como estadios vitelogénicos.

Posteriormente, el método fue utilizado para verificar el efecto de una inyección de 6.8 ng de farnesoato de metilo (potencial estimulante de la maduración) sobre los niveles de vitelogenina en hembras pre vitelogénicas *Macrobrachium rosenbergii*. No se observó una variación anormal en los niveles de vitelogenina de la hemolinfa, durante las 48 horas posteriores al tratamiento.



INDICE GENERAL

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

RESUMEN.....	VI
INDICE GENERAL.....	VIII
INDICE DE ABREVIATURAS.....	X
INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE TABLAS.....	XI
INTRODUCCION.....	12
I. ANTECEDENTES.....	15
1.1. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).....	15
1.1.1. Anticuerpos.....	17
1.2. Generalidades de la vitelogenesis.....	19
1.2.1. Niveles de vitelogenina en la hemolinfa.....	21
1.3. Procesos hormonales que regulan la vitelogenesis.....	23
1.4. Farnesoato de metilo.....	27
1.4.1. Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre el órgano mandibular.....	28
1.5. Aspectos generales del <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	30
II. MATERIALES Y METODOS.....	31
2.1. Purificación de vitelina y producción de un anticuerpo policlonal contra vitelogenina.....	31
2.2. Prueba de especificidad del anticuerpo.....	33

2.3. Animales.....	33
2.4. Toma de muestra de hemolinfa.....	34
2.5. Niveles de vitelogenina en hembras en estadio previtelogénico y vitelogénico.....	35
2.6. Tratamiento con farnesoato de metilo.....	35
2.7. Determinación de vitelogenina.....	37
III. RESULTADOS.....	39
3.1. Producción y especificidad del anticuerpo policlonal contra vitelogenina.....	39
3.2. Niveles de vitelogenina en la hemolinfa.....	39
3.3. Comparación entre la observación externa del estadio de madurez y la determinación de vitelogenina por el método de ELISA.....	41
3.4. Comportamiento de los niveles de vitelogenina posterior a una inyección con farnesoato de metilo.....	42
IV DISCUSION.....	46
4.1. Método de ELISA para la determinación de vt vg.....	46
4.2. Tratamiento con 6,8 ng farnesoato de metilo.....	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	56



BIBLIOTECA
FAC. ICS.
MARITIMA

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Descripción secuencial del procedimiento de ELISA	16
Figura 1.2 Configuración de una molécula de anticuerpo	18
Figura 1.3 Organos que conforman el sistema endócrino en el camarón	23
Figura 1.4 Glándulas endócrinas involucradas en la reproducción	26
Figura 1.5 Localización del órgano mandibular	28
Figura 1.6 Anatomía externa de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	30
Figura 3.1 Niveles de vitelogenina en hemolinfa de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	40
Figura 3.2 Niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras en estadio 0 de maduración determinado macroscópicamente	42
Figura 3.3 Variación en niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras tratadas con una dosis de farnesoato de metilo	44
Figura 3.4 Niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras tratadas con farnesoato de metilo	45

INDICE DE TABLAS

Tabla I Niveles de vitelogenina en la hemolinfa de algunos crustáceos	22
Tabla II Niveles de farnesoato de metilo en la hemolinfa en algunas especies de crustáceos	29
Tabla III Distribución del número de hembras por tratamiento y ensayo	36
Tabla IV Fluctuaciones de los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> durante el ciclo de maduración	41
Tabla V Promedio de los niveles de vitelogenina encontrados en la hemolinfa de hembras previtelogénicas y después de el tratamiento con $6,8 \mu$ farnesoato de metilo o control (aceite)	43

INDICE DE ABREVIATURAS

(vt)	Anticuerpo contra vitelogenina
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FM	Farnesoato de metilo
HEV	Hormona estimuladora de la vitelogénesis
HIG	Hormona inhibidora de la gónada
HJ	Hormona juvenil ("Juvenile Hormone")
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	kilodaltones
ng	nanogramos
µg	microgramos
µl	microlitros
mg	miligramos
ml	mililitro
OM	Organo manbidular
PBS	Phosphate buffer saline
PBSM	Phosphate buffer saline ajustado a la osmolaridad de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
PBS(t)	Phosphate buffer saline con 0,1% tween
rpm	revoluciones por minutos
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
vg	Vitelogenina
vt	Vitelina



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

INTRODUCCION



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

La única técnica utilizada para inducir la maduración precoz de crustáceos es la ablación del pedúnculo ocular. Esta técnica compromete la extirpación de órganos neurosecretores (glándula sinusal, médula terminalis y órgano-x) localizados en el pedúnculo ocular, los cuales, a más de estar implicados en la inhibición de la maduración, juegan un papel importante en la fisiología y procesos metabólicos del camarón (muda, adaptación cromática, metabolismo de glicógeno y lípidos, balance iónico, muda, crecimiento, regeneración, entre otros (Beltz, 1988). Por ende, la ablación del pedúnculo ocular resulta en un desbalance hormonal y fisiológico. Igualmente, el animal sufre un desgaste energético debido a la incapacidad de detener el proceso de maduración. Las consecuencias de éstos estados son 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).

Es evidente que resulta necesario hallar otro método de inducción a la maduración que no comprometa la integridad del animal y que nos permita tener un control sobre la calidad, número, y tiempo de maduración desove. Este objetivo supone una manipulación a nivel endócrino, campo que aún no ha sido develado completamente.

Con el fin de controlar y manipular la vitelogénesis es necesario primeramente, conocer los mecanismos involucrados en su inicio, desarrollo y terminación. Aún después de tres décadas de investigación en la maduración de camarones, y de una década y media de trabajo, el conocimiento de la reproducción es aún limitado (Ogle, 1992).

Con la introducción de técnicas inmunoquímicas humanas adaptadas al estudio de camarones, se ha abierto la puerta a un sinnúmero de metodologías con gran potencial investigativo. Una de estas técnicas es el ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), el cual utiliza anticuerpos marcados para la identificación y cuantificación de antígenos (bacterias, virus, proteínas). Es un método específico, sensible y confiable que requiere de poco equipo, y cuyos reactivos críticos se encuentran ampliamente disponibles. En la actualidad esta técnica está siendo utilizada para el diagnóstico de enfermedades y estudios relacionados a la fisiología de camarones.

Los estudios hasta hoy realizados han sido orientados hacia la comprensión de la fisiología de la maduración. Se han logrado grandes avances en el entendimiento de algunos aspectos básicos relacionados a la vitelogénesis, pero aún no se ha podido encontrar un método que sustituya a la ablación. Una alternativa, es la utilización de factores activos (sustancias estimulantes) con capacidad de inducir la maduración; estos serían suministrados (inyecciones, vía alimento, implantes subcutáneos) al animal según los requerimientos de producción.

Se conoce de la existencia de hormonas inhibitoras y estimuladoras pero estas no han podido ser identificadas químicamente ni tampoco su sitio

de producción. Por otro lado, se han identificado algunas proteínas del camarón que podrían ejercer alguna acción sobre la maduración, pero no se ha dilucidado aún su función específica.

Estudios comparativos entre insectos y crustáceos han demostrado que existen similitudes endocrinológicas entre estas dos clases (ej.: los ecdysteroides en ambos están involucrados en la muda). Las hormonas juveniles juegan un importante papel en la reproducción de los insectos. Los crustáceos presentan en su hemolinfa un producto similar en estructura a las hormonas juveniles de los insectos, llamado farnesoato de metilo (FM) (Schneiderman y Gilbert, 1958). Este producto se presenta como potencial estimulante del ciclo vitelogénico.

Este trabajo tiene como objetivo verificar la eficiencia de una técnica de inmunodiagnóstico (ELISA) en la búsqueda de la comprensión de la fisiología por medio de la determinación del efecto de una inyección de farnesoato de metilo sobre los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras previtelogénicas de *Macrobrachium rosenbergii*.

CAPITULO I



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

ANTECEDENTES

1.1 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

El Ensayo Inmunoenzimático es un procedimiento de inmunodetección cuantitativo y cualitativo utilizado con éxito en la investigación. En acuicultura ha sido aplicado para la inmunodetección de patógenos (moluscos y crustáceos) y en estudios endocrinológicos (crustáceos) para la identificación y cuantificación de vitelogenina (Derelle *et al.*, 1986; Quackenbush, 1989a; Okumura *et al.*, 1992), hormona dispersante del pigmento negro (Quackenbush y Fingerman, 1985) y hormona hiperglicémica (Kallen y Meusy, 1989).

El método se basa en el uso de anticuerpos mono o policlonales, los cuales pueden reconocer al antígeno de interés en una mezcla no purificada de antígenos. El proceso de determinación involucra el uso de una serie de anticuerpos los cuales forman un complejo de antígeno-anticuerpo.1-anticuerpo.2-enzima-sustrato.

En principio, el método de funcionamiento es el siguiente: la mezcla de antígenos es adherida a una fase sólida (fondo de la celda)(Fig 1.1.a), ésta es luego bloqueada para evitar la

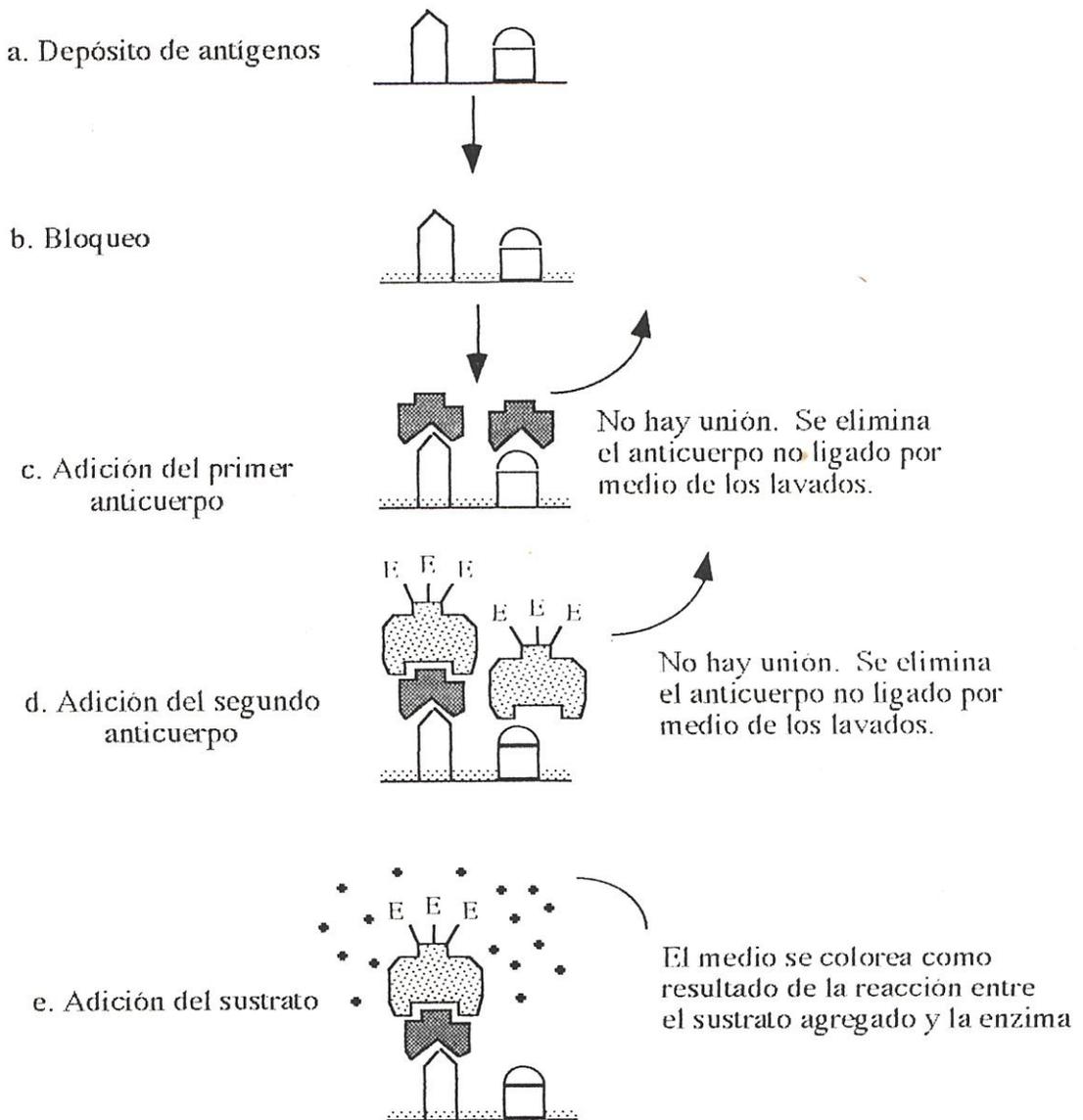


Figura 1.1. Descripción secuencial del procedimiento de ELISA.

adhesión directa del primer anticuerpo a la celda (Fig 1.1.b); posteriormente se adiciona el anticuerpo que reconoce al antígeno de interés (primer anticuerpo) (Fig 1.1.c). Un segundo anticuerpo marcado (ligado con una enzima) es agregado y éste reconocerá al primer anticuerpo (Fig 1.1.d).

Finalmente un sustrato se agrega a la celda (Fig 1.1.e). La reacción entre la enzima y el sustrato resulta en un cambio de color. La intensidad del color (grado de reacción) es directamente proporcional a la cantidad del antígeno en la celda. La intensidad del color es leída en un espectrofotómetro, obteniendo resultados en unidades de densidad óptica. Los resultados son interpolados en la curva de estandarización, la cual ha sido sujeta al mismo proceso que las muestras.

El ELISA ha demostrado ser una herramienta efectiva en la investigación endocrinológica debido a su sensibilidad en la determinación de concentraciones muy pequeñas de la sustancia de interés. Adicionalmente, es un método que no requiere de grandes cantidades de muestra ni reactivos, además de no utilizar materiales radioactivos (Derelle *et al.*, 1986).

1.1.1. Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas formadas por un huésped frente a un agente extraño en su cuerpo; estas proteínas circulan por la sangre y tienen la capacidad de ligarse específicamente al antígeno que los formó.

Estructuralmente, están conformados por cuatro cadenas de polipéptidos; dos copias idénticas de cadena pesada y dos copias idénticas de cadena ligera, otorgándole una configuración en "Y". Los anticuerpos se dividen según el



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

número de unidades “Y” que contenga y el tipo de cadena polipeptídica. El anticuerpo tipo IgG es aquel que solo presenta una unidad “Y” y es el más abundante en el plasma.

Los IgG tienen una porción constante formada por dos cadenas peptídicas pesadas, y dos porciones variables formadas por una cadena ligera y una pesada (Figura 1.2.). La región variable es el sitio donde se ligará el antígeno a ser reconocido.

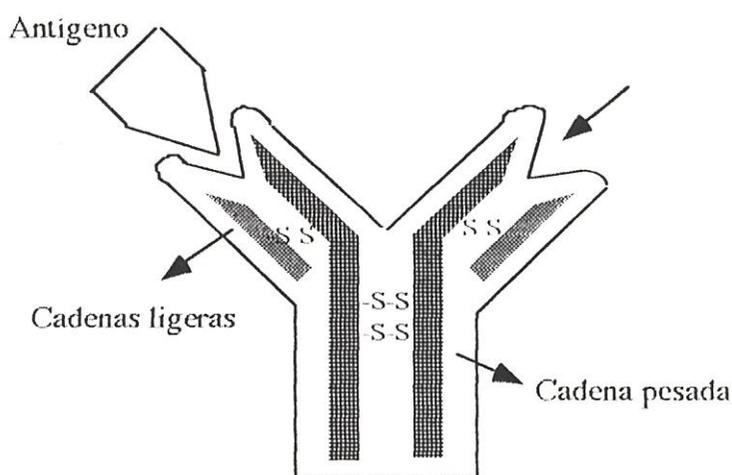


Figura 1.2. Configuración de una molécula del anticuerpo IgG.

La producción de anticuerpos es el resultado de la puesta en marcha del mecanismo de defensa de organismos superiores o de inmunizaciones con agentes extraños. Según la especificidad del anticuerpo podemos tener policlonales y monoclonales.

Los anticuerpos policlonales son el resultado de repetidas inmunizaciones (“boosters”) con un mismo antígeno; luego de lo cual el plasma sanguíneo contendrá anticuerpos contra ese antígeno.

Los anticuerpos policlonales son la consecuencia de la fusión de una célula inmortal (célula cancerosa) denominada mieloma, con células que porten el anticuerpo de nuestro interés. El resultado son células (hibridomas) que producen indefinidamente el anticuerpo en cultivos *in vitro*

1.2. Generalidades de la Vitelogénesis

La maduración en los crustáceos es un proceso que involucra una serie de estadios, los cuales han sido divididos en: Oogénesis (formación mitótica de los oocitos a partir del epitelio germinal del ovario; esta formación es continua a lo largo de la vida reproductiva de la hembra); vitelogénesis primaria (formación y lenta acumulación de proteínas de yema dentro de los oocitos); vitelogénesis secundaria (caracterizada por una deposición masiva de proteínas de yema acompañada de un incremento en el tamaño de los huevos), el proceso finalmente culmina con el desove.

La vitelogénesis *per se* agrupa a la vitelogénesis primaria y secundaria, y puede ser definida como el estadio de acumulación de proteínas de yema en el ovario. Las proteínas de yema son

el principal constituyente de oocitos maduros, y está compuesta por proteínas, lípidos, azúcares y esteroides (Wallace *et al.*, 1967; Adiyodi, 1985). Su función es la de proveer al embrión, durante su metamorfosis embrionica, de un medio de sustento independiente del organismo maternal (Adiyodi y Subramoniam, 1983).



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

El mayor componente de las proteínas de yema es la "vitelina" (vt). La vt es una lipoproteína de alta densidad, formada por lípidos (principalmente fosfolípidos), carbohidratos, carotenoides (responsables de la coloración) (Wallace *et al.*, 1967) y de pequeñas cantidades de proteínas, colesterol y triglicéridos. El origen de la vt es en algunas especies intra-oocítico y en otras puede además existir una fuente extra-oocítica en forma de precursor. Se ha demostrado que la vt es sintetizada en el ovario de *Uca pugilator* (Eastman-Reks y Fingerman, 1985), *Homarus americanus* (Dehn *et al.*, 1983), *Penaeus japonicus* (Yano y Chinzei 1987), *Penaeus vannamei* (Quackenbush, 1989a, 1992), *Penaeus semisulcatus* (Browdy *et al.*, 1990; Shafir *et al.*, 1992), crayfish *Procambarus clarkii* (Lui y O'Connor, 1976) y del cangrejo *Pachigrapsus crassipes* (Lui y O'Connor, 1977).

La vitelogenina (vg) es una proteína específica de hembras, la cual ha sido identificada en la hemolinfa de crustáceos durante la vitelogénesis y ausente en hembras inmaduras y machos (Kerr, 1969; Wolin *et al.*, 1973; Fyfee y O'Connor, 1974;

Ferrero *et al.*, 1983; Tom *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1988; Lee y Puppione, 1988; Quackenbush, 1989a, 1989b). Es inmunquímicamente igual a la vitelina. Esta evidencia sugiere una relación entre las dos moléculas y propone a la vg como la fuente extra-ovárica de vitelina (Wallace *et al.*, 1967; Kerr, 1969; Meusy *et al.*, 1983; Durliat, 1984). Una prueba adicional de la contribución externa de vt al ovario es la actividad micropinocítica que puede ser observada en la membrana de los oocitos durante la maduración ovárica (Hinsch y Cone, 1969; Wollin *et al.*, 1973).

La vitelogenina es transportada vía hemolinfa al ovario para ser captada por los oocitos en desarrollo (micropinocitosis). Potenciales productores de vg son el hepatopáncreas (Quackenbush, 1989b), tejido adiposo (Tom *et al.*, 1987) y los hemocitos (Kerr, 1969).

1.2.1. Niveles de vitelogenina en la hemolinfa

Una vez que la vitelogenina fue identificada y propuesta como potencial precursor de la vitelina, se inició el estudio de los niveles de vg en la hemolinfa.

Se han desarrollado algunos métodos para la identificación y cuantificación de vitelina y vitelogenina, tales como el Radio inmunoensayo, Rastreo de Electroforetograma (Byard y Aiken, 1984), Inmunoensayo Enzimático

(ELISA) y Rocket Inmunolectroforesis (Shafir *et al*, 1992).

Los niveles circulantes de vitelogenina medidos hasta el momento

en algunos crustáceos se detallan en la Tabla I.

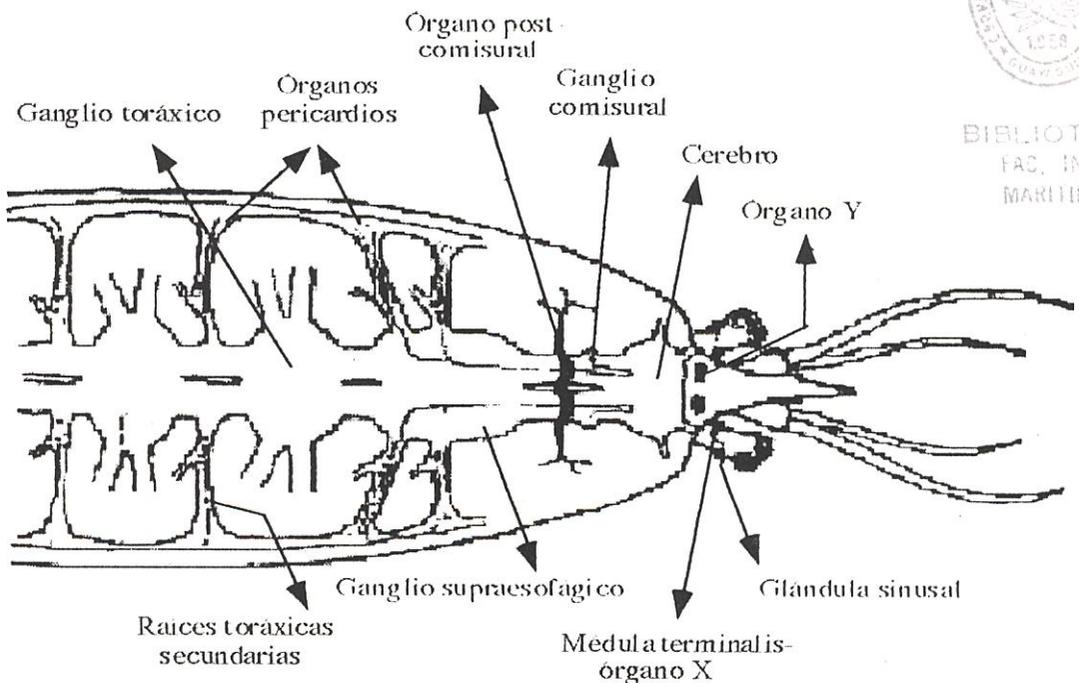
Tabla I Niveles de vitelogenina en la hemolinfa (ng/ml) en algunas especies de crustáceos.

Especie	min.	max.	Referencia
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	< 100 < 10	10.000 - 15.000 10.000	Derelle <i>et al</i> , 1986 Okumura <i>et al</i> , 1992
<i>Penaeus semisulcatus</i>	50	439	Shafir <i>et al</i> , 1989
<i>Homarus americanus</i>	< 100	10.000 - 12.000	Byard y Aiken, 1984
<i>Callinectes sapidus</i>	0	4.100 ± 2.000	Lee y Puppione, 1988

La concentración de vg en la hemolinfa no es constante durante la vida de la hembra. Hembras inmaduras no presentan vg en su hemolinfa. La concentración de vg en la hemolinfa está directamente correlacionada con el ciclo de vitelogénesis; niveles bajos o no detectables se presentan en la post muda, incrementándose a medida que la hembra madura. La vg alcanza su nivel máximo antes que el oocito alcance su máximo desarrollo (Quackenbush, 1989a); luego del desove los niveles retornan a cero.

1.3. Procesos Hormonales que regulan la Vitelogenésis

La vitelogenésis en los decápodos involucra dos fases, vitelogenésis primaria y secundaria. La ovogénesis (formación de oocitos en forma mitótica) y la vitelogenésis primaria (producción endógena de vitelina) son procesos continuos desde que el animal alcanza la madurez sexual y están parcialmente regulados por el sistema endócrino (Van Herp, 1992). La vitelogenésis secundaria ocurre durante la fase de maduración y su regulación está directamente afectada por el sistema endócrino.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Figura 1.3. Organos que conforman el sistema endócrino en el camarón.
Tomado de Beltz, 1988.

Los elementos que conforman el sistema endócrino de los decápodos son: 1) el sistema neurosecretor, formado por el complejo órgano X - glándula sinusal (pedúnculo ocular), células neurosecretoras del cerebro y sistema nervioso central, órganos post-comisurales y órganos pericardios. 2) el órgano Y, y 3) la glándula androgénica (solamente en machos) (Adiyodi, 1985) (Figura 1.3). El sistema endócrino controla los cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos asociados, entre otros, con los procesos de crecimiento y reproducción.

La regulación de la reproducción es lograda a través de acciones antagónicas de algunos factores. La reproducción y el crecimiento son procesos alternados, cuya ocurrencia está determinada por la presencia o ausencia de hormonas estimuladoras e inhibidoras específicas. Cuando los niveles de la hormona inhibidora de la muda y la estimuladora de la maduración son bajos, y la hormona estimuladora de la muda e inhibidora de la maduración son altos, se da inicio al proceso de muda somática. Cuando las relaciones se invierten, ocurre la maduración.

La inhibición de la vitelogénesis es mediada por la presencia de la hormona inhibidora de la gónada (HIG), la cual es producida y almacenada en el pedúnculo ocular; su acción fue descubierta por Panouse (1943), quien demostró que la extirpación del pedúnculo ocular resultaba en la maduración precoz de los

ovarios. La HIG es sintetizada por la glándula sinusal y almacenada en el órgano x para su posterior liberación al sistema circulatorio. La HIG es responsable de la diapausa del ciclo reproductivo; su modo de acción es aún desconocida. Se ha demostrado que inhibe la unión de la vitelogenina a la membrana de los oocitos (Jugan y Soyez, 1985) regulando de esta manera la endocitosis oocítica (Schade y Schivers, 1980).

La existencia de una hormona estimuladora de la vitelogénesis (HEV) ha sido propuesta. Las evidencias sugieren al ganglio torácico y al cerebro como fuentes de la HEV (Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Adiyodi, 1985). La implantación del ganglio torácico induce a la maduración y desove de *P. vannamei* (Yano *et al.*, 1988). Estudios recientes indican que en el período de diapausa genital, extractos del ganglio torácico de hembras activas anulan el efecto de la HIV (Payen, 1986). Se ha sugerido también al ovario como fuente de una hormona estimuladora de la vitelogenina ovárica (Meusy y Charniaux-Cotton, 1984). El órgano mandibular y su producto de secreción, farnesoato de metilo, han sido igualmente propuestos como factores estimuladores de la maduración (Laufer *et al.*, 1987; Landau *et al.*, 1989; Vogel y Borst, 1989). Los mecanismos de acción hasta hoy conocidos se detallan en la Figura 1.4.

A pesar de los estudios hasta hoy realizados, aún existen muchas dudas por dilucidarse en la identificación de las "rutas

hormonales” y en la “identificación de los factores involucrados en la maduración”.

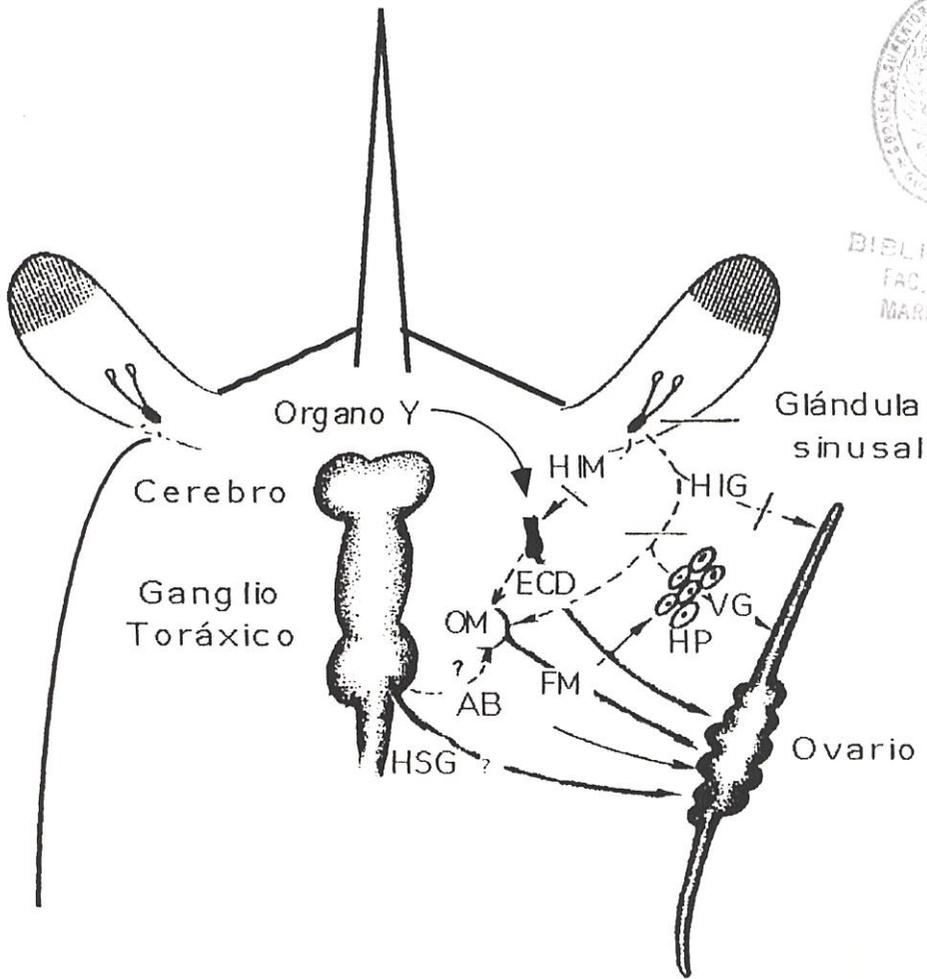


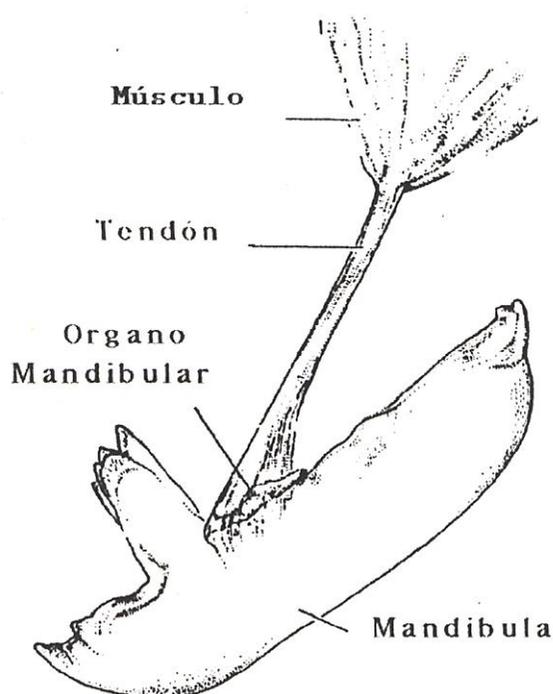
Figura 1.4. Las principales glándulas endocrinas de crustáceos superiores y sus tejidos objetivo involucrados en la reproducción de hembras. Los efectos estimuladores están indicados con líneas sólidas y flechas. Las interacciones inhibitorias están indicadas con líneas entrecortadas y flechas. Las líneas entrecortadas con barras cruzadas representan la liberación de inhibición como resultado de la ablación del pedúnculo ocular. Modificado de Laufer *et al.*, 1993.

1.4. Farnesoato de Metilo

Los "juvenile hormones" (HJ) son compuestos de origen lipoprotéico que se encuentran presentes en los insectos y que cumplen una función esencial en su crecimiento y reproducción. El farnesoato de metilo (FM) presente en los crustáceos, es la forma no oxidada de la hormona juvenil de los insectos, HJ III. En 1958, Schneiderman y Gilbert dieron las primeras indicaciones de que sustancias con actividad similar a las hormonas juveniles (HJ) de los insectos existían en los crustáceos. Basados en la similitud de la estructura química y otros estudios comparativos con insectos se consideró al FM como un factor potencial en la maduración de los crustáceos.

En 1968, Le Roux describió el órgano mandibular (OM) en crustáceos, como un órgano pareado con aspecto glandular localizado en la base del tendón de cada mandíbula (Figura 1.5). Cultivos *in vitro* de éste órgano resultaron en la secreción de un producto similar a las hormonas juveniles en insectos, el ácido HJ III (Laufer *et al.*, 1987) y por lo tanto se concluye que el OM es la fuente de FM en los crustáceos.

En 1980, Hinsch demostró que implantes de éste órgano en hembras inmaduras *Libinia emarginata* promovía el desarrollo de los ovarios, a más de observar actividad micropinocítica en los oocitos así como un aumento en la actividad de los organelos.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Figura 1.5. Localización del organo mandibular en la mandibula del *Macrobrachium rosenbergii*. Dibujo a partir de un macho disectado (90 g). Tomado de Sagi *et al.*, 1991.

1.4.1. Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre el Organo Mandibular

La ablación del pedúnculo ocular tiene un efecto estimulador en la tasa de síntesis de FM y afecta la estructura y dimensión del OM (Le Roux, 1983; Laufer *et al.*, 1986; Borst *et al.*, 1987; 1988; Landau *et al.*, 1989; Tsukimura y Borst, 1992; Borst y Laufer, 1990; Tsukimura *et al.*, 1993). Basados en los resultados realizados, existe una correlación entre la ablacion ocular y

el incremento de compuestos FM en la hemolinfa y OM, sugiriendo un papel regulador de algún factor del pedúnculo ocular sobre la síntesis de estos compuestos. Este hecho refuerza el rol propuesto para el FM como factor involucrado en la maduración.

El FM sintetizado por el OM es liberando a la hemolinfa (Laufer *et al.*, 1986; Tobe *et al.*, 1989; Sagi *et al.*, 1991). La presencia de FM en hemolinfa de crustáceos ha sido extensivamente confirmado (Laufer *et al.*, 1987; Borst y Tsukimura, 1992; Borst *et al.*, 1988) (Tabla II).

Tabla II Niveles de FM en la hemolinfa (ng/ml) en algunas especies de crustáceos.

Especie	min.	máx.	Promedio ng/ml	Referencia
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>				
hembra			24 ± 13,1	Sagi <i>et al.</i> , 1991
macho			17,3 ± 9,5	Sagi <i>et al.</i> , 1991
<i>Libinia emarginata</i>				
hembra			11	Laufer <i>et al.</i> , 1987
	0,4	65	9,3 ± 3,9	Borsty/Tsukimura, 1992
macho			24	Laufer <i>et al.</i> , 1987
	0,4	104	17,5 ± 3,6	Borsty/Tsukimura, 1992
<i>Homarus americanus</i>				
hembra	0,4	4		Borsty/Tsukimura, 1992
macho	0,5	21		Borsty/Tsukimura, 1992
<i>Scylla serrata</i>				
macho			21	Tobe <i>et al.</i> , 1989

La tasa de síntesis de FM por parte del OM está aparentemente relacionada con el estadio reproductivo (Laufer *et al.*, 1987; 1993; Borst *et al.*, 1987).

1.5. Aspectos Generales *Macrobrachium rosenbergii*

El camarón gigante de río *Macrobrachium rosenbergii*, es nativo de la región Indo-Pacífica. Es un camarón comercialmente producido en los países orientales y de gran importancia económica. Actualmente ha sido introducida en varios países del occidente con objetivos comerciales. Pudiendo alcanzar un peso entre 250 - 300 gramos dependiendo del sexo (Figura 1.6).

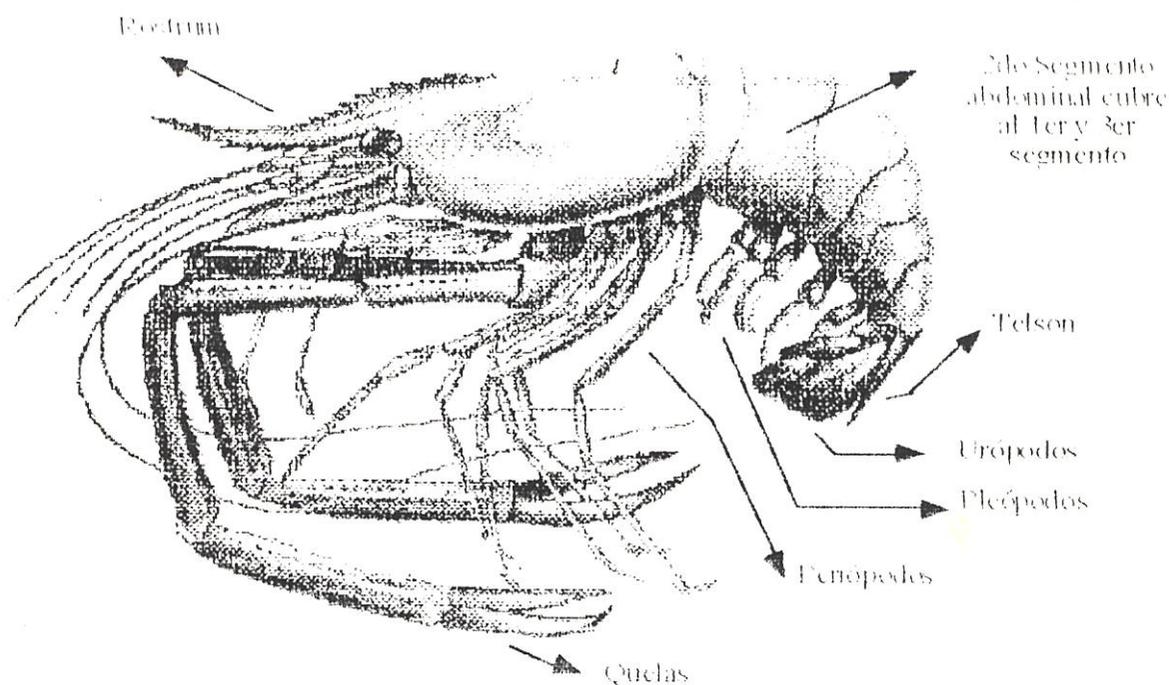


Figura 1.6. Anatomía externa de una hembra *Macrobrachium rosenbergii*.

CAPITULO II



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

MATERIALES Y METODOS

2.1 Purificación de vitelina y producción de un anticuerpo policlonal contra vitelogenina

Como fuente para la producción de un anticuerpo contra vitelogenina se utilizó el ovario maduro de *Macrobrachium rosenbergii*, el cual fue disectado, enjuagado en PBSM (PBS ajustado a la osmolaridad de *M. rosenbergii* agregando 3,16 g de NaCl por litro) y homogenizado en buffer frío (0°C) de carbonato de sodio (0,1M Na₂CO₃) con un homogenizador tipo Dounce con pistón de punta de vidrio, hasta que el homogenizado adquiriese fluidez. Se centrifugó el homogenizado a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en microtubos Eppendorf. Se determinó la concentración de proteína del sobrenadante recuperado según el método Lowry *et al* (1951) adaptado para lecturas en un espectrofotómetro de microplacas BIO-TECH MICROPLATE ELISA. Se diluyó el sobrenadante en buffer de denaturación para electroforesis (3:1 sobrenadante:buffer) y fue sometido a 100° C durante 5 minutos en baño María.

Se corrió 400 µg de proteína del sobrenadante en un gel de 10% de Acrilamida (Laemli, 1970) contra un marcador de alto peso molecular preteñidos (MW-SDS-70L SIGMA) durante 8 horas a

25 mAmp con corriente continua. Se transfirió el perfil de proteínas del gel de acrilamida a un papel de nitrocelulosa 5 μ por Western Blot (Sambrook *et al.*, 1989). Se tiñó el papel de nitrocelulosa con Ponceau (1:1.000 Ponceau:agua destilada) y se cortó la banda doble correspondiente a vitelina (96kDa). Se eliminó el Ponceau incubando la banda de papel en PBS hasta que el color desapareció (20 minutos). La tira de papel fue pulverizada en un mortero de porcelana con la ayuda de nitrógeno líquido. Se resuspendió el pulverizado en 4 ml de PBS y almacenó a -20°C para su posterior utilización.

Se inmunizó un conejo (raza neo Zelandes) con la proteína de vitelina preservada (96 kDa) por medio de inyecciones subcutáneas (4 ml) en el dorso del conejo, utilizando una jeringuilla descartable de 5 ml con aguja 26 1/2 G. Dos semanas después de la primera inyección, se realizó una segunda inmunización como refuerzo siguiendo el mismo procedimiento descrito para la primera inyección, y otra inmunización 2 semanas después de la segunda. Luego de seis semanas de la primera inyección, se desinfectó la oreja del conejo y se realizó un corte en la vena marginal (45 grados con respecto al eje de la vena) recolectando la sangre (10 ml) por goteo en un tubo de ensayo estéril. Se incubó la muestra a 30°C durante 2 horas. El coágulo fue removido, y el plasma fue centrifugado a 13.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante (anticuerpo policlonal denominado $\alpha(\text{vt})(165)$) fue colectado y almacenado a 80°C en alíquotas de 20 μl .

2.2 Prueba de especificidad del anticuerpo

Muestras de hemolinfa y ovario de hembras en estadio previtelogénico y vitelogénico y hemolinfa de macho, se corrieron en un gel de acrilamida de 10% (Laemli, 1970). El perfil de proteínas obtenidas fue transferido a un papel de nitrocelulosa (Sambrook *et. al*, 1989). Se incubó el papel durante una hora en solución bloqueadora (5% Marvel en PBS 0,1% Tween 20) a temperatura ambiente con ligera agitación. Se adicionó el anticuerpo a(vt) 165 a la solución bloqueadora diluido 1:1.000 y se incubó durante 12 horas en las mismas condiciones. Posteriormente se realizaron cinco lavados con PBS cada uno de 5 minutos de duración. Se incubó el papel con Protein A marcado con Iodo radioactivo 125 (segundo anticuerpo) diluido 1:4.000 en la solución bloqueadora durante una hora y media. Se enjuagó nuevamente el papel cinco veces durante cinco minutos con PBS 0,1% Tween 20. Se dejó secar el papel a temperatura ambiente y se expuso a una película de rayos-x durante dos días a -80°C dentro de un cassette. Se reveló la película en un Photorevealer automático KODAK.

2.3 Animales

Hembras adultas *Macrobrachium rosenbergii* fueron obtenidas de estanques de tierra del Kibbutz Kfar Rupin (Israel) y transportadas al área de mantenimiento de la Universidad

Hebrea de Jerusalén en Armon Hanatsiv. Fueron mantenidas en tanques plásticos rectangulares (2 toneladas) con sistema recirculante provistos de biofiltros de grava. La temperatura fue mantenida entre 22 y 25 °C utilizando calentadores y se suministró aireación constante. Se las alimentó con pescado y *Daphnia sp.* congelada, una vez al día.

Transcurrido un mes de aclimatación en la estación de mantenimiento, se seleccionaron las hembras que presentaban ovarios pre vitelogénicos de acuerdo con el criterio descrito por Ra'anán y Sagi (1985). Fueron llevadas al laboratorio de Bioquímica en la Universidad Hebrea y colocadas individualmente en fundas de malla (36,5 cm x 20 cm x 20 cm) codificadas y colocadas en acuarios (37,5 cm x 38,5 cm x 100 cm). Cada acuario estaba equipado con un biofiltro, calentador, piedra difusora y cubierta plástica negra. La temperatura se mantuvo entre 25 - 28 °C. Una dieta compuesta de *Daphnia sp.* y pescado congelado fue suministrada diariamente. El alimento sobrante y los detritus fueron removidos cada mañana. Los animales fueron mantenidos en este sistema mínimo una semana antes de ser utilizados.

2.4. Toma de muestra de hemolinfa

Las muestras de hemolinfa fueron tomadas de la región ventral entre el cuarto y quinto segmento abdominales. Antes de tomar la muestra, el área era secada; se realizó una punción a nivel



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

epidérmico con una aguja 22 1/2 estéril evitando dañar el cordón nervioso; la hemolinfa fue colectada con una micropipeta descartable (no se utilizó anticoagulante). Se colectó 10 µl de hemolinfa/animal/muestra. Las muestras fueron inmediatamente diluidas 1:100 en carbonato de sodio (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6 a 4 °C) y almacenadas a 20°C.

2.5. Niveles de vitelogenina en hembras en estadio pre-vitelogénico y vitelogénico

Se realizó un muestreo de hemolinfa en varias hembras que se encontraban en estadio pre-vitelogénico y vitelogénico. Se determinó el estadio según el método descrito por Ra'anan y Sagi (1985) para *Macrobrachium rosenbergii*.

Con el fin de definir la variación diaria de vitelogenina, se realizó un seguimiento durante 48 horas a un grupo de 10 hembras en estadio pre-vitelogénico. Los muestreos fueron realizados a las 0, 18, 24 y 48 horas después del primer muestreo.

2.6. Tratamiento con Farnesoato de Metilo (FM)

El curso de los niveles de vitelogenina, circulante en la hemolinfa, posterior a una dosis de FM fue estudiado en un grupo de 34 hembras pre-vitelogénicas *Macrobrachium rosenbergii* aclimatadas en acuarios en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad Hebrea de Jerusalén. Se

realizaron tres ensayos con un intervalo aproximado de tres semanas entre cada ensayo. Los tratamientos fueron distribuidos al azar entre las hembras que al momento del ensayo presentaban un ovario en estadio pre-vitelogénico. El número de hembras utilizadas para cada tratamiento se detalla en la tabla III..

Tabla III. Distribución del número de hembras por tratamiento y ensayo.

Ensayo	No. hembras/ tratamiento	No. hembras/ control
1	7	6
2	5	5
3	<u>6</u>	<u>5</u>
	18	16



BIBLIOTECA
IAC, ING,
MARITIMA

Cada ensayo inició con la determinación del estadio de madurez, consistencia del exoesqueleto (rechazo de animales blandos) y peso de cada hembra. Luego se tomó una muestra de hemolinfa y se dosificó según el tratamiento correspondiente.

El tratamiento consistió de una sola inyección con 6,8 ng FM/g de peso corporal a hembras en estadio pre-vitelogénico. El FM fue donado por Hans Laufer, Univ Connecticut, USA disuelto en etanol a una concentración 680 ng/ μ l. Para efectos del ensayo el FM fue diluido en aceite de oliva altamente refinado de baja acidez (O-1500 SIGMA) obteniéndose una concentración final de 6,8 ng/ μ l.

Se utilizó como control una inyección con aceite de oliva, altamente refinado de baja acidez (O 1500 SIGMA) conteniendo 1% etanol.

La dosis de tratamiento consistió en 1 $\mu\text{l/g}$ de peso corporal (control o tratamiento) y fue aplicado en la unión del segundo y tercer segmento abdominal (lateralmente) utilizando una jeringuilla Hamilton® (250 μl) con agujas descartables (22 1/2G). Todos los animales pertenecientes a un ensayo fueron inyectados el mismo día.

Luego de la inyección, los animales fueron devueltos a los acuarios. Muestreos de hemolinfa, monitoreo de temperatura, muda y estadio de madurez fueron realizados 18, 24 y 48 horas después de la inyección.

2.7 Determinación de vitelogenina (vg)

Se determinó la concentración de vt-vg en la hemolinfa por medio del Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) en microplacas (96 celdas) utilizando la técnica modificada de Okumura *et al* (1992).

Las muestras de hemolinfa fueron nuevamente diluidas 1:100 en carbonato de sodio (0,1 M Na_2CO_3 , pH 9,6; 4 °C)(conc. final 1:10,000). Para la elaboración de la curva estándar se utilizó una solución stock de 5 ng de vitelina/ μl , y se prepararon soluciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ng/celda. Se colocó

100 μ l de muestra por celda. Las muestras se analizaron por triplicado. La placa conteniendo la curva estándar y muestras fueron incubados durante 12 horas (pH 9,6; 4 °C). Las celdas fueron lavadas 5 veces durante 5 minutos con tampón salino de fosfato 0,1% tween (PBS(t)) para eliminar las proteínas no adheridas. Las celdas fueron luego bloqueadas con Marvel 5% en PBS(t) durante una hora. El anticuerpo α (vt)165, fue diluido 1:1.000 en la solución de bloqueo y agregado e incubado por 2 horas. Se lavó las celdas 3 veces por 5 minutos con PBS(t); el segundo anticuerpo (fosfatasa alcalina cabra anti conejo, USB) diluido 1:1.000 en solución de bloqueo es adicionado e incubado durante 1 1/2 horas. Se agregó el sustrato p-nitrophenyl fosfato (PNPP, pH 9,6); la reacción entre la enzima y el sustrato resultó en una coloración amarilla del medio. La intensidad de la reacción fue leída espectrofotométricamente luego de 10 minutos a 650 nm en lector BIO-TEK MICROPLATE ELISA. La concentración de vg de la hemolinfa fue calculada en base a la curva estándar. Los resultados están dados en μ g vg / ml de hemolinfa.

CAPITULO III



INSTITUTO
Tecnológico
MARÍTIMA

RESULTADOS

3.1 Producción y Especificidad del anticuerpo policlonal contra vitelogenina.

Como resultado de la inmunización de un conejo con vitelina purificada de *Macrobrachium rosenbergii*, se obtuvo un anticuerpo policlonal contra vitelogenina y vitelina, el cual fue denominado $\alpha(vt)$ 165.

En una electroforesis SDS-PAGE de hemolinfa y ovario de hembras vitelogénicas y macho, se identificó a la vitelogenina como una banda de 205 kDa y a la vitelina como una banda de 107 kDa y otra doble banda de 81 y 91 kDa. Luego de transferir las proteínas del gel a una hoja de nitrocelulosa e incubar con el anticuerpo $\alpha(vt)$ 165, se comprobó por medio del método inmunoradiactivo, que el anticuerpo es específico a las proteínas correspondientes a la vitelina y vitelogenina, lo que nos permitió validar la especificidad del anticuerpo con el fin de proceder con la determinación de vitelogenina. No se observó ninguna reacción con la hemolinfa de machos.

3.2. Niveles de vitelogenina en la hemolinfa

Luego de realizar un seguimiento de los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de 10 hembras previtelogénicas durante 48

horas, se combinaron los datos, obteniéndose la curva (Fig. 3.1) que refleja el comportamiento de la concentración de vg. Estos resultados evidencian que en un periodo de 48 horas los niveles variaron entre 11,5% a 25%, pero se mantuvieron siempre dentro del rango correspondiente a un estadio pre-vitelogénico. Como resultado del muestreo de hemolinfa realizado en hembras de *Macrobrachium rosenbergii* en estadios vitelogénicos, se pudo caracterizar los niveles de vitelogenina durante el desarrollo gonadal (Tabla IV). Adicionalmente, el muestreo permitió establecer los límites y capacidad del método de ELISA para la determinación de vitelogenina en la hemolinfa, demostrando que la técnica puede cuantificar amplios rangos de vitelogenina.

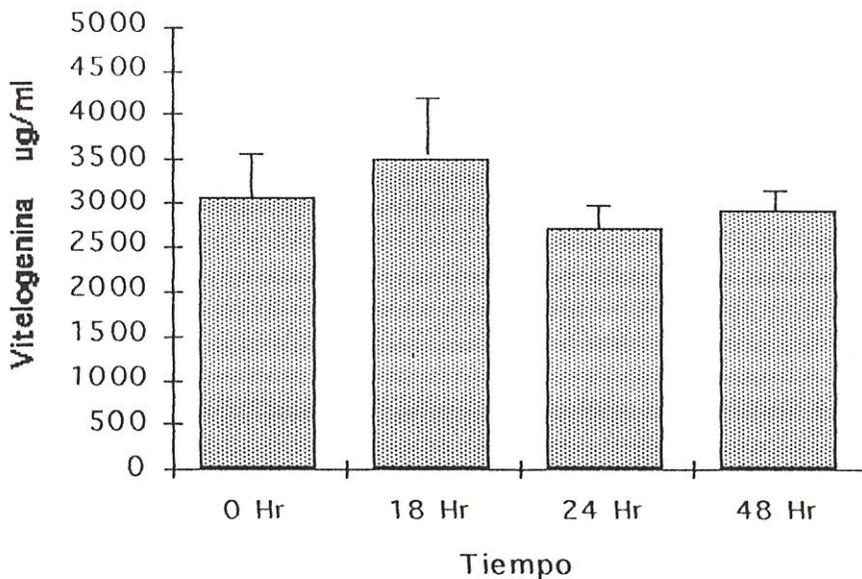


Figura 3.1 Niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras previtelogénicas *Macrobrachium rosenbergii* durante un período de 48 horas.

Tabla IV Fluctuaciones de los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de *Macrobrachium rosenbergii* durante el ciclo de maduración.

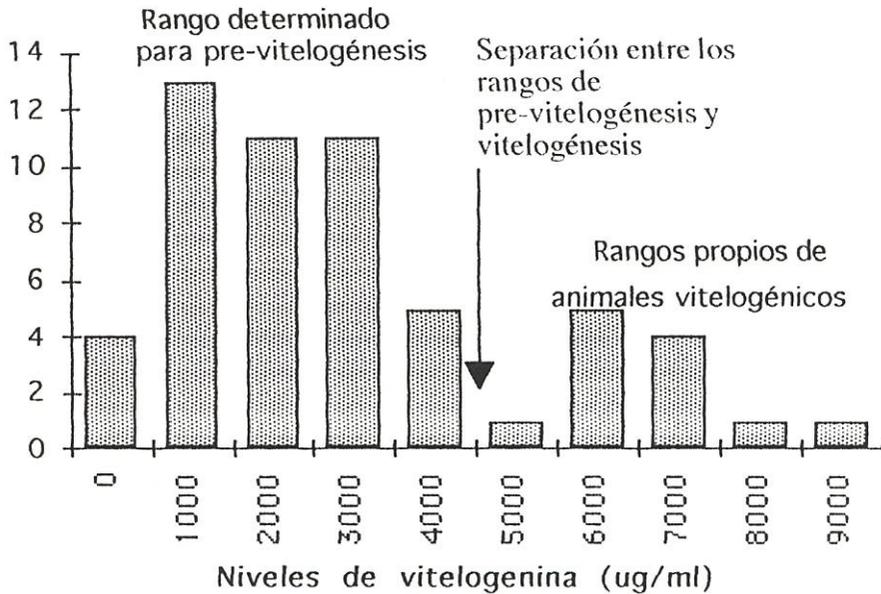
Estadio de Madurez	N	Concentración vitelogenina $\mu\text{g/ml}$
Post-muda	2	1.000
Pre-vitelogénesis	10	2.500 - 4.000
Vitelogénesis	5	4.000 - 8.000

Los niveles detectados en hembras post-muda (estadio previtelogénico) fueron menores de 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados para hembras en fase de intermuda (estadio previtelogénico), fue de 2.500 - 4.000 $\mu\text{g/ml}$. Una vez que un cambio en la apariencia externa del ovario era evidente (estadio vitelogénico) los niveles de vitelogenina incrementaron entre 4.000 - 8.000 $\mu\text{g/ml}$. Grupos de hembras recientemente mudadas y en estadio intermuda presentaron diferentes concentraciones de vg apesar de que ambos mostraban ovarios previtelogénicos. Hembras vitelogénicas presentan un amplio rango de concentración debido a que se agrupó varios estadios de ovarios en desarrollo (I, II, III y IV) en este grupo.

3.3 Comparación entre la observación externa del estadio de madurez y la determinación de vitelogenina por el método de ELISA

Los niveles de vitelogenina determinados para un estadio 0 identificado por observación externa variaron ampliamente,

obteniéndose niveles que sobrepasan el límite definido para un estadio previtelogénico (Fig. 3.2).



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Figura 3.2. Gráfico de frecuencia mostrando los niveles de vitelogenina obtenidos para estadios 0 clasificados por observación externa. Los obtenidos no corresponden en todos los casos a niveles característicos de animales previtelogénicos.

Nótese el caso que presenta un nivel de 7.000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de vg, a pesar de encontrarse en estadio 0 según observación externa. En general de todos los casos observados 21,4% mostraron niveles superiores a los 4.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vg, lo que es considerado como un estadio vitelogénico.

3.4. Comportamiento de los niveles de vitelogenina posterior a una inyección de FM

Un total de 18 hembras previtelogénicas *Macrobrachium rosenbergii* divididas en tres ensayos fueron inyectadas con 6,8 ng

de MF y 16 con aceite (control) por gramo de animal. Se tomaron muestras de hemolinfa antes de inyectar y 18, 24, 48 horas después. Las concentraciones de vitelogenina fueron determinadas por el método de ELISA y la agrupación de los resultados obtenidos en los tres ensayos se presentan en el tabla V.

Tabla V. Promedio de los niveles de vitelogenina encontrados en la hemolinfa de hembras previtelogénicas antes y después de el tratamiento con 6,8 μ MF o control (aceite).

Nivel de vitelogenina en hemolinfa $\mu\text{g/ml}$ por tratamiento				
Tiempo	N	MF 6,8	N	Control
Antes inyección	18	3.215 \pm 1.562	16	2.945 \pm 1.649
18 horas después	18	3.232 \pm 1.520	16	3.502 \pm 1.598
24 horas después	18	3.175 \pm 1.525	15	2.730 \pm 1.644
48 horas después	14	2.890 \pm 1.451	14	3.138 \pm 1.162

La supervivencia no se vió afectada por el tratamiento o la manipulación durante la toma de muestras. Los datos presentados en la tabla 3.2 y los generados durante el muestreo de las hembras previtelogénicas son presentados en la figura 3.3.

Una sola inyección con MF (concentración 6,8 ng por gr de peso del animal) realizada en hembras previtelogénicas *Macrobrachium rosenbergii* comparativamente no alteró los niveles de vitelogenina en la hemolinfa 18, 24 y 48 horas después del tratamiento, al ser contrastado con los niveles previos a la inyección, y a el efecto con la dosis de control y

curva del seguimiento (comportamiento de los niveles de vitelogenina) de la hemolinfa sin tratamiento. Las concentraciones de vitelogenina de los animales tratados con hormona, control y sin tratamiento siguieron la misma tendencia, y se mantuvieron durante las 48 horas del ensayo dentro de los límites establecidos para hembras previtelogénicas. Adicionalmente no se observó ningún cambio en el desarrollo ovárico (observación externa) posterior a los tratamientos con MF o control.

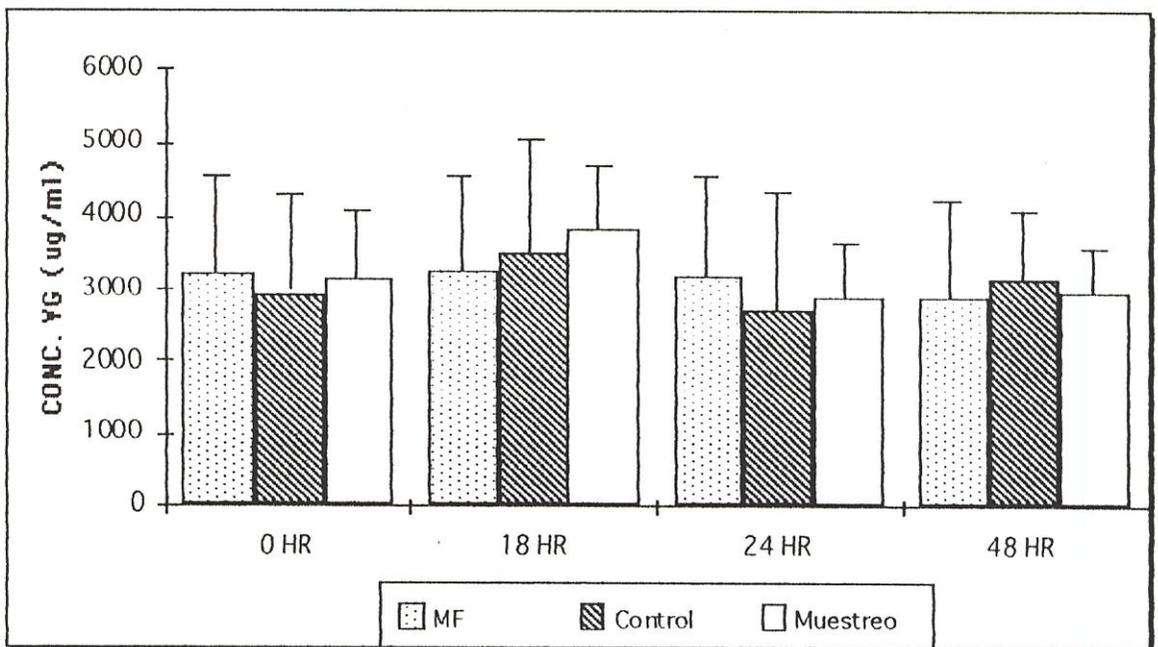
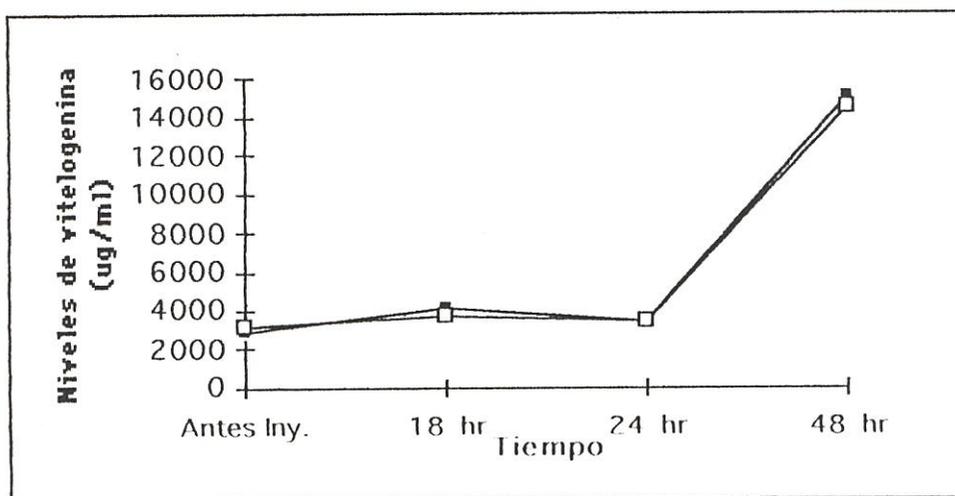


Figura 3.3 Variación en los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras previtelogénicas *Macrobrachium rosenbergii* antes y después de una inyección con 6,8 ng MF, control (aceite acarreador) y muestreo de vitelogenina en animales no tratados.

Dos hembras tratadas con 6,8 MF si mostraron un cambio en los niveles de vitelogenina luego de 48 horas (Fig. 3.4). Los resultados de estas hembras no fueron incluidos en el promedio.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Figura 3.4 Curva de niveles de vitelogenina en la hemolinfa obtenida para dos hembras tratadas con 6,8 ng. La tendencia seguida hasta las 24 horas es similar a la del resto del grupo; a las 48 horas el nivel se dispara.

CAPITULO IV

DISCUSION

4.1.- Método de ELISA para determinación de vt-vg

El Ensayo de Inmunoenzimático (ELISA) ha sido adaptado para la determinación de los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de hembras *Macrobrachium rosenbergii*. En este estudio, los niveles de vitelogenina encontrados posterior a la muda fueron mínimos ($<1.000 \mu\text{g/ml}$) y se incrementaron en el estadio pre-vitelogénico a pesar de no mostrar cambios en la apariencia externa del ovario. Durante la etapa vitelogénica los niveles de vg en la hemolinfa se incrementaron hasta alcanzar $8.000 \mu\text{g/ml}$; durante la etapa vitelogénica tardía las concentraciones se mantuvieron o decrecieron; antes de la muda reproductiva los niveles caen drásticamente a cero (Derelle *et al.*, 1986; Okumura *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos durante el establecimiento de la técnica semejan a los presentados por Derelle *et al.* (1986) para *Macrobrachium rosenbergii* y Okumura *et al.* (1992) para *Macrobrachium nipponense*, donde los niveles de vitelogenina fueron medidos en hembras en estadios de maduración ovárica con referencia a los estadios de muda. En contraste, las concentraciones de vitelogenina para *Penaeus semisulcatus* de Haan (Shafir *et al.*, 1992) son considerablemente menores, presentándose el nivel

más alto ($562 \pm 410 \mu\text{g/ml}$) en oocitos de 250-350 micras. En general, un incremento en la concentración de vitelogenina en la hemolinfa ha sido reportado durante la vitelogenesis.

El método de ELISA a más de ser capaz de cuantificar niveles bajos ofrece un amplio rango de determinación. Es importante notar que el anticuerpo se conjuga a la vitelogenina (precursor de la vitelina en la hemolinfa) y vitelina (proteína de yema en el ovario) indiferentemente, debido a que ambos tienen dos subunidades de peso molecular muy similar (Derelle *et al.*, 1986).



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

El ELISA es una herramienta sofisticada de inmunodiagnos; su eficiencia está basada en el tipo de anticuerpo utilizado. “El anticuerpo es el componente crítico en los inmunoensayos, y un anticuerpo estandarizado con la especificidad y sensibilidad apropiada son requeridos para la interpretación consistente de los resultados” (Mialhe *et al.*, 1992). La variabilidad entre ensayos es debida, en parte, al tipo de anticuerpo utilizado: el anticuerpo policlonal es resultado de una respuesta individual frente a un antígeno. Si se prepara el mismo anticuerpo a partir de la respuesta inmunológica de otro individuo, existirá una variación entre los dos anticuerpos, dado por el aporte de anticuerpos propios independientes del antígeno introducido. Al utilizar anticuerpos monoclonales, se elimina la variación introducida por el individuo, ya que se producen poblaciones homogéneas de anticuerpos a partir de células denominadas

hibridomas. Los hibridomas resultan de la fusión de células secretoras con una línea celular con la capacidad de multiplicarse ilimitadamente. De esta forma tenemos células que producen el anticuerpo en forma homogénea e ilimitada.

El hecho de que se obtuvieron niveles elevados de vitelogenina en hembras que externamente presentaban un ovario vacío (pre-vitelogénico) puede explicarse por el hecho de que la determinación del estadio de madurez por observación externa no puede discernir entre animales recientemente desovados, en estado pre-vitelogénico y aquellos iniciando el ciclo.

La determinación de vitelogenina por el método de ELISA nos permite identificar con mayor precisión el estado de madurez. Los desoves generalmente no son completos, dejando un remanente en el ovario el cual es luego reabsorbido. La reabsorción se realiza eliminando a la hemolinfa el sobrante, el cual eleva la concentración de nuestro antígeno (vitelina) en la hemolinfa (Byard y Aiken, 1984). Este hecho nos permite diferenciar una hembra recientemente desovada de una en estado pre-vitelogénico. Podemos afirmar que la observación externa tiene un limitante en cuanto a la diferenciación de estos dos estados.

La elección del método a utilizarse depende de que tan específicos queremos o necesitamos ser. A nivel productivo (comercial) es evidente que no es relevante tal definición, pero a nivel investigativo si resulta importante. Una desventaja es

que los resultados del análisis se obtienen luego de 10 - 12 horas de la toma de muestra. Adicionalmente, el ELISA requiere para su uso de equipos y materiales que no se encuentran disponibles en todos los laboratorios. Una ventaja es que no está sujeto a apreciaciones personales, es imparcial a más de ser sensible.

Poco se conoce sobre la endocrinología involucrada en el proceso de maduración y resulta necesario detallar el ciclo para su conocimiento y posterior manipulación. Por medio de la determinación de vitelogenina podemos diferenciar un estadio desovado de uno pre-vitelogénico y en proceso de vitelogénesis.

El método de ELISA para la determinación de vitelogenina resulta útil como parámetro para verificar el efecto de un potencial estimulante sobre la maduración en vez de utilizar la observación externa. En especial si el agente estimulante a probar no ejerce una acción lo suficientemente fuerte como para producir un cambio en la apariencia externa del ovario.

Siendo la vitelogenina el precursor del mayor componente del ovario durante la maduración, resulta de gran ayuda el poder identificar y cuantificarla a partir de una mezcla heterogénea de antígenos. Estudios de los mecanismos vitelogénicos y hormonales requieren de una alta sensibilidad, y el hecho de poder reconocer al precursor de la vitelina, aún en pequeñas concentraciones, nos permite realizar estudios destinados a

identificar los sitios de producción o fuente, incrementando nuestro conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la producción de vitelogenina, y por ende de la actividad vitelogénica en hembras.

El ELISA es una técnica versátil la cual ha sido adaptada a varias investigaciones, entre los cuales tenemos estudios relacionados con la inmunocitoquímica de la hormona inhibidora de la vitelogenesis (Meusy *et al.*, 1987); para determinar la variación circadiana de la hormona hiperglicémica en la hemolinfa del crayfish (Kallen *et al.*, 1990); cuantificación de la hormona dispersante del pigmento (Quackenbush y Fingerman, 1985) y para determinar la síntesis de vitelogenina en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa *in vitro* e *in vivo*.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

4.2. Tratamiento con 6,8 ng FM

Una inyección con 6,8 ng/gr de farnesoato de metilo no tuvo efecto en los niveles de vitelogenina en la hemolinfa 48 horas después del tratamiento, cuando fue inyectado a hembras pre-vitelogénicas *Macrobrachium rosenbergii*. Los resultados de este estudio se muestran consistentes con los obtenidos por Tsukimura *et al.* (1993), quien no observó variación alguna en los niveles de vitelogenina en la hemolinfa de langostas pre-vitelogénicas *Homarus americanus* luego de una inyección de

50 μg de farnesoato de metilo. En este estudio, las hembras tratadas con 6,8 ng FM no mostraron cambios evidentes en los niveles de vitelogenina, mientras que 2 sí mostraron un cambio luego de 48 horas. Este último resultado no debe ser despreciado, debe ser tomado en consideración para futuras investigaciones concernientes al rol que FM desempeña en la reproducción.

Los resultados del presente estudio no son conclusivos. Solamente se ha probado una concentración de FM (6,8 ng FM por g de peso corporal). El hecho que las hembras tratadas no mostrasen ninguna variación en los niveles de vitelogenina luego del tratamiento puede ser atribuído a varias causas:

A. La dosis de FM inyectada fue demasiado baja o insuficiente y/o la tasa de liberación de FM del aceite acarreador al sistema es demasiado lenta. La cantidad de FM suministrada pudo ser insuficiente y liberada a una tasa demasiado lenta al sistema circulatorio para producir un efecto en los niveles de vitelogenina. El MF inyectado fue incluído en una gota de aceite en el músculo abdominal de la hembra. La hormona es lentamente liberada de la gota hacia el sistema circulatorio donde se liga a proteínas específicas de la hemolinfa para su transporte; el proceso de liberación de la gota de aceite pudo ser demasiado lenta para tener resultados en 48 horas; o en cantidades demasiado bajas para producir un efecto. Cantidades mayores de FM (ej: 68 ng) han demostrado tener

mejores efectos estimulantes en la síntesis de protefna en ovarios de *Macrobrachium rosenbergii* cultivados *in vitro* que con concentraciones bajas (6,8 ng) (Soroka *et al.*, 1993), $49 \pm 14\%$ y $40 \pm 15\%$ respectivamente; este efecto estimulador solamente fue observado en 40% de los casos.

B. Los niveles de FM circulantes eran eliminados del sistema por la acción de las esterazas antes de poder estimular el órgano objetivo o de acumularse en cantidades suficientes en la hemolinfa para producir un efecto. Borst y Tsukimura (1992) caracterizaron los niveles de FM en langostas y cangrejos (spider crab) encontrando que los niveles de FM pueden variar drásticamente en el mismo animal en un corto período de tiempo, lo que sugiere que la vida media del FM es corta, y por ende, puede ser rápidamente eliminado de la hemolinfa. Esta declaración es soportada por la existencia de la actividad de esterazas en el organismo, la cual está involucrada en la degradación catabólica del FM (Takac *et al.*, 1993). Si este es el caso, una segunda o sucesivas inyecciones de FM resultarían necesarias. En *Penaeus vannamei*, una sola inyección de FM (6,8 ng/g) permite a la hembra alcanzar el estadio I de maduración pero no a estadios sucesivos (comunicación personal), por lo tanto una segunda inyección de FM es requerida.

C. o, simplemente FM no juega un papel en la producción de vitelogenina, pero esta involucrado en procesos colaterales y/o

preparatorios tales como la predisposición del ovario a la incorporación de vitelogenina o producción de vitelina. El OM y su producto de secreción, FM, pueden jugar un rol distinto a la estimulación de la producción de vitelogenina durante la maduración ovárica. Se ha probado que el OM produce un cambio en la morfología del oocito cuando es implantado en *Libinia emarginata* inmaduras (Hinsch, 1980). Las hormonas juveniles activan la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase en el epitelio folicular del ovario, induciendo una reducción de la célula folicular facilitando la incorporación de vitelogeninas al oocito (Hlenchuk y Davey, 1985). FM ha demostrado estimular la síntesis de proteínas *in vitro* del ovario de *Macrobrachium rosenbergii* (Soroka *et al.*, 1993). El órgano-Y cuando es cultivado *in vitro* con el OM incrementa su tasa de secreción de 20-HE (Tamone y Chang, 1992).

Aún permanece oscuro como el órgano mandibular y su producto de secreción, farnesoato de metilo, contribuyen a la maduración óvarica y cuales son las sendas para llevar a cabo su objetivo, si juega un rol directo en tejidos objetivos o si está indirectamente involucrado en la maduración ovárica.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARTINA

BIBLIOGRAFIA

1. Adiyodi, R., 1985. Reproduction and its control. In *The Biology of Crustacea* (Edited by Bliss D.E. and Mantel L.H.), Vol 9, pp 147-217. Academic Press, New York.
2. Adiyodi, R and T. Subramoniam, 1983. Arthropoda-Crustacea. In *Reproductive Biology of Invertebrates* (Edited by Adiyodi K.G. and Adiyodi R.), pp 443-496. Wiley, New York.
3. Beltz, B.S., 1988. Crustacean Neurohormones. In: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. p 235-258. Alan R. Liss, Inc. New York.
4. Borst D.W. and B. Tsukimura, 1992. Methyl Farnesoate levels in Crustaceans. In *Insect Juvenile Hormone research*. B. Manchamp, F. Couillaud and J.C. Barh (eds.) Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 27-35.
5. Borst, D.W; H. Laufer; M. Landau; I.S. Chang; W.A.Hertz; F.C. Baker and D.A. Schooley, 1987. Methyl Farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. *Insect. Biochem.*, 17:1123-1127.
6. Borst, D.W.; M. Martin and I.S. Chang, 1988. Regulation of methyl farnesoate levels in hemolymph of *Homarus americanus*. *Am. Zool.* 28:83a.
7. Borst, D.W. and H. Laufer, 1990. Methyl Farnesoate, a JH-like compound in crustaceans. In *Recent Advances in Comparative Arthropod Morphology, Physiology, and Development: Morphogenic Hormones of Arthropods* (A.P. Gupta, Ed.), pp. 35-60. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NJ.
8. Borst, D.W. and B. Tsukimura, 1991. Quantification of methyl farnesoate levels in hemolymph by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.*, 545:74-78.
9. Browdy, C.; M. Fainzilber; M. Tom; Y. Loya and E. Lubzens, 1990. Vitellin synthesis relation to oogenesis in *in vitro* incubated

- ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *J. exp. Zool.*, 255: 205-215.
10. Byard E.H. and D.E. Aiken, 1984. The relationship between molting reproduction and a hemolymph Female-Specific Protein in the lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A(4): 749-757.
 11. Dehn P.F; D.E Aiken and S.L.Waddy, 1983. Aspects of vitellogenesis of the lobster, *Homarus americanus*. *Can. Tech. Rep. Fish Aqua. Sci.*, 1161:1-24.
 12. Derrelle, E; J. Grosclaude; J-J Meusy; H. Junera and M. Martin, 1986. Elisa Titration of Vitellogenin and Vitellin in the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B (1): 1-4.
 13. Durliat M., 1984. Occurrence of plasma proteins in ovary and egg extracts from *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B:745-753.
 14. Eastman-Reks, S. and M. Fingerman, 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic amp on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A:679-684.
 15. Eastman-Reks, S. and M. Fingerman, 1985. *In vitro* synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *J. exp. Zool.* 233:111-116.
 16. Ferrero, F.A.; G. Grazziosi; R. Marzario and A. Mosco, 1983. Protein pattern variability of the hemolymph of mantis shrimp, *Squilla mantis* L. (Crustacea, Stomatopoda). *J. Exp. Zool.*, 225: 341-345.
 17. Fyfe, W.E. y J.D. O'Connor, 1974. Characterization and Quantification of a crustacean lipovitellin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47B: 851-867.
 18. Hirsch G.W. and M.V. Cone, 1969. Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* (L). *J. Cell Biol.*, 40: 336-342.

19. Hinsch G.W., 1980. Effect of Mandibular Organ implants upon the spider crab ovary. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 99(3): 317-322.
20. Ilenchuk T.T. and K.G. Davey, 1985. The binding of juvenile hormone to membranes of the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect. Biochem.*, 17:525-529.
21. Jugan P. y D. Soyez, 1985. *In vitro* inhibitory effect of a sinus gland extract on oocyte endocytosis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *C.R. Acad. Sc. Paris 300 Ser. III*, (20): 705-709.
22. Kallen, J. y J-J Meusy, 1989. Do the neurohormones VIII (Vitellogenesis inhibiting hormone) and CIII (Crustacean hyperglycemic hormone) of crustaceans have a common precursor? Immunodetection of VIII and CIII in the x-organ sinus gland complex of the lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 16: 43-52.
23. Kallen, J.L.; S.L. Abrahamse and F. Van Herp, 1990. Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CIII) in the Hemolymph of the Crayfish. *Biol. Bull.*, 179: 351-357.
24. Kerr, M.S., 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*. II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. *Devl. Biol.*, 20: 1-17.
25. Iaemli, U.K., 1970 Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
26. Landau, M.; H. Laufer and 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.
27. Laufer, H.; M. Landau; D.W. Borst and E. Homola, 1986. The synthesis and regulation of methyl farnesoate, a juvenile hormone for crustacean reproduction. En "Advances in Invertebrate Reproduction 4" (M. Porchet, J-C. Andries and A. Dhainaut, Eds.), p. 135-143. Elsevier, Amsterdam New York.



28. Laufer, H.; D. Borst; F.C. Baker; C. Carrasco; M. Sinkus; C.C. Reuter; L.W. Tsai, and D.A. Schooley, 1987. Identification of a Juvenile Hormone-Like Compound in a Crustacean. *Science*, 235: 202-205.
29. Laufer, H.; J. Ahl and A. Sagi, 1993. The role of Juvenile Hormone in Crustacean Reproduction. *American Zoology*, 33: 365-374.
30. Le Roux, A. 1968. Description d'organes mandibulaires nouveaux chez les Crustacés Décapodes. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 266:1411-1417.
31. Le Roux, A. 1983. Reactions de l'organe mandibulaire à l'ablation des pedoncules oculaires chez les larves et les juvéniles de *Palaemonetes varians* (Leach) (Decapoda, Natantia) *C.R. Acad. Sc. Paris. Serie III* 296: 697-700.
32. Lee R.F. and D.L. Puppione, 1988. Lipoproteins I and II form the Hemolymph of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II Associated with Vitellogenesis. *J. Exp. Zool.*, 248: 278-289.
33. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.S. 1951. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
34. Lui C.W. and J.D. O'Connor, 1976. Biosynthesis of lipovitellin of the crustacean ovary. II. Characterization of and *in vitro* incorporation of amino acids into the purified subunits. *J. Exp. Zool.* 195: 41-51.
35. Lui C.W. and J.D. O'Connor, 1977. Biosynthesis of lipovitellin III. The incorporation of labelled amino acids into the purified lipovitellin of the crab, *Pachygrapsus crassipes*. *J. exp. Zool.*, 199: 105-108.
36. Meusy J-J. and H. Charniaux-Cotton, 1984. Endocrine control of vitellogenesis in malacostraca crustaceans. In: *Advances in Invertebrate Reproduction*. V. Engels ed. pp. 231-241. Elsevier Science Publishers, North Holland.
37. Meusy J-J.; H. Junera; P. Cledon et M. Martin, 1983. La vitelogénine chez un Crustacé Décapode Natantia, *Palaemon*

serratus Pennant. Mise en evidence, comparaison immunologique avec les vitellins, site de synthese et role des pedoncules oculaires. *Reprod. Nutr. Develop.* 23, 625-640.

- 38. Meusy, J-J.; G. Martin; D. Soyez; J.E. Van Deijnen and J-M Gallo, 1987. Immunochemical and Immunocytochemical Studies of the Crustacean Vitellogenesis-Inhibiting Hormone (VIII). *General and Comparative Endocrinology*., 67: 333-344.
- 39. Mialhe, E.; V. Boulo; E. Bachere; D. Hervio; K. Cousin; D. Noel; M. Ohresser; R.M. le Deuff; B. Despres and S. Gendreau, 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107: 155-164.
- 40. Nelson, K.; J.E. Heyer; D. Hedgercock and E. Chang, 1988. Photoperiod induced changes in the hemolymph vitellogenins in female lobster (*Homarus americanus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B(4): 809-821.
- 41. Ogle, J.T., 1992. A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 22(1-3): 267-274.
- 42. Okumura, R.; C-H Han; Y. Suzuki; K. Aika and I. Hanye, 1992. Changes in Hemolymph Vitellogenin and Ecdysteroid Levels during the Reproductive Cycle and Non-reproductive Molt Cycles in the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Zool. Science*, 9: 37-45.
- 43. Panouse, M.J., 1943. Influence de l'ablation du pedoncule oculaire sur la croissance de l'ovarie chez la Crevette *Leander serratus*. *C.R.Acad. Sc. Paris*, 217: 553-555.
- 44. Payen, G.G., 1986. Endocrine regulation of male and female genital ativity in crustaceans. A retrospect and perspectives. In: *Advances in Invertebrate Reproduction*, Vol.,4 M. Porchet, J.C. Andries and A. Dhainaut, eds., North Holland: Elsevier Science, Amsterdam, 1986.: 125-134.
- 45. Quackenbush L.S. and M. Fingerman, 1985. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Black Pigment Dispersing Hormone



BIBLIOTE
P.O. BOX
MARITIMA

- from the Fiddler Crab, *Uca pugilator*. Gen. Comp. Endocrin., 57: 438-444.
46. Quackenbush, L.S., 1989a. Yolk protein production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. J. Crust. Biol. 9(4): 509-517.
 47. Quackenbush, L.S. 1989b. Vitellogenesis in the shrimp *Penaeus vannamei*: *in vitro* studies of the isolated hepatopancreas and ovary. Comp. Biochem. Physiol., 94B (2): 253-261.
 48. Quackenbush, L.S. 1992. Yolk synthesis in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol., 103A(4): 711-714.
 49. Ra'anani, Z. y A. Sagi, 1985. Alternative mating strategies in male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Biol Bull., 196: 592-601.
 50. Sagi A., Ilomola E. and H. Laufer. 1991. Methyl Farnesoate in the Prawn *Macrobrachium rosenbergii* synthesis by the mandibular organ *in vitro*, and titers in the hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 99B (4): 879-882.
 51. Sagi, A; E. Ilomola and H. Laufer, 1993. Distinct Reproductive Types of Male Spider Crabs *Libinia emarginata* Differ in Circulating and Synthesizing Methyl Farnesoate. Biol. Bull., 185: 168-173.
 52. Sambrook, J; E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Press, Vol 2. pp 654
 53. Schade M.L. and R.R. Schivers, 1980. Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocytes during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope-protein tracer study. J. Morph., 163:13-26.
 54. Schafir S; M. Ovadia; M. Tom and E. Lubzens, 1989. Protein and Vitellogenin concentration in the haemolymph during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* de Haan. Amer. Zool., 29:62A.
 55. Schafir, S; M. Tom; M. Ovadia and E. Lubzens, 1992. Protein, Vitellogenin and Vitellin Levels in the Hemolymph and Ovaries

- during Ovarian Development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). Biol. Bull., 183
56. Schneiderman, H.A. and L.I. Gilbert., 1958. Substances with Juvenile Hormone activity in crustacea and other Invertebrates. Biol. Bull., 115: 530-535.
 57. Soroka, Y.; Y. Milner; H. Laufer and A. Sagi, 1993. Protein Synthesis in the Ovary of *Macrobrachium rosenbergii* during the reproductive Cycle: Effects of Methyl Farnesoate (MF). Amer Zool., 38(5): 123a.
 58. Takac P.; H. Laufer and G. Prestwich, 1993. Characterization of Methyl Farnesoate (MF) binding proteins and the metabolism of MF by some tissues of the spider crab, *Libinia emarginata*. Amer. Soc of Zool., 33: 5-10A.
 59. Tamone, S.L. and E.S. Chang, 1992. Methyl Farnesoate stimulates Ecdysteroid Secretion from Crab Y-Organ *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol., 425-432.
 60. Tobe, E. S.; D.A. Young; H.W. Khoo and F.C. Baker, 1989. Farnesoic Acid as a Major Product of Release from Crustacean Mandibular Organs *in vitro*. Exp. Zool., 249: 165-171
 61. Tom, M.; M. Goren and M. Ovadia, 1987. Localization of the vitellin and its possible Precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Int. Journal of Inv. Reprod. and Develop., 12: 1-12.
 62. Tsukimura, B and D.W. Borst, 1992. Regulation of Methyl Farnesoate in the Hemolymph and Mandibular Organ of the lobster, *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol., 86: 297-303.
 63. Tsukimura, B.; F.I. Kamemoto and D.W. Borst. 1993. Cyclic Nucleotide Regulation of Methyl Farnesoate synthesis by the Mandibular Organ of the Lobster, *Homarus americanus*. Exp. Zool., 265: 427-431.
 64. Van Herp, F., 1992 Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. Inv. Reprod. Develop. 22(1-3): 21-30.

65. Vogel, M.M. and D.W. Borst, 1989. Spider crab yolk protein: Molecular characterization and the effect of methyl farnesaote (MF) on its hemolymph level. *Am. Zool.*, 29:49a.
66. Wallace, R.A.; S.L. Walker and P.V. Hauschka, 1967. Crustacean Lipovitellin: Isolation and characterization of the major High density lipoproteins from the eggs of decapods. *Biochemistry*, 6:1582-1590.
67. Wolin, E.M.; H. Laufer D.F. Albertini, 1973. Uptake of the yolk protein lipovitellin by developing crustacean oocytes. *Devl. Biol.*, 35: 160-170.
68. Yano I. and Y. Chinzei, 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B: 213-218.
69. Yano I.; B. Tsukimura; J.N. Sweeney and J.A. Wyban, 1988. Induced Ovarian Maturation of *Penaeus vannamei* by Implantation of Lobster Ganglion. *J. World Aq. Soc.*, 19(4): 204-209.