



# Perfil de ecdisteroides en el ovario del camarón *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) a lo largo del ciclo reproductor

Azevedo, B.; Cortez, A.; Abreu, C.; Carvalho, F.

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Largo Abel Salazar 2, 4099-003 Porto (Portugal)

## Resumen

Los ecdisteroides, ecdisona y 20-OH-ecdisona, son hormonas esteroideas existentes en los artrópodos, nombradamente en crustáceos, regulando el control de la muda de estos animales. La forma característica de crecimiento de este grupo así como las particularidades de su reproducción (fecundación, puesta, etc.) implica una regulación concertada de estas dos fundamentales funciones biológicas: el crecimiento y la reproducción. En este sentido se ha observado en los crustáceos, de forma idéntica a la encontrada en los insectos, la relación entre las hormonas de la muda y de la reproducción. Con el objetivo de estudiar el perfil de ecdisteroides, ecdisona y 20-OH-ecdisona en el ovario, a lo largo del ciclo reproductor del camarón *Palaemon serratus*, se extrajeron estas hormonas de los ovarios y se purificaron, después de un trabajo de optimización de una técnica ya existente y de su validación. Posteriormente se cuantificarán las hormonas por enzimo-inmuno-ensayo (EIA). Los resultados obtenidos demuestran una buena precisión y exactitud del método optimizado así como la existencia de una variación del nivel de ecdisteroides totales a lo largo del ciclo reproductor, sugiriendo la relación de la hormona de la muda con la vitelogenénesis.

**Palabras clave:** *Palaemon serratus*, ecdisteroides, ecdisona, 20-OH-ecdisona, ovogénesis, vitelogenénesis

## Abstract

The ecdysteroids, ecdysone and 20-OH-ecdysone, are steroids hormones existent in the arthropods, namely in crustaceans, controlling the moult of these animals. The characteristic form of growth of this group as well as the particularities of their reproduction (fecundating, spawns, etc) implicates an adjusted regulation of these two fundamental biological functions: growth and reproduction. In this sense it has been sought in the crustaceans, in an identical way to the found already for the insects, the relationship between the moult's hormones and the reproduction. With the objective of studying the ecdysteroids profile, ecdysone and 20-OH-ecdysone, during the reproductive cycle in the shrimp *Palaemon serratus*, they were extracted and purified from the ovaries, after a work of optimisation of a technique already existent and is validation. Later, the hormones were quantified by enzymoimmunoassay (EIA). The obtained results show a good precision and accuracy of the method of extraction optimised, as well as a variation in the level of total ecdysteroids along the oogenesis, suggesting a relationship of these hormones of the moult with the vitellogenesis.

**Keywords:** *Palaemon serratus*, ecdysteroids, ecdysone, 20-OH-ecdysone, oogenesis, vitellogenesis

## Introducción

Los crustáceos constituyen uno de los principales recursos marinos dentro de

los invertebrados, habiéndose verificado un aumento de las capturas de  $4,8 \times 10^9$  toneladas en 1990 para un valor total de  $7,9 \times 10^9$  toneladas en 1998 (FAO, Fisheries Department, 1997). El estudio de la especie *Palaemon serratus* reviste gran importancia debido a su elevado valor económico, a su gran abundancia en la costa Portuguesa, así como a la escasez de datos sobre esta especie respecto al efecto de los ecdisteroides en la reproducción. Además de su bien conocido papel en la muda, los ecdisteroides pueden aún tener un papel en la estimulación de la síntesis proteica en el ovario y en la producción de vitelogenina (revisado por Subramoniam, 2000).

Los aspectos más importantes y más estudiados en la reproducción de las hembras de los crustáceos son: la ovogénesis, caracterizada principalmente por la actividad mitótica y meiótica de las ovogónias y la vitelogénesis, proceso por el cual el ovócito produce y acumula las reservas vitelinas.

Se extrajeron y purificaron las hormonas ecdisteroides (ecdisona y 20-OH-ecdisona) de los ovarios de *P. serratus* en distintas fases de la ovogénesis después de un trabajo de optimización de la técnica de rutina (Carvalho, 1994). El nuevo método fue posteriormente validado mediante estudios de precisión y exactitud.

Los ecdisteroides totales se cuantificarán usando el método de enzimo-inmunoensayo (EIA), técnica altamente selectiva y sensible para este grupo de compuestos (Porcheron, 1989).

## Material y métodos

### Optimización del método de extracción y purificación de ecdisteroides

Se usaron muestras de 150 mg de ovario provenientes de una mezcla ("pool") de varios ovarios vitelogénicos de *Penaeus japonicus* liofilizados. Se realizaron tres ensayos por duplicado, siendo cada muestra de ovario enriquecida con una solución patrón de ecdisona y 20-OH-ecdisona (concentración final de 5 mg/mL para cada una de las hormonas), homogeneizada con 4 mL de metanol (100%), centrifugada a 4.500 r.p.m. y a 4°C durante 20 min. El sobrenadante se decantó y el residuo extraído de nuevo con 2 x 1 mL de metanol. El extracto metanólico fue secado en corriente de nitrógeno a 50°C y resuspendido en 5 mL de tampón fosfato 0,2 M (pH=7,4). El tiempo de resuspensión utilizado en la técnica original era de 12 h en un agitador de placas, y en este trabajo se testaron los tiempos de 5 y 15 min. con agitación de las muestras en un baño de ultrasonidos (a la temperatura ambiente y a 100% de irradiación). Las muestras resuspendidas en tampón fosfato se purificaron haciéndolas pasar bajo vacío a un flujo de 5 mL/min., por dos minicolumnas de fase reversa (RP 18/400 mg, Merck) previamente acondicionadas (5 mL de agua seguidos de 10 mL de metanol). Las minicolumnas se lavaron con 5 mL de agua y 5 mL de metanol/agua (5/95; v/v), al mismo flujo y los ecdisteroides arrastrados con 5 mL de metanol/agua (90/10; v/v) a un flujo de 2 mL/min. El solvente se evaporó hasta la sequedad y se resuspendió en 300 mL de metanol, filtrado por filtro de nylon 66 y de nuevo evaporado. Las muestras se disolvieron en 150 mL de metanol e inyectados 20 mL en un aparato de cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC (RP, C18, 4,6x25 mm; 5 mm; 30°C) para posterior identificación y cuantificación.

Esta técnica se validó posteriormente, con el tiempo de resuspensión de las

muestras en tampón fosfato de 5 min. en un baño de ultrasonidos, mediante estudios de precisión se extrajeron 5 muestras enriquecidas con padrones en el mismo día (repetibilidad), 3 extracciones en distintos días (reproductibilidad) y de exactitud (porcentaje de recuperación), en 5 muestras igualmente enriquecidas con padrones. Todas las muestras obtenidas hay una concentración final de 5 mg/mL para cada una de las hormonas.

### **Perfil de ecdisteroides en el ovario a lo largo del ciclo reproductor**

Hembras de *P. serratus* provenientes de la costa norte de Portugal, se transportaron en cajas térmicas hasta el laboratorio donde se determinó el estadio de desarrollo del ovario mediante características de escala macroscópica (Forster, 1951; Campillo, 1979). Estos estadios están íntimamente relacionados con el proceso vitelogenico descrito por CHAN (1995): I: Inmaduro; II: pre-vitelogenico; III y IV: vitelogenico y V: maduro.

Mediante la conjugación de los parámetros IGS (Índice gonado-somático) y estadio de desarrollo del ovario, se eligieron individuos característicos de cada fase. Posteriormente estos cinco grupos de "pools" se congelaron y liofilizaron para su posterior análisis.

### **Extracción y purificación**

De cada "pool" correspondiente a cada fase de desarrollo del ovario (de I a V) se retiraron (en duplicado o triplicado) 70 mg de ovario liofilizado y se extrajeron los ecdisteroides por el método descrito anteriormente.

### **Cuantificación por enzimo-inmuno-ensayo (EIA)**

Los niveles de ecdisteroides totales se cuantificaron en los cinco estadios de desarrollo de los ovarios mediante la técnica de enzimo-inmuno-ensayo desarrollada por PORCHERON (1989).

El método EIA, bastante específico y sensible, utiliza como marcador la enzima acetilcolinesterase ligada covalentemente a la derivada 20-hidroxi-ecdisona-6-carboximetoxima.

El marcador enzimático utilizado fue el Lot #G(U)-0996 y el antisuero específico AS49/9 (gentilmente cedido por P. Porcheron: École Normale Supérieure (ENS)). La actividad enzimática fue determinada pela adición de lo reagente de Ellman (Tampón fosfato 1M; Iodeto de acetilcolina 0,069M; ácido 5-5' ditiobis-2-nitrobenzónico-DTNB 0,054M). La intensidad de la color amarilla resultante, dada por la cantidad de tionitrobenzoato producido por la reacción entre 1 grupo sulfídrico de la tiocolina (resultante de la hidrólise de la acetilcolina) y el DTNB, fue medida 4-5 horas después, a 405 nm en el lector de placas ELISA (Multiskan EX de la Labsystem).

## **Resultados y discusión**

La extracción de ecdisteroides de tejidos biológicos con metanol produce la precipitación de las proteínas (Wilson, 1990) que son separadas por centrifugación. Utilizando tampón fosfato como solvente de extracto metanólico, permite a su purificación por SPE, através de sucesivos lavado con agua y metanol/agua (5/95; v/v). Así, las impurezas de mayor polaridad, incluido azúcares, aminoácidos, proteínas hidrofílicas y otros compuestos orgánicos polares, son eliminadas (Watson, 1982).

## Validación del método de extracción y purificación optimizado

Los tres extractos de ovario enriquecidos con padrones (5 m g/mL) por duplicado, submetidos a tres tratamientos diferentes en tampón fosfato, después de su extracción por SPE y filtración por Nylon 66, fueran inyectados en HPLC y los distintos componentes detectados en la banda de onda de 254 nm.

Del análisis de los resultados obtenidos con el HPLC mediante ANOVA, permítenos concluir que no hay diferencias significativas en la eficiencia de la extracción de las muestras que permanecieron en tampón fosfato durante 12 h en el agitador de placas y las que estuvieron durante 5 o 15 min. en el aparato de ultrasonidos ( $P>0,05$ ).

En el estudio de precisión (repetibilidad, reproducibilidad) de la extracción de las hormonas ecdisona y 20-OH-ecdisona, se obtuvieron coeficientes de variación comprendidos entre 8,22 y 11,31% (tabla 1) y porcentajes de recuperación superiores al 98% (tabla 2), lo que permite concluir que el método fue validado con una elevada precisión y exactitud.

**Tabla 1:** Estudios estadísticos de precisión dos ecdisteroides del ovario enriquecido con padrones (conc. final de 5 m g/mL) de *Penaeus japonicus*

Hormonas	Repetibilidad (1)				Reproducibilidad (2)			
	Tiempo retención (min.)	CV (%)	Áreas de los picos (u.mV)	CV (%)	Tiempo retención (min.)	CV (%)	Áreas de los picos (u.mV)	CV (%)
20-OH-ecdisona	13,06±0,52	3,98	81380±7222	8,87	13,02±0,46	3,50	80422±6611	8,22
Ecdisona	15,03±0,45	2,99	76581±6513	8,50	15,14±0,37	2,46	72808±8237	11,31

(1) Media y desviación estándar correspondiente a 5 extracciones efectuadas un mismo día

(2) Media y desviación estándar correspondiente a 3 extracciones efectuadas en días diferentes

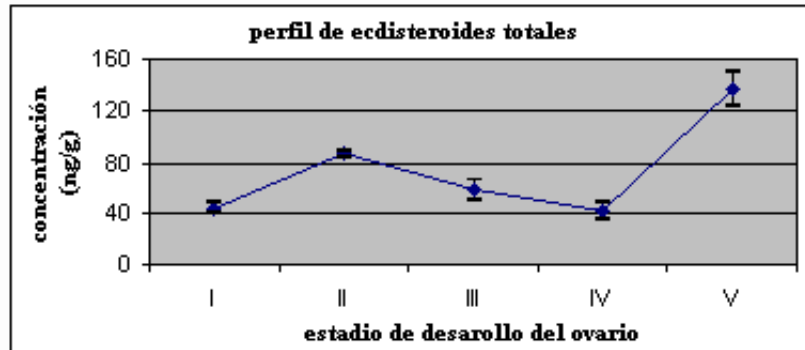
**Tabla 2:** Porcentaje de recuperación resultantes de 5 extracciones enriquecidas con padrones (conc. final de 5 m g/mL)

Hormonas	Recuperación (%)
20-OH-ecdisona	97,9± 2,3
Ecdisona	100,7± 2,9

## Perfil de ecdisteroides en el ovario de *P. serratus* a lo largo del ciclo reproductor

Los niveles de ecdisteroides totales en el ovario de *P. serratus* al inicio de su desarrollo se sitúan alrededor de los 43 ng/g de peso seco. Este valor aumenta al doble en la fase siguiente (II) volviendo al valor inicial en las fases III y IV. La cantidad de ecdisteroides alcanza el máximo en la última fase (fase de maduración), valor que se encuentra en el orden de los 136 ng/g (Gráfica 1).

**Gráfica 1:** Niveles de ecdisteroides totales en el ovario de *Palaemon serratus* a lo largo del ciclo reproductor.



Los resultados obtenidos revelan la presencia de ecdisteroides en el ovario, así como su variación a lo largo del ciclo vitelogénico.

La presencia de ecdisteroides en el ovario ya fue descrita en varios crustáceos, por varios autores, teniéndose verificado todavía, que su perfil durante la vitelogénesis varía bastante de una especie a otra.

Estudios efectuados con *Penaeus vannamei* (Chan, 1995) muestran niveles bajos de ecdisteroides en las primeras fases (I, II e III) aumentando en las fases siguientes, con un pico en la fase IV.

Ya en *Penaeus monodon* (Young *et al.*, 1993) se encuentran valores más elevados de estas hormonas en las primeras fases vitelogénicas, seguidos de una caída brusca de la pre-vitelogénesis hasta la maduración.

Las especies *P. japonicus* y *P. kerathurus* presentan un perfil de ecdisteroides semejante (Carvalho, 1997), en el que los niveles de ecdisteroides disminuyen progresivamente desde la pre-vitelogénesis (fase I) hasta el final de la maduración (fase IV) y aumentan bruscamente en la fase V, que corresponde a la puesta.

En *Palaemon serratus*, en estudio, los perfiles de ecdisteroides son similares al de los dos de *Penaeus kerathurus*, aunque la subida del nivel de estos ecdisteroides en la fase II sea bastante más acentuada, y las concentraciones de estas hormonas en ovario sean bastante inferiores (el máximo de concentración en *Palaemon serratus* es de 121 ng/g mientras que en *Penaeus kerathurus* es de 600 ng/g).

## Conclusiones

- Se puede concluir que 5 min. en ultrasonidos (a la temperatura ambiente y a 100% de irradiación) son suficientes para resuspender el extracto metanólico de ovarios de crustáceos en tampón fosfato.
- En el estudio de precisión de la extracción de las hormonas ecdisona y 20-OH-ecdisona, se obtuvieron coeficientes de variación comprendidos entre 8,22 y 11,31% y porcentajes de recuperación superiores al 98%, lo que permite concluir que el método fue validado con una elevada precisión y exactitud.
- El perfil de ecdisteroides varía durante el ciclo de desarrollo del ovario sugiriendo que estas hormonas se relacionan con la reproducción. La subida del

nivel de estas hormonas ocurre al final de la pre-vitelogénesis (sugiriendo una señal para el inicio de la vitelogénesis) y en la fase final de maduración, o sea cuando los ovocitos están listos para la puesta.

## Bibliografía

- **Carvalho, F.; Cortez, A.; Baldaia, L. & Cardoso, J.M.** (1994). Extracção e purificação de hormonas sexuais esteróides e ecdisteróides no camarão *Penaeus japonicus*. In *Actas do XIV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química*. Aveiro, 5-8 Abril 1994.
- **Carvalho, F.** (1997). Reprodução de crustáceos Peneídeos: *Endocrinologia e Ultraestrutura da Ovogénese*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do porto, 313p.
- **Campillo, A.** (1984). La crevette rose *Palaemon serratus*: *Biologie et exploitation*. *La peche maritime*, nº 1276.
- **Chan, S.M.** (1991). Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem Physiol.*, 112C(1), 51-59.
- **Porcheron, P., Morinière, M., Grassi, J. & Pradelles, P.** (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect biochem.*, 19:2, 117-122.
- **Subramonium, T.** (2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogénesis. Review *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 125, 135-156.
- **Watson, R.D. & Spaziani, E.** (1982). Rapid isolation of ecdysteroids from crustacean tissues and culture media using SEP-PAK C18 cartridges. *Journal of Liquid Chromatography*, 5(3), 525-535.
- **Wilson, I.D., Morgan, E.D. & Murphy, S.J.** (1990). Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods. *Analytica Chimica Acta*, 236, 145-155.
- **Young, N.J., Webster, S.G. & Rees, H.H.** (1993). Ecdysteroid profiles and vitellogénesis in *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). *Invertebrate Reproduction and Development*, 24(2), 107-118.



Artículo publicado en la Revista AquaTIC nº 13 (especial VIII Congreso Nacional de Acuicultura), mayo 2001