

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

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

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS). Largo Abel Salazar, 2. P-4099-003 Porto, Portugal. Correo electrónico: becas2k@hotmail.com

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

Los ecdisteroides ecdisona ( $\alpha$ -ecdisona) y 20-OH-ecdisona ( $\beta$ -ecdisona) son hormonas esteroideas existentes en los artrópodos, específicamente en crustáceos, que regulan la muda de estos animales.

Las características de crecimiento de este grupo, así como las particularidades de su reproducción (fecundación, puesta, etc.), implican una regulación simultánea de estas dos funciones biológicas fundamentales. Estas funciones están reguladas hormonalmente de manera similar a la encontrada en los insectos, en los que es bien conocida la relación entre las hormonas de la muda y la reproducción.

Con el objetivo de estudiar el perfil de los ecdisteroides ecdisona y 20-OH-ecdisona en el ovario del camarón *Palaemon serratus* Pennant, 1777 a lo largo del ciclo reproductor, se extrajeron dichos ecdisteroides de los ovarios y se purificaron por extracción en fase sólida (SPE). Posteriormente se cuantificaron las hormonas por enzima-inmunoensayo (EIA).

Los resultados obtenidos demuestran una buena precisión y exactitud del método, y 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 vitelogénesis.

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

## ABSTRACT

### *Ecdysteroids titres during the reproduction cycle in shrimp Palaemon serratus Pennant, 1777*

The ecdysteroids ecdysone and 20-OH-ecdysone are steroid hormones found in arthropods, such as crustaceans, which control their moult. This characteristic form of growth, as well as the particularities of its reproduction (e.g., fecundation, spawning), involve simultaneous regulation of these two basic biological functions. These functions are hormonally regulated in a way similar to that of insects, for which the relationship between moulting hormones and reproduction hormones is already well known.

With the aim of studying the profiles of the ecdysteroids ecdysone and 20-OH-ecdysone during the reproductive cycle in the shrimp *Palaemon serratus* Pennant, 1777, they were extracted from the ovaries and purified. Subsequently, the hormones were quantified with an enzymeimmunoassay (EIA). Results confirm the extraction method's precision and accuracy; a variation in the overall level of ecdysteroids during the oogenesis was also found, suggesting a relationship between these moult hormones and 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 desde  $4,8 \times 10^9$  t en 1990 hasta  $7,9 \times 10^9$  t en 1998 (FAO, 2000). El estudio de la especie *Palaemon serratus* Pennant, 1777 es de gran importancia debido a su elevado valor económico, y a su gran abundancia en la costa portuguesa, así como a la escasez de datos sobre el efecto de los ecdisteroides en la reproducción en esta especie. Además de su bien conocido papel en la muda (Baldaia *et al.*, 1984), los ecdisteroides pueden también desempeñar 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 ovogonias, y la vitelogénesis, proceso por el cual el ovocito produce y acumula las reservas vitelinas (*Palaemon serratus*: Sarasquete, Gutiérrez y Rodríguez, 1986; Papatthanassiou y King, 1984. *Penaeus kerathurus* (Förskal, 1775): Carvalho *et al.*, 1998a, b, 1999 y 2001).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Método de extracción y purificación de ecdisteroides

Para la validación del método se usaron muestras de 150 mg de ovario provenientes de una mezcla de varios ovarios vitelogénicos de *Penaeus japonicus* (Bate, 1888) liofilizados. Se realizaron tres ensayos por duplicado. Cada muestra de ovario contenía una solución patrón de ecdisona (Sigma E-9004) y 20-OH-ecdisona (Sigma H-5142) con una concentración final de 5 µg/ml para cada una de las hormonas. Las muestras se homogeneizaron con 4 ml de metanol (100 %) y se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el residuo se extrajo de nuevo con  $2 \times 1$  ml de metanol. La extracción de ecdisteroides de tejidos biológicos con metanol induce la precipitación de las proteínas (Wilson, Morgan y Murphy, 1990) que son separadas por centrifugación. 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), pues el uso de tampón fosfato como solvente del extracto metanólico permite su purificación por SPE. Así son eliminadas las impurezas de mayor polaridad, incluidos azúcares, aminoácidos, proteínas hidrofílicas y otros compuestos orgánicos polares (Watson y Spaziani, 1982). Se probaron dos métodos de resuspensión: 12 h en un agitador de placas, y 5 ó 15 min en un baño de ultrasonidos a la temperatura ambiente con agitación de las muestras. Las muestras resuspendidas en tampón fosfato se purificaron por extracción en fase sólida, haciéndolas pasar bajo vacío a un flujo de 5 m/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 solución acuosa de metanol al 5 % al mismo flujo, y los ecdisteroides fueron arrastrados con 5 ml de solución acuosa de metanol al 90 % a un flujo de 2 ml/min. El solvente se evaporó hasta la sequedad, y la muestra se resuspendió en 300 ml de metanol, se pasó por un filtro de nailon 66 y fue de nuevo evaporado. Las muestras se disolvieron en 150 µl de metanol y 20 µl de la resuspensión se inyectaron en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) (RP, C18, 4,6 × 25 mm; 5 µm; 30°C) para su posterior identificación y cuantificación a 254 nm.

Esta técnica fue validada mediante estudios de precisión y de exactitud (porcentaje de recuperación) para un tiempo de resuspensión de las muestras en tampón fosfato de 5 min en un baño de ultrasonidos. Cada muestra contenía una solución con una concentración final de 5 µg/ml para cada una de las hormonas patrón y se extrajeron 5 muestras en el mismo día (repetibilidad) y 3 muestras en distintos días (reproductibilidad).

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

Se transportaron 220 hembras de *P. serratus*, provenientes de la costa norte de Portugal, en cajas aisladas térmicamente hasta el laboratorio donde se determinó el estadio de desarrollo del ovario mediante características macroscópicas (Forster, 1951; Campillo, 1984). Estos estadios están íntimamente relacionados con el proceso vitelogénico descrito por Sarasquete, Gutiérrez y Rodríguez (1986) para esta especie o por Chan (1995) para el langostino

*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y son los siguientes: I: inmaduro; II: pre-vitelogénico; III y IV: vitelogénico, y V: maduro.

La selección de individuos de cada fase se hizo mediante la combinación de las variables IGS (índice gonadosomático) y el estadio de desarrollo del ovario, variando su número entre 7 (fase IV) y 62 (fase I) del total de 130 hembras. Los ejemplares de cada uno de estos cinco grupos fueron congelados y liofilizados para su posterior análisis.

#### Extracción y purificación

De cada grupo correspondiente a cada fase de desarrollo del ovario (de I a V) se tomaron muestras de 70 mg de ovario liofilizado (por duplicado o triplicado), de las que se extrajeron los ecdisteroides por el método descrito anteriormente.

#### Cuantificación por enzima-inmunoensayo (EIA)

Los niveles de ecdisteroides totales (en equivalentes de ecdisona) se cuantificaron para los cinco estadios de desarrollo de los ovarios mediante la técnica de enzima-inmunoensayo desarrollada por Porcheron *et al.* (1989).

## RESULTADOS

### Método de extracción y purificación de ecdisteroides

Las medias de las áreas obtenidas por HPLC para las inyecciones de las muestras de las extracciones rea-

lizadas por ultrasonidos y en el agitador de placas fueron comparadas mediante un Anova y sus resultados están comprendidos entre  $p = 0,22$  y  $p = 0,65$  para las dos hormonas (ecdisona y 20-OH-ecdisona).

#### Validación del método de extracción y purificación

Los tres extractos de ovario con los patrones (5 µg/ml) fueron sometidos, por duplicado, a tres tratamientos diferentes en tampón fosfato; después de su extracción por SPE y filtración por nailon 66, fueron inyectados en el HPLC y los componentes se detectaron a 254 nm.

### 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 (estadio I) se sitúan alrededor de los 43 ng/g (ng de equivalente de ecdisona por gramo de peso seco de ovario). Este valor se duplica en el estadio siguiente (II) volviendo al valor inicial en los estadios III y IV. La cantidad de ecdisteroides alcanza el máximo en el último estadio (maduración), siendo del orden de 136 ng/g (figura 1).

## DISCUSIÓN

El Anova aplicado a los resultados obtenidos con el HPLC permite concluir que no hay dife-

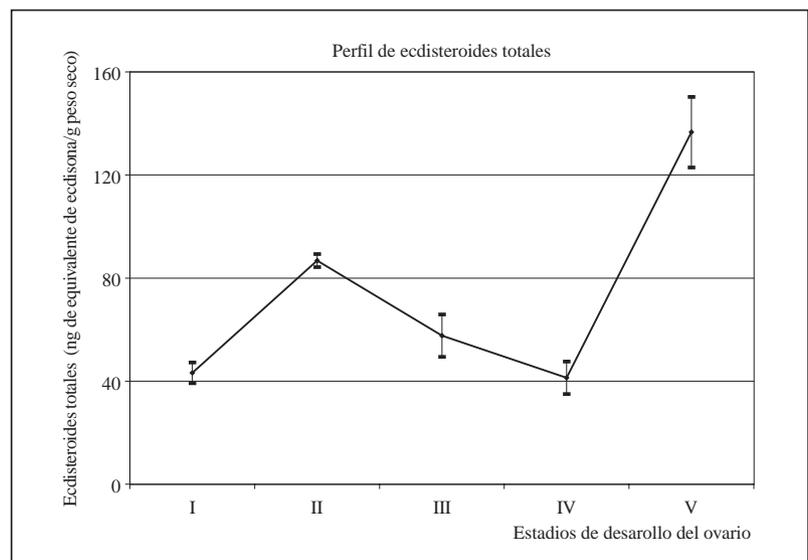


Figura 1. Niveles de ecdisteroides totales en el ovario de *Palaemon serratus* a lo largo del ciclo reproductor.

rencias 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 se estuvieron durante 5 ó 15 min en el aparato de ultrasonidos ( $p > 0,05$ ). Se puede concluir que 5 min en ultrasonidos a la temperatura ambiente son suficientes para resuspender el extracto metanólico de ovarios de crustáceos en tampón fosfato.

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

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, habiéndose verificado que su concentración varía bastante durante la vitelogénesis entre las distintas especies: *Litopenaeus vannamei* (Chan, 1995), *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (Wilder *et al.*, 1991; Young, Webster y Rees, 1993); *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Young, Webster y Rees, 1993); *Palaemon serratus* (Papathanassiou y King, 1984; Clédon, 1985); y *Homarus gammarus* (Linnaeus, 1758) (Goudeau *et al.*, 1990).

Estudios efectuados en el langostino *Litopenaeus vannamei* (Chan, 1995) muestran niveles bajos de ecdisteroides en los primeros estadios (I, II y III) aumentando en los estadios siguientes, con un pico en el estadio IV.

Tabla II. Porcentajes de recuperación resultantes de cinco extracciones de ovarios con patrones de  $\alpha$  y  $\beta$ -ecdisona (concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Hormonas	Recuperación (%)
$\alpha$ -ecdisona	100,7 $\pm$ 2,9
$\beta$ -ecdisona	97,9 $\pm$ 2,3

En la especie *Penaeus monodon* (Young, Webster y Rees, 1993) los valores más elevados de estas hormonas se encuentran en los primeros estadios vitelogénicos, permaneciendo en este nivel hasta la maduración.

Las especies *P. japonicus* y *P. kerathurus* presentan perfiles de ecdisteroides semejantes (Carvalho, 1997), y los niveles de ecdisteroides disminuyen progresivamente desde la previtelogénesis (estadio I) hasta el final de la maduración (estadio IV), aumentando bruscamente en el estadio V, que se corresponde con la puesta.

Según los datos obtenidos en el presente trabajo para el camarón *Palaemon serratus*, el perfil de ecdisteroides es semejante al de *Penaeus kerathurus*, aunque el pico de los ecdisteroides en el estadio II es más acentuado, y las concentraciones de estas hormonas en el ovario son muy inferiores (la concentración máxima en *P. serratus* es 121 ng/g, mientras que en *P. kerathurus* es 600 ng/g).

El perfil de ecdisteroides varía durante el ciclo de desarrollo del ovario, sugiriendo que estas hormonas se relacionan con la reproducción. El aumento de la concentración de estas hormonas tiene lugar al final de la previtelogénesis (sugiriendo una señal para el inicio de la vitelogénesis) y en la fase final de maduración, es decir, cuando los ovocitos están listos para la puesta.

Tabla I. Estudios estadísticos de precisión de la determinación de los ecdisteroides del ovario de *Penaeus japonicus* con patrones de  $\alpha$  y  $\beta$ -ecdisona (concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$ ). (1) Media y desviación correspondientes a cinco extracciones efectuadas en el mismo día. (2) Media y desviación correspondientes a tres extracciones efectuadas en días diferentes.

		Hormonas	
		$\beta$ -ecdisona	$\alpha$ -ecdisona
Repetibilidad (1)	Tiempo retención (min)	13,06 $\pm$ 0,52	15,03 $\pm$ 0,45
	CV (%)	3,98	2,99
	Áreas de los picos (u.mV)	81 380 $\pm$ 7 222	76 581 $\pm$ 6 513
	CV (%)	8,87	8,5
Reproductibilidad (2)	Tiempo retención (min)	13,02 $\pm$ 0,46	15,14 $\pm$ 0,37
	CV (%)	3,5	2,46
	Áreas de los picos (u.mV)	80 422 $\pm$ 6 611	72 808 $\pm$ 8 237
	CV (%)	8,22	11,31

## BIBLIOGRAFÍA

- Baldaia, L., P. Porcheron, J. Coimbra y P. Cassier. 1984. Ecdysteroids in shrimp *Palaemon serratus* relations with the molt cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 437-443.
- Campillo, A. 1984. La crevette rose *Palaemon serratus*. Biologie et explotación. *La Pêche Maritime* 1276: 385-390.
- Carvalho, F. 1997. *Reprodução de Crustáceos Peneídeos – Endocrinologia e Ultraestrutura da Ovogénese*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. Porto, Portugal: 313 pp.
- Carvalho, F., M. Erkan, E. Oliveira, J. Carvalheiro y M. Sousa. 2001. Fine silver staining analysis of the nucleolar organizer regions during oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas* 4: 427-432.
- Carvalho, F., M. Sousa, E. Oliveira, J. Carvalheiro y L. Baldaia. 1998a. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). I. Previtellogenic oocytes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30 (3): 409-416.
- Carvalho, F., M. Sousa, E. Oliveira, J. Carvalheiro y L. Baldaia. 1998b. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). II. Vitellogenesis. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30 (4): 527-535.
- Carvalho, F., M. Sousa, E. Oliveira, J. Carvalheiro y L. Baldaia. 1999. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). III. Cortical Vesicle Formation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31 (1): 57-63.
- Chan, S. M. 1995. Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 112 C (1): 51-59.
- Clédon, P. 1985. Analyse cytologique et expérimentale de la maturation et de l'activation de l'ovocyte de la crevette *Palaemon serratus* (Crustacé Décapode Natantia). *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. III Paris* 301 (6): 317-322.
- FAO. 2000. <http://www.fao.org>. Departamento de Pesquerías, FAO. Roma.
- Forster, G. R. 1951. The biology of common prawn, *Leander serratus* Pennant. *Jour. Mar. Biol. Ass. (UK)* 30 (2): 331-360.
- Goudeau, M., F. Lachaise, G. Carpentier y B. Goxe. 1990. High titers of ecdysteroids are associated with the secretory process of embryonic envelopes in the european lobster. *Tissue and Cell* 22 (3): 269-281.
- Papathanassiou, E. y P. E. King. 1984. Ultrastructural studies on gametogenesis of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant). I. Oogenesis. *Acta Zool. (Estocolmo)* 65 (1): 17-31.
- Porcheron, P., M. Morinière, J. Grassi y P. Pradelles. 1989. Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochemistry* 19 (2): 117-122.
- Sarasquete, M., M. Gutiérrez y A. Rodríguez. 1986. Estudio histológico e histoquímico durante la ovogénese de *P. serratus* (Pennant, 1977). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 3 (1): 131-142.
- Subramonium, T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. Review. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 125: 135-156.
- Watson, R. D. y E. Spaziani. 1982. Rapid isolation of ecdysteroids from crustacean tissues and culture media using SEP-PAK C18 cartridges. *Journal of Liquid Chromatography* 5 (3): 525-535.
- Wilder, M. N., T. Okumura, A. Aida e I. Hanyu. 1991. Ecdysteroid fluctuations during embryogenesis in the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 93-100.
- Wilson, I. D., E. D. Morgan y S. J. Murphy. 1990. Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods. *Analytica Chimica Acta* 236: 145-155.
- Young, N. J., S. G. Webster y H. H. Rees. 1993. Ecdysteroid profiles and vitellogenesis in *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). *Invertebrate Reproduction and Development* 24 (2): 107-118.