

# Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



**BIOACTIVIDAD DE CAROTENOIDES Y RETINOIDES  
DURANTE LA INDUCCION A LA MADURACION  
GONADICA DE *Litopenaeus vannamei***

**TESIS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MARCO AGUSTIN LINAN CABELLO**

**Ensenada, Baja California, Mexico. Abril de 2001.**



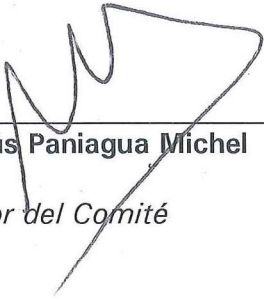




TESIS DEFENDIDA POR

**Marco Agustín Liñán Cabello**

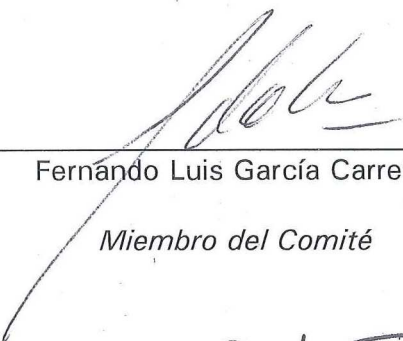
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

**José de Jesús Paniagua Michel**

*Director del Comité*



---

**Fernando Luis García Carreño**

*Miembro del Comité*



---

**Dr. Jorge Olmos Soto**

*Miembro del Comité*



---

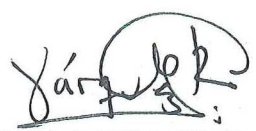
**Fernando Díaz Herrera**

*Miembro del Comité*

---

(Nombre del Sinodal)

*Miembro del Comité*



---

**Dr. Facundo Márquez Rocha**

*Jefe del Departamento de  
Biotecnología Marina*



---

**Dr. Luis Alberto Delgado Argote**

*Director de Estudios de Posgrado*

02/04/2001



**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada.**

**Departamento de Biotecnología Marina**



**BIOACTIVIDAD DE CAROTENOIDES Y  
RETINOIDES DURANTE LA INDUCCIÓN A LA  
MADURACIÓN GONÁDICA DE *Litopenaeus*  
*vannamei*.**

**T E S I S**

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el  
grado de DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Biotecnología  
Marina presenta:**

**MARCO AGUSTÍN LIÑÁN CABELLO**

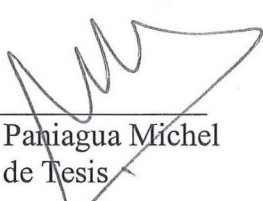
**Ensenada, Baja California, México. Abril de 2001**



**RESUMEN de la Tesis de MARCO AGUSTÍN LIÑÁN CABELLO, presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en BIOTECNOLOGIA MARINA. Ensenada, Baja California, Abril de 2001.**

**BIOACTIVIDAD DE CAROTENOIDES Y RETINOIDES DURANTE LA INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN GONÁDICA DE *Litopenaeus vannamei***

Resumen aprobado por:



Dr. José de Jesús Paniagua Michel  
Director de Tesis

La función no pigmentante de los carotenoides en crustáceos requiere determinarse con precisión, principalmente la relacionada con las funciones bioactivas específicas. Los carotenoides son precursores de moléculas bioactivas tales como los retinoides. Los metabolitos de carotenoides y retinoides poseen funciones tipo hormona cuya interacción con receptores hormonales nucleares incide en el crecimiento, reproducción y desarrollo de los organismos. Las funciones asociadas con estas características se estudiaron en este trabajo. Se utilizaron organismos sexualmente agotados con el fin de elucidar la asociación de los carotenoides y retinoides durante la maduración gonádica del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. En un primer experimento el perfil de carotenoides y retinoides se caracterizó en la glándula digestiva, ovario, músculo, integumento y pedúnculos oculares de poblaciones silvestres y sexualmente agotadas.

En este experimento se analizaron organismos de la etapa de maduración II (gónada parcialmente desarrollada) y IV (gónada totalmente desarrollada). Una vez caracterizado el perfil de carotenoides y retinoides, se realizó otro experimento, en el cual  $\beta$ -caroteno, astaxantina y tres concentraciones de retinol palmitato y ácido retinoico se administraron mediante inyección en reproductores hembra de *L. vannamei*. Después del periodo experimental (una semana), se extrajeron la glándula digestiva, ovario y pedúnculos oculares. Los carotenoides, retinoides y sus respectivos metabolitos se analizaron utilizando espectroscopía *UV-Vis* y cromatografía líquida (HPLC). Con el fin de determinar los receptores de retinoides (RXR) se realizó un análisis inmunohistoquímico en músculo y ovario de hembras de estadio IV de maduración gonádica.

Los niveles de maduración obtenidos se relacionaron con el perfil y nivel de carotenoides y retinoides. Los tratamientos a base de  $\beta$ -caroteno, astaxantina y retinol palmitato presentaron las mejores respuestas respecto a la inducción a la maduración de los ovarios. La capacidad de bioconversión de carotenoides hacia retinoides e isomerización de los mismos en ovario y pedúnculos oculares, indican un papel importante de éstos en eventos morfogenéticos relacionados con la diferenciación del ovocito y posteriormente podrían cobrar importancia durante el desarrollo embrionario y metamorfosis. Al comparar los resultados de poblaciones silvestres y cultivadas de *L. vannamei*, se concluye que independientemente de la función como moléculas pigmentantes, los carotenoides y retinoides juegan un papel bioactivo importante durante la reproducción. La capacidad removedora de radicales libres y especies reactivas de oxígeno por parte de carotenoides y retinoides, evita la acción oxidante respecto a las biomoléculas, organelos y estructuras en procesos vitales durante el desarrollo somático y reproducción. La conformación de estas moléculas, aportan las estructuras necesarias para la producción de metabolitos durante el proceso de señalamiento nuclear y diferenciación celular que inciden en el crecimiento, desarrollo y reproducción de *Litopenaeus vannamei*.

Palabras clave: *carotenoides, maduración, litopenaeus*



**ABSTRACT of the Thesis of MARCO AGUSTÍN LIÑÁN CABELLO, presented as a partial requirement to obtain the degree of DOCTOR IN SCIENCES, option in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California. April 2001.**

**BIOACTIVITY OF CAROTENOIDS AND RETINOIDS DURING THE  
INDUCTION TO THE GONADIC MATURATION OF *Litopenaeus*  
*vannamei***

In crustacea, the non pigmentanting function of carotenoids requires to be elucidated, mainly these related to specific bioactive roles. Carotenoids are precursors of highly bioactive molecules such as retinoids. Carotenoids and retinoids metabolites have functions of hormone like compounds such as the case of the hormonal nuclear receptors which are involved in the growth, reproduction and development of the organisms. The related functions with these characteristics were studied in this work. Sexually exhausted broodstock were used aiming to elucidate the role of carotenoids and retinoids in the induction of the gonadic maturation of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

In a first experiment, the carotenoids and retinoids profile was characterized in digestive gland, ovary, muscle, integument and eyestalk of wild shrimp and in sexually exhausted broodstock. Shrimp in the maturation stages II (less developed gonad) and IV (fully mature gonad) were chosen during all the experiments. Once characterized the profile of important carotenoids and retinoids, a second experiment was performed. Three different concentrations of retinol palmitate, retinoic acid,  $\beta$ -carotene and astaxanthine were administered by injection in female broodstock sexually exhausted. After the experimental period (one week), the digestive gland, ovaries and eyestalk were extracted and its profiles of carotenoids, retinoids and related metabolites were analyzed by UV-Vis spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). In order to determine retinoids receptors (RXR, RAR) immunohistochemical analysis was performed in each case.

The maturation level obtained was related with the profile and levels of carotenoids and retinoids. The treatments based on retinol palmitate, beta-carotene and astaxanthine induced in different way, the best responses respectively in the activation and ovary maturation. The bioconversion capacities of carotenoids to bioactive retinoids and its metabolites points-out an important participating role in the morphogenic events related to oocyte maturation and in late embryonic development and metamorphosis. When comparing wild and farmed *L. vannamei* populations, we conclude that apart of its pigmentating roles, carotenoids and retinoids plays an important bioactive function. The double bond of these molecules avoids the attack of free oxygen radicals in the molecules, structures and associated organelles to the critical processes of growth, development and reproduction of shrimp, including lipovitelline, sperm and oocyte. Moreover the molecular conformation of carotenoids and retinoids provides the function required for the production of the metabolites involved in the process of nuclear signaling and cell differentiation, which in turn enhances growth, development and reproduction.

**Key word:** carotenoids, maturation, *Litopenaeus*.

## Dedicatoria

*A mis lindas hijas Andrómeda, Liliana y  
Viridiana porque fueron y siempre  
serán mi mayor fuente de  
motivación, amor  
y ternura*

*A mi esposa Ofelia,  
sin tu apoyo, comprensión  
y amor nada sería posible.*

*A mis Padres y hermanas por  
su amor y fraternal  
ejemplo.*



## A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Luis Fernando Garcia-Carreño Co-director de esta tesis, por su apoyo, su invaluable sentido critico y valiosos consejos.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las facilidades otorgadas durante mi estancia experimental.

Al Dr. Jorge Olmos-Soto, Investigador en Biotecnología Marina CICESE, por sus valiosas críticas.

Al Dr. Fernando Díaz-Herrera, Investigador del Departamento de Acuicultura CICESE, por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Oscar Sosa Nishizaki y Tec. Nury López Fraga por su apoyo y valiosa ayuda durante el análisis experimental.

A la Dra. Penny M. Hopkins del Laboratorio de Endocrinología Reproductiva de Crustáceos del Laboratorio de Zoología (University of Oklahoma), por su hospitalidad, por las facilidades otorgadas durante el análisis experimental y valiosas enseñanzas.

Al Dr. Milon Fingerman del Departamento de Ecología y Biología Organismal (University of Tulane), quien con su invaluable experiencia e incondicional apoyo, siempre tuvo elementos para enriquecer este trabajo de investigación.

Al Ing. Rafael Mena, Director técnico de la Empresa Thaimex S. A de C. V., y cuerpo de colaboradores, por las facilidades otorgadas para la realización de la última etapa experimental .

A la Dra. Celia Vásquez-Boucard Especialista en Endocrinología Reproductiva del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por su apoyo incondicional y enseñanzas.

Con especial agradecimiento a la Universidad de Colima que a través del Dr. Carlos Silva Salazar, Rector de esta Institución, me brindara su apoyo para lograr esta meta en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico durante el periodo de mis estudios.

A todos mis compañeros y profesores del posgrado, como parte fundamental de mi formación académica y personal.

**Con especial agradecimiento a mi Director el Dr. José de Jesús**

**Paniagua-Michel porque a través de su sencillez,**

**me contagio de su inquietante**

**capacidad por**

**el saber.**



# CONTENIDO

|                                                                                                                 | Página    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. INTRODUCCION</b>                                                                                          | <b>1</b>  |
| <b>II. ANTECEDENTES</b>                                                                                         | <b>3</b>  |
| II.1.- Estado actual del metabolismo de carotenoides y retinoides en peneidos                                   | 3         |
| II.2.- Bioactividad de metabolitos: Retinoides, ácido retinoico.                                                | 6         |
| II.3.- Funciones moleculares de retinoides: receptores hormonales nucleares                                     | 7         |
| II.4.- Efectos bioactivos de carotenoides /retinoides en peneidos                                               | 9         |
| <b>III JUSTIFICACION</b>                                                                                        | <b>12</b> |
| <b>IV OBJETIVO GENERAL</b>                                                                                      | <b>14</b> |
| <b>V. OBJETIVOS PARTICULARES</b>                                                                                | <b>14</b> |
| <b>VI METAS</b>                                                                                                 | <b>14</b> |
| <b>VII HIPOTESIS</b>                                                                                            | <b>15</b> |
| <b>VIII METODOLOGIA</b>                                                                                         | <b>16</b> |
| VIII.1.- Caracterización de carotenoides /vitamina A en órganos asociados a maduración gonadal de reproductores | 16        |
| VIII.1.1.- Muestreo de reproductores                                                                            | 16        |
| VIII.1.2.- Colecta y preservación de tejidos                                                                    | 17        |
| VIII.1.3.- Extracción y análisis de carotenoides                                                                | 21        |
| VIII.1.4.- Extracción y análisis de vitamina A                                                                  | 22        |
| VIII.1.5.- Superoxido dismutasa (SOD) como indicador de estrés oxidativo                                        | 22        |
| VII.2.-Carotenoides /retinoides como moléculas activadoras de la inducción a maduración gonádica                | 23        |
| VIII.2.1.- Condiciones y diseño experimental                                                                    | 24        |
| VIII.2.2- Inclusión de tratamientos experimentales                                                              | 24        |
| VIII.2.3.- Obtención de muestras y análisis de carotenoides y retinoides.                                       | 27        |
| VIII.2.4.- Efectos celulares de tratamientos inductores                                                         | 29        |
| VIII.2.5.- Análisis estadísticos                                                                                | 30        |

## **IX RESULTADOS**

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IX.1.- Perfil de carotenoides y retinal asociados a la maduración gonadal y su relación con estrés oxidativo. | 31 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| IX.1.1.- Carotenoides y retinal asociados a la condición gonádica. | 31 |
|--------------------------------------------------------------------|----|

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| IX.1.2.- Maduración gonadal y su relación al estrés oxidativo | 38 |
|---------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IX.2.- Efecto en la maduración gonadal de carotenoides, retinoides y ácido retinoico. | 38 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| IX.2.1.- Indicadores de condición reproductiva | 38 |
|------------------------------------------------|----|

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| IX.2.2.- Análisis comparativo durante el desarrollo gonadal | 41 |
|-------------------------------------------------------------|----|

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| IX.2.3.- Biotransformación vía hemolinfa | 57 |
|------------------------------------------|----|

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| IX.2.4.- Efectos celulares de tratamientos inductores | 60 |
|-------------------------------------------------------|----|

|                    |    |
|--------------------|----|
| <b>X DISCUSION</b> | 66 |
|--------------------|----|

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| X.1.- Metabolismo de carotenoides y nivel de maduración | 66 |
|---------------------------------------------------------|----|

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| X.2.- Carotenoides y su función inmunoprotectora | 73 |
|--------------------------------------------------|----|

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| X.3.- Carotenoides/retinoides como moléculas activadoras de la inducción gonádica. | 77 |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| X.4.- Relaciones metabólicas de tratamientos vía hemolinfa | 79 |
|------------------------------------------------------------|----|

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| X.5.- Interacciones carotenoides-retinoides | 84 |
|---------------------------------------------|----|

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| X.6.- Efectos fisiológicos de retinoides | 88 |
|------------------------------------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| <b>XI CONCLUSIONES</b> | 91 |
|------------------------|----|

|                     |    |
|---------------------|----|
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> | 92 |
|---------------------|----|



## Lista de Figuras

| Figura                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Ruta de bioconversión de carotenoides en peneidos (Meyers y Latcha, 1997).                                                                                                                                                                                                                   | 4      |
| 2 Extracción de órganos en reproductores hembra de <i>L. vannamei</i> .                                                                                                                                                                                                                        | 17     |
| 3 Órganos extraídos de reproductores hembra en <i>L. vannamei</i> : a) pedúnculo ocular, b) integumento, c) glándula digestiva, d) ovario.                                                                                                                                                     | 18     |
| 4 Procedimiento de extracción e identificación de carotenoides polares y no polares (Schiedt et al, 1995).                                                                                                                                                                                     | 19     |
| 5 Estandares de carotenoides, retinoides y ácido retinoico (hexano)(a); extractos de glándula digestiva, pedúnculos oculares y ovario (hexano) (b).                                                                                                                                            | 20     |
| 6 Espectro de absorción de cada metabolito incluido en el aceite como vehículo. AC = aceite vegetal, RP = retinol palmitato, ast = astaxantina, AR = ácido retinoico, beta-carot = $\beta$ -caroteno                                                                                           | 26     |
| 7 Procedimiento de extracción para retinoides y ácido retinoico por HPLC.                                                                                                                                                                                                                      | 28     |
| 8 Curvas de calibración utilizadas para la determinación de carotenoides y retinoides por espectroscopia UV-Vis y HPLC: a) 450 nm, hexano; b) 463 nm, hexano c) 471 nm hexano/cloroformo;d) 442 nm, hexano; e) 16.95 TR, metanol f) 19.5 TR, metanol g) 17.1 TR, metanol; h) 21.87 TR metanol. | 34     |
| 9 Perfil de carotenoides y retinal en ovario de reproductores silvestres.                                                                                                                                                                                                                      | 35     |
| 10 Perfil de carotenoides y retinal en glándula digestiva en reproductores silvestres.                                                                                                                                                                                                         | 35     |
| 11 Perfil de carotenoides y retinal en ovario de reproductores cultivados.                                                                                                                                                                                                                     | 36     |
| 12 Perfil de carotenoides y retinal en glándula digestiva de reproductores cultivados.                                                                                                                                                                                                         | 36     |

|     |                                                                                                                                         |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 13  | Nivel de maduración promedio por tratamiento al final del experimento (n=13).                                                           | 39 |
| 14  | Cromatogramas HPLC (350 nm) de retinoides extraídos del pedúnculo ocular nivel II (a) y nivel IV (b) de maduración (tratamientos RP 3). | 48 |
| 15  | Espectro de absorción (UV-Vis), bajo distinta condición de maduración en pedúnculo ocular (RP3).                                        | 48 |
| 16  | Cromatogramas HPLC (350 nm) de retinoides extraídos de la glándula digestiva nivel II (a) y nivel IV (b) de maduración (RP 3).          | 49 |
| 17  | Espectro de absorción (UV-Vis), bajo distinta condición de maduración en glándula digestiva (RP3).                                      | 49 |
| 18. | Cromatogramas HPLC (350 nm) de retinoides extraídos en ovario nivel II (a) y nivel IV (b) de maduración (RP 3).                         | 50 |
| 19  | Espectro de absorción (UV-Vis), bajo distinta condición de maduración en ovario (RP3).                                                  | 50 |
| 20  | Concentraciones de carotenoides y retinoides en pedúnculo ocular nivel II maduración.                                                   | 51 |
| 21  | Concentraciones de carotenoides y retinoides en pedúnculo ocular nivel IV de maduración.                                                | 51 |
| 22  | Perfiles de retinoides por nivel de maduración en pedúnculo ocular.                                                                     | 53 |
| 23  | Perfil de carotenoides respecto al nivel de maduración en pedúnculo ocular.                                                             | 53 |
| 24  | Carotenoides y retinoides en glándula digestiva nivel II maduración.                                                                    | 54 |
| 25  | Concentraciones de carotenoides y retinoides en glándula digestiva nivel II de maduración.                                              | 54 |
| 26  | Perfil de retinoides por nivel de maduración en glándula digestiva.                                                                     | 55 |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 27 | Perfil de carotenoides respecto al nivel de maduración en glándula digestiva.                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 55 |
| 28 | Carotenoides y retinoides en ovario nivel II maduración.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 56 |
| 29 | Concentraciones de carotenoides y retinoides en ovario nivel IV de maduración.                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 56 |
| 30 | Perfil de retinoides por nivel de maduración en ovario.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 58 |
| 31 | Perfil de carotenoides respecto al nivel de maduración en ovario.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 58 |
| 32 | Proporción de carotenoides y retinoides, en los diferentes tratamientos inyectados, ovario de <i>L. vannamei</i> . Tratamientos: a) $\beta$ -caroteno, b) astaxantina, c) retinol palmitato 1, d) retinol palmitato 2, e) retinol palmitato 3, f) control.                                                                                                                            | 59 |
| 33 | Estructura de ovario estadio IV de maduración gonádica mostrando un oocito en ovario de reproductor hembra en <i>L. vannamei</i> (35.0 g). Sección longitudinal en parafina 4-5 $\mu$ m, fijación Bouin's, tinción H&E, longitud de barrido 40 $\mu$ m. Tratamientos: A) $\beta$ -caroteno; B) astaxantina C) Retinol palmitato 1; D) Retinol palmitato 2; E) C) Retinol palmitato 3. | 61 |
| 34 | Estructura de músculo en estadio IV de maduración gonádica, reproductor hembra de <i>L. vannamei</i> (35.0 g). Tratamiento retinol palmitato 3. Sección longitudinal en parafina 4-5 $\mu$ m, fijación Bouin's, tinción H&E, longitud de barrido 40 $\mu$ m.                                                                                                                          | 62 |
| 35 | Inmunohistoquímica de ovario de <i>L. vannamei</i> para receptores X de retinoides (RXR) tratamiento retinol palmitato (A); ácido retinoico (B). (A); ácido retinoico (B). Sección longitudinal 4-5 $\mu$ m; 40 $\mu$ m longitud de barrido.                                                                                                                                          | 63 |
| 36 | Inmunohistoquímica del músculo de <i>L. vannamei</i> , para receptores X de retinoides (RXR), tratamiento retinol palmitato (A); ácido retinoico (B). (A); ácido retinoico (B). Sección longitudinal                                                                                                                                                                                  |    |



- 4-5  $\mu\text{m}$ ; 40  $\mu\text{m}$  longitud de barrido. 64
- 37 Inmunohistoquímica en extremidades regeneradas de *Uca pugilator*, A: reacción positiva a RXR, B: reacción negativa  
Sección longitudinal 4-5  $\mu\text{m}$ ; 40  $\mu\text{m}$  longitud de barrido. 65
- 38 Esquema propuesto de los efectos macromoleculares de carotenoides y retinoides sobre la capacidad reproductiva de camarón blanco *L. vannamei*. 69
- 39 Ruta de bioconversión propuesta para carotenoides a retinoides en camarón. 70
- 40 Mecanismo de acción de carotenoides sobre la atenuación a peroxidación lipídica (Terao et al., 1992): A: radical de baja actividad; LH; ácido graso poliinsaturado;  $\text{LOO}^\cdot$ ,  $\text{AOO}^\cdot$ : radical peroxil;  $\text{L}^\cdot$ : radical lípido; LOOH: hidroperóxidos; Car: carotenoides 75
- 41 Representación esquemática sobre la acción genómica de retinoides, y su interacción con receptores nucleares<sup>a</sup>; Representación estructural de un receptor X de retinoides<sup>b</sup>. RBP = proteína de atadura a retinol; Ro= retinol; PBRC= proteína de atadura a retinol celular; RXR= receptor X de retinoides; AF2 = dominio de activación transcripcional dependiente de ligante; ERR= elemento de respuesta a retinoides; EcR= receptor ecdisteroide; Ec= ecdisteroide; LBD= dominio de atadura a ligante. 78
- 42 Contribución al esquema propuesto por Charmantier, et al., (1997), sobre los mecanismos de regulación hormonal durante el crecimiento y reproducción de crustáceos. propuestas:  
AC: ácido farnesoico; GA: glándula androgénica; CHH: hormona hiperglicémica de crustáceos; CNS: sistema nervioso central; 3-de-OH-ecd.: 3-dehidroxiecdisona; EcR: receptores de ecdisteroides; Enk: enkefalina; CF: células foliculares; Cer: cerebro; GIH hormona inhibidora de la gónada; GSH: hormona estimuladora de la gónada; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; IMN oocito: oocito inmaduro; MAT oocito: oocito maduro; MF: metil farnesoato; MIH: hormona inhibidora de la muda; OM: órgano mandibular; 20-OH-ecd.: 20-hidroxiecdisona; RXR: receptores X de retinoides; RPCH: hormona concentradora del pigmento rojo; PDH: hormona dispersadora del pigmento; PREV oocito: oocito previtelogénico; SOG: ganglio supra-oesofágico; TG: ganglio torácico; VIT oocito: oocito vitelogénico; VSOH: hormona del ovario estimuladora

de la vitelogenina; OY: órgano Y.

80

- 43 Efectos relacionados a altas concentraciones de ácido retinoico sobre las relaciones de dimerización entre receptores nucleares, y sus consecuente efectos teratogénicos y sobre la diferenciación de genes durante el desarrollo; ERAR: elementos de respuesta de ácido retinoico; RXR: receptor X de retinoides; EcR: receptores de ecdysteroides. 81

## Lista de Tablas

| Tabla                                                                                                                                                                     | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| I Principales efectos bioactivos de carotenoides registrados en crustáceos.                                                                                               | 10     |
| II Principales efectos bioactivos de retinoides registrados en Crustáceos                                                                                                 | 11     |
| III Dosis inyectadas por tratamiento a reproductores de <i>L. vannamei</i> .                                                                                              | 25     |
| IV Composición y porcentaje de carotenoides y retinal de hembras cultivadas de <i>L. vannamei</i> a diferentes estadios de maduración gonádica (n=6).                     | 32     |
| V Composición y porcentaje de carotenoides y retinal de hembras silvestres de <i>L. vannamei</i> a diferentes estadios de maduración gonádica (n=6).                      | 33     |
| VI Análisis comparativo en la concentración de carotenoides totales y retinal respecto a la condición gonádica (n=6).                                                     | 38     |
| VII Relaciones promedio de peso, índice gonadosomático, total de organismos y nivel de actividad de la superoxido dismutasa (SOD), en poblaciones de <i>L. vannamei</i> . | 39     |
| VIII Supervivencia y promedios de índice hepatosomático (IHS), e índice gonadosático (IGS) de reproductores de <i>L. vannamei</i> (n=13).                                 | 40     |
| IX Tiempos de respuesta en cuanto a la maduración gonádica de reproductores de camarón por cada tratamiento inyectado.                                                    | 41     |
| X Concentraciones de retinoides y carotenoides en pedúnculo ocular nivel II de maduración (µg/g)                                                                          | 42     |
| XI Concentraciones de carotenoides y retinoides en pedúnculo ocular nivel IV de maduración (µg/g)                                                                         | 42     |
| XII Concentraciones de carotenoides y retinoides en glándula digestiva, nivel II de maduración (µg/g)                                                                     | 43     |
| XIII Concentraciones de carotenoides y retinoides en glándula digestiva de organismos nivel IV de maduración (µg/g)                                                       | 43     |



|     |                                                                                                                                                              |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| XIV | Concentraciones de carotenoides y retinoides en ovario nivel de maduración II ( $\mu\text{g/g}$ ).                                                           | 44 |
| XV  | Concentraciones de carotenoides y retinoides en ovario nivel de maduración IV ( $\mu\text{g/g}$ ).                                                           | 44 |
| XV  | Proporción de conversión carotenoides/retinoides en el estadio IV en los tratamientos en los cuales se obtuvo la maduración gonádica de <i>L. vannamei</i> . | 46 |
| XVI | Porcentaje de carotenoides respecto al nivel IV de los tratamientos en los cuales se obtuvo la maduración gonádica de <i>L. vannamei</i> .                   | 46 |

## I INTRODUCCIÓN.

El uso de sustancias bioactivas como aditivos nutricionales para mejorar los rendimientos de camarones cultivados es un tópico que ha recibido poca atención. La alimentación de crustáceos en cautiverio esta limitada a dietas artificiales carentes de metabolitos bioactivos considerados como importantes para el crecimiento normal y sobrevivencia de crustáceos. La limitación o carencia de estos metabolitos y/o sus precursores conduce a desequilibrios nutricionales, alteraciones fisiológicas y enfermedades (Harrison 1990, Scott 1999). Pocos estudios han analizado los pigmentos en la dieta de camarón como moléculas bioactivas o como precursoras de otras altamente bioactivas incluyendo funciones biológicas específicas. Comúnmente, las funciones de los carotenoides en crustáceos se han relacionado principalmente con la pigmentación, funciones antioxidantes, y en pocos estudios como fuente de provitamina A (Meyers y Latscha, 1997; Miki et al., 1982; Miki, 1991). Varios autores han publicado resultados de experimentos en relación a carotenoides los que se encuentran poco sustentados sobre la teoría de estos compuestos. Desde 1981, Tacon propuso funciones de los carotenoides en peces, sugiriendo que los carotenoides podían realizar funciones nutricionales o fisiológicas independientemente de su papel como fuente de provitamina. Sin embargo, sus resultados le llevaron a especular las funciones de estos metabolitos en peces y crustáceos. Las propiedades fisiológicas de carotenoides en crustáceos requiere más investigación para elucidar las funciones de estos compuestos distintas a la pigmentación. Sin embargo ciertas evidencias sugieren, que los pigmentos pueden realizar otras funciones importantes en la nutrición de crustáceos, desafortunadamente estas funciones no han sido apoyados con datos científicos y consecuentemente no son completamente aceptadas. Ciertas evidencias

sugieren que los pigmentos carotenoides pueden realizar funciones vitales en la nutrición de crustáceos. Asimismo, la importancia de los carotenoides y su teoría asociada señalan a estos metabolitos como importantes precursores de moléculas bioactivas, en gran medida por las propiedades de conversión hacia retinoides. La bioactividad de retinoides en vertebrados se relaciona directamente con el crecimiento, visión, la reproducción, función inmune y el mantenimiento de tejidos epiteliales y regeneración (Tsuchiya, et al., 1992; Blomhoff et al., 1992; Mangelsdorf y Evans, 1995). Se ha reconocido al ácido retinoico (RA) como el principal metabolito bioactivo de la vitamina A, que interviene durante el crecimiento y la diferenciación de muchas células *in vitro*, afectando así la expresión de una amplia variedad de genes (Lorraine et al., 1994; Wellink and DeLuca, 1996).

En crustáceos los carotenoides son moléculas químicamente reversibles que sufren metabolismo reductivo y son la única fuente biológica de retinoides. Los retinoides (vitamina A) pueden ser metabolizados mediante reacciones oxidativas para formar retinal (retinaldehído), seguido por un paso de oxidación terminal que genera ácido retinoico que es el metabolito de mayor capacidad bioactiva (Wolf, 1990; Ross, 1993). Sin embargo esta ruta ha sido parcialmente corroborada en crustáceos, conociéndose muy poco acerca de estos metabolitos dichos organismos. Descubrimientos recientes de la funcionalidad de retinoides en vertebrados podrían ser extrapolables al campo de la fisiología de las especies acuáticas, como es el caso del camarón y su cultivo exitoso.

Esta investigación, tuvo como objetivo demostrar el efecto bioactivo de los carotenoides, y sus metabolitos. Así como las interacciones de estos con receptores



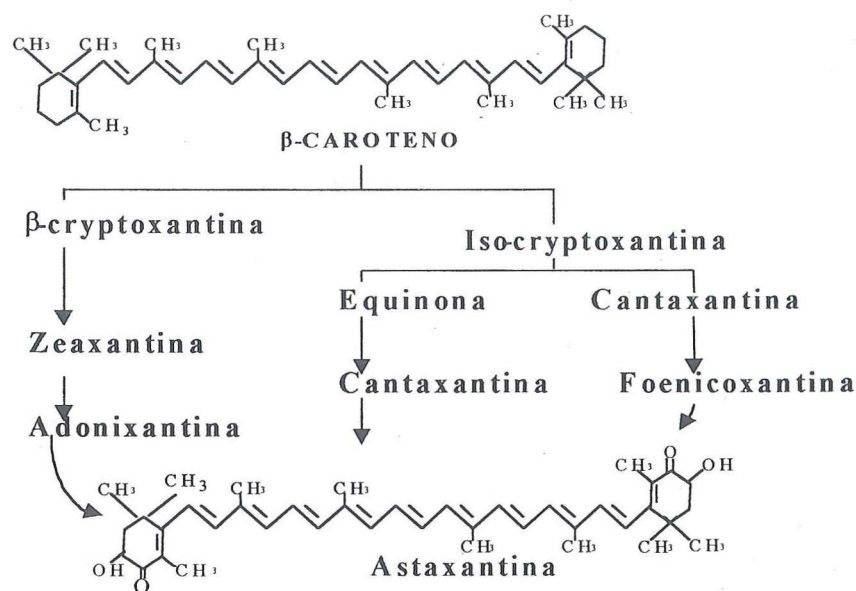
hormonales nucleares durante la maduración gonádica del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

## II ANTECEDENTES

### 2.1- Estado actual del metabolismo de carotenoides y retinoides en peneidos

En base a la experimentación con *P. japonicus*, *P. monodon* y *L. vannamei* (Yamada et al., 1990; Schiedt et al., 1993), se ha reconocido la capacidad de peneidos para oxidar y convertir los carotenoides ingeridos como el  $\beta$ -caroteno, la cantaxantina, la zeaxantina en astaxantina, este último considerado como el carotenoide principal y más abundante en integumento, glándula digestiva y ovario. En estos organismos, la fuente de carotenoides la constituyen las microalgas y diversos microinvertebrados marinos que conforman la dieta natural de peneidos. La capacidad de biotransformación de carotenoides contenidos en la dieta del medio natural puede derivar en hacia una notable modificación en los carotenoides inicialmente ingeridos (Petit et al., 1991). Por lo general esta capacidad ocurre mediante la inserción de grupos ceto en las posiciones 4, 4' de los carotenoides de la dieta (Figura 1), siendo variada la proporción de moléculas necesarias de cada uno de los compuestos para obtener una molécula de astaxantina, la cual puede ser igualmente absorbida directamente de la dieta (Latscha 1989). De acuerdo a métodos analíticos específicos, se ha reconocido la presencia de tres estereoisómeros de astaxantina como lo son las formas 3R, 3'R; 3R,3'S y 3S,3'S, en una proporción de 1:2:1 observada en varias especies de peneidos (Schiedt, 1990 en Schiedt et al., 1993), así como en diversos órganos asociados a la reproducción en los que estas proporciones se encuentran de forma específica de acuerdo al órgano y la condición de maduración (Dall et al., 1995). Adicionalmente se

han identificado cantidades menores de carotenoides menos bioactivos, asumiendo que éstos pueden ser producto de la reducción del metabolismo de otros carotenoides incluyendo la astaxantina (Figura 1), entre los que se encuentran la isoastaxantina y 3,4,3',4'-tetrahidroxipirardixantina lo cual ha sido reconocido para *P. japonicus* y *P. vannamei* (Schiedt et al., 1993; Schiedt et al., 1990). Algunos otros componentes de los carotenoides identificados no corresponden al proceso metabólico de la



**Figura 1.** Ruta de bioconversión de carotenoides en peneidos propuesta por Meyers y Latcha (1997).

astaxantina como son los derivados de diatoxantina y alloxantina originados de las fuentes algales. Otras formas tales como 7, 8-didehydroastaxantina y 7,8,7',8'-tetrahydroastaxantina, al parecer tienen su origen a partir de diatoxantina y alloxantina presentes en proporciones respectivas de 5 al 32% de los carotenoides totales en tejido del mejillón *Mytilus edulis* (Schiedt et al., 1993).

Los crustáceos poseen dos tipos de efectores pigmentarios, los cromatóforos que ocurren principalmente en el integumento y de manera secundaria en ovario, cordón nervioso ventral e intestino (Fingerman 1985). Otros efectores corresponden a los pigmentos retinales cuya función está relacionada a la protección fotosensibilizadora por medio de la regulación en la cantidad de luz percibida. Los movimientos de los pigmentos en los melanóforos específicos y los pigmentos retinales distales en ojos son regulados por la acción antagonista de hormonas conocidas como la hormona dispersadora del pigmento negro (BPDH), hormona concentradora del pigmento negro (BPCH), la hormona adaptadora de la luz (LAH), y la hormona adaptadora de la oscuridad (DAH) (Fingerman 1957; 1985; 1998).

En crustáceos Fingerman, (1957), propuso la acción antagonista de dos hormonas, la hormona concentradora y dispersadora del pigmento rojo (RPCH, PDH respectivamente), las cuales son distribuidas en el sistema nervioso central de *Cambarellus shufeldti*. Mangerich et al., (1986) determinaron la localización de RPCH en la glándula del seno del complejo órgano X de los pedúnculos oculares de *Carcinus maenas* y *Orconectes limosus*, así como en el cerebro y ganglio torácico de *C. maenas*. Landau et al., (1989) encontraron que la RPCH estimula el órgano mandibular en *Procambarus clarkii*, para sintetizar metil farnesoato siendo esta síntesis inhibida por la hormona dispersadora del pigmento (PDH). La aplicación de la RPCH en su forma sintética en relación a la estimulación de metil farnesoato en *Libinia* y *Procambarus clarkii*, registró altos porcentajes de síntesis de dicha componente hormonal (Laufer 1987). Del mismo modo, existen evidencias que RPCH actúa como neurotransmisor en *P. clarki* para estimular la liberación de la hormona estimuladora de la gónada (GSH), utilizando suplementariamente calcio como segundo mensajero para RPCH



(Sarajoni et al., 1995). Adicionalmente, existen evidencias sobre el efecto de RPCH sobre el incremento en la frecuencia del ritmo pilórico en *Cancer borealis*, lo cual antepone una función relacionada con la modulación del ganglio estomatogástrico, lo que representa una función en la coordinación y comportamiento alimenticio (Fingerman 1997).

Lo anterior no solo sugiere una relación neurohormonal de RPCH respecto a la dispersión-concentración de pigmentos, evidentemente existe una relación entre la RPCH respecto a la liberación de dos hormonas inductoras al proceso de maduración gonádica como lo es la hormona estimuladora de la gónada y metil farnesoato.

## **2.2.- Bioactividad de metabolitos: Retinoides y ácido retinoico**

El  $\beta$ -caroteno como otros carotenoides han sido reconocidos por su capacidad de bioconversión hacia vitamina A (Blomhoff et al., 1992), la molécula de  $\beta$ -caroteno posee dos anillos periféricos de  $\beta$ -ionona, por la acción enzimática de  $\beta$ -caroteno 15-15' deshidrogenaza se produce el clivado central del carotenoide originándose dos moléculas de retinol (Lorraine et al., 1995). El rompimiento excéntrico de carotenoides tales como astaxantina, cryptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno ha sido referido no con la misma eficiencia en cuanto a la producción de retinoides (Blomhoff et al., 1992). Particularmente el aporte de cada molécula de astaxantina a retinal es de 1:1 (Wolf, 1994). Este mismo principio de clivado excéntrico sobre las formas *apo* de carotenoides puede tener en menor grado vitamina A como componentes intermedios y a partir del proceso oxidativo terminal puede ser la producción de ácido retinoico, el cual tiene una gran capacidad bioactiva (Alam y Alam, 1983). Este proceso de bioconversión es realizado por diferentes enzimas que pertenecen a cuatro grandes

familias: alcohol deshidrogenasa (ADH), deshidrogenasa /reductasa de cadena corta (SDH), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y citocromo P450 (P450), de las cuales la clase III ADH que cataliza la oxidación de retinol a retinal en presencia de NAD, ha sido descrita en distintos grupos de vertebrados ((Duester 1996).

El conocimiento parcial de estas vías enzimáticas invalidan funciones registradas en humanos asignables a crustáceos y específicamente en camarón. Sin embargo la presencia de componentes terminales e intermedios podrían validar la conversión enzimática y la presencia de rutas metabólicas específicas.

### **2.3.- Funciones moleculares de retinoides:receptores hormonales nucleares.**

Investigaciones en vertebrados, reconocen la funcionalidad de los retinoides en la transcripción del gene y su naturaleza esencial en la división y diferenciación celular (Wolf 1984; Blomhoff et al., 1991; Ross, 1993). Esta capacidad ha sido demostrada bioquímica y molecularmente (Ross 1993), y obedece a las facultades que estas moléculas presentan como factores ligantes a receptores nucleares de ácido retinoico (RARs) y receptores X de retinoides (RXRs). El descubrimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos se relacionan directamente con el descubrimiento de las familias de receptores, los cuales son activados por la atadura de la molécula del retinoide de acuerdo a un gradiente en el orden: ácido retinoico>retinal>retinil acetato>retinol (Mangelsdorf y Evans 1992). Los RXRs Y RARs corresponden a factores ligantes de inducción a la transcripción, cuya familia también incluye receptores de hormonas esteroides, tiroides y receptores de vitamina D (Bonnie et al., 1994). Ambos receptores han sido clasificados como receptores nucleares tipo II de acuerdo a su eficiencia de atadura respecto al DNA. Particularmente los RXRs tienen

una gran eficiencia respecto a la activación transcripcional sobre de un número de receptores nucleares en la categoría II (Beckett y Petkovich 1999). Así se han identificado algunos genes que son regulados por ácido retinoico (AR), vía sus receptores incluyendo  $\beta$ -RAR, CRABP II, Hoxa-1, NHF1 $\beta$ , Stra 1 and HNF-3 (Lorraine et al., 1994; Wellink and DeLuca, 1996).

El descubrimiento particular de una nueva hormona la 9-*cis*-ácido retinoico, la cual puede atar y activar tanto los RARs y RXR, y la facultad de los RXRs para modular la acción de otros receptores ligantes inducibles, sugiere una alta complejidad en el sistema de regulación del gene (Bonnie et al., 1994), y por ende, un papel funcional de gran interés y expectativa en relación a éste y otros isómeros del ácido retinoico entre ellos 3,4 ácido didehidroretinoico, all-*trans* ácido retinoico, (Leid, et al., 1992; Napoli 1993).

En el caso particular de crustáceos no hay antecedentes específicos sobre procesos de bioconversión a estas formas bioactivas de retinoides. Existen algunas experiencias de invertebrados en cultivo, donde la vitamina A incluida en la dieta ha mejorado los niveles de crecimiento (He, et al., 1991), y ha favorecido la inducción al desarrollo del ovario de *P. vannamei* (Alava et al., 1994).

Hopkins y Durica, (1995) reconocieron un efecto del ácido retinoico sobre la regeneración de extremidades en *Uca pugilator*. La caracterización de receptores de retinoides (*UpRXR*) y su expresión durante el ciclo de muda en el cangrejo *Uca pugilator* (Chung, et al., 1998b; Durica et al, 1999), conduce a suponer posibles funciones paralelas a las descritas en vertebrados que pudieran llegar a tener un significado determinante en procesos de fisiología reproductiva y crecimiento en peneidos.



#### 2.4.- Efectos bioactivos de carotenoides/retinoides en peneidos.

Existen ciertas evidencias en crustáceos y particularmente en peneidos que suponen el efecto funcional de algunas especies de carotenoides durante los procesos de maduración y durante el desarrollo metamórfico inicial (Tabla I). Al respecto Wyban et al., (1997) reconocen el efecto de la paprika como fuente de carotenoides sobre la maduración de *P. vannamei*, considerando así los carotenoides como aditivos para la maduración. Esta práctica ha sido parcialmente considerada en algunos laboratorios de producción. Vincent et al., (1988a) investigaron los cambios cuantitativos y cualitativos de pigmentos carotenoides durante el ciclo de maduración en *P. schmitti*, comparando el total de carotenos respecto al nivel de maduración. Las relaciones encontradas sugieren la transferencia de carotenoides de la glándula digestiva al ovario, siendo la zeaxantina y la astaxantina los principales carotenoides en cada órgano respectivamente. Nelis et al., (1988) establece ciertos procesos de movilización de las gónadas de *Artemia* al inicio de reproducción, reconociendo que el clivado de las caroteno-proteínas ocurre en los huevos durante las diferentes etapas de desarrollo. Evidencias de la predominancia de la forma *cis*-cantaxantina en los huevos de *Artemia*, indican una función protectora de lipovitelos contra la destrucción proteolítica (Nelis et al., 1993).

Dall et al., (1995) caracterizaron las concentraciones de astaxantina y de  $\beta$ -caroteno durante la maduración del ovario de *P. esculentus*, encontrando que las formas monoestéricas y estéricas de la astaxantina son generalmente altas en relación a la astaxantina libre en hepatopancreas, músculo e integumento. Sin embargo este patrón se invierte hacia el estadio IV en gónada reconociendo así que la astaxantina libre es el carotenoide dominante en la etapa terminal de la maduración. Los efectos de la

**Tabla I. Principales efectos bioactivos de carotenoides registrados en crustáceos**

| <b>Compuesto</b>                    | <b>Efecto</b>                                                            | <b>Especie</b>           | <b>Fuente</b>           |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Paprika como fuente de carotenoides | Calidad sostenible en producción de nauplios.                            | <i>Penaeus vannamei</i>  | Wyban, et al., (1997)   |
| Astaxantina                         | Reducción del ciclo de muda.                                             | <i>Penaeus japonicus</i> | Petit, et al., (1997)   |
| Formas esterificadas de astaxantina | Incremento característico durante la embriogenesis                       | <i>Homarus gammarus</i>  | Martiri, et al., (1996) |
| Carotenoides totales                | Carotenoides en el ovario se incrementan durante la maduración gonádica. | <i>Penaeus schmitti</i>  | Vincent, et al., (1988) |
| Cantaxantina                        | Metabolismo y movilización durante la maduración gonádica.               | <i>Artemia</i>           | Nelis et al., (1988)    |
| Astaxantina                         | Mejora el crecimiento de postlarvas.                                     | <i>Penaeus monodon</i>   | Merchie, et al., (1998) |

**Tabla II.- Principales Efectos bioactivos de retinoides registrados en crustáceos.**

| <b>Compuesto</b>                                   | <b>Efecto</b>                                        | <b>Especie</b>             | <b>Fuente</b>                                 |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|
| Vitamina A acetato                                 | Mejora el crecimiento de postlarvas                  | <i>Penaeus vannamei</i>    | He, et al., 1991                              |
| Retinol palmitato                                  | Mejora el desarrollo del ovario                      | <i>Penaeus vannamei</i>    | Alava et al., 1993)                           |
| Retinol ,<br>Retinol palmitato,<br>Retinol acetato | Bioconversión de retinoides a ácido retinoico.       | <i>nauplios de artemia</i> | Takeuchi, et al., 1998                        |
| All-trans- ácido retinoico                         | Regeneración de extremidades                         | <i>Uca pugilator</i>       | Hopkins and Durica, 1995; Chung, et al., 1998 |
| Receptores X de retinoides ( <i>Up RXR</i> )       | Cambios en el nivel de circulación de ecdisteroides. | <i>Uca pugilator</i>       | Chung, et al., 1998 a<br>Chung, et al 1988b   |



vitamina A sobre el crecimiento (He et al., 1994) y sobre la capacidad reproductiva de peneidos (Alava et al., 1993) (Tablas II), la presencia de carotenoides de naturaleza oxigénica y anoxigénica, y retinoides en ovario y glándula digestiva durante los estados avanzados de la maduración gonadal sugieren un patrón de bioconversión y una funcionalidad específica en maduración (Liñán-Cabello y Paniagua-Michel, 1998; Paniagua-Michel y Liñán-Cabello, 1999; Liñán-Cabello y Paniagua-Michel, 1999).

De acuerdo a los trabajos referidos es posible que una función importante no considerada de los carotenoides lo represente su capacidad precursora de retinoides cuya función bioactiva podría ser determinante durante la embriogénesis y la metamorfosis (Tabla II), sin embargo se desconocen en gran medida las rutas de bioconversión de carotenoides-retinoides así como los sitios específicos donde esta se pudiera realizar.

### **III.- Justificación**

Actualmente el cultivo de camarón se encuentra en un proceso de expansión, sobre todo para el caso de *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo la fase de reproducción en cautiverio es la menos dominada, de ahí la importancia de desarrollar investigación sobre los metabolitos bioactivos que inciden en el rendimiento de la especie.

Desde el punto de vista biotecnológico es necesario reconocer las propiedades que exhiben componentes como los carotenoides y sus metabolitos que puedan poseer una funcionalidad respecto a la transcripción de genes durante el desarrollo embrionario, la activación de neuropéptidos involucrados con la maduración gonadal y como vehículos de inmunoprotección celular, lo cual no ha sido caracterizado en camarón y podría estar estrechamente relacionado con la maduración y el éxito reproductivo.

Aunque el análisis de las rutas metabólicas de retinoides indican una posible interacción de estas moléculas con hormonas de crustáceos, se desconoce si esta capacidad bioactiva pudiera estar relacionada con la activación de neurotransmisores como elementos de estimulación al desarrollo gonádico, o si la activación de la misma tenga alguna relación con el tipo y nivel de carotenoides ingeridos a través de la dieta.

Actualmente la información sobre mecanismos endocrinos para el caso de peneidos requiere de investigación para el manejo adecuado de las funciones vitales. La elucidación de éstas y otras incógnitas contribuirá al conocimiento sobre la domesticación de tal especie, a través del control del potencial reproductivo.

#### IV. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la funcionalidad de carotenoides como precursores de retinoides, los principios bioactivos de éstos componentes respecto a la inducción a maduración gonadal de *Litopenaeus vannamei* y su relación con el estrés oxidativo.

#### V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la composición de carotenoides y sus metabolitos (retinoides) como moléculas asociadas a la maduración gonádica en poblaciones silvestres y sexualmente agotadas de *L. vannamei*.
- Caracterizar la interacción de carotenoides y retinoides respecto a los niveles de superóxido dismutasa como indicadores de estrés oxidativo en poblaciones silvestres y sexualmente agotadas de *L. vannamei*.
- Evaluar la conveniencia de la inclusión hemolinfática de carotenoides y retinoides a niveles fisiológicos como agentes inductores a la maduración gonádica de *L. vannamei* en cautiverio.
- Determinar la posible existencia de receptores nucleares de retinoides asociados a la maduración gonádica.

#### VI. METAS

- Determinar la bioactividad funcional de carotenoides y retinoides durante la maduración gonadal de peneidos.
- Obtener un método práctico para la estimulación a la maduración de *L. vannamei* en cautiverio.



## VII. HIPOTESIS

De acuerdo a los anteriores planteamientos se refieren las siguientes hipótesis:

- $H_1$ . El potencial reproductivo de las poblaciones de reproductores silvestres de *L. vannamei* esta asociado a un perfil de carotenoides de mayor concentración y abundancia respecto a organismos cultivados y disminuidos en su potencial reproductivo.
- $H_2$ . Retinoides y carotenoides en hembras reproductoras tendrán un efecto inductor en favor a la activación de neuropeptidos relacionados a la maduración gonádica.

## VIII. METODOLOGIA

### 8.1.-Caracterización de carotenoides/retinoides en órganos asociados a maduración gonadal de reproductores.

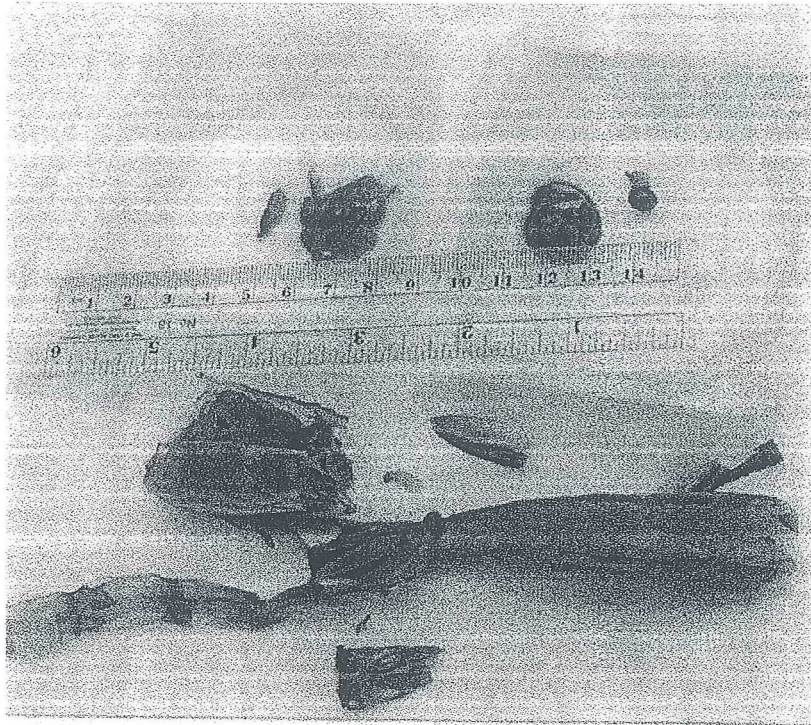
#### 8.1.1.- Muestreo de reproductores

Los organismos silvestres de *Litopenaeus vannamei* fueron recolectados por arrastres de corta duración (15-20 min.) en la Bahía de Matanchen Nayarit, durante el verano de 1998. Para el caso de organismos cultivados fueron muestreadas hembras consideradas como agotadas en su potencial reproductivo después de 12 semanas de inducción a la maduración por ablación unilateral en el laboratorio comercial Génesis (Sonora, México).

#### 8.1.2. -Colecta y preservación de tejidos

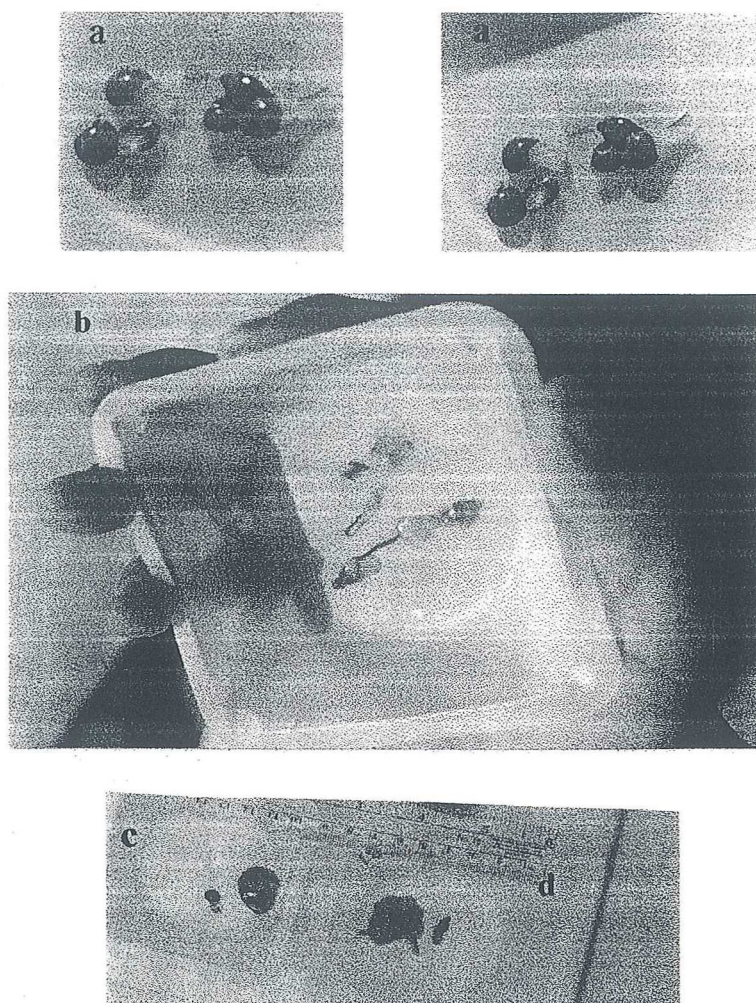
En ambas poblaciones fueron tomadas 12 hembras pertenecientes a dos estadios de maduración (6 estadio II y 6 estadio IV), los criterios para su selección fueron: ovarios coloreados discontinuos no abundantes sobre el abdomen estadio II; los ovarios ocurren en gran proporción sobre la superficie dorsal, significativamente pigmentado estadio IV (Dall, 1995).

Los organismos fueron pesados y medidos (Figura 2). Se extrajeron 100  $\mu$ L de hemolinfa utilizándose como anticoagulante citrato de sodio al 2%, se obtuvo la glándula digestiva, la totalidad del ovario, el músculo, integumento y pedúnculos oculares (Figura 3). Cada órgano fue rápidamente pesado antes de ser preservado en un contenedor de nitrógeno líquido a  $-173^{\circ}\text{C}$ .

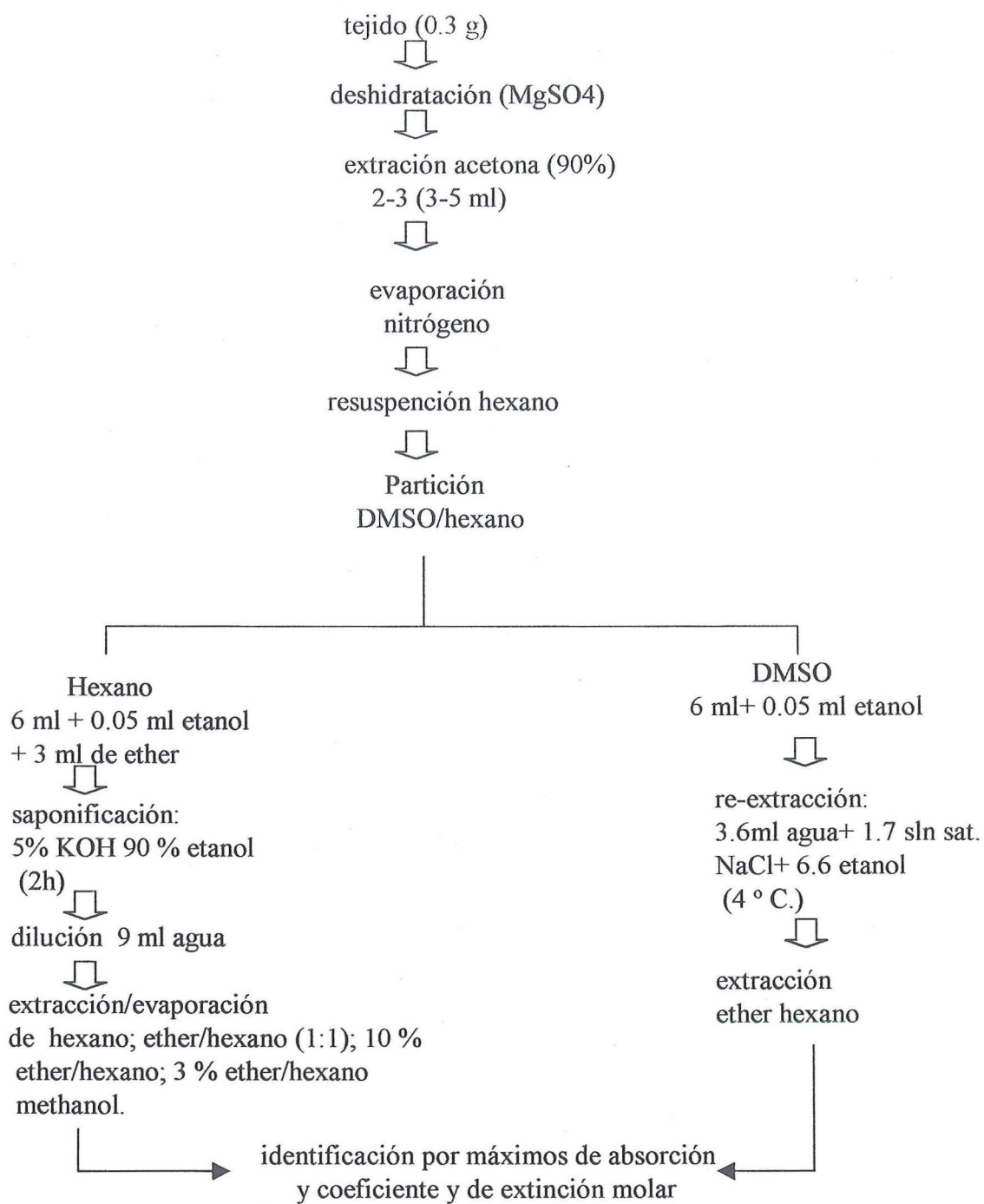


**Figura 2.** Extracción de organos en reproductores hembra de *L. vannamei*.



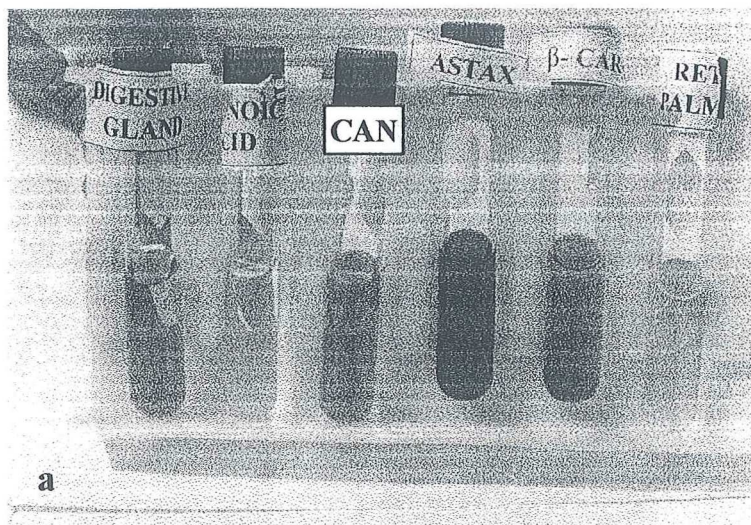


**Figura 3.** Organos extraídos de reproductores hembra en *L. vannamei*  
a) pedúnculo ocular, b) integumento, c) glándula digestiva, d)  
ovario.



**Figura 4.** Procedimiento de extracción e identificación de carotenoides polares y no polares de (Schiedt et al., 1995)





**Figura 5.**Estándares de carotenoides, retinoides y ácido retinoico (hexano)(a); extractos de glándula digestiva, pedúnculos oculares y ovario (hexano) (b).



### 8.1.3.- Extracción y análisis de carotenoides

El análisis de carotenoides se realizó en glándula digestiva, músculo, integumento, gónada y en pedúnculos oculares de organismos silvestres. Fue empleada una modificación a la técnica propuesta por Schiedt et al., 1993, la cual considera inicialmente la extracción en acetona al 90 %, evaporación en una atmósfera de nitrógeno, obtención del pellet y su resuspensión en hexano (Figura 4). En todos los casos se utilizaron solventes grado HPLC y se trabajó en bajo condiciones de penumbra. La separación de carotenos polares se realizó a partir de la bipartición de hexano con dimetil sulfoxido (DMSO). La fase hexano se saponificó a partir de KOH en etanol al 90 % por dos horas, previo lavado con agua destilada. Los carotenoides no polares se extrajeron a partir de ether/hexano (1:1), y la identificación se realizó mediante los picos característicos de absorción a partir de un barrido entre 400-500 nm., mediante un espectofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard, mod *HP 8453*). Una vez identificado los picos de absorción máximos, la muestra fue nuevamente concentrada por evaporación para resuspenderse en hexano, metanol, 10% ether/hexano, 3% ether/hexano, registrándose las lecturas por barrido en cada caso. Los carotenoides polares presentes en la fase DMSO, fueron resuspendidos a partir etanol-agua destilada y una solución saturada de NaCl. (1:54:25), a baja temperatura (4 °C). Finalmente los carotenoides fueron extraídos a partir de ether/hexano, para ser leídos siguiendo los criterios empleados para recuperar la fase hexano arriba descritos. Para la identificación y cálculo de concentraciones, se elaboraron curvas con estándares analíticos (Figura 5), de astaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, (*Sigma-Adlrich*), así como el empleo del coeficiente de extinción molar asociado a cada carotenoide.

#### 8.1.4 Extracción y análisis de vitamina A

La extracción de vitamina A se realizó de acuerdo a la técnica sugerida por Napoli y Horst (1989), que considera el homogeneizado de 0.3 g de tejido en 3 mL de agua destilada, para saponificar en dos volúmenes de 0.025 N KOH en etanol. Posteriormente la muestra se extrae con hexano, y se evapora en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, para finalmente resuspenderla en cloroformo. La identificación de retinoides mediante máximos de absorción característicos se realizó mediante un barrido entre 300-400 nm en un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard, mod *HP 8453*). La caracterización se realizó a partir de estándares analíticos de retinol palmitato y *all-trans*-retinal (Sigma Adrich).

#### 8.1.5.- Superoxido dismutasa (SOD) como indicador de estrés oxidativo

La actividad de SOD se realizó considerando la reducción del nitro azul tetrazolium (NBT), en presencia de riboflavina como un sensibilizador de color (Beauchamp y Fridoch 1971). Un volumen de 10  $\mu$ L de hemolinfa más un buffer de fosfato 50 mM, pH=8.0 fue homogenizado a 4 °C, agitando en pulsos de 30 en intervalos de 30 segundos, se centrifugó (2250 x g, 8 min. a 4 °C). El sobrenadante se mezcló con 300g/L de  $K_2HPO_4$  para obtener un nuevo sobrenadante. Después de la centrifugación, 2 mL de la mezcla de reacción (0.1 mM EDTA, 13  $\mu$ M metionina, 0.75 mM NBT, 20  $\mu$ M riboflavina en buffer de fosfato 50 mM, pH= 7.8) más 0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L del extracto enzimático, se expusieron a luz fluorescente por 10 minutos hasta obtener en los tubos de control 0.2 a 0.25 OD. El volumen de enzima necesario para inhibir el 50 % de la reducción de NBT fue considerada como una unidad de actividad enzimática (U) y expresada en unidades por mililitro de hemolinfa.

## 8.2.- Carotenoides/retinoides como moléculas efectoras de la maduración gonádica.

Con el fin de evaluar los efectos de carotenoides y retinoides durante la maduración gonádica de *L. vannamei*, se realizó una metodología de inclusión de estos metabolitos. Esta metodología consistió en la inyección de los carotenoides y retinoides tomando en consideración los compuestos de mayor abundancia y funcionalidad bioactiva asociados a los órganos de reproductores silvestre. Así se eligió al  $\beta$ -caroteno, astaxantina, retinol palmitato y ácido retinoico, cuyas propiedades se describen a continuación.  $\beta$ -caroteno pigmento cuyo color va del amarillo-naranja al rojo. Sus propiedades de bioconversión en sistemas animales puede derivar en dos moléculas de retinal, lo cual lo sitúa en una de las moléculas de mayor bioactividad biológica. Su coeficiente de extinción molar ( $E^{1\%}$ ) es de 2620. Por su parte la astaxantina ( $E^{1\%} = 2100$  hexano) es el carotenoide terminal en la ruta de biotransformación de carotenoides (Figura 1), siendo el más abundante en gónada de peneidos. La presencia de estos carotenoides en la dieta natural de peneidos ha sido registrados por diversos autores (Fisher et al., 1958; Tacon, 1981; Yamada et al., 1990; Torrissen, 1990; Miki et al., 1994).

La funcionalidad de la vitamina A en vertebrados e invertebrados ha sido reconocida durante diferentes procesos tales como la espermatogénesis, oogenesis y desarrollo embrionario. El retinol palmitato es la forma principal de almacenamiento de vitamina A, además de ser la más estable y de mayor disponibilidad para la absorción durante el metabolismo de dicha vitamina, su  $E^{1\%}$  es de 1000 (etanol). Dentro de los compuestos considerados como vitamina A, el ácido retinoico y sus estereoisómeros han sido



referidos como componentes de mayor efecto biactivo, ya que sus efectos están relacionados con el control de la diferenciación celular y la transcripción del gene durante el desarrollo embrionario. Al igual que los carotenoides y retinoides el ácido retinoico es liposoluble y su E<sup>19</sup> es de 1510 (etanol) (Takeuchi et al 1981; Srivastava y Goldsmith, 1997; Rønnestad et al., 1988; Takeuchi et al., 1998).

### 8.2.1.- Condiciones y diseño experimental

Un lote de 180 reproductores hembra de *L. vannamei* de la granja comercial Thaimex, S. A de C. V. (San Blas Nay. México), fueron puestos en cuarentena por 3 días y seleccionados en base a su peso y condición de intermuda C, se seleccionaron 120 con un peso corporal de 35.7 g ( $\pm$  3.0), mismos fueron marcadas, ablacionadas unilateralmente y se confinaron aleatoriamente en 9 tanques rectangulares de 2.5 X 5 m. Fueron considerados 9 tratamientos experimentales para la inyección de 13 hembras por cada tratamiento y mantenidas a una densidad de 5 org/m<sup>2</sup> y se compararon con reproductores sin tratamiento.

El recambio de agua fue del 600 % al día, fotoperíodo de 12 horas luz X 12 de obscuridad, salinidad de 34 ppm, y la temperatura controlada en un intervalo 28 $\pm$  2 °C mediante un calentador con placas de titanio. Se suministro alimento fresco a razón del 15 % de la biomasa en 6 raciones al día, calamar (3), mejillón (1), pata de mula (1), poliqueto (1).

### 8.2.2.- Tratamientos experimentales

Se utilizó aceite vegetal de maíz como vehículo de disolución en todos los tratamientos, de acuerdo a la naturaleza liposoluble que comparten carotenoides y

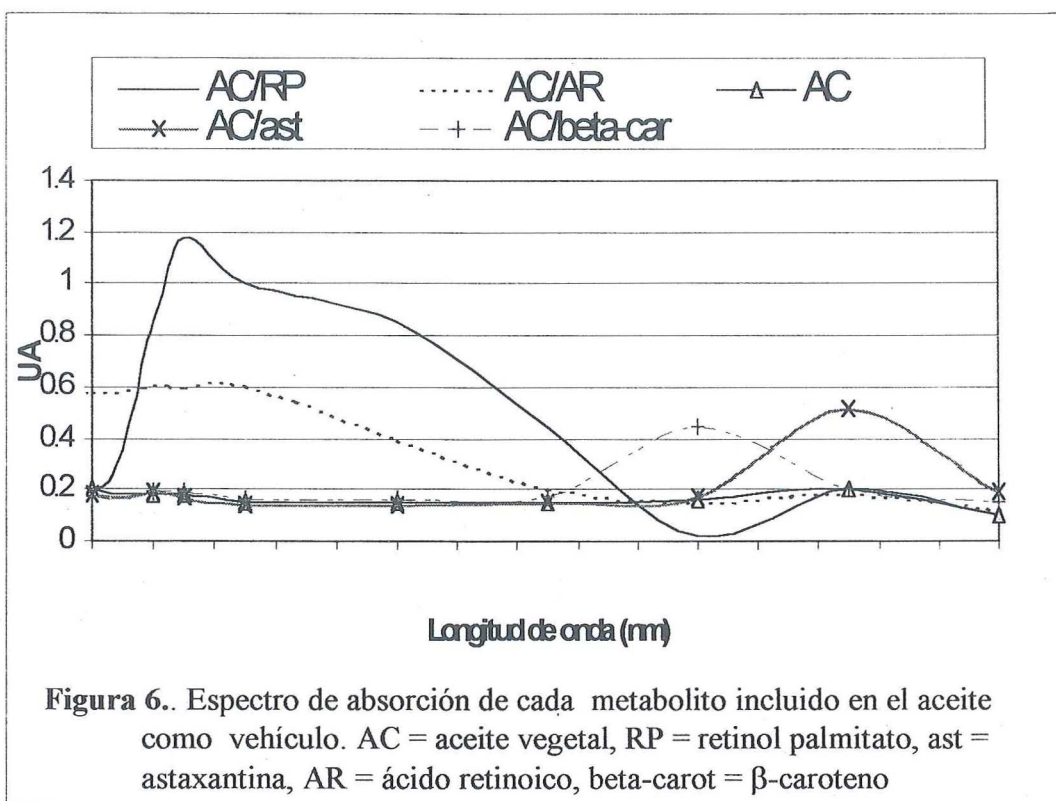
retinoides. El espectro de absorción de este vehículo y la inclusión de los tratamientos se muestran en la Figura 6.

Reproductores hembra en estadio intermuda fueron inyectados por una sola ocasión en el seno hemolinfático, a través de una microjeringa de 100  $\mu$ l. En cuanto a la concentración inyectada de carotenoides (Tabla III), se consideró el criterio de inclusión realizada por Cita et al., 1994, para cultivos celulares *in vitro* en concentraciones de 3 mM de  $\beta$ -caroteno; en relación al retinol palmitato, se consideraron los criterios realizados por Armstrong et al., 1994, tomando en cuenta como máxima medida de concentración el LD<sub>50</sub> de 31 mg/kg de peso corporal inyectado en ratón. En el caso de los tratamientos con ácido retinoico las concentraciones fueron 40 veces menores a las consideradas para retinol palmitato, debido a que su actividad teratogénica es similar en ese orden de proporcionalidad a dicho retinoide (Armstrong, et al., 1994). En cada caso se realizaron experimentos previos sobre curvas/respuesta de los metabolitos en reproductores hembra de *Cherax quadricarinatus* en el laboratorio de Acuicultura (CICESE).

**Tabla III.** - Dosis inyectadas por tratamiento a reproductores de *L. vannamei*.

| Tratamiento                       | Dosis aplicada<br>( $\mu$ g/ g) |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -car) | 18.6                            |
| astaxantina (ast)                 | 18.6                            |
| retinol palmitato 1 (RP 1)        | 5.3                             |
| retinol palmitato 2 (RP 2)        | 10.6                            |
| retinol palmitato 3 (RP 3)        | 16.0                            |
| ácido retinoico 1 (AR 1)          | 133.0 *                         |
| ácido retinoico 2 (AR 2)          | 266.0 *                         |
| ácido retinoico 3 (AR 3)          | 400.0 *                         |

\* Concentración en  $\eta$ g/g





### 8.2.3.- Obtención de muestras y análisis de carotenoides y retinoides.

Se realizaron observaciones diarias a fin de identificar el nivel de maduración en cada tratamiento, muestreándose las hembras en estadio IV de maduración, para lo cual se utilizaron los criterios establecidos por Dall et al., 1995, de acuerdo a la ocurrencia de los ovarios en gran proporción sobre la superficie dorsal, significativamente pigmentado.

Cada organismo fue pesado, medido y disectado a fin de extraer la masa ovarica, la glándula digestiva, el pedúnculo ocular y músculo, a fin de efectuar los análisis bioquímicos necesarios. Las muestras obtenidas se preservaron en CO<sub>2</sub> sólido hasta realizar su análisis. Los tejidos destinados al estudio inmunohistológico (músculo y 300 mg de gónada) fueron fijados en una solución Bouin's [ácido picrico, formalina (4 %), ácido acético glacial (75:25:5)]. El análisis de carotenoides se realizó en glándula digestiva, músculo, y gónada. La técnica fue de acuerdo a una modificación a la propuesta por Schiedt, et al.(1993, Figura 4).

Para la identificación de retinoides se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo al procedimiento propuesto por Thaller y Eichele, (1987), Esta técnica (Figura 7), considera un homogeneizado del tejido en un buffer a 4 °C (0.5 % ácido ascórbico, 0.5 EDTA, en buffer de fosfato salino, pH ajustado a 7.3 con NaOH). Previamente la muestra fue sonicada por unos segundos, el tejido en suspensión fue extraído por la adición de 0.5 ml de solvente de extracción (8:1 acetato de etilo:acetato de metilo, más 0.5% hydroxi tolueno butilaldo), agitado vigorosamente por 30 minutos en un agitador mecánico. La fase sobrenadante se evaporó en una atmósfera de nitrógeno, resuspendiendo posteriormente en 50 ml de metanol, y una vez filtrada a través de un filtro Milpore de 0.5 µm, se procedió a inyectar 100 µl al HPLC

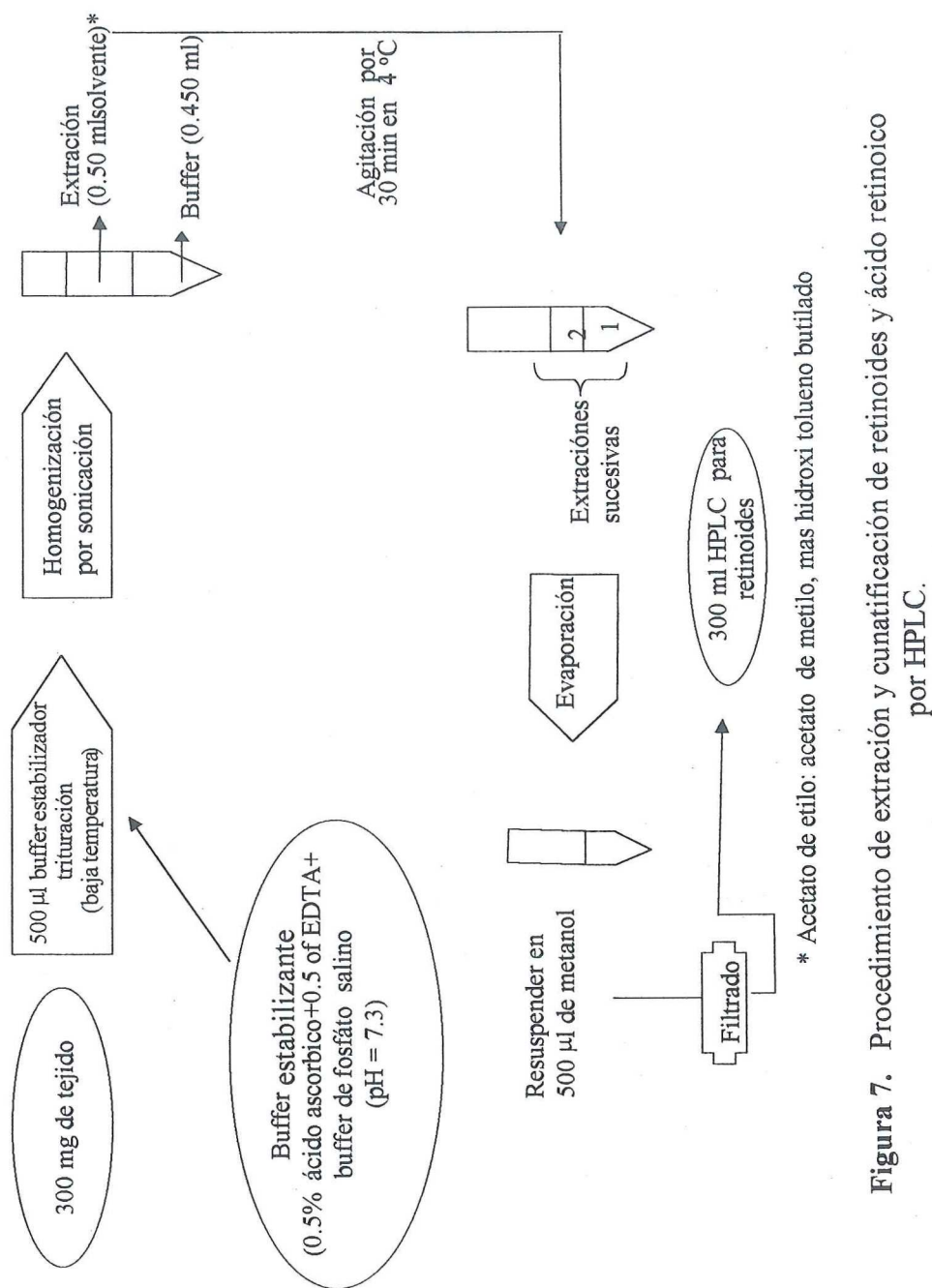


Figura 7. Procedimiento de extracción y cunatificación de retinoides y ácido retinoico por HPLC.

de fase móvil. Se empleo acetonitrilo/metano 1/ 1 % ácido acético (45:15:40%), usando una bomba Waters 27354 con un detector a 370 nm, un gradiente de separación de 1.0 ml min<sup>-1</sup>, a través de una columna de silica de 39 X 20 mm 2/pkg (μBondapak<sup>TM</sup>C<sub>18</sub>).

#### 8.2.4.- Efectos estructurales y funcionales de carotenoides y retinoides.

Muestras de músculo y ovario inicialmente fijadas en solución Bouin's, fueron deshidratadas de acuerdo a Bell y Lightner, (1987). Los tejidos fueron embebidos en parafina, realizándose 20 cortes en un microtomo en secciones de 7 μ. Los cortes se montaron en portaobjetos adicionando solución de montado y se evaporaron a 42 °C en una plancha térmica fijando así el corte. Cada muestra se obtuvo por duplicado hasta este paso a fin de poder practicar respectivamente la tinción con hematoxilina/eosina y la identificación de receptores nucleares de retinoides por inmunohistoquímica.

Para identificar los receptores nucleares de retinoides (RXR), una vez montados los cortes se realizó el procedimiento de acuerdo a Hopkins y Durica, (1995). Se removió la parafina, los tejidos se hidrataron mediante el empleo de xileno en un gradiente de alcohol etílico y agua, a diferentes tiempos. Posteriormente los portaobjetos fueron incubados en Tris-buffer-blotto (TBS-blotto), por una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente. El primer anticuerpo antiUpRXR se aplicó posteriormente en una dilución de 1:1000, dejándose 2 días a 4 °C en una cámara húmeda. Las muestras fueron lavadas 5 veces con solución TBS-blotto. Se adicionó el anticuerpo secundario obtenido de conejo IgG HRP-conjugado (BIO-RAD), mezclado con TBST (buffer Tris-salino, 0.2 % Tween 20, 0.1 % BSA, 5 % leche libre de grasa), toda una noche a 4°C en una dilución de 1:500, se lavo con TBST 5 veces, para adicionar 0.5 ml de DAB (3,3'-



diaminobenzidina), y tabletas de peróxido hidróxido de urea diluidas en agua destilada, a temperatura ambiente, hasta registrar un cambio en la coloración del tejido. El tejido se deshidrató con distintas proporciones de alcohol etílico y xileno y se cubrió el portaobjetos con cubreobjetos previa adición de solución permont, a fin de observarse al fotomicroscopio (Olympus, mod AHB7), la aparición de fotocromos.

#### 8.2.5.- Análisis estadísticos

Se aplicaron pruebas de Bartlett y de Kolmogorov-Smirnov, (Zar, et al., 1994) a todos los parámetros a fin de comprobar su normalidad y su homocedasticidad e independencia con significancia del 95 % de intervalo de confianza. Se realizaron comparaciones no paramétricas en los casos requeridos. Se aplicaron análisis de varianza de una y dos vías teniendo como variable independiente el tratamiento o el estado de maduración y como variables dependientes, las concentraciones de metabolitos y demás parámetros bioquímicos y morfométricos con el fin de identificar diferencias significativas con respecto al control y entre los tratamientos. Para las pruebas *a posteriori* se utilizaron las estimaciones de Tukey. Se utilizó el programa Statistica® (versión 6.0). El límite de aceptación y rechazo para las análisis fue de  $\alpha = 0.05$ .

## IX RESULTADOS

### 9.1.- Perfil de carotenoides/ retinal asociados a la maduración gonádica y su relación con estrés oxidativo

#### 9.1.1.- Carotenoides y retinal asociados a la condición gonádica

Las Tablas IV y V, representan las especies de carotenoides identificados por órgano y las concentraciones de retinoides de acuerdo a las curvas de calibración realizadas (Figura 8), observándose mayor número de carotenoides en órganos de reproductores silvestres. En ambas poblaciones, las mayores concentraciones de carotenoides totales fueron en orden jerárquico: glándula digestiva, integumento, gónada y músculo. En todos los casos la astaxantina total se presenta como el carotenoide de mayor concentración, siendo la glándula digestiva y el ovario los órganos que mayor nivel presentan (Figuras 9, 10, 11 y 12). En el caso de la gónada de organismos silvestres se presenta en forma más abundante el  $\beta$ -caroteno así como rodaxantina y una cantidad más significativa de otros carotenoides no identificados.

El perfil y concentraciones de carotenoides y retinal determinado entre organismos reproductores silvestres y cultivados muestran diferencias de acuerdo al órgano analizado. Un aspecto sobresaliente son las diferencias encontradas en cuanto a las concentraciones en carotenoides totales de glándula digestivas en poblaciones silvestres y cultivadas de diferente nivel de maduración y en el caso de retinal dichas diferencias fueron encontradas en organismos cultivados (Tabla VI). En lo que respecta a carotenoides totales, en la Tabla IV y V se observa una acumulación importante en glándula digestiva (9.56 mg/g), la cual fue superior a lo determinado en el ovario (5.95 mg/g). En relación al retinal, se encontró que en glándula digestiva de organismos silvestres en condición gonadal avanzada se acumula una mayor concentración,

**Tabla IV.** Composición y porcentaje de carotenoides y retinal de hembras cultivadas de *L. vannamei* a diferentes estadios de maduración gonádica (n=6)

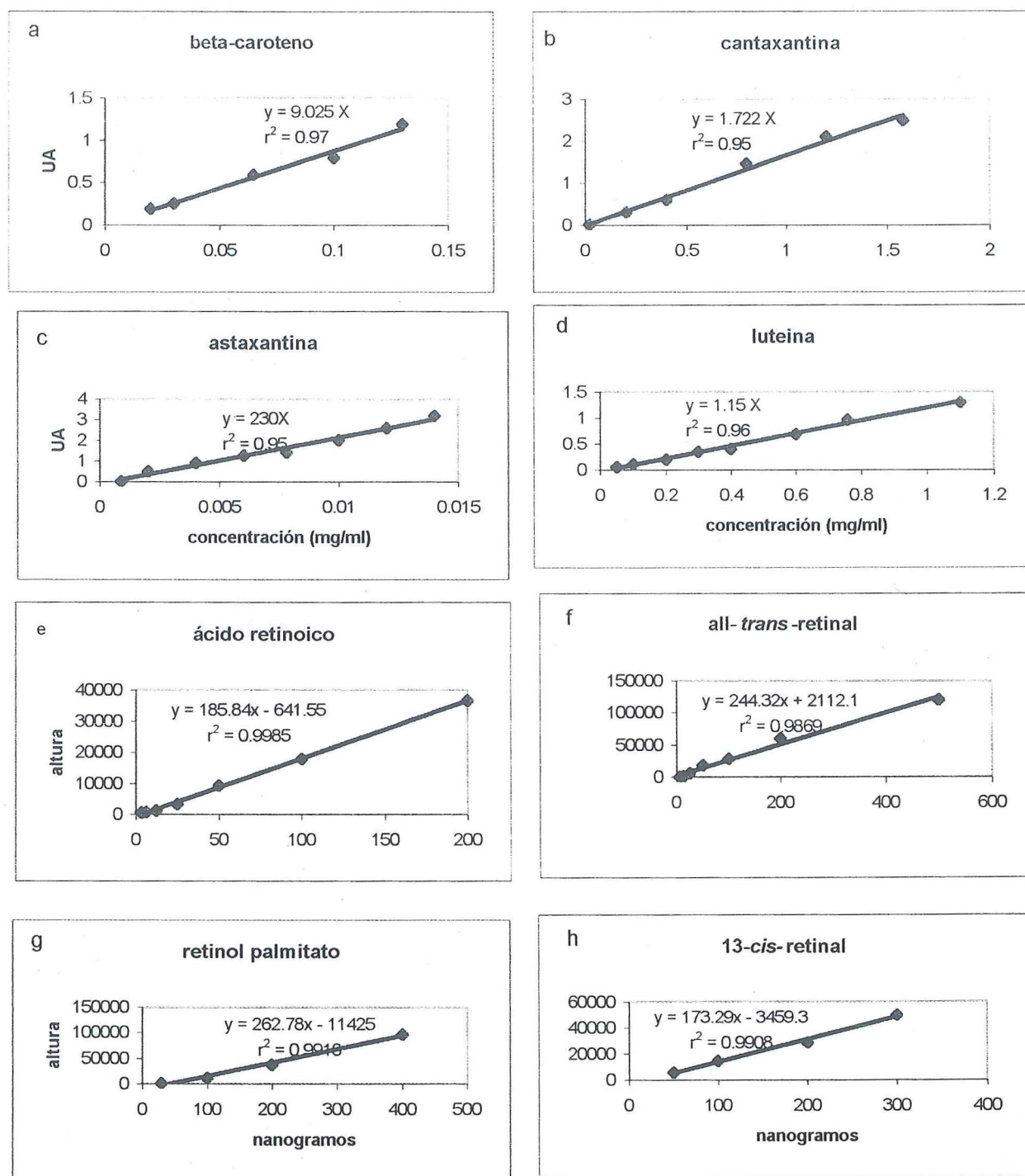
| Órgano<br>Estadio                                 | músculo |      | glándula digestiva |       | integumento |      | ovario |      |
|---------------------------------------------------|---------|------|--------------------|-------|-------------|------|--------|------|
|                                                   | II      | IV   | II                 | IV    | II          | IV   | II     | IV   |
| Carotenoides totales<br>( $\mu\text{g/g}$ tejido) | 0.0022  | 0.04 | 2.3                | 3.8   | 1.97        | 2.0  | 0.32   | 0.51 |
| Carotenoides (% del total)                        |         |      |                    |       |             |      |        |      |
| astaxantina                                       | 47.4    | 48.6 | 45.6               | 39.3  | 35.4        | 34.6 | 33.9   | 33.7 |
| canthaxantina                                     | 53.6    | 51.5 | nd                 | nd    | nd          | nd   | nd     | nd   |
| rodaxantina                                       | nd      | nd   | 39.5               | 36.4  | 32.7        | 32.3 | 32.4   | 32.7 |
| 14- $\text{apo } \beta$ caroteno                  | nd      | nd   | 14.7               | 24.1. | nd          | nd   | nd     | nd   |
| foenicoxantina                                    | nd      | nd   | nd                 | nd    | 33.2        | 33.0 | nd     | nd   |
| $\beta$ caroteno                                  | nd      | nd   | nd                 | nd    | nd          | nd   | 33.6   | 33.6 |
| Vitamina A ( $\mu\text{g/g}$ )                    | nd      | nd   | 1.03               | 2.5   | nd          | nd   | 0.10   | 0.18 |

nd = no detectado

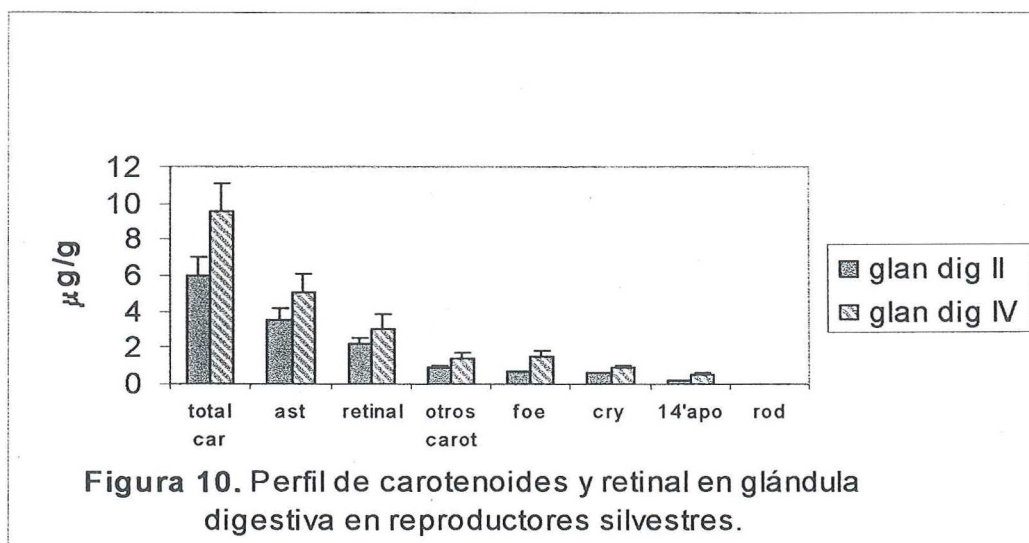
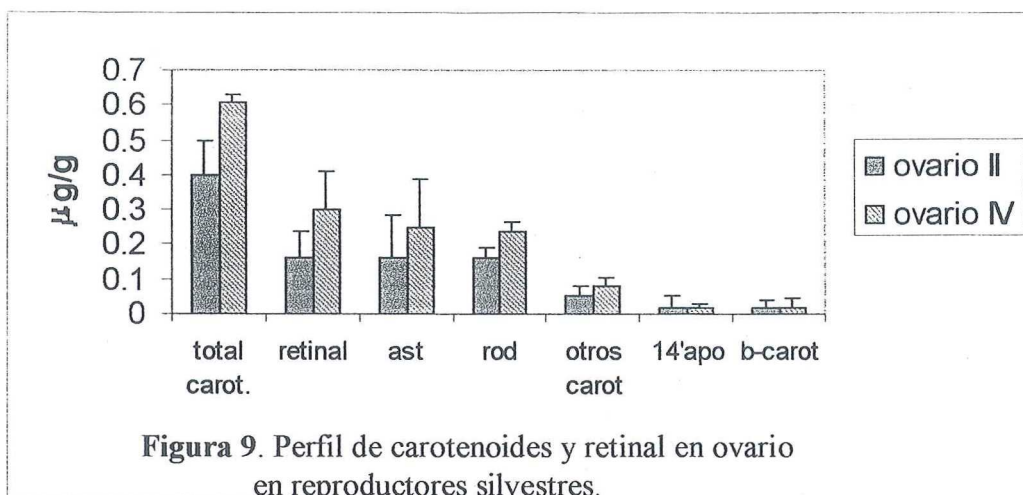


**Tabla V.** Composición y porcentaje de carotenoides y retinal de hembras silvestres de *L. vannamei* a diferentes estadios de maduración gonádica (n=6).

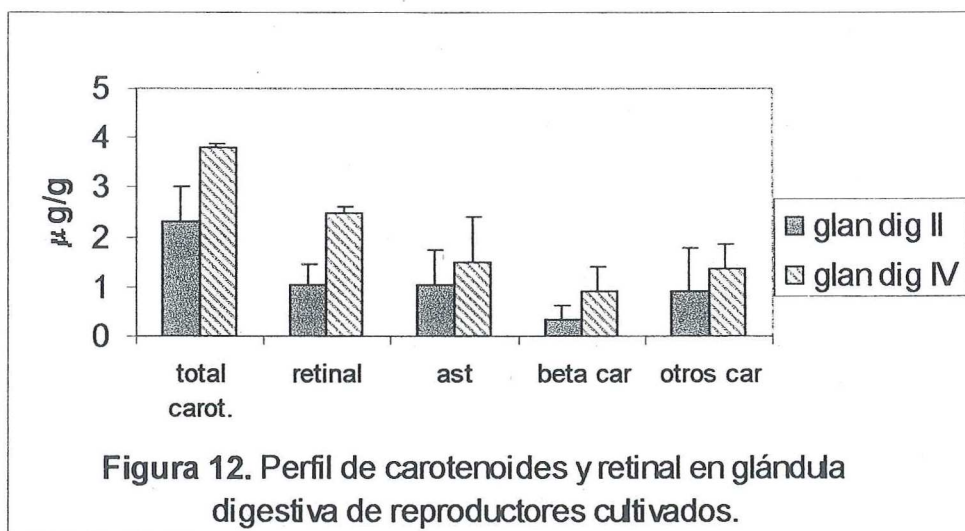
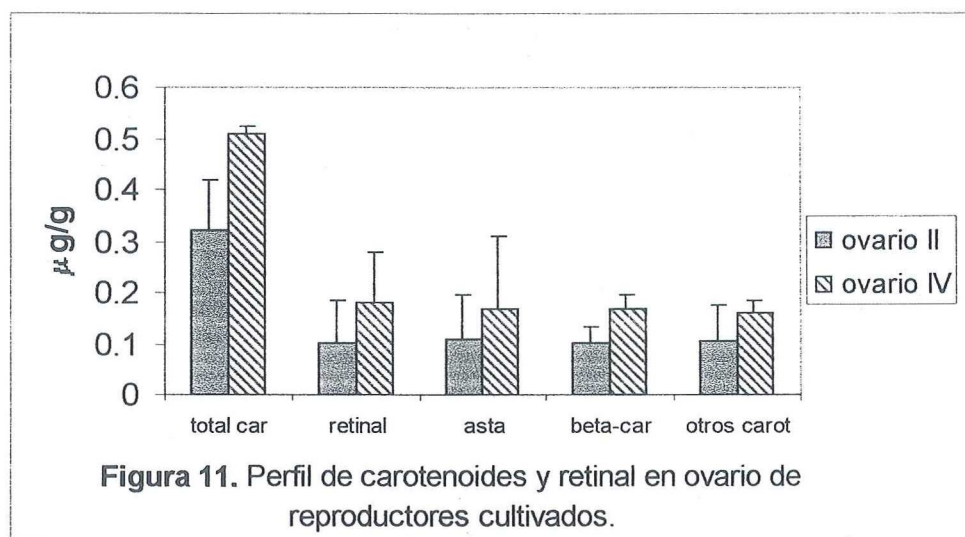
| Organo<br>Estadio    | músculo |      | glándula digestiva |      | integumento |      | ovario |      | pedúnculo |      |
|----------------------|---------|------|--------------------|------|-------------|------|--------|------|-----------|------|
|                      | II      | IV   | II                 | IV   | II          | IV   | II     | IV   | II        | IV   |
| Carotenoides totales |         |      |                    |      |             |      |        |      |           |      |
| (µg/g tejido)        | 0.003   | 0.02 | 5.95               | 9.56 | 1.41        | 2.45 | 0.40   | 0.61 | 2.10      | 1.79 |
| Caroteno (% total)   |         |      |                    |      |             |      |        |      |           |      |
| astaxantina          | 98.6    | 98.7 | 58.4               | 53.3 | 15.3        | 16.1 | 40.5   | 41.3 | 9.5       | 7.6  |
| foenicoxantina       | nd      | nd   | 11.3               | 15.9 | 11.8        | 13.2 | nd     | nd   | 13.1      | 12.1 |
| 14'apo-β-car         | nd      | nd   | 3.0                | 5.7  | nd          | nd   | 4.1    | 3.9  | -         | -    |
| cryptoxantina        | nd      | nd   | 10.3               | 9.9  | nd          | nd   | nd     | nd   | 2.3       | 3.7  |
| 4'hydroxyquinona     | nd      | nd   | 10.3               | 9.9  | 13.5        | 14.3 | nd     | nd   | nd        | nd   |
| rhodoxantina         | nd      | nd   | 0.4                | 0.2  | 7.6         | 12.3 | 40.1   | 40.5 | 1.9       | 3.3  |
| α-caroteno -5-6-epo- | nd      | nd   | nd                 | nd   | 13.6        | 16.7 | nd     | nd   | nd        | nd   |
| caroteno             |         |      |                    |      |             |      |        |      |           |      |
| α-cryptoxantina      | nd      | nd   | nd                 | nd   | 7.5         | 13.6 | nd     | nd   | nd        | nd   |
| equinona             | nd      | nd   | nd                 | nd   | 7.7         | 13.6 | nd     | nd   | nd        | nd   |
| β-caroteno           | nd      | nd   | nd                 | nd   | nd          | nd   | 4.5    | 3.5  | nd        | nd   |
| ε-caroteno           | nd      | nd   | nd                 | nd   | nd          | nd   | nd     | nd   | 20.3      | 20.8 |
| otros carotenoides   | nd      | nd   | 0.4                | 0.2  | nd          | nd   | 7.5    | 5.8  | nd        | nd   |
| Vitamina A (µg/g)    |         |      | 2.2                | 3.1  | nd          | nd   | 0.16   | 0.3  | 42.6      | 43.9 |



**Figura 8.** Curvas de calibración utilizadas para la determinación de carotenoides y retinoides por espectroscopia UV-Vis y HPLC: a) 450 nm, hexano; b) 463 nm, hexano c) 471 nm hexano/cloroformo; d) 442 nm, hexano; e) 16.95 TR, metanol f) 19.5 TR, metanol g) 17.1 TR, metanol; h) 21.87 TR metanol.







respecto a organismos de nivel de maduración intermedia (Tabla V). En relación al perfil de carotenoides se encontró predominantemente astaxantina en ambas poblaciones y condición de maduración (Figuras 9, 10, 11, 12) con la acumulación de este pigmento en la glándula digestiva. Se observa igualmente la presencia de  $\beta$ -caroteno en ovario y las formas *apo* del  $\beta$ -caroteno en ambas poblaciones y estadios de maduración. Con relación a los reproductores cultivados, se determinó cuantitativamente menos carotenoides totales y retinoides al compararse con los organismos silvestres. En esta condición la concentración del  $\beta$ -caroteno fue más abundante en la glándula digestiva para la condición IV de maduración. En ovario el  $\beta$ -caroteno es común en ambas poblaciones sin embargo en poblaciones cultivadas es mayor la proporción de este carotenoide, en este órgano se destaca la presencia de retinal en ambos estados de maduración, presentándose una reducción respecto a la maduración gonádica en organismos silvestres e incremento de este compuesto en cultivados (Tablas IV y V).

Con relación al total de carotenoides de cada población y considerando los dos niveles de maduración (Tabla VII), solo existieron diferencias en glándula digestiva y ovario de organismos cultivados, mientras que las concentraciones de retinal presentaron diferencias en la misma población en la glándula digestiva ( $p < 0.05$ ).

Al realizar comparaciones entre organismos de diferente población y la misma condición gonádica se encuentran diferencias significativas en el nivel II y IV de glándula digestiva, nivel II de integumento y nivel IV de ovario ( $p < 0.05$ ). En todos los casos las mayores concentraciones correspondieron a organismos silvestres.

**Tabla VI.** Análisis comparativo en la concentración de carotenoides totales y retinal respecto a la condición gonádica (n=6).

| Población<br>(Carotenoides totales) | estadio | ANDEVA valores (P) |                    |             |        |
|-------------------------------------|---------|--------------------|--------------------|-------------|--------|
|                                     |         | músculo            | glándula digestiva | integumento | ovario |
| silvestres                          | II, IV  | 0.254              | 0.138*             | 0.957       | 0.145  |
| cultivados                          | II, IV  | 0.433              | 0.045*             | 0.874       | 0.045* |
| vitamina A (retinal)                |         |                    |                    |             |        |
| silvestres                          | II, IV  | np                 | 0.476              | np          | 0.587  |
| cultivados                          | II, IV  | np                 | 0.039*             | np          | 0.471  |

\* difieren significativamente ( $\alpha = 0.05$ )

np= no presentó

### 9.1.2.- Maduración gonadal y su relación con estrés oxidativo.

La Tabla VII representa la condición de los organismos analizados del medio silvestre respecto a los cultivados y su relación con el índice gonadosomático. Se determinó un mayor peso corporal de los reproductores silvestres particularmente en el estadio IV de maduración. Respecto al nivel de actividad de SOD en hemolinfa los valores mayores se reconocen en organismos sexualmente agotados. Sin embargo se observan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre ambas poblaciones independientemente del estadio.

## 9.2.- Efecto en la maduración gonádica de carotenoides, retinoides y ácido retinoico

### 9.2.1.- Indicadores de condición reproductiva

La Figura 13 representa los valores promedio del índice gonadosomático (IGS) por tratamiento, sobre el total de los organismos muestreados después de siete días posteriores a la inyección de los metabolitos. Se destaca una mayor respuesta a la

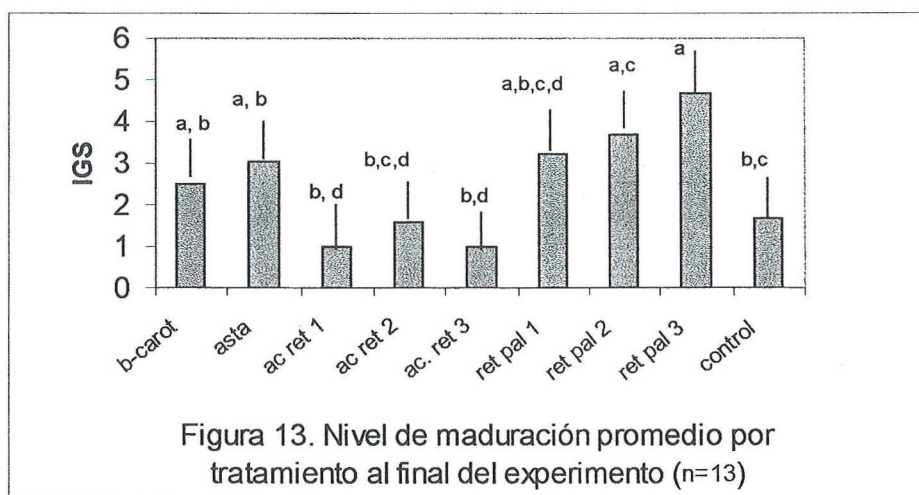


**Tabla VII.** Relaciones promedio de peso, índice gonadosomático (IGS), total de carotenoides en organismos y nivel de actividad de superóxido dismutasa (SOD), en poblaciones de *L. vannamei*.

|                       | Población               |                         |                         |                         |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                       | silvestre               |                         | cultivada               |                         |
|                       | II                      | IV                      | II                      | IV                      |
|                       | (n=6)                   | (n=6)                   | (n=6)                   | (n=6)                   |
| Peso                  | 42.6±0.11               | 45.3±0.15               | 32 ±0.22                | 33.2±0.17               |
| IGS                   | 1.75±0.42               | 4.5±0.24                | 1.68±0.67               | 4.2±0.24                |
| SOD                   |                         |                         |                         |                         |
| (Unid/ml hemol)       | <sup>b</sup> 379.9±.27  | <sup>c</sup> 77.10±0.37 | <sup>a</sup> 536.9±0.65 | <sup>a</sup> 598.8±0.12 |
| Total de carotenoides |                         |                         |                         |                         |
| (µg/g tejido)         |                         |                         |                         |                         |
| glándula digestiva    | <sup>b</sup> 5.95 ±0.51 | <sup>a</sup> 9.56±0.15  | <sup>b</sup> 2.3±0.75   | <sup>b</sup> 3.8±0.42   |
| ovario                | <sup>b</sup> 0.40±0.1   | <sup>a</sup> 0.61±0.018 | <sup>b</sup> 0.32±0.19  | <sup>b</sup> 0.51±0.17  |

Letras distintas difieren significativamente ( $\alpha=0.05$ ).

maduración gonadal en los tratamientos a base de retinol palmitato, siendo significativamente mayor los índices del tratamiento de RP 3 ( $p<0.05$ ) respecto a los tratamientos con ácido retinoico y al tratamiento control.



**Figura 13.** Nivel de maduración promedio por tratamiento al final del experimento (n=13)

letras distintas difieren significativamente  $\alpha=0.0$

La Tabla VIII presenta los datos de sobrevivencia, índice gonadosomático (IGS) e índice hepatosomático (IHS) de los organismos posterior a 7 días a la inyección de cada tratamiento, observándose sobrevivencias del 64 % en los tratamientos inyectados con ácido retinoico así como la más baja proporción de peso del ovario y glándula digestiva, esto último similar al tratamiento control. El IGS del tratamiento RP 3 registro el mayor valor y al igual que los tratamientos de carotenoides y control. Entre los carotenoides inyectados se observa que el tratamiento con astaxantina presentó mayores índices de IGS e IHS.

**Tabla VIII.-** Sobrevivencia y promedios de Índice hepatosomático (IHS), e índice gonadosomático (IGS) de reproductores de *L. vannamei* (n=13).

| Tratamiento | sobrev<br>(%) | IGS       | IHS       |
|-------------|---------------|-----------|-----------|
| β-carot     | 100           | 2.51±0.19 | 2.16±0.16 |
| asta        | 100           | 3.05±0.34 | 2.23±0.22 |
| RA 1        | 89            | 0.98±0.34 | 2.13±0.06 |
| AR 2        | 64            | 1.4±0.51  | 2.27±0.4  |
| AR 3        | 64            | 0.99±0.23 | 2.12±0.34 |
| RP 1        | 100           | 3.24±0.42 | 2.24±0.57 |
| RP 2        | 100           | 3.69±0.49 | 2.42±.45  |
| RP 3        | 100           | 4.7±0.46  | 2.24±0.43 |
| Control     | 100           | 1.7±0.33  | 2.4±0.38  |

La Tabla IX exhibe la respuesta en el tiempo por tratamiento respecto al los organismos que alcanzaron el máximo nivel de maduración gonadal (estadio IV). Se destaca la respuesta temprana en 3-4 días en los tratamientos de carotenoides y de 3-5 días en los tratamientos inyectados con retinol palmitato. Los tratamientos inyectados con ácido retinoico no exhibieron organismos a esta etapa terminal, al igual que el tratamiento control. Al final de siete días los tratamientos con carotenoides y retinol

palmitato presentaron entre 4 y 5 organismos maduros, lo cual contrasto con la ausencia del resto de los tratamientos.

**Tabla IX.** Porcentaje de reproductores que alcanzaron el nivel IV de la maduración gonádica posterior a la aplicación del tratamiento.

| Días transcurridos     | Tratamientos (n=13) |      |      |     |     |      |      |      |         |
|------------------------|---------------------|------|------|-----|-----|------|------|------|---------|
|                        | $\beta$ -carot      | asta | RA 1 | RA2 | RA3 | RP 1 | RP 2 | RP 3 | Control |
| 1                      | -                   | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -    | -       |
| 2                      | -                   | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -    | -       |
| 3                      | -                   | 23   | -    | -   | -   | 15   | -    | -    | -       |
| 4                      | 15                  | 15   | -    | -   | -   | -    | 23   | -    | -       |
| 5                      | -                   | -    | -    | -   | -   | 15   | 15   | 38   | -       |
| 6                      | 15                  | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -    | -       |
| 7                      | -                   | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -    | -       |
| Total (% org/nivel IV) | 31                  | 38   | 0    | 0   | 0   | 31   | 38   | 38   | 0       |

#### 9.2.2.- Análisis comparativo durante el desarrollo gonadal

Con el objeto de asociar el efecto de los diferentes metabolitos inyectados en estadios tempranos gonádica respecto a cada órgano en los niveles II y IV de maduración en las Tablas X, XI, XII, XIII, XIV y XV se muestran las concentraciones de carotenoides y retinoides encontrados para pedúnculo ocular, glándula digestiva y ovario en cada tratamiento y estadio de maduración. Se registró la presencia de astaxantina y 13-hidroxi- $\beta$ -caroteno en pedúnculos oculares para ambos estadios de maduración, mientras que en el nivel IV se presentaron además del *all-trans*-retinal, el 13-*cis*-retinal, el *all-trans*-retinal y el 13-*cis*-retinol. En el estadio II de glándula digestiva predominó la forma esterificada de la astaxantina sobre la forma libre y la cantaxantina, el 13-*cis*-retinal se presentó en concentraciones similares para ambos estadios. Se observó para el tratamiento de  $\beta$ -caroteno valores muy conservados de

Tabla X.- Concentraciones de retinoides y carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) en pedúnculo ocular nivel II de maduración.

|              | all-t retinal | Asta | 3-hidro- $\beta$ -ap | total retinoid | total carot |
|--------------|---------------|------|----------------------|----------------|-------------|
| $\beta$ -car | 11.02         | 5.91 | 0.06                 | 11.02          | 5.97        |
| Asta         | 11.43         | 8.87 | 0.06                 | 11.43          | 8.93        |
| RA 1         | 15.10         | 0.07 | 0.06                 | 15.10          | 0.13        |
| RA 2         | 23.26         | 0.07 | 0.06                 | 23.26          | 0.13        |
| RA 3         | 23.67         | 0.07 | 0.06                 | 23.67          | 0.13        |
| RP 1         | 4.90          | 5.91 | 7.52                 | 4.90           | 13.43       |
| RP 2         | 5.31          | 5.58 | 7.84                 | 5.31           | 13.42       |
| RP 3         | 5.71          | 6.24 | 12.23                | 5.71           | 18.47       |
| control      | 21.55         | 0.90 | 16.30                | 21.55          | 17.20       |

Tabla XI.- Concentraciones de carotenoides y retinoides ( $\mu\text{g/g}$ ) en pedúnculo ocular nivel IV de maduración

|              | all t-retinal | 13-c-retinol | all t-retinol | 13-c-retinol | Asta | 3-hidro-b-ap | total retinoid | total carot |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------|--------------|----------------|-------------|
| $\beta$ -car | 3.42          | 2.93         | 2.82          | 0.04         | 3.15 | 2.32         | 9.17           | 5.79        |
| Asta         | 1.39          | 0.63         | 0.70          | 0.25         | 0.85 | 0.75         | 2.72           | 1.58        |
| RA 1         | nd            | nd           | nd            | nd           | nd   | nd           | nd             | nd          |
| RA 2         | nd            | nd           | nd            | nd           | nd   | nd           | nd             | nd          |
| RA 3         | nd            | nd           | nd            | nd           | nd   | nd           | nd             | nd          |
| RP 1         | 0.19          | 0.20         | 0.14          | 0.68         | 0.18 | 0.22         | 0.52           | 1.02        |
| RP 2         | 0.16          | 0.16         | 0.11          | 1.51         | 0.16 | 0.25         | 0.43           | 1.77        |
| RP 3         | 0.16          | 0.20         | 0.16          | 0.25         | 0.69 | 0.43         | 0.51           | 0.61        |
| control      | 0.17          | 0.25         | 0.19          | 0.76         | 0.59 | 0.01         | 0.62           | 1.20        |

nd = no determinado



**Tabla XII.-** Concentraciones de carotenoides y retinoides ( $\mu\text{g/g}$ ) en glándula digestiva, nivel II de maduración.

|              | 13-c-retinal | Ast est | Ast libre | can   | total retinoid | total carot |
|--------------|--------------|---------|-----------|-------|----------------|-------------|
| $\beta$ -car | 2.82         | 2.01    | 6.35      | 0.07  | 2.82           | 8.43        |
| Ast          | 2.98         | 1.98    | 3.88      | 0.07  | 2.98           | 5.93        |
| RA 1         | 7.98         | 24.27   | 22.93     | 0.07  | 7.98           | 47.27       |
| RA 2         | 4.61         | 23.63   | 22.93     | 0.07  | 4.61           | 46.63       |
| RA 3         | 0.11         | 23.63   | 12.70     | 0.07  | 0.11           | 36.40       |
| RP 1         | 0.65         | 14.81   | 13.05     | 5.64  | 0.65           | 33.51       |
| RP 2         | 9.77         | 13.05   | 16.58     | 13.40 | 9.77           | 43.03       |
| RP 3         | 11.94        | 19.05   | 20.46     | 14.81 | 11.94          | 54.32       |
| control      | 5.68         | 15.29   | 14.62     | 14.46 | 5.68           | 44.38       |

**Tabla XIII.-** Concentraciones de carotenoides y retinoides ( $\mu\text{g/g}$ ) en glándula digestiva de organismos nivel IV de maduración.

|              | 13-c-retinal | Ast est | Ast libre | can   | total retinoid | total car |
|--------------|--------------|---------|-----------|-------|----------------|-----------|
| $\beta$ -car | 2.88         | 8.56    | 8.16      | 0.07  | 2.88           | 16.79     |
| Asta         | 3.26         | 6.00    | 5.64      | 0.07  | 3.26           | 11.71     |
| RA 1         | nd           | nd      | nd        | nd    | nd             | nd        |
| RA 2         | nd           | nd      | nd        | nd    | nd             | nd        |
| RA 3         | nd           | nd      | nd        | nd    | nd             | nd        |
| RP 1         | 3.21         | 11.10   | 0.49      | 0.08  | 3.21           | 11.68     |
| RP 2         | 6.90         | 22.13   | 0.42      | 0.11  | 6.90           | 22.66     |
| RP 3         | 5.90         | 14.79   | 13.96     | 14.58 | 5.90           | 43.33     |
| control      | 7.05         | 17.00   | 7.00      | 25.91 | 7.05           | 49.91     |

nd = no determinado

carotenoides totales particularmente en pedúnculo ocular, respecto a los incrementos que presentó dicho indicador hacia el estadio IV en gónada y glándula digestiva en el resto de los tratamientos experimentales. El total de retinoides en este tratamiento no tuvo incrementos en pedúnculos oculares y glándula digestiva. Sin embargo éste si se registró en tejido ovárico hacia la etapa IV de maduración (Tablas XIV y XV).

En general, en los tratamientos con retinol palmitato, las concentraciones de carotenoides totales se ven disminuidas en el nivel IV de maduración respecto al II en los tres órganos analizados. Un patrón similar se registró en los retinoides totales en este tratamiento siendo más pronunciado esta reducción en pedúnculos oculares (Tabla X, XI). En la glándula digestiva, se observó un aumento en el total de carotenoides totales, solo en los tratamientos con carotenoides respecto a los dos niveles de maduración (Tablas XII y XIII). En los tres tratamientos inyectados con ácido retinoico no se presentaron organismos en la etapa IV de maduración, sin embargo en pedúnculo ocular de la etapa II se observa mucho menor la concentración de carotenoides totales, respecto al resto de los tratamientos y mayor en cuanto a retinoides totales (Tabla XI). En estos mismos tratamientos particularmente en glándula digestiva se observaron mayores concentraciones respecto al resto de los tratamientos (Tabla XIII).

En la glándula digestiva las concentraciones de retinoides y carotenoides totales, aumentan gradualmente respecto a la concentración del metabolito inyectado en el estadio II (Tabla XIII), los organismos de maduración avanzada presentan este mismo patrón pero en forma más pronunciada (Tabla XIV). En el caso del ovario (Tablas XIV y XV) en ambos niveles de maduración gonádica, se presentó la astaxantina en su forma libre y esterificada, se observa en general un patrón de reducción de la forma esterificada hacia el nivel IV de maduración. Respecto al total de retinoides, se

**Tabla XVI.** Proporción de conversión carotenoides/retinoides en el estadio IV en los tratamientos en los cuales se obtuvo la maduración gonádica de *L. vannamei*.

| Trat.           | dosis<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Car total<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Ret total<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Relación<br>carot/retin |
|-----------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| $\beta$ -carot. | 18.6                         | 3.54*                            | 2.53                             | 1: 0,71                 |
| Asta            | 18.6                         | 2.03*                            | 1.18                             | 1: 0,58                 |
| RP1             | 5.3                          | 2.06                             | 0.68*                            | 1: 0,33                 |
| RP2             | 10.6                         | 1.89                             | 1.4*                             | 1: 0,74                 |
| RP3             | 16                           | 4.111                            | 3.34*                            | 1: 0,81                 |
| control         | -                            | 0.63                             | 1.25                             | 1: 1,42                 |

\* Valor producto de la diferencia entre la concentración del tratamiento inyectado menos la concentración del tratamiento control en el caso

**Tabla XVII** Porcentaje de carotenoides respecto al nivel IV de los tratamientos en los cuales se obtuvo la maduración gonádica de *L. vannamei*.

| Trat.           | dosis<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Carotenoides (%) |            |                 |       |
|-----------------|------------------------------|------------------|------------|-----------------|-------|
|                 |                              | asta libre       | asta ester | $\beta$ -carot. | canta |
| $\beta$ -carot. | 18.6                         | 29.4             | 31.8       | 8.8             | 29.7  |
| Asta            | 18.6                         | 40.9             | 3.38       | 15              | 40.9  |
| RP1             | 5.3                          | 2.9              | 29.1       | 33.9            | 33.9  |
| RP2             | 10.6                         | 38.1             | 53.4       | 5.2             | 3.7   |
| RP3             | 16                           | 49.1             | 46.7       | 2.1             | 2.1   |
| control         | -                            | 12.6             | 58.7       | 12.6            | 13.4  |



observa un incremento hacia el nivel IV únicamente del tratamiento con  $\beta$ -caroteno, en este último nivel se presentan además del 13-*cis*-retinal y el *all-trans*-retinal el 13-*cis*-retinol.

Las Figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19 presentan los cromatogramas HPLC (350 nm) y espectros de absorción característicos en pedúnculos oculares, glándula digestiva y ovario en forma respectiva para el tratamiento de retinol palmitato con mayor concentración de inclusión (RP3). En la Figura 14 y 15 se observan cuatro especies de retinoides en el estadio IV, mientras que en el estadio II solo se destacó la presencia de *all-trans*-retinol en pedúnculos oculares. Los espectros de absorción corroboraron la presencia de retinoides y exhiben la absorción de carotenoides como la astaxantina. En el caso de la glándula digestiva (Figuras 16, 17), la presencia de retinoides solo fue representada por el 13-*cis*-retinal, en cuanto a los carotenoides presenta un perfil conservado en ambos estadios en cuanto a las formas libres y esterificada de la astaxantina, y la cantaxantina. En tejido ovarico (Figuras 18 y 19) el *all-trans*-retinol se presentó para la condición II y el 13-*cis*-retinal, y en el caso del nivel IV de maduración gonádica además de dichos retinoides se presentó el 13-*cis*-retinol. Las formas libres y esterificadas de astaxantina así como el  $\beta$ -caroteno y la cantaxantina conformaron las curvas características en el espectro de absorción.

Las Figuras 20 y 21, exhiben el perfil de carotenoides y retinoides en pedúnculo ocular, los cuales varían en composición y abundancia respecto al niveles de maduración II y IV. De acuerdo a ello el nivel II presentó solo un compuesto retinoico en todos los tratamientos (*all-trans*-retinal), siendo este único el presente entre tratamientos con ácido retinoico. Para el nivel IV se identificaron adicionalmente el 13-*cis*-retinol, *all*-



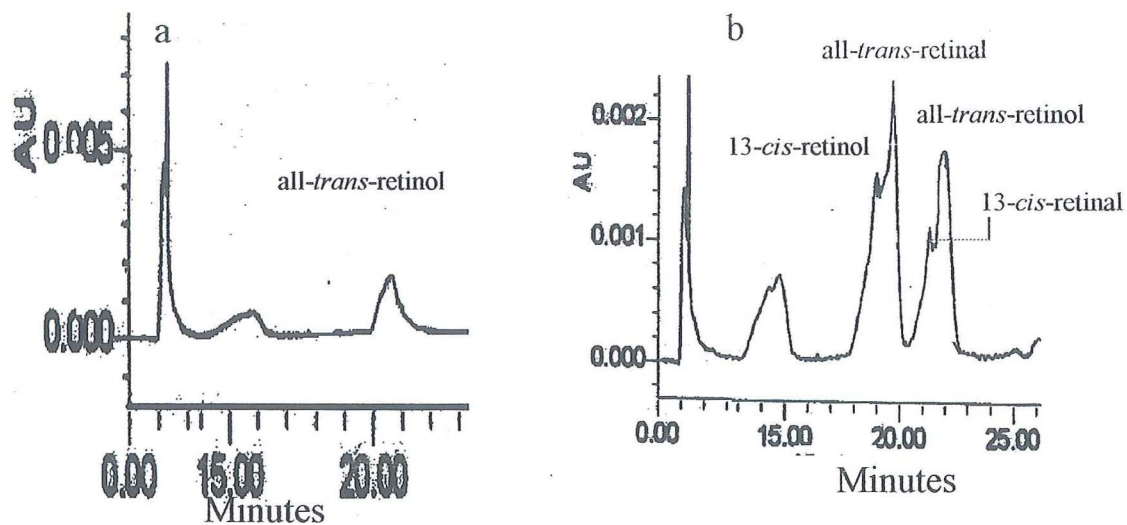


Figura 14.-Cromatogramas HPLC (350 nm) de retinoides extraídos del pedúnculo ocular nivel II (a) y nivel IV (b) de maduración (tratamientos RP 3)

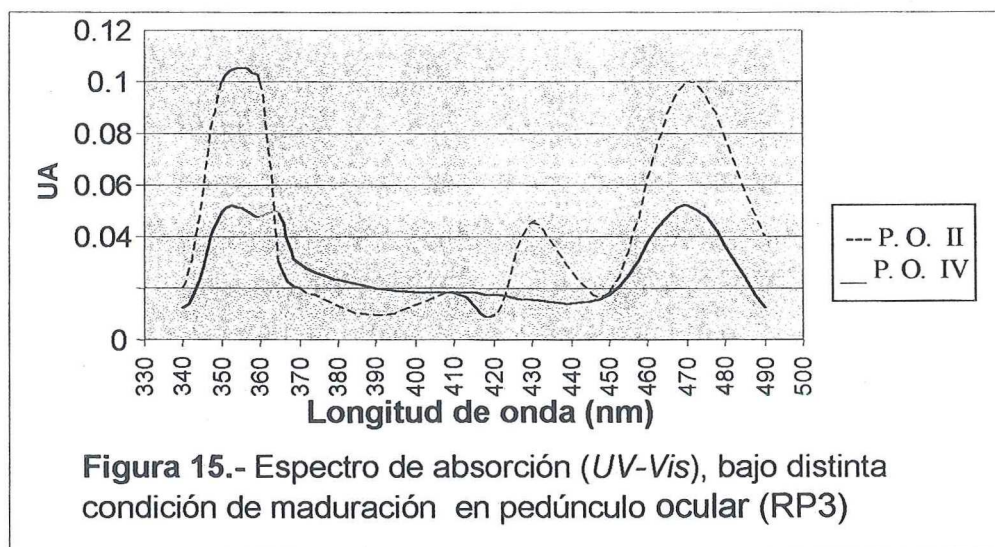


Figura 15.- Espectro de absorción (UV-Vis), bajo distinta condición de maduración en pedúnculo ocular (RP3)

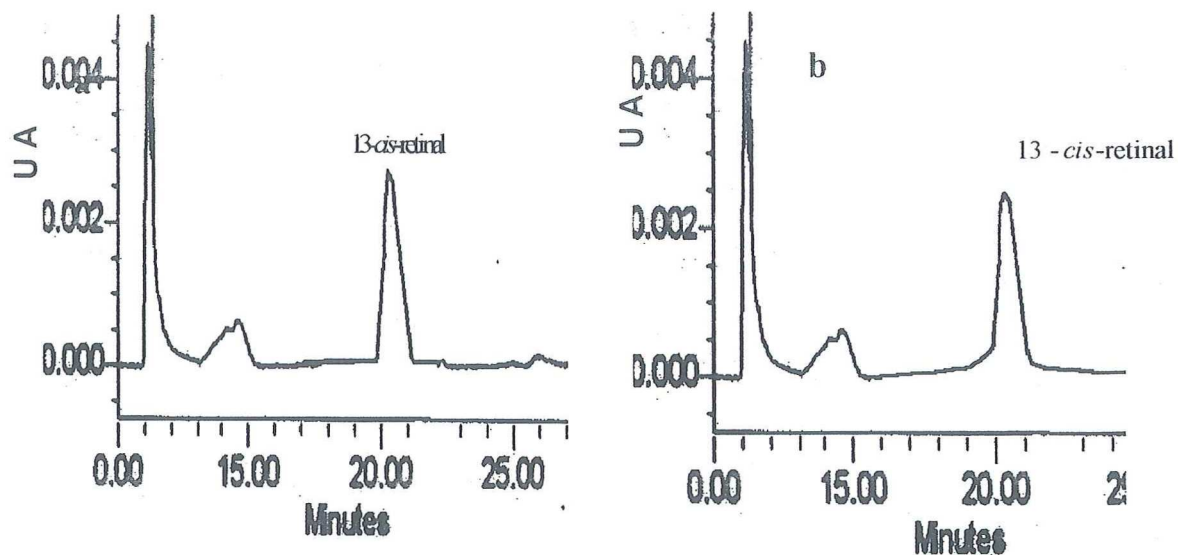


Figura 16.-Cromatogramas HPLC (350 nm) de retinoides extraídos de la glándula digestiva nivel II (a) y nivel IV (b) de maduración (RP 3)

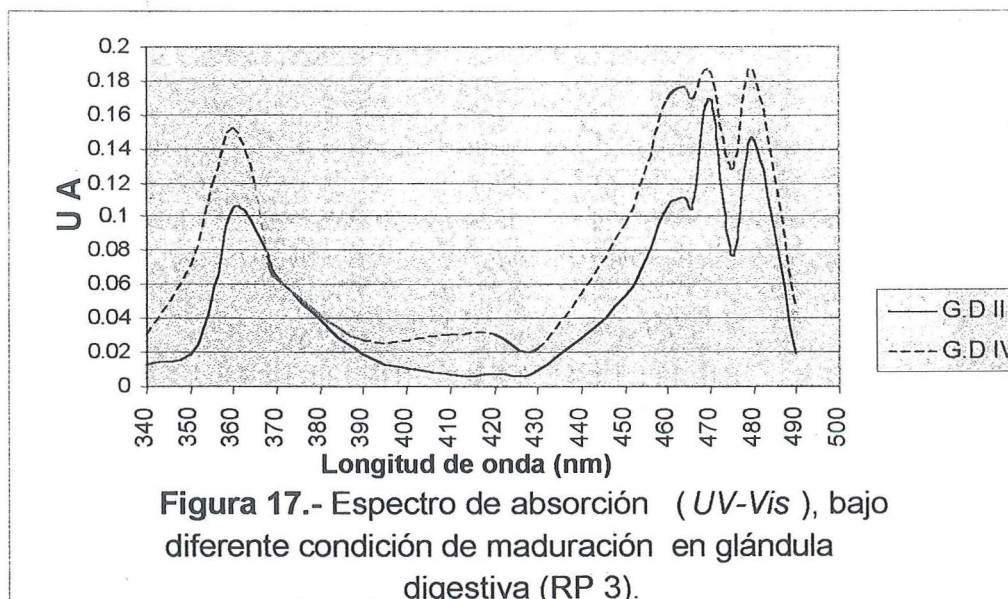
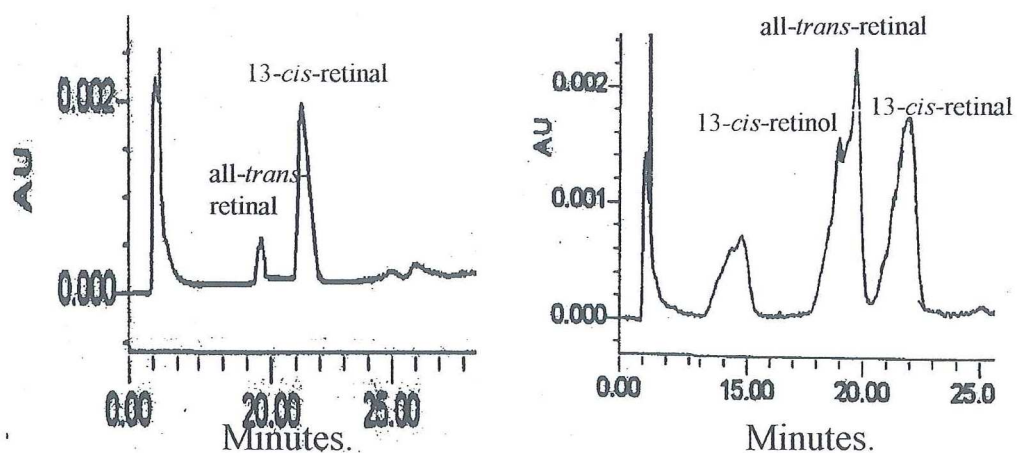
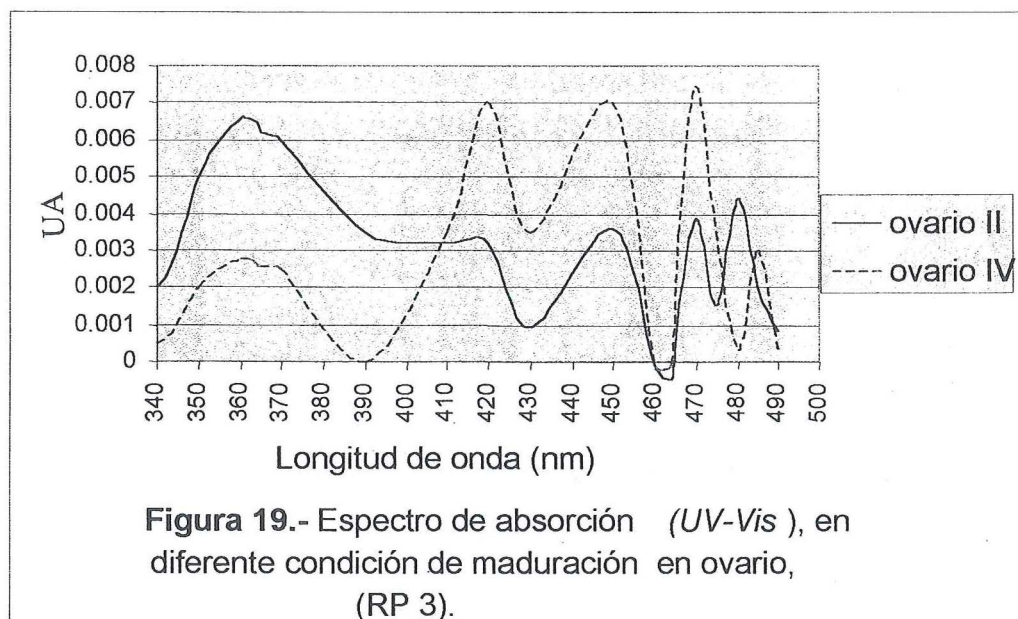


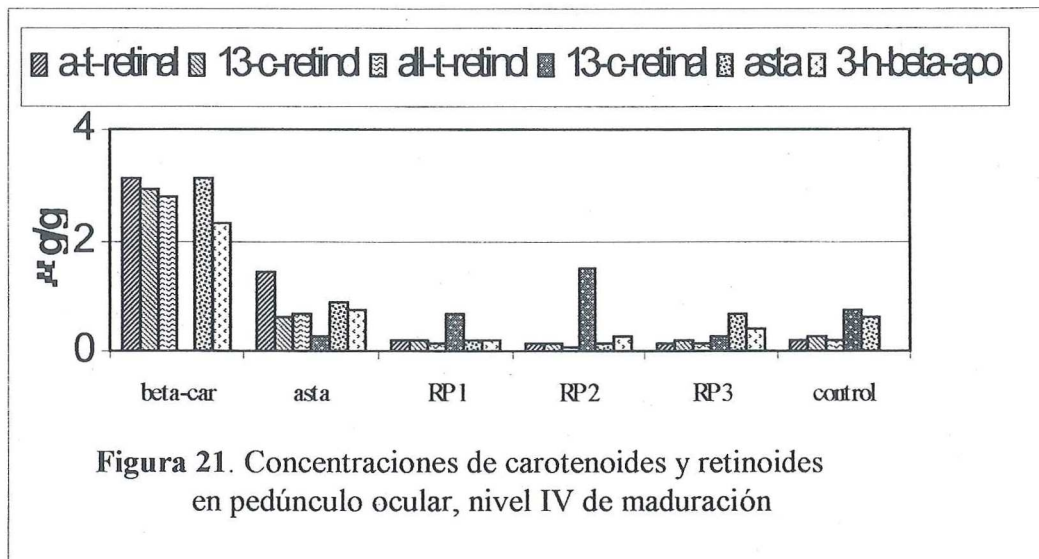
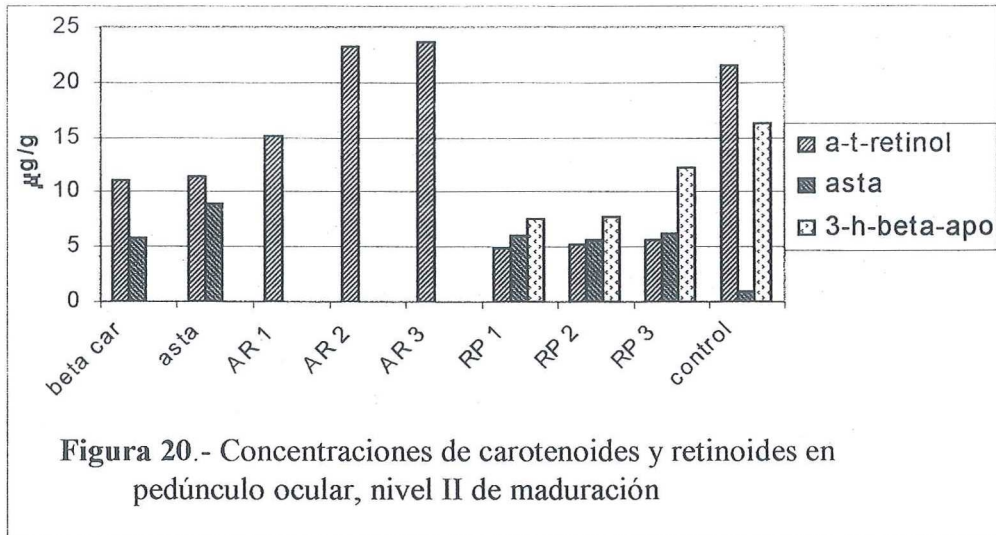
Figura 17.- Espectro de absorción (UV-Vis), bajo diferente condición de maduración en glándula digestiva (RP 3).



**Figura 18.-** Cromatogramas HPLC (350 nm) de retinoides extraídos del ovario nivel II (a) y nivel IV (b) de maduración (RP 3)



**Figura 19.-** Espectro de absorción (UV-Vis), en diferente condición de maduración en ovario, (RP 3).



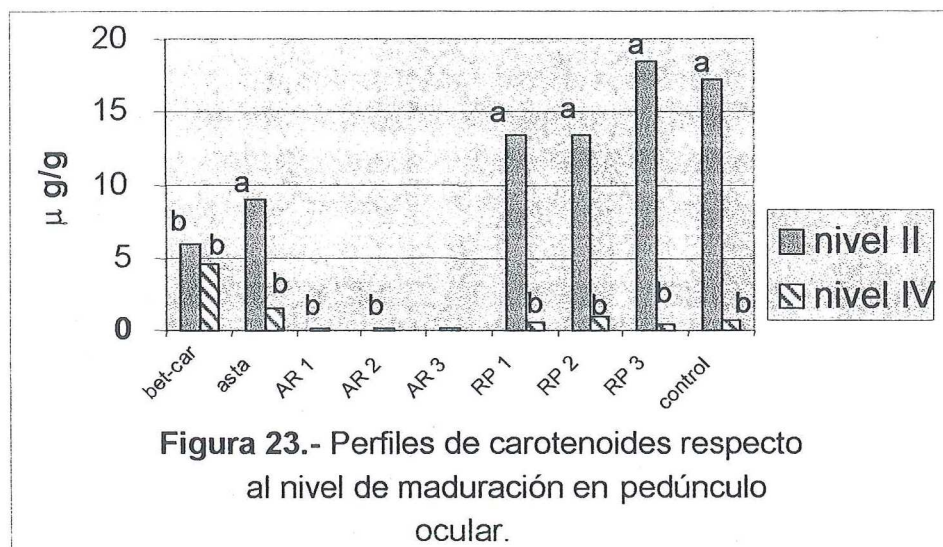
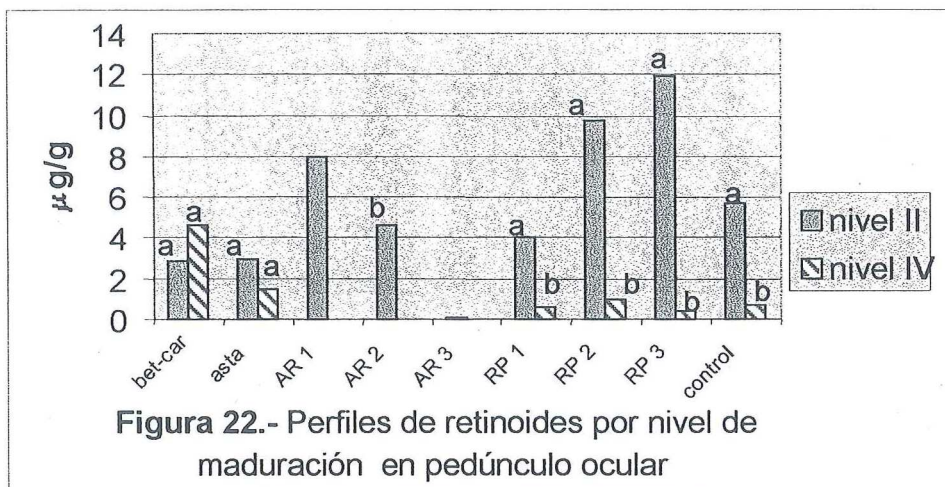


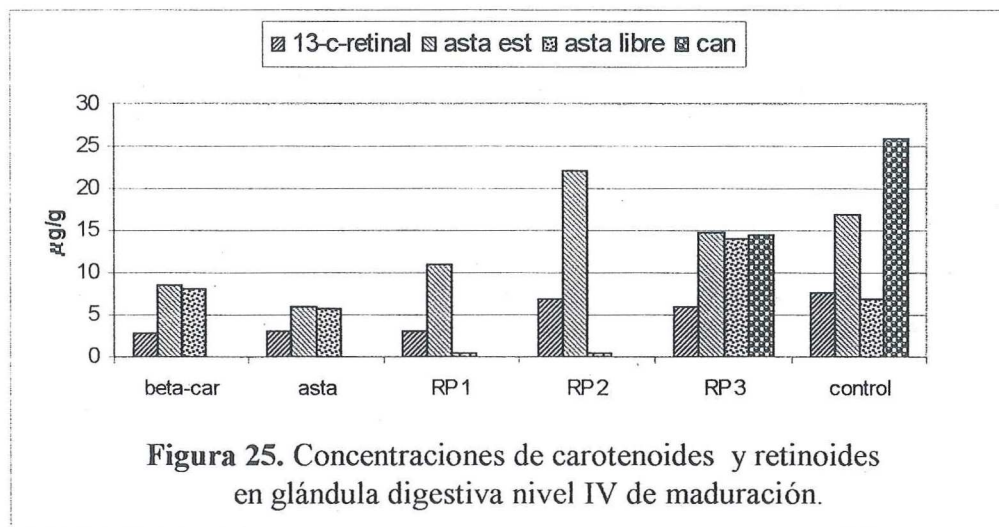
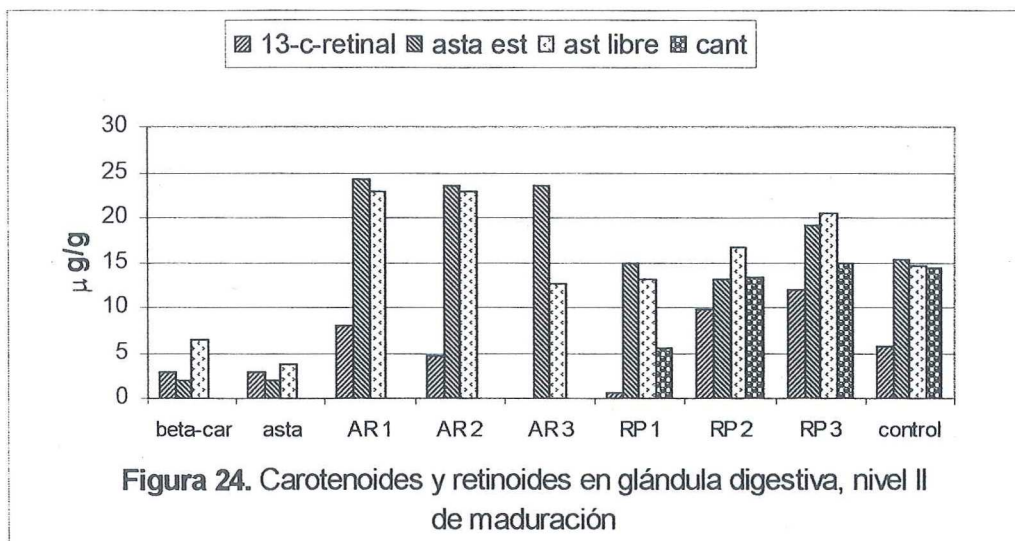
*trans*-retinol, y 13-*cis*-retinal, correspondiendo particularmente a los tratamientos con  $\beta$ -caroteno y retinol palmitato (Figura 21).

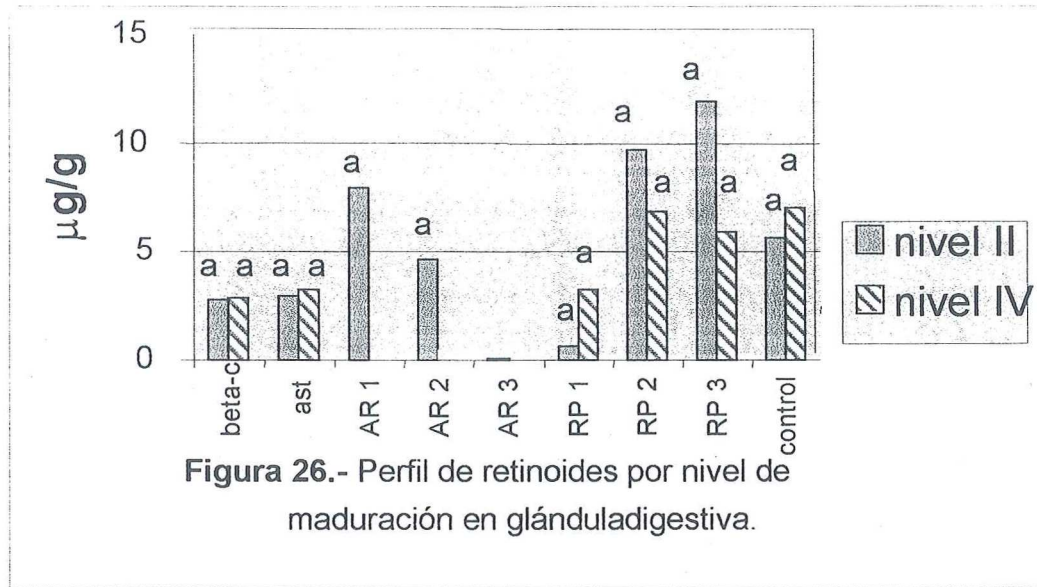
En las Figuras 22 y 23 se presentaron la totalidad de componentes de retinoides y carotenoides en pedúnculo ocular por estadio respectivamente, las concentraciones totales de retinoides fueron mayores en el estadio IV respecto al II, a excepción del tratamiento  $\beta$ -car y Ast ( $p < 0.05$ ). Los carotenoides fueron significativamente mayores en el nivel IV solamente en los tratamientos RP1, RP2, RP3 y control ( $p < 0.05$ ).

Las Figuras 24 y 25 muestran los compuestos presentes en los estadios II y IV de maduración en la glándula digestiva respectivamente, se destaca la presencia del 13-*cis*-retinal en ambos estadios al igual que la cantaxantina y la astaxantina en su forma libre y esterificada. En el estadio II se reconocen las mayores concentraciones de carotenoides en los tratamientos de ácido retinoico. La cantaxantina se presenta en todos los tratamientos de RP y control en estadio II y solamente en RP3 y control del nivel IV. De acuerdo a las comparaciones entre retinoides y carotenoides totales (Figuras 26 y 27 respectivamente), en glándula digestiva no existieron diferencias significativas entre retinoides a los dos niveles de maduración ( $p > 0.05$ ), sin embargo en los tratamientos RP1, RP2 y RA 2, se observó una mayor proporción de retinoides en nivel II, en tratamientos con  $\beta$ -caroteno y astaxantina las concentraciones de retinoides son similares. El total de carotenoides en este organismo es significativamente mayores ( $p < 0.05$ ), en el nivel IV respecto al II en tratamiento control ( $p > 0.05$ ) y se observaron menores concentraciones en ambos niveles en los tratamientos con ácido retinoico respecto a los tratamientos RP2, RP3 y control.

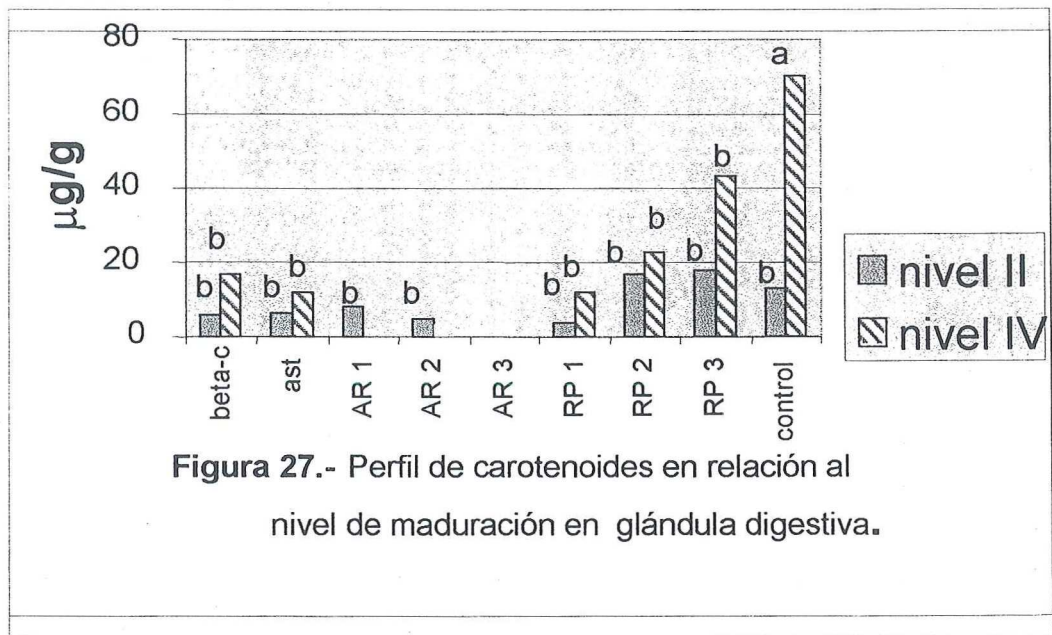
Las Figuras 28 y 29 presentan las concentraciones de carotenoides niveles II y IV de ovario respectivamente, detectándose un nivel de concentración de astaxantina libre en





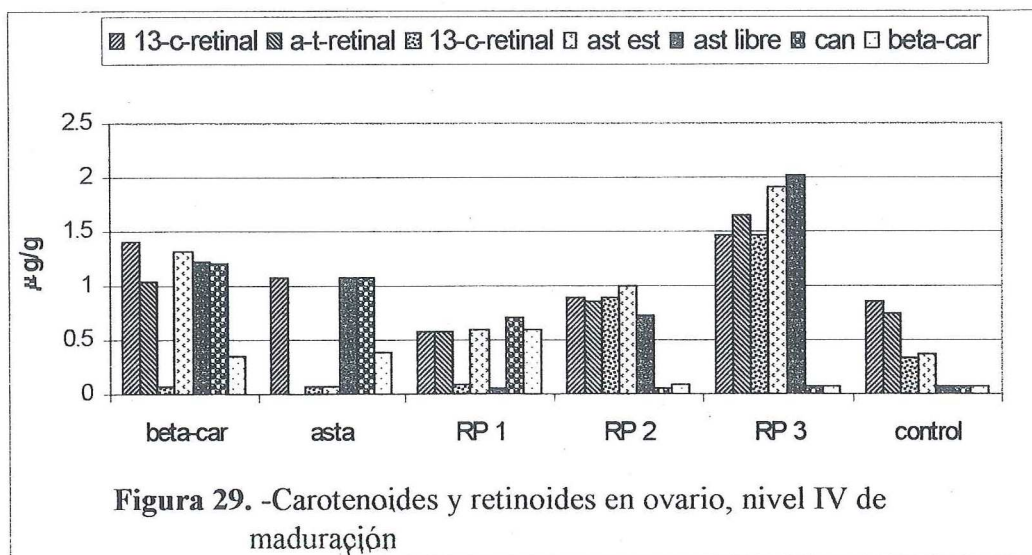
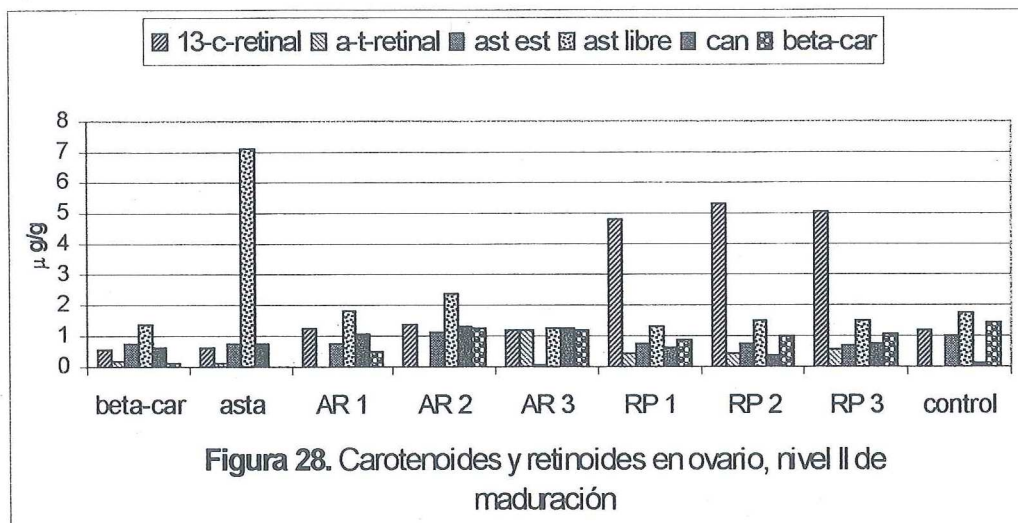


**Figura 26.-** Perfil de retinoides por nivel de maduración en glándula digestiva.



**Figura 27.-** Perfil de carotenoides en relación al nivel de maduración en glándula digestiva.



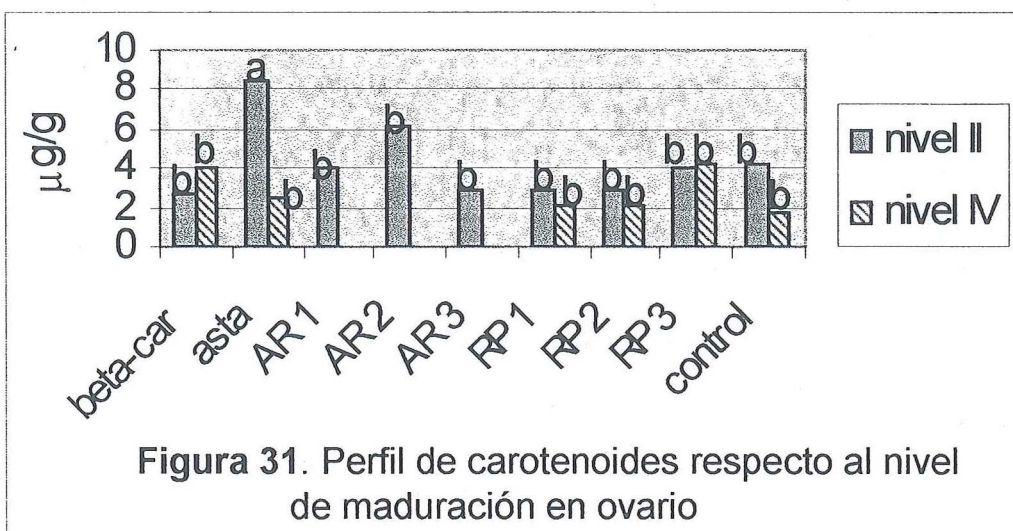
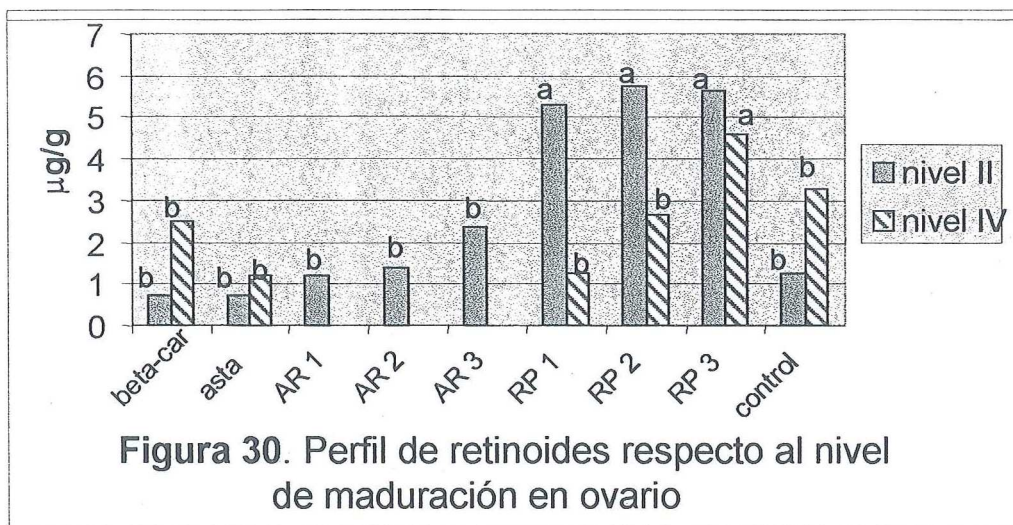


el tratamiento astaxantina, que fue significativamente diferente al resto de los tratamientos del nivel II de maduración ( $p < 0.05$ ). En ambos niveles y en la mayoría de los tratamientos estuvieron presentes la astaxantina en su forma estérica y libre, el  $\beta$ -caroteno y cantaxantina. En cuanto a retinoides en el estadio II se presentaron dos de los tres retinoides presentes en el nivel IV, el 13-*cis*-retinal fue el de mayor concentración en el estadio II, mientras que en el nivel IV no se registraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en cuanto a los diferentes retinoides.

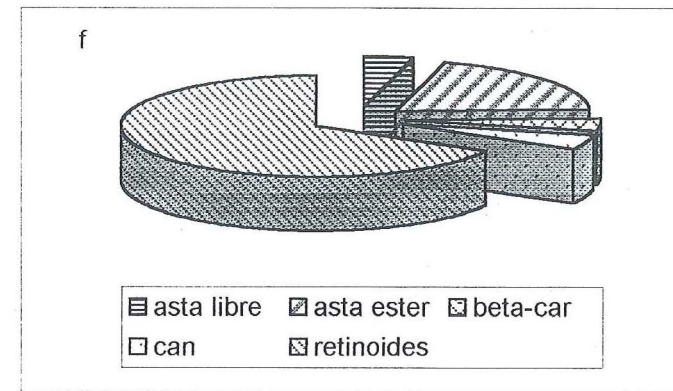
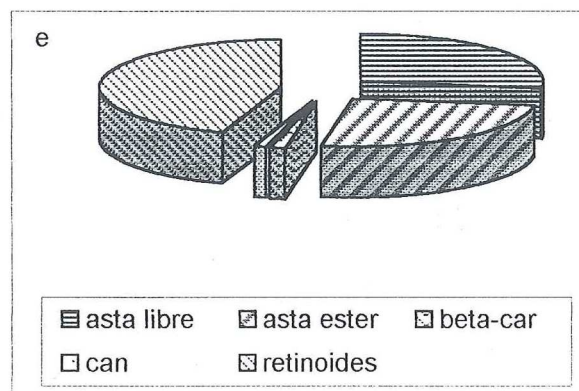
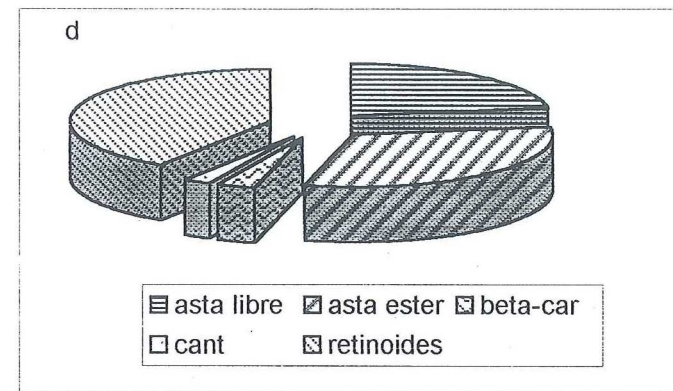
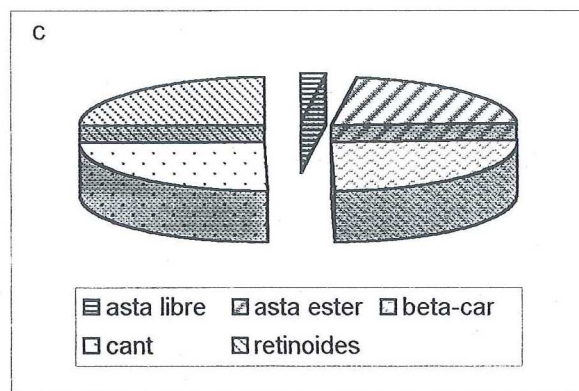
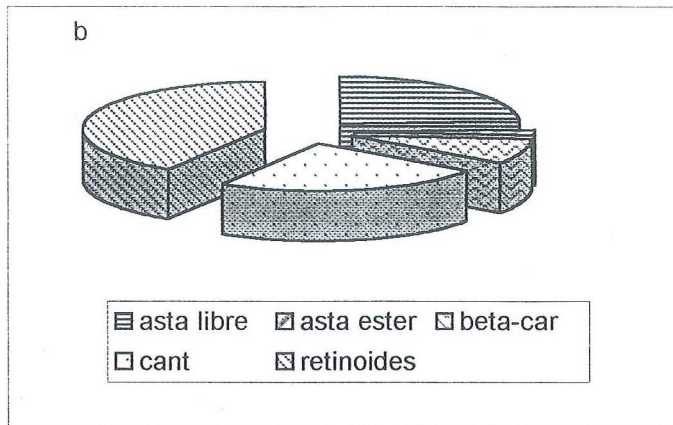
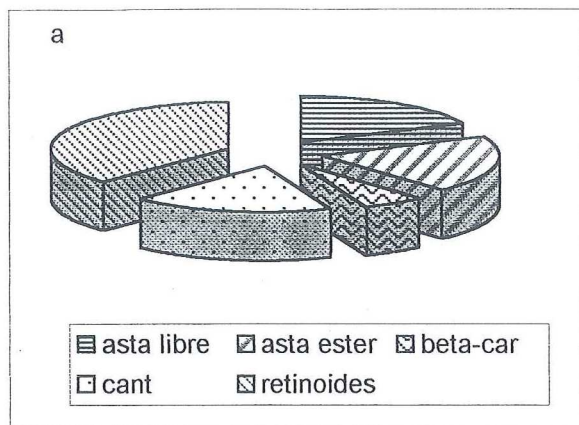
La Figura 30 representa el total de retinoides respecto al estado de maduración observándose mayores niveles de retinoides ( $p < 0.05$ ), en estadio II en los tratamientos RP 1, RP 2. En el resto de los tratamientos las concentraciones no llegaron a ser diferentes significativamente ( $p > 0.05$ ). El total de carotenoides por su parte (Figura 31) se presentó a mayor concentración ( $p < 0.05$ ) en el estadio II para el tratamiento de Ast respecto a la mayoría del resto de los tratamientos. Se observaron concentraciones de carotenoides totales en todos los tratamientos que fluctúa entre los 4  $\mu\text{g/g}$ .

### **9.2.3.- Biotransformación de tratamientos vía hemolinfa**

Con la finalidad de reconocer los posibles mecanismos de biotransformación de los metabolitos inyectados, la Tabla XVI y la Figura 32 presentan las proporciones de conversión de carotenoides/retinoides en ovario, en la última fase de maduración gonadal (IV), considerando las diferencias entre compuesto inyectado menos nivel del metabolito en el control, y la relación entre carotenoides:retinoides. Se observó una mayor relación de retinoides respecto a carotenoides en el tratamiento de  $\beta$ -caroteno, RP 3, y RP2, sin embargo estos valores fueron inferiores al presentado en el tratamiento control. En este tratamiento predominó la forma estérica de la astaxantina,







**Figura 32.** Proporción de carotenoides y retinoides, en los diferentes tratamientos inyectados, ovario de *L. vannamei* (nivel IV de maduración gonadal). Tratamientos: a)  $\beta$ -caroteno, b) astaxantina, c) retinol palmitato 1, d) retinol palmitato 2, e) retinol palmitato 3, f) control.

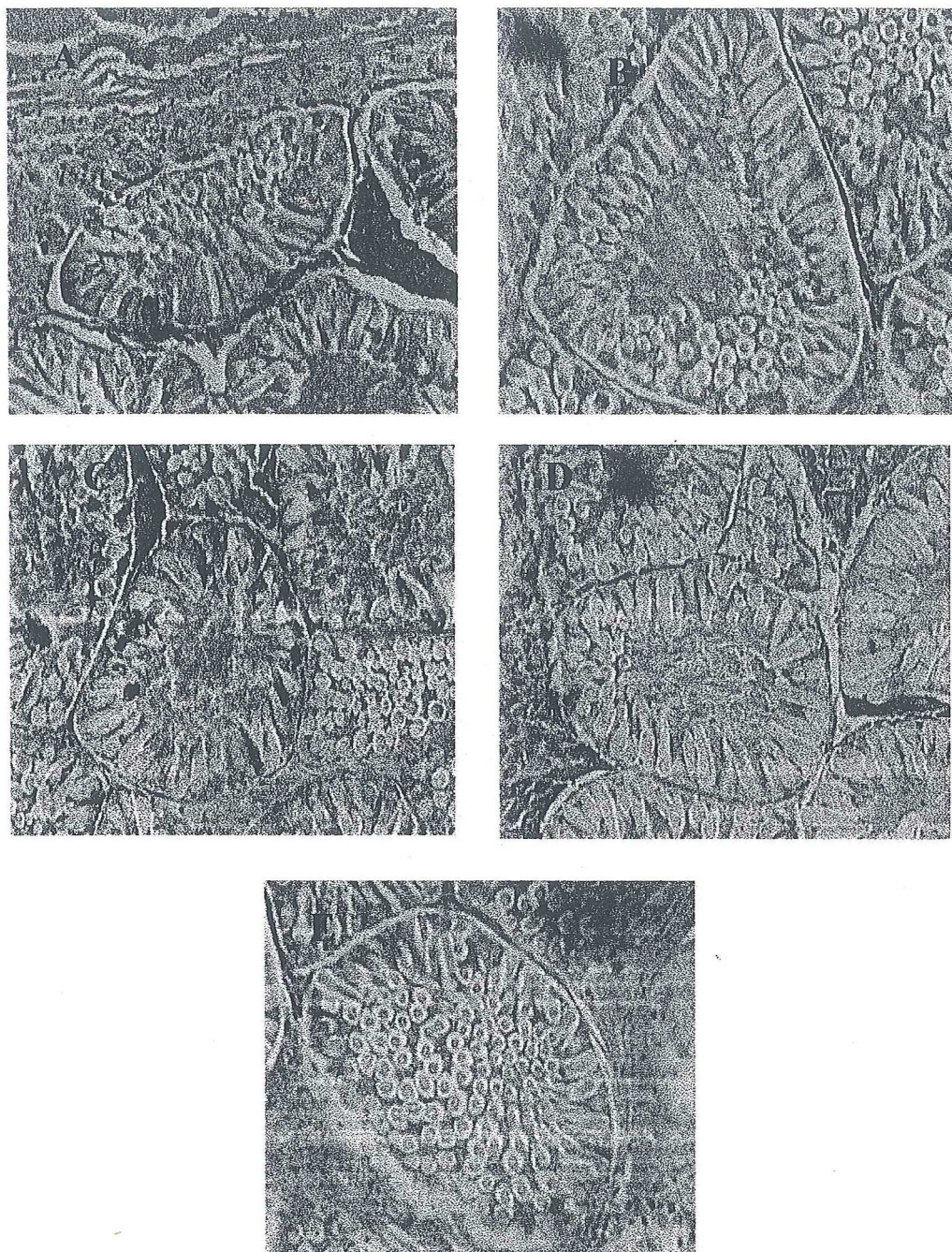


al igual que en los tratamientos RP2. Y  $\beta$ -caroteno. En el caso del tratamiento RP 3 predominó la forma libre de la astaxantina sobre la esterica (Tabla XVII).

#### 9.2.4.- Efectos celulares de tratamientos inductores

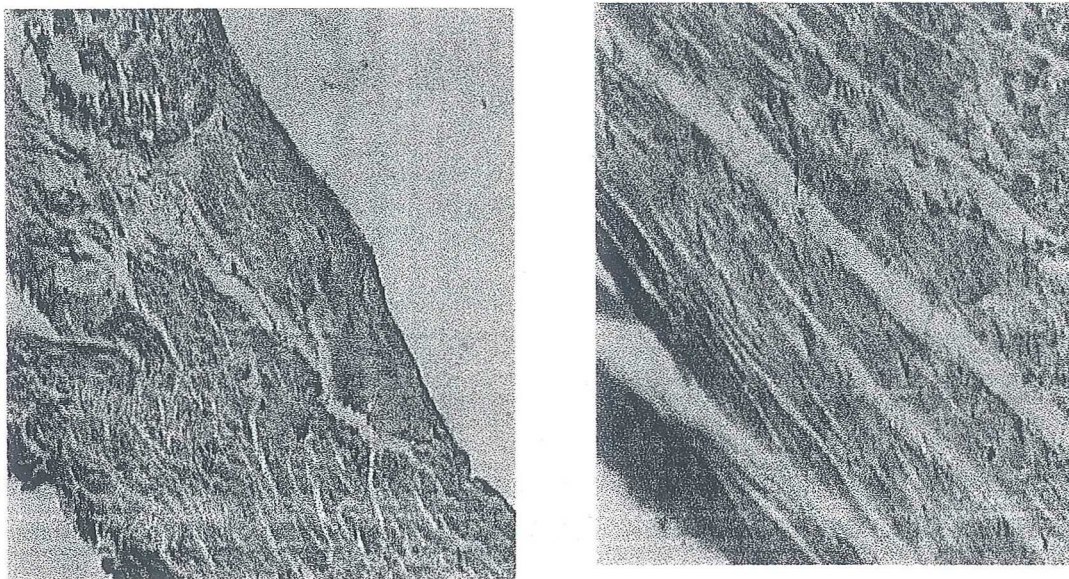
Las Figuras 33 y 34 presentan las estructuras del ovario y músculo de reproductores hembra, condición IV de maduración, la cual se realizará paralela a las pruebas de inmunohistoquímica. Con base a la descripción histológica para peneidos propuesta por Bell y Lightner, 1988, se muestra que en ovario y estructuras internas del oocito así como en tejido muscular, no se presentó algún tipo de alteración en su estructura interna.

Las Figuras 35 y 36 presentan las estructuras de la gónada y músculo respectivamente bajo distintos tratamientos (retinol palmitato y ácido retinoico), en las cuales no se detectó la pigmentación característica hacia el rojo que denota al acoplamiento de los anticuerpos respecto a fluorocromos (Figura 37 A, B), y con ello se considera que los anticuerpos para receptores nucleares de *Uca pugilator*, no correspondieron a los receptores nucleares para *L. vannamei*.

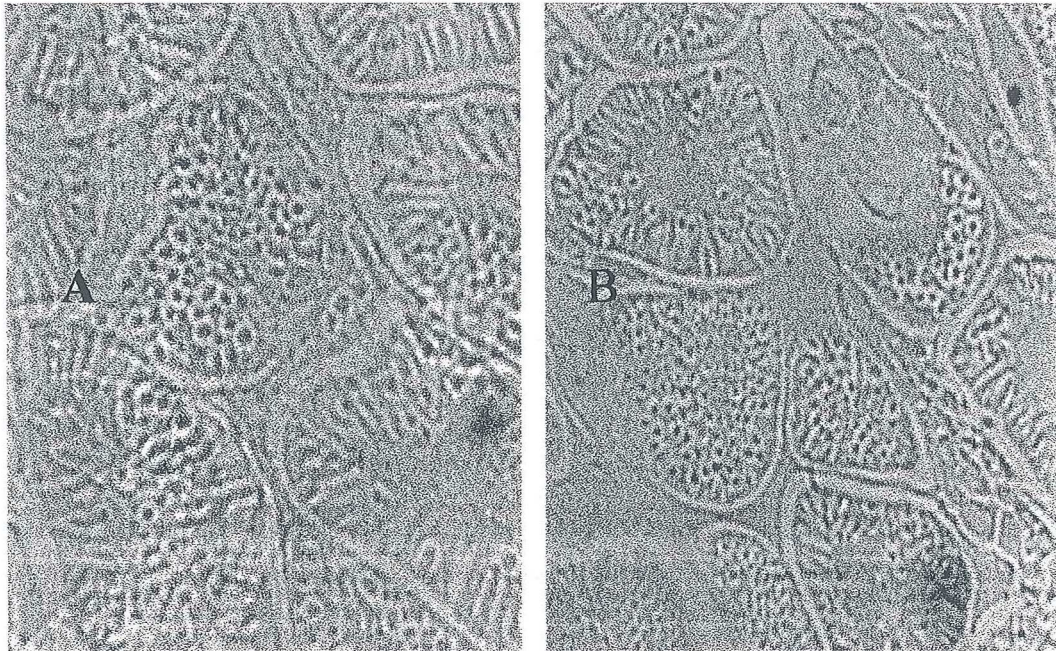


**Figura 33.** Estructura de ovario estadio IV de maduración gonádica mostrando un oocito en ovario de reproductor hembra en *L. vannamei* (36.0 g). Sección longitudinal en parafina 4-5  $\mu\text{m}$ , fijación Bouin's, tinción H&O, longitudinal de barrido 40  $\mu\text{m}$ . Tratamientos: A)  $\beta$ -caroteno; B) astaxantina C) Retinol palmitato 1 D) Retinol palmitato 2; E) Retinol palmitato 3.



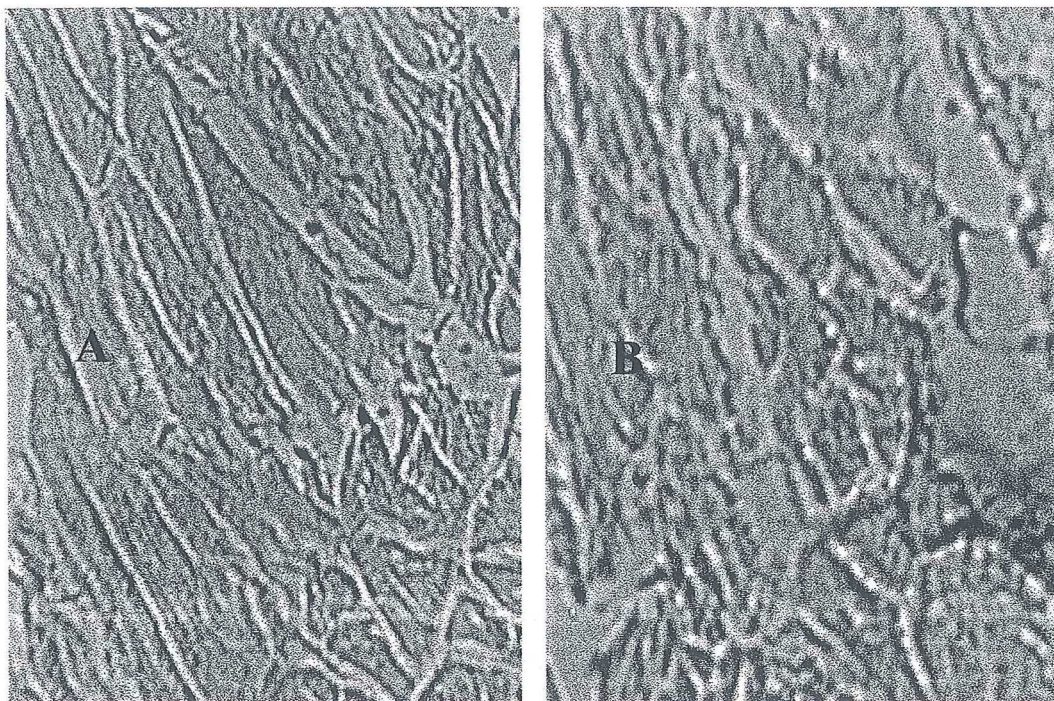


**Figura 34.** Estructura de músculo, en estadio IV de maduración gonádica, reproductor hembra de *L. vannamei* (35.0 g). Tratamiento retinol palmitato<sup>3</sup>. Sección longitudinal en parafina 4-5  $\mu\text{m}$ , fijación Bouin's, tinción H&O, longitudinal de barrido 40  $\mu\text{m}$ .

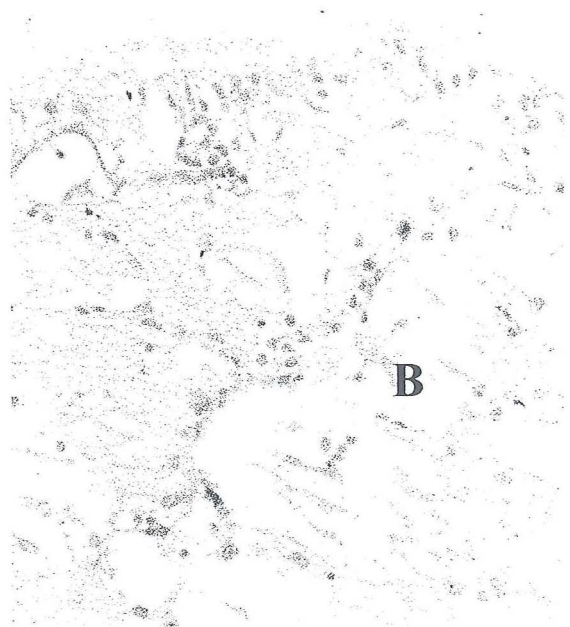


**Figura 35.-**Inmunohistoquímica de ovario de *L. vannamei* para receptores X de retinoides (RXR) tratamiento retinol palmitato (A); ácido retinoico (B). Sección longitudinal 4-5  $\mu\text{m}$ ; 40  $\mu\text{m}$  longitud de barrido.





**Figura 36.**-Inmunohistoquímica del músculo de *L.vannamei*, para receptores X de retinoides (RXR), tratamiento retinol palmitato (A); ácido retinoico (B). Sección longitudinal 4-5  $\mu\text{m}$ ; 40  $\mu\text{m}$  longitud de barrido.



**Figura 37.-** Inmunohistoquímica en extremidades regeneradas de *Uca pugilator*, A: reacción positiva a RXR, B: reacción negativa. Sección longitudinal 4-5  $\mu\text{m}$ ; 40  $\mu\text{m}$  longitud de barrido.



## X DISCUSIÓN

### 10.1 Metabolismo de carotenoides y nivel de maduración

Los organismos del medio silvestre exhibieron una mayor diversidad y abundancia de carotenoides totales, debido a la diversidad alimentaria disponible en el medio natural. Por su parte en organismos sexualmente agotados las concentraciones de carotenoides totales aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) del estadio II al IV en glándula digestiva y gónada ( $p < 0.05$ ). En organismos silvestres las diferencias solo se dieron en la glándula digestiva, donde la conformación y variedad de carotenoides es mucho mayor respecto a organismos cultivados. Así, en organismos silvestres no se presentó el  $\beta$ -caroteno pero si se determinaron carotenoides como el 14-*apo*- $\beta$ -caroteno, foenicoxantina, criptoxantina además de la astaxantina, lo cual es lógico si consideramos son parte la ruta biotransformación de  $\beta$ -caroteno a astaxantina (Figura 1). Un factor que pudo haber tenido efecto sobre la aparente deficiencia en cuanto al metabolismo de  $\beta$ -caroteno en los reproductores cultivados y ablacionados para su inducción a la reproducción, fue lo mencionado por Castillo y Negre-Sadargés, 1991, los cuales reconocieron un efecto de la ablación bilateral sobre la depositación de carotenoides en diferentes tejidos del cangrejo *Clibanarius erythropus*, lo cual resulta lógico al considerar la importancia de los pedúnculos oculares como fuente de control hormonal a través del complejo órgano-X/glándula del seno que esta involucrado en el control de múltiples procesos entre los cuales se regula los cambios de color y migración de pigmentos.

Desde el punto de vista nutricional se ha reconocido un cambio en cuanto a las preferencias nutricionales de hembras de peneidos a medida que éstas alcanzan la parte



terminal de la vitelogenesis y maduración de la gónada, por lo cual migran hacia aguas más profundas donde los alimentos contienen otros carotenoides que podrían intervenir en la maduración gonádica (Crocós 1985).

Diferentes autores han publicado modificación en los perfiles de carotenoides durante el proceso de maduración y desarrollo embrionario de crustáceos (Vincent, et al. 1988a; Vincent, et al. 1988b; Kour y Subramoniam, 1992; Sagi, et al. 1995; Mantiri, et al. 1996). De acuerdo a Chang, (1993) y Harrison, (1990), este requerimiento de carotenoides obedecería a sus facultades de asociación con vitelinas, a través de un complejo de naturaleza lipo-glico-carotenoproteico. Esta macromolécula se acumula en el citoplasma del oocito quedando disponible para los distintos requerimientos metabólicos y nutricionales del embrión.

En el ovario y la glándula digestiva de organismos silvestres se observó además del  $\beta$ -caroteno y astaxantina, la presencia de otros carotenoides como el 14-*apo*- $\beta$ -caroteno, rodaxantina, foenicoxantina y una cantidad mayor de carotenoides no identificados, cuyo origen puede ser la mayor diversidad de la dieta natural, así como el hecho que algunos tales como la foenicoxantina y criptoxantina sean productos intermediarios de la biotransformación de astaxantina (Meyers y Lacha 1997). Por otra parte las formas *apo* de carotenoides al cual pertenece el 14-*apo*- $\beta$ -caroteno y la criptoxantina pertenecen al grupo reducido de carotenoides que presenta una menor capacidad de ser transformados a vitamina A (Burton y Ingold 1984; Bauernfeld et al., 1980).

De acuerdo a las Tablas IV, y V las concentraciones de vitamina A, se mantuvieron en una misma proporción respecto a los carotenoides totales tanto en ovario y glándula digestiva en poblaciones silvestres y cultivadas así como en los diferentes estadios de maduración (Figuras 9, 10, 11, 12). Lo anterior permitiría hipotetizar el hecho que los

peneidos exhiban de manera alterna a la función pigmentaria, rutas alternas para la biotransformación de carotenoides a retinoides como una respuesta a las demandas fisiológicas relacionadas con la señalización y activación de procesos biológicos vitales, así como a la inmunoprotección de tejidos celulares (Figura 38). Esta estrategia hacia la obtención de vitamina A partir de carotenoides, ha sido ampliamente descrita en vertebrados (New, 1976; Bauernfeind, et al., 1980; Wolf, 1984; Olson, 1989); en peces marinos y agua dulce (Schiedt, et al 1985; Katsuyama y Matsumo 1985; Guillou et al., 1989), y particularmente descritos en algunos invertebrados marinos como langosta, euphausiáceos y artemia, sin embargo aun se consideran poco conclusivos. (Neilands 1947; Fisher et al., 1957; Takeuchi, et al., 1995). Particularmente para peneidos, nuestros trabajos se han centrado en proponer la biotransformación de carotenoides en retinoides asociados a los procesos de maduración gonádica de *L. vannamei*. (Liñán-Cabello y Paniagua-Michel, 1998; Paniagua-Michel y Liñán-Cabello, 1999) (Figura 39). Así metabolitos como el  $\beta$ -caroteno al igual que otros carotenoides han sido reconocidos por su capacidad de bioconversión hacia vitamina A. Para ello el rompimiento central o excéntrico a lo largo de la estructura molecular del carotenoide permite que no solo compuestos anoxigénicos como el  $\beta$ -caroteno tengan potencial bioactivo, así algunos carotenoides de naturaleza oxigénica como astaxantina, cryptoxantina, cantaxantina, equinona y rodoxantina, pueden llegar a ser biotransformados por procesos enzimáticos alternos a retinoides (Bauernfeind et al., 1980; Blomhoff et al., 1992; Duster 1996).

Independiente del total de carotenoides en ovario y glándula digestiva de reproductores silvestres, además del  $\beta$ -caroteno y astaxantina, se presentan la rodaxantina, y el 14-*apo*-carotenoide cuyas propiedades bioactivas han sido descritas por Blomhoff et al.,

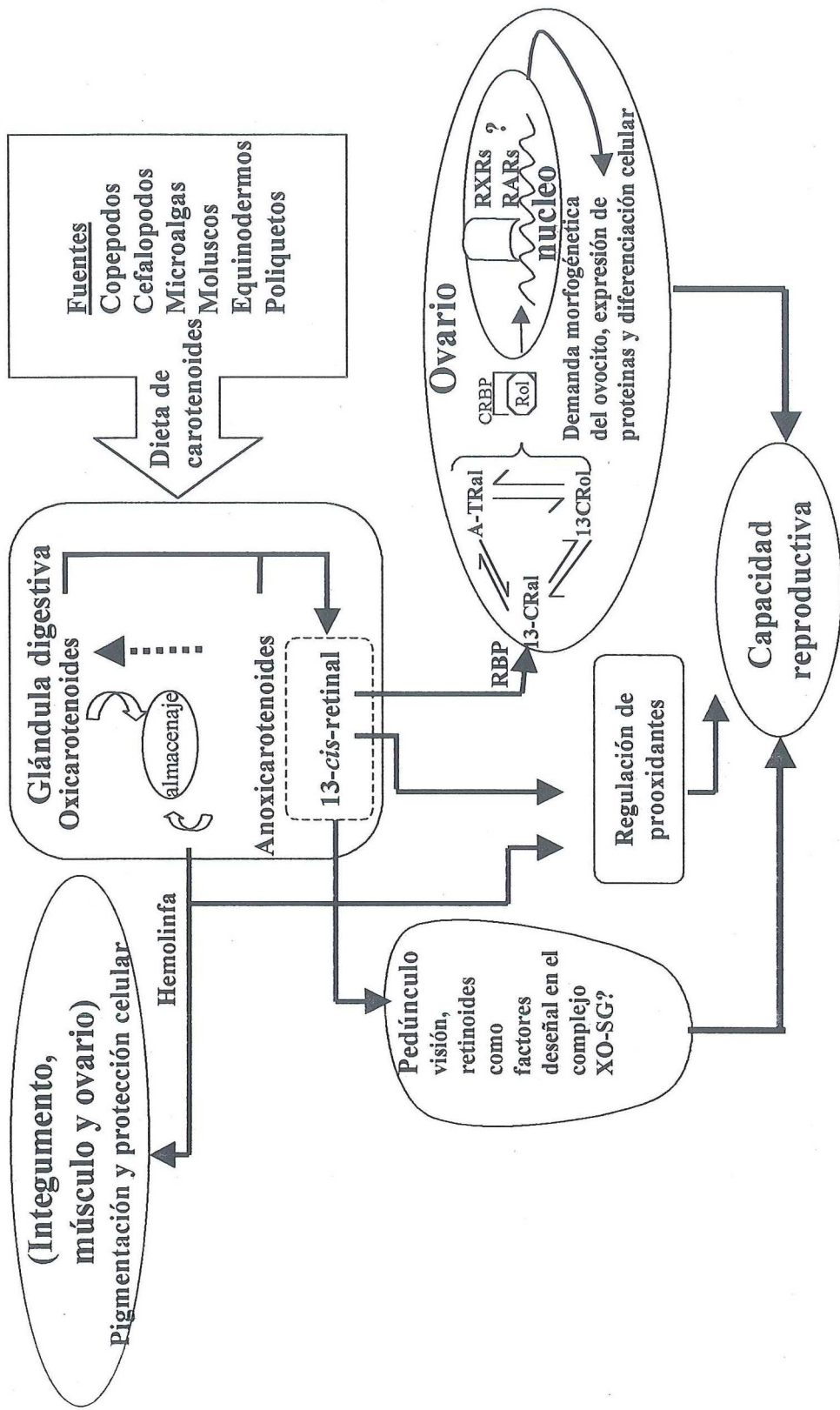
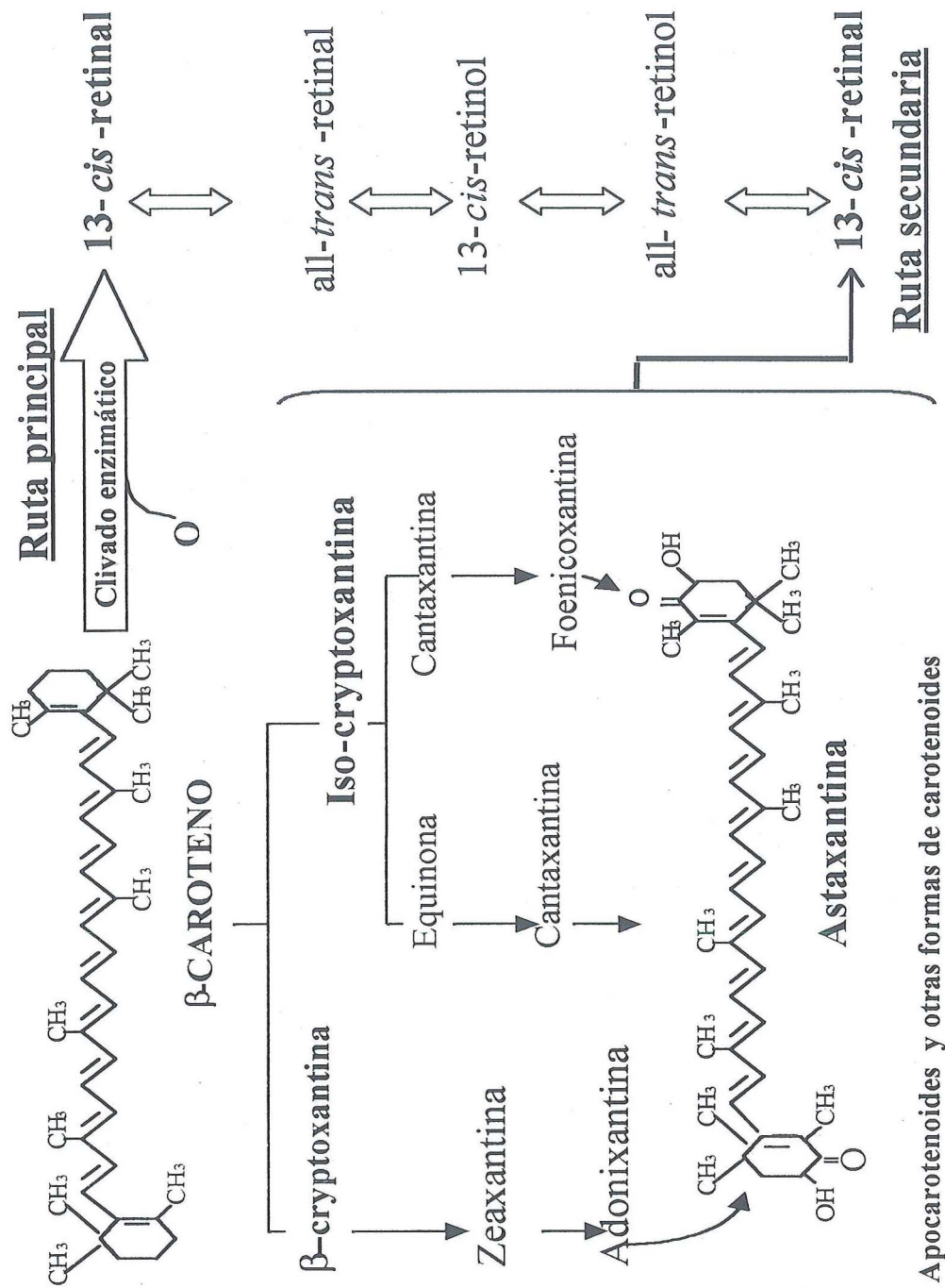


Figura 38. Esquema propuesto de los efectos macromoleculares de carotenoides y retinoides sobre la capacidad reproductiva del camarón blanco *L. vannamei*.





**Figura 39.** - Ruta de la bioconversión propuesta para carotenoides a retinoides en camarón.

1992. La presencia de estos componentes en ovario podrían sugerir su participación activa en la fisiología reproductiva de camarón debido a su funcionalidad en la transcripción de gene y la diferenciación celular (Alam y Alam, 1983; Mangelsdorf y Evans 1992), los cuales son procesos vitales durante la morfogénesis del oocito y desarrollo embriónico de *L. vannamei*.

En crustáceos decápodos, la maduración gonádica es un período de enorme gasto energético debido al requerimiento biosintético de macromoléculas para la producción de material genético, así la calidad y cantidad de nutrientes del vitelo dependen principalmente de las reservas corporales del organismo, así como de la capacidad de biosintetizar macromoléculas y como principio determinante el estatus alimenticio durante el proceso de maduración (Harrison 1990). Esto explicaría las diferencias de carotenoides totales al comparar niveles de maduración entre poblaciones, los organismos en cautiverio al estar bajo la condición intensa de demanda energética propiciada por la ablación peduncular y una dieta restringida a ciertos componentes alimenticios, exhibieron menores concentraciones de carotenoides en sus órganos. Así, las menores concentraciones se determinaron en glándula digestiva (ambos niveles) y en el ovario (nivel IV) de organismos cultivados. Por lo anterior la disminución en el potencial reproductivo de las hembras en cautiverio podría tener una componente en la carencia de ingestión de carotenoides, ya que éstos constituyen una fuente de asociación y estructura de carotenoglicoproteínas de las cuales, la lipovitelina es la principal fuente de enriquecimiento para el oocito durante la maduración gonádica (Browdy, 1992; Chang, 1993).

La relación entre carotenoides respecto a la maduración de crustáceos han sido investigada por Gilchrist y Lee (1972); Vincent et al., (1988a,b); Dall (1995); Dall et al

(1995) y Sagi et al., (1995). En general todos ellos refieren un patrón de enriquecimiento hacia la etapa terminal de la maduración y especulan la posible funcionalidad de carotenoides respecto a la reproducción en el medio silvestre. El empleo de estos compuestos como aditivos nutricionales en favor a la maduración, ha sido publicado por Wyban et al. (1997), los cuales reconoce una mejoría en cuanto a la calidad y sobrevivencia en nauplios de *L. vannamei*, al suministrar durante la maduración paprika como una fuente de carotenoides. Independientemente al uso pigmentario, la funcionalidad de estas moléculas en crustáceos podría ser similar a lo establecido en vertebrados, en los cuales el clivado de las moléculas de carotenoides deriva a la obtención de retinoides, metabolitos de mayor capacidad bioactiva. Así los retinoides además de cumplir una función determinante en la visión, podrían representar un factor de gran importancia durante en desarrollo embrionario debido a su naturaleza esencial en la división y diferenciación celular. (Blomhoff et al., 1991; Ross 1993).

Algunos autores han asumido la funcionalidad de retinoides contenidos en la dieta o derivados de carotenoides, en cuanto a favorecer la inducción a la maduración, la tasa de reproducción, fecundidad y embriogenesis de crustáceos (Fisher y Kon, 1958; Harrison, 1990; Torrissen, 1990). Sin embargo, estos autores hipotetizan sobre estas propiedades sin experimentar la adición de estos metabolitos. Para el caso particular, Alava (1994) publicó una mejora notable en cuanto al desarrollo del ovario de *P. japonicus*, a partir del suministro de retinil palmitato como fuente de vitamina A. De acuerdo a lo anterior, los cambios observados en cuanto a retinal en glándula digestiva y gónada y su tendencia a incrementarse hacia el nivel IV de maduración de *L. vannamei*, pone de manifiesto la importancia de los carotenoides no solo como

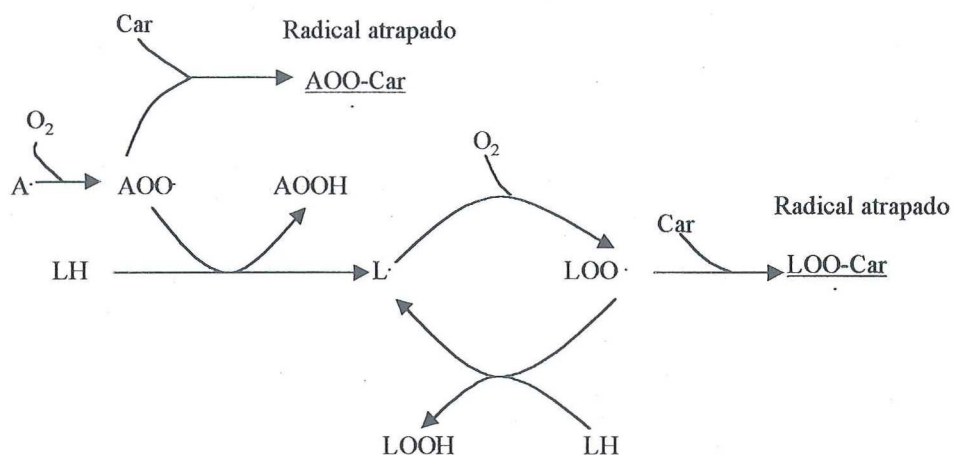


agentes pigmentantes, o vehículos para la inmunoprotección de macromoléculas, sino como precursores de retinoides, moléculas de alta especialización bioactiva, por su funcionalidad en la transcripción del gene y su naturaleza esencial en la división y diferenciación celular.

## **10.2 Carotenoides y su función inmunoprotectora**

La generación de prooxidantes en organismos acuáticos en cautiverio tiene diferentes componentes. Entre los principales se encuentran la producción de radicales libres debido a los procesos del metabolismo y reducción incompleta del oxígeno durante el proceso respiratorio (Diplock, 1991); diversos factores relacionados con el medio de cultivo como sería la interacción de componentes xenobioticos respecto a la calidad de agua (Baumann 1989; Winston y Di Giulio 1991); las deficiencias en dietas producto de una inadecuada preservación y/o las carencias de microantioxidantes como lo son algunos carotenoides, las vitamina C y E y flavonoides entre otros (Tappel 1975; Mourente et al., 1999). Aunado a esto, es reconocido que el oocito requiere de grandes cantidades de energía para la síntesis de macromoléculas y para la construcción de estructuras, incrementando para ello el número de mitocondrias por unidad celular (Brachet, 1973). Con ello se incrementa de manera desproporcionada la generación de radicales superóxido ( $O_2^-$ ), como una consecuencia inevitable de la liberación de electrones de sus vías correctas en la cadena de transferencia de electrones durante el proceso respiratorio. La superóxido dismutasa (SOD) forma parte de un grupo de enzimas que depuran catalíticamente los radicales superóxido, debido a ello es considerada como indicador del estrés oxidativo (Bradley y Min, 1992; Livongstone, y Winston. 1997). Del mismo modo, se ha reconocido la funcionalidad de ciertos

carotenoides tanto oxigénicos como anoxigénicos, además de ciertos retinoides como potentes antioxidantes (Hiramatsu, y Packer, 1990; Tsuchiya, et al., 1992; Terao et al., 1992; Halliwell, y Arouma, 1992; Miki et al., 1994), los cuales pueden actuar a nivel de hemolinfa y en tejido gonadal de crustáceos, protegiendo de este modo las macromoléculas contra el daño oxidativo ocasionado por los radicales libres (Harrison, 1990). De esta manera los antioxidantes operan de manera conjunta respecto a los mecanismos catalíticos de depuración de tipo enzimático dentro del organismo. Por lo anterior tanto los carotenoides y retinoides pueden constituir un elemento clave para prevenir el estrés oxidativo y con ello evitar daños sobre macromoléculas como proteínas, ADN y ácidos grasos poliinsaturados en periodos críticos como lo es la maduración gonádica de peneidos (Figura 40). De acuerdo a Miki et al., (1994), la capacidad depuradora de radicales libres de los carotenoides depende la reactividad estructural, la localización intracelular de los radicales libres y desde un punto de vista estructural, debido a la alta reactividad de la cadena del polieno sobre otras partes de la molécula del carotenoide. Así, la reacción entre las dobles bandas conjugadas del carotenoide con los radicales libres deriva en agregados químicos de dobles bandas y con ello de mayor estabilidad y menor reactividad (Terao et al., 1992; Miki et al., 1994). Al respecto Burton y Ingold (1984) publicaron mayores capacidades de remoción de radicales libres del  $\beta$ -caroteno en la medida que disminuyen las presiones parciales de oxígeno, condición en la cual, la capacidad removedora de antioxidantes como del  $\alpha$ -tocoferol se ven totalmente limitadas. Lo anterior cobra importancia si consideramos que el hábitat natural de peneidos lo constituyen ambientes bentónicos a profundidades en las que las presiones parciales de oxígeno son muy bajas, así como en lagunas y estuarios que generalmente exhiben condiciones reducidas Hendrickx (1996).



**Figura 40.** Mecanismo de acción de carotenoides sobre la atenuación a peroxidación lipídica (Terao et al., 1992):  $A\cdot$  : radical de baja actividad; LH; ácido graso poliinsaturado;  $LOO\cdot$ ,  $AOO\cdot$  : radical peroxil;  $L\cdot$  : radical lipido; LOOH: hidroperoxidos; Car: carotenoides.



Así la funcionalidad de carotenoides como el  $\beta$ -caroteno podrían representar los metabolitos de auto-protección no enzimáticos de mayor funcionalidad en peneidos.

La funcionalidad biológica de carotenoides como agentes antioxidantes en organismos acuáticos ha sido investigada por diferentes autores (Miki, 1991; Miki et al., 1994; Hasspieler, et al., 1994; Calvin y Muscatine 1997; Mourente, et al., 1999). Sin embargo durante procesos fisiológicos más específicos como la maduración gonádica son limitadas las experiencias publicadas en favor a elucidar los mecanismos de interacción entre prooxidantes-antioxidantes, se ha reconocido que en carpa las deficiencias en antioxidantes durante el desarrollo del ovario tuvo como resultado un decremento en la tasa de eclosión y sobrevivencia larvaria (Watanabe y Takashima, 1977; Takeuchi et al., 1981).

Podemos considerar que los organismos silvestres al tener mayor facultad de ingestión en cuanto a la concentración y diversidad de carotenoides durante la maduración gonádica, demandaron una menor actividad removedora de radicales libres (Tabla VII), por parte de los mecanismos de remoción enzimática (SOD). En los organismos bajo condiciones de cultivo la baja concentración de estos compuestos principalmente en glándula digestiva, integumento y ovario, propició que la acción removedora de antioxidantes no fuera suficiente para neutralizar los procesos característicos del estrés oxidativo como lo es la lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos, los cuales se consideran elementos clave durante el desarrollo ovarico de peneidos (Cahu et al., 1995). Lo anterior hizo más exigente los mecanismos de remoción enzimática, elevando así la actividad de SOD. De lo anterior se desprende la importancia de los carotenoides no solo como agentes pigmentantes, sino como compuestos asociados a la inmunoprotección celular y sus organelos

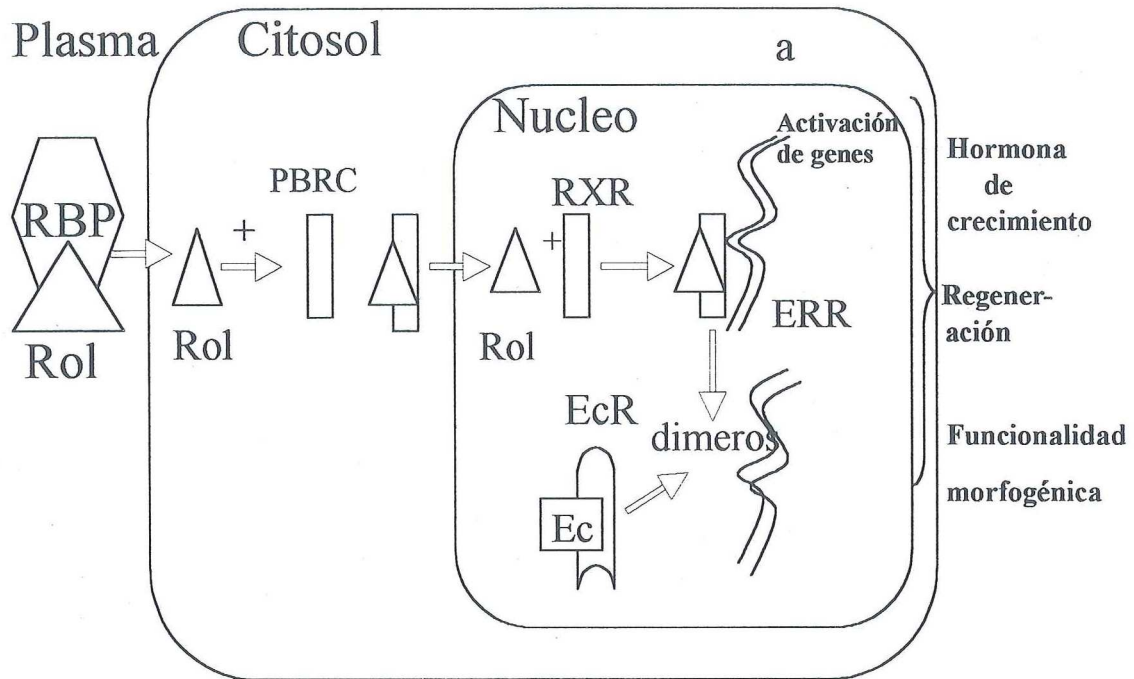
durante etapas tan críticas como la diferenciación del oocito o durante la embriogénesis contra el daño celular derivado del estrés oxidativo.

### **10.3 Carotenoides/retinoides como moléculas activadoras de la inducción gonádica**

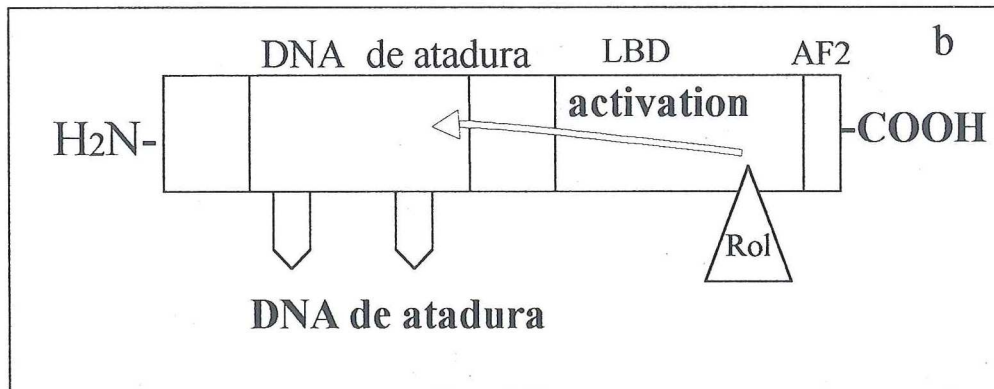
Varias alternativas han sido evaluadas a favor de la optimización de la reproducción de peneidos. La manipulación de fotoperíodo y temperatura ha tenido éxito satisfactorio en peneidos no ablacionados particularmente en *P. japonicus*, *P. styirostris* y *P. setiferus* (Laubier-Bonichon, 1978; Chamberlain y Gervais, 1984; Chamberlain 1988), sin embargo el control del fotoperíodo parece tener mayor efecto en especies de peneidos subtropicales (Browby, 1992). Paralelamente a ésto se ha reconocido que la implantación de órganos derivados del sistema nervioso central como el cerebro y ganglio torácico de hembras maduras a inmaduras, la inyección de extractos de estos órganos ha estimulado la vitelogénesis en diferentes especies de crustáceos (Otsu, 1963; Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Kulkarni, 1992). Lo anterior se basa en la existencia de actividad neuropeptídica ocasionada por la hormona estimuladora de la gónada (HEG). Esta hormona es el principal neuropeptido relacionado con la estimulación a la maduración gonadal (Fingerman, 1995; Fingerman, et al., 1998). Esta técnica ha sido aplicada en *P. vannamei* sin embargo los resultados no son concluyentes.

De acuerdo a los tiempos de respuesta en cuanto a maduración gonádica observadas por la inyección de carotenoides y retinol palmitato en organismos ablacionados, estos estimularon la maduración en el 46 y 30 % de las hembras inyectadas, en un tiempo de 5 días. En hembras únicamente ablacionadas el mismo efecto se observó entre la

# Célula



## Receptor X de retinoides (RXR)



**Figura 41.** Representación esquemática sobre la acción genómica de retinoides y su interacción con receptores nucleares <sup>a</sup>; Representación estructural de un receptor X de retinoides <sup>b</sup>. RBP = proteína de atadura a retinol; Ro retinol; PBRC= proteína de atadura a retinol celular; RXR= receptor X de retinoides; AF2 = dominio de activación transcripcional dependiente de ligante; ERR= elemento de respuesta a retinoides; EcR= receptor ecdisteroide; Ec= ecdisteroide; LBD= dominio de atadura a ligante.

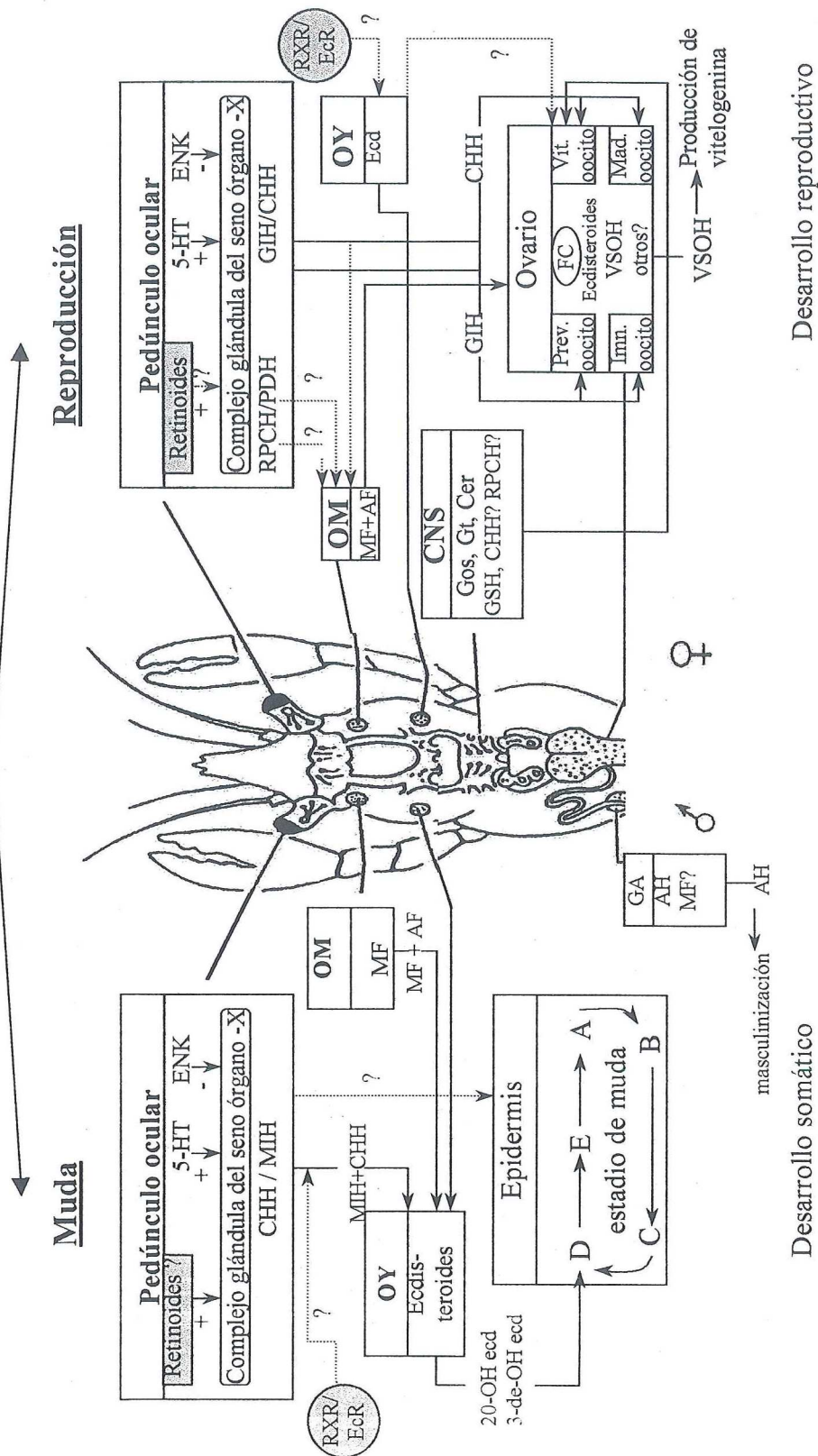


primera y segunda semana (Vaca y Alfaro, 2000). Lo anterior sugiere que el desarrollo del ovario y maduración del oocito en crustáceos podría estar concatenado a los mecanismos de acción de retinoides (Figura 41). Estos metabolitos podrían cumplir una función de señalizadores para la activación de genes que codifiquen para las hormonas que estimulen la maduración gonádica, directamente a través de hormonas tales como HEG, la hormona hiperglicémica de crustáceos (HHG), y la hormona concentradora del pigmento rojo (HCPR). Al respecto Landu et al., (1989); Laufer, 1994) encontraron que la HCPR estimula el órgano mandibular en *Procambarus clarkii*, para sintetizar metil farnesoato (MF). Laufer et al., (1987) obtuvieron resultados similares con otros productos hormonales tales como HPL/HDP (hormona retinal pigmentante de la luz y hormona dispersante de los pigmentos en cromatoforos retinales). En forma análoga, existen evidencias que HCPR actúa como neurotransmisor en *P. clarki* para estimular la liberación de HEG, utilizando calcio como segundo mensajero (Sarajoni, et al., 1995). Lo anterior hace suponer la posible existencia de relaciones neurohormonales relacionadas con la dispersión-concentración de pigmentos en cromatoforos y en la retina, respecto a la expresión bioactiva de carotenoides/retinoides en cuanto a su capacidad de señalización de genes responsables de la acción de HCPR. Derivándose de ello las capacidades efectoras para estimular la maduración gonádica vía HES y MF (Figura 42). De este modo se explicarían los efectos en cuanto a la maduración gonádica de los tratamientos inyectados con carotenoides/retinoides.

#### **10.4 Bioconversión y efectos de carotenoides y retinoides en *L. vannamei*.**

Se conoce que la absorción de carotenoides presentes en la dieta de mamíferos se realiza por difusión pasiva y se conoce que entre el 5 y 50 % puede ser absorbido

# Fotoperíodo - Temperatura - Nutrición - Estrés

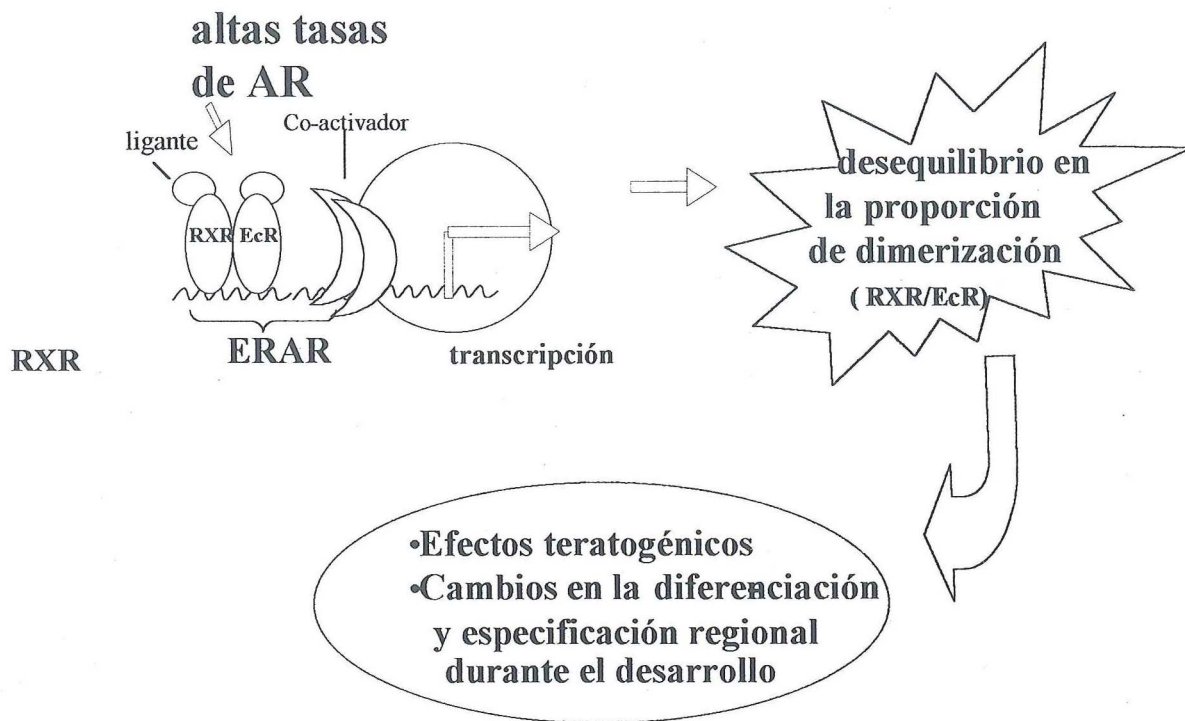


**Figura 42.** Contribución al esquema propuesto por Charmantier, et al., (1997), sobre los mecanismos de regulación hormonal durante el crecimiento y reproducción de crustáceos. Interacciones propuestas:



AC: ácido farnesoico; GA: glándula androgénica; CHH: hormona hiperglicémica de crustáceos; CNS: sistema nervioso central; 3-de-OH-ecd.: 3-dehidroxiecdisona; EcR: receptores de ecdisteroides; Enk: enkefalina; CF: células foliculares; Cer: cerebro; GIH hormona inhibidora de la gónada; GSH: hormona estimuladora de la gónada; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; IMN oocito: oocito inmaduro; MAT oocito: oocito maduro; MF: metil farnesoato; MIH: hormona inhibidora de la muda; OM: órgano mandibular; 20-OH-ecd.: 20-hidroxiecdisona; RXR: receptores X de retinoides; RPCH: hormona concentradora del pigmento rojo; PDH: hormona dispersadora del pigmento; PREV oocito: oocito previtelogenico; SOG: ganglio supra-oesofangial; TG: ganglio torácico; VIT oocito: oocito vitelogenético; VSOH: hormona del ovario estimuladora de la vitelogenina; OY: órgano Y.





**Figura 43.** Efectos relacionados a altas concentraciones de ácido retinoico sobre las relaciones de dimerización entre receptores nucleares, y sus consecuente efectos teratogénicos y sobre la diferenciación de genes durante el desarrollo; ERAR: elementos de respuesta de ácido retinoico; RXR: receptor X de retinoides; EcR: receptores de ecdysteroides.

como carotenoide y el resto puede ser convertido a retinol en los enterocitos (Blomhoff et al. 1992), principalmente por efecto del clivado central (Olson, y Hayaishi 1965; Goodman et al., 1966), o por el desdoblamiento excéntrico de la molécula de carotenoide (Blomhoff et al., 1992; Lorraine, et al., 1994). Sin embargo en crustáceos no hay estudios específicos en relación a la eficiencia de clivado y absorción, así como los sitios específicos donde se lleve a cabo esta bioconversión.

En general se observan distintas respuestas en cuanto a la biotransformación de los metabolitos inyectados hacia el nivel IV de maduración gonadal (Tabla XVI). Así el tratamiento consistente de  $\beta$ -caroteno registró un aumento en las concentraciones y proporción de cantaxantina y astaxantina libre, presentando una relación carotenoides:retinoides totales, en el orden de 1: 0.7 que es mayor a la relación 1: 0.58 del tratamiento con astaxantina. Lo anterior es lógico si consideramos los principios de biotransformación del  $\beta$ -caroteno hacia el carotenoide de la ruta terminal como lo es la astaxantina descritos para peneidos (Meyers y Latcha, 1997). El tratamiento con astaxantina causó un aumento en relación a la astaxantina libre, y cantaxantina, asimismo la inyección de 18.6  $\mu\text{g/g}$  de este carotenoide produjo un aumento en la concentración de astaxantina libre en el ovario en la etapa final de la maduración gonádica (nivel IV) en un orden de 1.0 g, respecto a los 1.14 g del tratamiento con  $\beta$ -caroteno al ser comparadas con las concentraciones del tratamiento control (Tabla XVI).

La inyección de astaxantina favoreció que ésta se almacenara directamente en su forma libre en el ovario. Esto es lógico debido a que la astaxantina es el carotenoide terminal de la ruta de biotransformación, que además posee mayor afinidad de asociación a lipoproteínas de alta densidad para ser transportado a través de la hemolinfa hacia el

ovario para constituir las carotenoglicoproteínas (Harrison 1990). En el nivel IV de maduración la concentración de astaxantina libre disminuyó, conservándose una proporción 1:1 respecto a la forma estérica. Al respecto Dall et al., (1995) al caracterizar los carotenoides en *P. sculentus* registraron una mayor proporción de la forma esterificada de la astaxantina respecto a la libre en ovario en las etapas iniciales de maduración, invirtiéndose esta relación durante el nivel avanzado de maduración. En los tratamientos inyectados con retinol palmitato aumentaron gradualmente las concentraciones de retinoides totales y astaxantina libre, observándose un cambio en la proporcionalidad que los diferentes carotenoides presentan hacia un patrón no conservado (Figura 32). Aunado a la reducción gradual de  $\beta$ -caroteno y cantaxantina, constituyentes primarios e intermedios de la ruta de biotransformación de carotenoides, respecto al incremento de las concentraciones de retinoides, sugiere un efecto del retinol palmitato respecto a la dinámica de depositación de carotenoides sobre el ovario. Este efecto podría ser derivado de la mayor afinidad del retinol palmitato para asociarse a proteínas de atadura plasmáticas y transportarse a dicho órgano (Soprano y Blaner 1994). El abatimiento de carotenoides totales hacia el estadio IV de maduración en reproductores del tratamiento control (Tabla XVI) antagoniza respecto al incremento de retinoides totales, lo cual se justificaría al reconocer las facultades bioactivas de retinoides

### **10.5 Interacciones carotenoides-retinoides**

Los pigmentos carotenoides en crustáceos son acumulados de diferentes formas: como pigmentos libres, esterificados a ácidos grasos, covalentemente atados a macromoléculas y asociados no covalentemente a proteínas y carbohidratos como es el caso de las



carotenoglycoproteínas (Harrison 1990) de las cuales, la lipovitelina es la principal fuente de enriquecimiento para el oocito (Browdy, 1992; Chang, 1993).

En el tratamiento inyectado con astaxantina libre, este metabolito tendió a acumularse en el ovario en la etapa intermedia de maduración (nivel II), sin embargo al estadio IV fue esterificada, conservándose las concentraciones de retinoides en los mismos niveles gonádicos, lo cual conduce a suponer que los peneidos no recurrieron a esta fuente de carotenoide como fuente de retinoides. Al respecto ha sido reconocido que los oxicarotenoides como la astaxantina pueden llegar a ser clivados en una proporción 1:1 respecto a la formación de retinoides, sin embargo su rendimiento al clivarse corresponde a un 50% menos respecto al de carotenoides anoxigénicos como el  $\beta$ -caroteno, el cual es 1:2 derivándose así 2 moléculas de retinal y por lo tanto brinda mayor eficiencia al proceso de biotransformación (Wolf, 1994). De este modo el  $\beta$ -caroteno podría representar una conveniencia metabólica durante la maduración gonádica por representar menos costo energético para la obtención de metabolitos de uso bioactivo, dentro de la gran demanda de macromoléculas y la producción de material genético, gónadas, oocitos y vitelina durante la inducción y maduración gonádica.

Por su parte en el nivel IV de maduración del tratamiento inyectado con  $\beta$ -caroteno, se presentó una mayor diversidad de retinoides en ovario y pedúnculos oculares, registrándose además del *all-trans*-retinal el *13-cis*-retinal, *all-trans*-retinol y excepcionalmente el *13-cis*-retinol en pedúnculo ocular. La concentración de estos compuestos en ovario fue mayor aunque no significativamente diferente respecto a astaxantina y los tratamientos con ácido retinóico. Sin embargo lo anterior permite suponer que los peneidos exhibieron una capacidad similar mostrada por los

vertebrados con relación a la bioconversión de la molécula de  $\beta$ -caroteno, para la obtención de retinoides (Backett y Pertovich 1999).

En la glándula digestiva de los reproductores en todos los tratamientos se observó la presencia del 13-*cis*-retinal, mientras que en pedúnculos oculares se presentaron otros isómeros. La naturaleza del 13-*cis*-retinal corresponde a las formas de mayor capacidad de almacenaje de retinoides en huevos de peces marinos (Rønnestad et al., 1998). Esto sugiere que la isomerización de retinoides se realizó particularmente en ovario y pedúnculos oculares. Al respecto estos mismos autores encontraron que en peces marinos (*Hippoglossus hippoglossus*), el 95 % de la vitamina A presente en huevos recientemente fertilizados está representado por la forma *all-trans*-retinol y el 13-*cis* retinol. Así el desarrollo embrionario de este pez, el contenido de *all-trans*-retinol se incrementó hasta antes de los primeros estadios de alimentación propia y disminuye la forma *all-trans* retinal, de este modo la isomerización parece estar estrechamente vinculado con el desarrollo del organismo. Srivastava y Goldsmith, (1997) al respecto reconocen que los mecanismos de isomerización de retinol a sus formas *cis* se realiza en pedúnculo ocular de langosta y cangrejo e involucra la hidrólisis de ésteres *all-trans*-retinil.

Particularmente en ovario de *L. vannamei*, a diferencia del nivel II de todos los tratamientos, el nivel IV de maduración presenta *all-trans*-retinal y 13-*cis* retinol, lo que podría significar que la maduración gonádica precisa de la biotransformación del 13-*cis* retinal presente en la condición II de maduración, hacia diferentes isómeros que pueden tener uso bioactivo.

De acuerdo a Mangelsdorf y Evans (1992) diferentes retinoides pueden interactuar con receptores nucleares (RXRs y RAR), e inducir a la transcripción de genes, existiendo

un orden de afinidad con diferentes agonistas de la familia de retinoides de acuerdo a la siguiente relación: ácido retinóico>retinal>retinil acetato>retinol, de acuerdo a este orden se pone de manifiesto la mayor capacidad de reacción del ácido retinoico respecto a los receptores nucleares. De acuerdo a ello la ausencia de este compuesto puede no ser una limitante para que la interacción de retinoides/receptores nucleares tenga efecto. Así los retinoides particularmente presentes en ovario del camarón podrían tener una participación activa al interactuar con sus respectivos receptores nucleares, a fin de controlar la producción local de señaladores morfogénicos en las etapas de mayor demanda morfogénica como lo es durante la diferenciación del oocito y durante el desarrollo embrionario y metamorfosis (Brachet 1973). Al respecto Lynn et al., (1994) determinaron una serie de eventos activacionales en huevos de peneidos durante el desove, como lo son, al momento de la liberación del precursor gelatinoso en criptas corticoides, durante la transformación de este agregado celular en una capa homogénea alrededor del huevo, así como al momento la reanudación y consumación de la fase meiótica y durante la elaboración de una cubierta extracelular para la cría. Dichos eventos fueron activados en cascada al exponer los huevos en agua de mar aun sin realizarse la fertilización.

Tomando en cuenta los promedios del índice gonadosomático en *L. vannamei*, los tratamientos con retinol palmitato presentaron la mayor capacidad inductora a la maduración, particularmente el tratamiento de retinol palmitato en dosis de 16.0 µg/. Una marcada proporcionalidad entre los distintos carotenoides y retinoides presentes en cada órgano y tratamiento se observó en el nivel II. Dicho efecto solo se mantuvo en el pedúnculo ocular una vez que los organismos alcanzan el nivel IV de maduración. Sin embargo la falta de proporcionalidad de compuestos en glándula digestiva en el



nivel IV se explica considerando que durante la etapa de vitelogenesis tardía, carotenoides como la astaxantina libre, la cantaxantina y retinoides como el 13-*cis*-retinal sean movilizados de manera análoga a lípidos, proteínas, aminoácidos libres, azúcares libres y polisacáridos de acuerdo a la demanda de incorporación externa por parte del ovocito (Harrison, 1990; Anilkumar, 1980; Lui y O' Connor 1977, 1976). Lo anterior se hace evidente al observar la amplia diversidad y homogeneidad de carotenoides y retinoides en el nivel IV de maduración, que además exhibió un aumento progresivo en las concentraciones de componentes, respecto al aumento en la dosis de retinol palmitato. La elevada concentración de 13-*cis*-retinal en ovario en el estadio II, la disminución en su concentración y la aparición proporcional de all-*trans*-retinal, 13-*cis*-retinol, corrobora la hipótesis que este retinoide es una fuente de almacenamiento y que en ovario se realiza la isomerización de retinoides, siendo éstos a su vez claves tanto para el enriquecimiento de la lipovitelina como posibles agentes de señalización para la activación de hormonas relacionadas a la estimulación de la maduración gonádica. (Figura 38).

#### **10.6 Efectos fisiológicos de retinoides**

En ningún órgano del camarón se detectó la presencia de ácido retinóico, aun en los mismos tratamientos inyectados con este compuesto, lo cual se podría explicar considerando que aunque el tiempo promedio de residencia en plasma puede variar con la especie en cuestión, éste se ubica entre 0.5-1 hora que es suficiente para conducir efectos teratogénicos (Barua y Olson 1986, Creech-Kraft, 1989).

La imperante afinidad hidrofóbica del ácido retinoico (Morriss-Kay, 1992) sobre el resto de los retinoides, con relación a competir por los sitios de atadura y el ligarse a

receptores nucleares y demás complejos moleculares presentes en plasma, como el caso de las proteínas de atadura a retinol (PBR) (Soprano y Blaner 1994), la carencia de pigmentación en los organismos bajo tratamiento de ácido retinoico, la ausencia de carotenoides en pedúnculo ocular, y la abundancia de los mismos en la glándula digestiva, sugiere que el ácido retinóico tuvo un efecto sobre la dinámica de depositación, movilización y utilización de nutrientes como podrían ser los mismos carotenoides, retinoides, esteres de colesterol y pigmentos de biliverdina, entre otros, teniendo efecto sobre el metabolismo y como consecuencia de la mortalidad de algunos organismos en estos tratamientos.

De acuerdo a Durica et al., (1999) al estudiar los efectos del ácido retinóico sobre la regeneración temprana de extremidades en *Uca pugilator*, reconocen que esta molécula tuvo un efecto originado por la perturbación del estado de proporcionalidad en los patrones de dimerización entre los receptores receptor de ecdiesteroides de *Uca pugilator* (*UpEcR*) y receptores X de retinoides de *Uca pugilator* (*UpRXR*), esto pudo originar dímeros que compiten con los sitios de atadura al DNA. Así, la exposición de organismos de *U. pugilator* a la inmersión de un medio rico en ácido retinóico, redujo el crecimiento de las extremidades y ocasiono un patrón de segmentación anormal en las extremidades (Hopkins y Durica, 1995). Tomando en cuenta lo anterior y considerando la reacción negativa respecto a los anticuerpos de *Uca pugilator* en camarón, es posible que en *L. vannamei* exista una alta selectividad de sus compuestos retinóicos respecto a receptores nucleares de naturaleza propia a la especie y con ello distintos a los RXRs derivados de *Uca pugilator*. De este modo el ácido retinóico al ser un producto no derivado de la ruta de biotransformación propia del organismo, haya provocado un efecto antagónico en la transcripción respecto a dichos receptores,

(Figura 43), alterando así la proporcionalidad y equilibrio de receptores nucleares de manera análoga a lo publicado por Durica et al.,1999).



## XI Conclusiones

- Reproductores del medio silvestre de *L. vannamei* exhibieron una mayor abundancia y concentración de carotenoides respecto a reproductores cultivados y sexualmente agotados.
- Durante la maduración gonádica de reproductores hembra de *L. vannamei* existió una demanda significativa de diversos carotenoides que son en gran medida metabolizados a astaxantina, la cual se almacena en integumento ovario y glándula digestiva.
- Adicionalmente al metabolismo de carotenoides anoxigénicos hacia astaxantina, *L. vannamei* exhibió rutas de biotransformación a componentes bioactivos como los retinoides.
- Los tratamientos aplicados vía inyección de astaxantina,  $\beta$ -caroteno y retinol palmitato, tuvieron un efecto en cuanto a reducir el tiempo de inducción a la maduración de *L. vannamei*.
- La presencia de diferentes isómeros de retinoides en ovario de *L. vannamei*, podría estar relacionado con su funcionalidad bioactiva como factores de auto-protección celular, y como controladores de la producción local de señaladores morfogénicos durante la diferenciación del oocito, desarrollo embrionario y metamorfosis.
- La capacidad de isomerización de retinoides en pedúnculos oculares podría estar vinculada a las facultades características que estos compuestos exhiben para interactuar como moléculas de señalización en la activación de neuropeptidos relacionados con la inducción a la maduración gonádica.

## XII Bibliografia

- Alam, S. Q., B. S. Alam. 1983. "Chemopreventive effects of  $\beta$ -carotene and 13-*cis*-retinoic acid on salivary gland tumors". Fed. Proc. Fed. Soc. Exp. Biol. 42:1313 p.
- Alava, V. R., A. Kanazawa, S. Teshima, y S. Koshio. 1993. "Effects of dietary vitamins A, E, and C on the ovarian development of *Penaeus japonicus*". Nippon Susian Gakkaishi. 59 (7):235-1242 p.
- Anilkumar, G. 1980. "Reproductive physiology of female crustaceans". Ph. D. Thesis, Calicut University.
- Armstrong, R. B., K. O. Ashenfelter, C. Eckhoff, A. Levin, y S. Shapiro. 1994. "General and reproductive toxicology of retinoids". En M. B. Sporn, A. B. Roberts, D. S. Goodman, (eds.). "The retinoids biology chemistry and medicine". Raven Press, New York, 545-569 p.
- Barua, A. B. y J. A. Olson. 1986. "Retinoyl  $\beta$ -glucuronide: An endogenous compound of human blood". Am. J. Clin. Nutr. 43:481-485 p.
- Bauernfeind, J. C., C. R. Adams y W. L. Marusich. 1980. "Carotenes and other vitamin A precursors in animal feed". En J. C. Bauernfeind (ed.). "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors". Academic Press, New York. 567-577 p.
- Baumann, P. C. 1989. "PAH, metabolites and neoplasia in feral fish populations". En: U. Varanasi (ed.). "Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment". CRC Press, Boca Raton, FL. 269-289 p.
- Beauchamp, C., y I. Fridovich. 1971. "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels". Anal. Biochem. 44:276-287 p.
- Beckett, B. R., y M. Petkovich. 1999. "Evolutionary conservation in retinoid signalling and metabolism". Amer. Zool., 39:783-795 p.
- Bell, T. A, y D. V. Lightner. 1988. "A handbook of normal penaeid shrimp histology", World Aquaculture Society Arizona USA 4-5 p.
- Bonnie, F. T., A. A. Levin, y J. F. Grippo. 1994. "The discovery of 9-*cis*-retinoic acid a hormone that binds the retinoic-X receptor". TEM 5:189-194 p.
- Bouillet, P., M. Oulad-Abdelghani, S. Vicaire, J. Garnier, B. Schuhbaur, P. Dollé, y P. Chambon. 1995. Dev. Biol. 170: 420-433 p.

- Chung, A. C., D. S. Durica y P. M. Hopkins. 1998b. "Tissue-Specific patterns and steady-state concentrations of ecdysteroid receptor and retinoid-X-receptor mRNA during the molt cycle of the fiddler crab, *Uca pugilator*". Gen, Comp. Endocrinol. 109: 375-389 p.
- Creech Kraft, J., W. Jr. Slikker, J. R. Bailey, L. G. Roberts, B. Fischer, W. Wittfoht y H. Nau, 1989. "Plasma pharmacokinetics and metabolism of 13-*cis*- and all-*trans*- retinoic acid in the *Cynomolgus* monkey and the identification of 13-*cis*- and all-*trans* retinoyl- $\beta$ -glucoronides: A comparison to one human case study with isotretinoin". Drug. Metb. Dispos. 19:317-324 p.
- Crococ, P. J. 1985. "Appraisal of some factors relevant to the development of penaeus prawn population reproductive mode". En: P. C. Rothlisberg, B. J. Hill y D. J. Staples (eds.). Second National Prawn Seminar. NPS2, Cleveland, Queensland, 159-164 p.
- Dall, W. 1995. "Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in Penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*)". Mar. Biol. 124: 209-213.
- Dall, W., D. M. Smith y L. E. Moore. 1995. "Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation". Mar. Biol. 123:435-441 p.
- Diplock, A. 1991. "Antioxidant nutrients and disease prevention". Am. J. Clin. Nutr. 53:189-193 p.
- Durica, D. S., A. C. Chung y P. M. Hopkins. 1999. "Characterization of EcR and RXR gene homologs and receptor expression during the molt cycle in the crab, *Uca pugilator*". Amer. Zool. 39:758-773 p.
- Duster, G. 1996. "Involvement of alcohol deshydrogenase, short-chain deshydrogenase/reductase, aldehyde deshydrogenase, and cytochrome P470 in the control of retinod signaling by activation of retinoic acid synthesis". American Chemical Society. 35:12221-12227 p.
- Eastman-Reks, S. y 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. 79:679-684.
- Fingerman, M. 1957. "Endocrine control of the red and white chromatophores of the dwarf crawfish, *Cambarellus shufeldti*". Tulane Stud. Zool. 5: 37-148 p.
- Fingerman, M. 1985. "The physiology and pharmacology of crustacean chromatophores". Am. Zool. 25:233-252 p.
- Fingerman, M. 1995. "Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of Hormone Release". Amer. Zool., 35: 68-78 p.



- Fingerman, M. 1997 "Endocrinology: retrospective, prospective, and introspective analysis" *Physiol Zool* 70(3):257-269 p.
- Fingerman, M., R. Sarojini, y R. Nagabhushanam. 1998. "New technology for the acceleration of reproductive maturation in economically important crustaceans". En: Le Gal, y H.O. Halvorson. "New. Developments in Marine Biotechnology". (eds.). Plenum Press, New York pp. 85-87 p.
- Fisher, L. R., y S. K. Kon. 1958. "Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates". I. Marine Crustacea. *J. Mar. Biol. Ass U.K* 31, 229
- Gilchrist, B. M., y W. L. Lee. 1972. "Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab *Emrita analoga* (Stimpson 1857)". *Comp. Biochem. Physiol.* 42:263-294 p.
- Goodman, D. S., H. S. Huang y T. Shiratori. 1966. "Mechanisms of the biosynthesis of vitamin A from beta-carotene". *J. Biol. Chem.* 24:1929-1932 p.
- Guillou, A. G. Choubert, T Storebakken, J. De La Noüe y Kaushik. 1989. "Bioconversión pathway of astaxantin into retinol<sub>2</sub> in mature rainbow trout (*Salmo gairdneri rich*)". *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 481-485p.
- Halliwell, B. y O. I. Arouma. 1992. "DNA Damage by oxygene-derived species: Its mechanism, and measurement using chromatographic methods". En M. Scandalios (ed.). "Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems". CSHL Press. 47-63 p.
- Harrison, K. E. 1990. "The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of Decapod crustacean: A review". *J. of Shellfish*, vol 6-1, 1-28 p.
- Hassppieler, B. M., J. V. Behar, D. B. Carlson, D. E. Walts y R. T. D. Giulio. 1994. "Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*) to oxidative stress: a comparative study". *Aquatic Toxicology* 28:53-64 p.
- He, H., L. Addison, A. Lawrence y L. Ruiyu. 1991. "Evaluation of dietary essential of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for Penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*)". *Aquaculture*, 103: 177-185 p.
- Hendrickx, M., M. 1996. Los Camarones Penaeoidea Bentónicos del Pacífico Mexicano. CONABIO, Mazatlán, Sin México 147 p.
- Hiramatsu, M.y L. Packer. 1990. "Antioxidant activity of retinoids". *Methods Enzymol.* 190:273-280 p.
- Hopkins, P. M. y D. S. Durica. 1995. "Effects of all-trans-retinoic acid on regenerating limbs of the fidler crab, *Uca pugilator*". *J. Exp. Zoology.* 272: 455-463 p.

- Katsuyama, M, T. Matsumo. 1985. "Carotenoids and vitamin A, and metabolism of carotenoids,  $\beta$ -carotene, cantaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in Tilapia, *Tilapia nilotica*". Comp. Biochem. Physiol. 90B:131-139.
- Kour V. R. D. y T. Subramoniam. 1992. "Carotenoid metabolism during embrionic develoment of marine crab, *Emerita asiatica* (Milne-Edwards)". Inv. Rep. And Devel. 21(2):99-106.
- Kulkarni, G. K. 1992. "Quantitative analysis by reverse phase high performance liquid chromatography of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*". Biol. Bull. 182: 341-347.
- Landau, M., H. Laufer y E. Homola. 1989. "Control of methyl farnesoate synthesis in the mandibular organ of the crayfish *Procambarus clarkii*: Evidence for peptide neurohormones with dual functions". Invert. Reprod. Dev. 16:165-168 p.
- Landau, M., H. Laufer, y E. Homola. 1989. "Control of methyl farnesoate synthesis in the mandibular organ of the crayfish *Procambarus clarkii*: Evidence for peptide neurohormones with dual functions". Invert. Reprod. Dev. 16:165-168.
- Latscha, T. 1989. "The role of astaxanthin in shrimp pigmentation", Adv. Trop. Aquaculture. Aquacop. INFREMER, actes de colloque 9:319-325 p.
- Laubier-Bonichon, A. 1978. "Ecophysiologie de la reproduction chez la crevette *Peneaus japonicus* Trois annees d' experience en milieu controle". Oceanologica Acta 1(2): 135-150 p.
- Laufer, H., D. Borst, F. C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C. C. Reuter, L. W. Tsai, y D. A. Schooley. 1987. "Identification of a hormone-like compound in a crustacean". Science 235: 202-205 p.
- Laufer, H., L. Liu y F. Van Herp. 1994. "A neuropeptide family that inhibits the mandibular organ of crustacea and may regulate reproduction". En: A. B. Borkovec y M. J. Loeb. (eds.). "Insect Neurochemistry and Neuroparmacology". CRC Press, Boca Raton, Florida, 203-206 p.
- Leid, M., P. Kautner, R. Lyons, H. Nakshatri y M. Saunders. 1992. "Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently". Cell 68: 377-395 p.
- Liñán-Cabello, M. A., y J. J. Paniagua-Michel. 1998. "Carotenoides como precursores de moléculas bioactivas durante en la reproducción de *Penaeus vannanei*". Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18 La Paz B.C.S., México.
- Liñán-Cabello, M. A., y J. J. Paniagua-Michel 1998. "New insights on the role of carotenoids in shrimp biotechnology". Proceedings Marine Biotechnology



Application-commercialisation-cooperations. July 19.-22 Wilhelmshaven, Germany.

- Livongstone, D. R. y G. W. Winston. 1997. "Pro-oxidant and antioxidant processes in biological systems". *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 117(2):121 pp.
- Lorraine, J. G., M. B. Spon y A. B. Roberts. 1994. "Cellular biology and biochemistry of the retinoids". En: M. B. Sporn, A. B. Roberts, D. S. Goodman. (eds.). "The retinoids biology chemistry and medicine". Raven Press, New York. 443-480 p.
- Lui, C. W. y J. D. O'Connor. 1976. "Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. II Characterization of and *in vitro* incorporation of amino acids into purified subunits". *J. Exop. Zool.* 155:41-52 p.
- Lynn, J. W., M. C. Pillai, P. S. Glas y J. D. Green. 1994. "Comparative physiological and morphological during the activation of penaeoidea eggs". *Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society.* 4:214-126 p.
- Mangelsdorf, D. J. y R. M. Evans. 1992. "Vitamin A receptors: new insights on retinoid control of transcription". En: G. Morris-Kay (ed.). "Retinoids in normal development and teratogenesis". Oxford University Press, Oxford New York. 27-50 p.
- Mangelsdorf, D. J. y R. M. Evans. 1995. "The heterodimers and orphan receptors". *Cell* 10:940-954 p.
- Mangerich, S., Keller, R., y Dirksen H. 1986. "Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment-concentrating hormone in two species of decapod crustaceans". *Cell. Tissue Res.*, 245: 377-386 p.
- Mantiri, D. M., G. Nègre-Sadargues, G. Charmatier, J. P. Trilles, J. C. G. Milicua y R. Castillo. 1996. "Nature and metabolism of carotenoid pigments during the embryogenesis of European Lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758)". *Comp. Biochem. Physiol.* 115A:237-241 p.
- Merchie, G., E. Kontara, P. Lavens, R. Robles, K. Kurmaly y P. Sorgeloos. 1998. "Effects of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricus)". *Aquaculture Research* 29:579-585 p.
- Meyers, S. M. y T. Latscha. 1997. "Carotenoids". En L. R. D'Abramo (ed.). "Advances in world aquaculture". *Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society.* 6:164-193 p.
- Mourete, G., D. R. Tocher, E. Diaz, A. Grau y E. Pastor. 1999. "Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae". *Aquaculture* 179: 309-324 p.



- Miki, W. 1991. "Biological functions and activities of animal carotenoids". *Pure Appl. Chem.* 63:141-146 p.
- Miki, W. N., N. Otaki, P. Shimidzu, y A. Yokoyuma. 1994. "Carotenoids as free radical scavengers in marine animal". *J. Mar. Biotechnol.* 2:35-37 p.
- Napoli, J. L. 1993. "Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis". *J. Nutr.* 123: 363-366 p.
- Napoli, J.L. y R. L. Horst. 1989. "Quantitative analyses of naturally occurring retinoids". En: C. P. Redfern. (ed.). "Retinoid protocols human". Press Totowa, New Jersey. 29-41 p.
- Neilands, J. B. 1947. "The conversion of carotene to vitamin A in the fish". *Arch. Biochem.* 13:415-416 p
- Nelis, H., Levens, P., M. M. Van Steenberg, P. Sorgeloos, G. R. Criel y A. De Leenheer. 1988. "Qualitative and quantitative changes in the carotenoids during development of the brine shrimp *Artemia*". *J. Lipid Res.* 29:491-499 p.
- Nelis, H. J., P. Sorgeloos y A. P. De Leenheer. 1993. "Relation of *Cis-Trans* isomers of carotenoids to developmental processes". En: L. Packer (ed.). "Carotenoids Part B Metabolism, Genetics and Biosynthesis". *Methods in Enzymology.* 214: 218-225 p.
- New, M. B., 1976. "A review of dietary studies with shrimp and prawns". *Aquaculture*, 9:101-104 p.
- Olson, J. A. 1989. "Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A". *J. Nutr.* 119: 105-108 p.
- Otsu, T. 1963. "Bihormonal control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*". *Embryologica* 8 1-20 p.
- Paniagua-Michel, J. J. y M. A. Liñán-Cabelo. 1999. "On the roles of carotenoids and retinoids in shrimp reproduction". *Proceedings of 12 th International Carotenoid Symposium, July 19-23 Cairns, Australia.*
- Petit, H, S. Sance, G. Nègre-Sadargues, R. Castillo y J. P. Trilles. 1991. "Ontogeny of carotenoid metabolisms in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1988) (Crustacea Penaeidae): a quantitative approach". *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 667-671 p.
- Petit H, G. Nègre-Sadargues, R. Castillo, S. Valin y J. P. Trilles. 1998. "The effects of dietary astaxanthin and the carotenoid pattern of the prawn *Penaeus japonicus* during postlarval development". *Comp. Biochem, Physiol.* 119:523-527 p.
- Ross, A. C. 1993. "Overview of retinoid metabolism. Symposium: Retinoids: Cellular

Metabolism and Activation". Am. Inst. Nut. 346-350 p.

- Rønnestad, I., G. I. Hemre, R. N. Finn y Ø. Lie. 1998. "Alternate sources and dynamics of vitamin A and incorporation into the eyes during the early endotrophic and exotrophic larval stages of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)". Comp. Biochem. Physiol. 119A:787-793 p.
- Sagi, A., M. Rise, K. Isam y S. Arad. 1995. "Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*". Comp. Biochem. Physiol. 112B:309-313 p.
- Sarojini, R., R. Nagabhushanam y M. Fingerman, 1995. "A neurotransmitter role for red-pigment-concentrating hormone in ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*". J Exp Biol 198:1253-1257 p.
- Scita, G., Aponte, G. W., y Wolf, G. 1992. "Uptake and cleavage of  $\beta$ -carotene by cultures of rat small intestinal cells and human lung fibroblast". J. Nutr. Biochem. 3:118-123 p.
- Schiedt, K., F. Leuenberger, J. Vecchi y E. Glinz 1985. "Absorption retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow, salmon and chicken". Pure. appl. Chem. 57:685-692.
- Schiedt, K. 1990. "Carotenoids, Chemistry and Biology". En: N. L. Krinsky, M. M. Mathews-Roth y R. F. Taylor. (eds.). "Carotenoids" Plenum, New York.
- Schiedt, K., S. Bischof, E. Glinz. 1993. "Metabolism of carotenoids and *in Vivo* Racemization of (3S, 3'S) astaxanthin in the crustacean *Penaeus*", Methods Enzymology. 214:148-168 p.
- Scott, R. W. 1999. "Marketing bioactive ingredients in food products". Food Technology Vol. 53:69-53 p.
- Soprano, D. R. y W. S. Blaner. 1994. "Plasma retinol-binding protein". En M. B. Sporn, A. B. Roberts y D. S. Goodman. (eds.). "The retinoids biology chemistry, and medicine" 2 edition Raven Press, New York. 257-282 p.
- Srivastava, R. y T. H. Goldsmith. 1997. "On the mechanism of isomerization of ocular retinoids by the crayfish *Procambarus clarkii*". J. Exp. Biol. 200: 625-631.
- Swevers, L., L. Chervas, P. Chervas, K. Iatrou. 1996. "*Bombyx* ECR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCFI) combine to form a functional ecdysone receptor". Insect Biochem. Mol. Biol. 26:217-221 p.
- Tacon, A. G. 1981. "Speculative review of possible carotenoid function in fish". Prog. Fish-cult., 43:205-208 p.



- Tappel, A. L. 1975. "Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes". En B. F. Trump, A. U. Astila. (eds.). "Pathology of Cell Membranes, Vol. 1. Academic Press. New York. 145-173 p.
- Thaller, C. y Eichele. 1987. "The identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud". *Nature*. 327(3):625-628 p.
- Terao, J., A. Nagao, D. Park, y P. Lim. 1992. "Lipid Hydroperoxide assay for antioxidant activity of carotenoids". *Methods Enzymol* 213: 454-460 p.
- Takeuchi, M., S. Ishii, y T. Ogino. 1981. "Effects of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution and mortalities of the fertilized eggs and fry in ayu *Plecoglossus altivelis*". *Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab.* 104:111-122 p.
- Takeuchi, T., J. Dedi, C. Ebisawa, T. Watanabe, T. Seikai, K. Hosaya y J. Nakazoe. 1995. "The effect of  $\beta$ -carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder". *Fisheries Science* 61 (1), 141-148 p.
- Takeuchi, T., Y. Deli, Y. Haga, T. Seikai y T. Watanabe. 1998. "Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)". *Aquaculture* 169:155-165 p.
- Thomas, H. E., H. G. Stunnenberg, A. F. Steward. 1993. "Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and *ultraespiracle*". *Nature* 362: 471-475 p.
- Torrisen, O. J. 1990. "Biological activities of carotenoids in fishes. The current status of fish nutrients in aquaculture". En: M. Takeda y T. Watanabe, (eds.). "Proceedings of the international symposium on feeding and nutrition in fish", Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan.
- Tsuchiya, M., G. Scita, H-L. Freisleben, V. E. Kagan y L. Packer. 1992. "Antioxidant radical-scavenging activity of carotenoids and retinoids compared to  $\alpha$ -tocopherol". *Methods Enzymol* 213:460-472 p.
- Vaca, A. A., J. Alfaro. 2000. "Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection". *Aquaculture* 182:373-385 p.
- Vincent, M. L. Ramos, M. Oliva. 1988a. "Variations qualitatives et quantitatives des pigments caroténoïdes dans l'ovaire et l'hépatopancréas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne". *Arch. Int. Physiol. Biochim* 96: 155-164 p.
- Vincent, M. L. y H. J. Ceccaldi. 1988b. "Variations in the total carotenoid pigments in the ovary and hepatopancreas of *Penaeus schmitti* during ovarian maturation". *Biochem. Syst. Ecol.* 16(4): 431-436 p.



- Watanabe, T., y F. Takeshima. 1977. "Effects of  $\alpha$ -tocopherol deficiency on carp-VI. Deficiency symptoms and change of fatty acid and triglyceride distribution in adult carp". Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 43:819-830 p.
- Wellik, D. M. y DeLuca, H. F. 1996. "Metabolites of all-*trans*-retinol in day 10 conceptuses of vitamin A-deficient rats. Archives of Biochemistry and Biophysics. 330:2, 355-362 p.
- Winston, G. W. y R. T. Giulio. 1991. "Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms". Aquat. Toxicol. 19, 137-161 p.
- Wolf, G. 1990. "Recent progress in vitamin A research: nuclear retinoic acid receptors and their interactions with gene elements". *J. Nutr. Biochem.* 1:284-289 p.
- Wolf, G. 1984. "Multiple functions of vitamin A". *Physiol. Reviews* 64, 873-937 p.
- Wyban, J., G. Martinez y J. Sweeney 1997. "Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality". *World Aquaculture*, June pp 59-62 p..
- Yano, I., 1987. "Effects of 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*". *Aquaculture* 61: 49-57 p.
- Yamada, S., Y. Tanaka, M. Semeeshima y Y. Ito. 1990. "Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I. Effect of dietary astaxanthin,  $\beta$ -carotene and cantaxanthin on pigmentation". *Aquaculture* 87, 323-330 p.
- Yao, T. P., A. Forman, L. Jiang, J-D. Cherbas, M. Chen, P. McKeown, K. Cherbas, y R. M. Evans. 1993. "Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes". *Nature*. 366:476-479 p.
- Zar, J. H. 1994. *Biostatistical Analysis*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA 360 p