

Implementación de un Bioensayo *in vitro* con Células Disociadas de Hepatopáncreas de *Palaemon serratus* y *Procambarus bouvieri* para Detectar la Secreción de la α -Amilasa.

Isis Fernández (1), Laida Ramos (1), Alberto Huberman (2) y Alain Van Wormhoudt (3)

1. Centro de Investigaciones Marinas # 2808, avenida 1ra entre 30 y 28, Miramar, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba.
2. Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran", Vasco de Quiroga # 15 Tlalpan, Distrito Federal. México.
3. Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle et du Collège de France, 29 110 Concarneau. France.

Introducción

En los crustáceos la digestión comienza en la cavidad cardíaca del estómago y se continúa en los túbulos del hepatopáncreas (Vonk, 1960). Es a nivel de esta glándula que la digestión se hace más activa (Van Wormhoudt, 1980), asegurada por enzimas secretadas por células especializadas (Barker y Gibson, 1977). Cinco tipos celulares han sido descritos: las células E (embryonic cells), las células R (resorptive cells), las células F (fibrillar cells), las células B (blister-like cells) y las células M (midget cells) (Al-Mohanna *et al.*, 1985a,b; Al-Mohanna y Nott, 1987a,b; Vogt, 1994). El porcentaje de cada tipo de células varía en función del estadio de muda, las células F, responsables de la síntesis y de la secreción de las enzimas digestivas se encuentran en mayor concentración en la intermuda (estadio C) (Toullec *et al.*, 1992).

La secreción de las enzimas y la síntesis de las proteínas están reguladas por diferentes mecanismos, siendo el control hormonal de gran importancia (Fingerman *et al.*, 1967). En los pedúnculos se encuentran diferentes hormonas peptídicas que regulan las principales funciones de los crustáceos (la muda, la reproducción y el metabolismo de los carbohidratos) (Webster, 1986 en *Carcinus maenas*; Van Wormhoudt *et al.*, 1984 en *Palaemon serratus*; Huberman *et al.*, 1993 en *Procambarus bouvieri*; Soyez *et al.*, 1994 en *Homarus americanus*; Sefiani *et al.*, 1996 en *Penaeus vannamei*).

Diversos autores han estudiado la estimulación de la secreción de las enzimas digestivas *in vitro* fundamentalmente de la amilasa bajo el efecto del calcio, de nucleótidos cíclicos, de hormonas y otros efectores utilizando como modelo las células de vertebrados (Gardner, 1979; O'Doherty y Stark, 1982; Knight y Koh, 1984).

En los invertebrados se ha encontrado una estimulación de la secreción de la α -amilasa hepatopancreática *in vitro* por la presencia del calcio y de la hormona hiperglucemiante en *Orconectes limosus* (Sedlmeier, 1988). Giard *et al.*, (1995) obtuvieron efectos semejantes con células de la glándula digestiva en *Pecten maximus*.

Fernández I.; L., Ramos; A. Huberman y A. Van Wormhoudt. 2000. Implementación de un bioensayo *in vitro* con células disociadas de hepatopáncreas de *Palaemon serratus* y *Procambarus bouvieri* para detectar la secreción de la α -Amilasa. pp 202-219 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México

Hasta este momento en los crustáceos se conocen trabajos *in vitro* sobre la estimulación de la secreción de la α -amilasa por la influencia de diferentes efectores pero solamente a nivel del órgano (hepatopáncreas) (Sedlmeier, 1988).

Objetivos de la investigación:

- Implementar un bioensayo *in vitro* utilizando células disociadas del hepatopáncreas en dos tipos de crustáceos decápodos, *Palaemon serratus* y *Procambarus bouvieri*.

- Determinar la secreción de la α -amilasa por las células disociadas ante la presencia de diferentes condiciones de incubación, entre ellas, la influencia del ionoforo de calcio A 23187, del AMP cíclico, de extractos del pedúnculo ocular y de las neurohormonas de la familia de la CHH.

Aplicación en la Acuicultura:

Contar con un bioensayo *in vitro* que pueda detectar la estimulación de las enzimas digestivas como la α -amilasa bajo la influencia de diferentes efectores antes de realizar los bioensayos *in vivo*.

Materiales y Métodos

Animales

Procambarus bouvieri es un crustáceo de agua dulce. Su peso medio es de 20 g y su talla de 20 cm. *Palaemon serratus* y *Penaeus notialis* son crustáceos marinos. Los organismos fueron mantenidos en acuarios de 30 litros con filtros biológicos. Para los bioensayos los camarones se seleccionaron en estadio C de intermuda.

Viabilidad celular

La identificación de las células se realizó siguiendo la metodología de Vogt, (1994). La viabilidad de las células es controlada utilizando azul tripán 0.2%. Después de cada experiencia, una alícuota de la suspensión celular es observada al microscopio óptico con el objetivo de realizar el conteo de las células mediante una cámara de Malassez. La estimación de la tasa de viabilidad celular es calculada a través de la fórmula siguiente:
Sobrevivencia celular = células vivas/(células vivas + células muertas).

Medios de separación y de incubación celular para *Palaemon serratus*.

Tres medios salinos son utilizados: el primero es un medio fisiológico que contiene NaCl (427mM), CaCl₂ (30.0mM), KCl (15.7mM), MgCl₂ (13.0mM), Na₂SO₄ (8.4mM), NaHCO₃ (4.2mM). El segundo medio salino se encuentra desprovisto de iones divalentes y es utilizado en la disociación, está compuesto de: NaCl (467mM), KCl (15.7mM), Na₂SO₄ (8.4mM),

NaHCO₃ (4.2mM) a pH 7.4. El tercer medio de incubación es el medio Van Harreveld (1936). Todos estos medios fueron ajustados a un pH de 7.4 y una osmolaridad calculada de 1100mOsmoles.

Medios de separación y de incubación celular para *Procambarus bouvieri*.

Dos medios son utilizados. El primero es el medio Van Harreveld (1936). El segundo es el medio 199 que contiene sales de Earles y de la L-glutamina. La osmolaridad es ajustada a 450 mOsmol y pH 7.4. A estos dos medios se le añaden 1% de albúmina bovina. A todos los medios se le adicionan dos antibióticos (estreptomicina, 100µg/ml; penicilina-G 100UI/ml), así como un fungicida (anfotericina-B, 0.25µg/ml).

Condiciones óptimas de incubación celular.

a) Temperatura.

Las células son incubadas a diferentes temperaturas: 5, 10, 20 y 30°C.

b) AMP cíclico y ionoforo de calcio A23187 (C7522).

Una solución de adenosín monofosfato 3'-5' cíclico es preparada a concentraciones de 1, 5, 50 y 200µM y una solución de ionoforo de calcio a concentraciones de 10, 50 y 100µM en solución salina.

Preparación de los extractos.

a) Extracto bruto de pedúnculo ocular de *P. notialis*.

Dos tipos de extracciones fueron realizados en los pedúnculos oculares de *P. notialis*. Una con ácido acético al 0.1% y la otra con acetato de amonio 10 mM. Un gramo de pedúnculo ocular en distintos estadios del ciclo de muda (postmuda B, intermuda C y premuda (Do, D1 y D2) fueron macerados y centrifugados a 1800 g, posteriormente fueron liofilizados y resuspendidos 2 ml de solución salina.

b) Extracto de las glándulas del seno de *P. bouvieri* y de las neurohormonas se realizaron según la metodología de Huberman *et al.*, (1993, 1995).

Determinación de proteínas.

Las proteínas solubles del extracto del pedúnculo ocular se cuantificaron según el método de Lowry *et al.*, (1951). La concentración de proteínas de las neurohormonas puras fueron medidas por el método de Hazra *et al.*, (1984).

Determinación de la actividad de la enzima α -amilasa.

La actividad de la α -amilasa fue medida por un método colorimétrico (No 577, Sigma). Este método está basado en la liberación del nitrofenol detectado a 405 nm.

Los resultados fueron expresados de la siguiente manera: UA/min/10⁶ células

La unidad de actividad (UA) se definió:

$$UA = \text{Unidad/ml} = (\Delta \text{ Abs} \times VT \times 1,25) / (E \times VE \times 1)$$

Δ Abs = diferencia entre las absorbancias finales e iniciales.

VT= volumen total

VE= volumen de la muestra

E= coeficiente de absorción del p-nitrofenol

1= trayecto óptico.

El porcentaje de liberación total corresponde a la actividad al final de cada incubación dentro del medio y en las células.

Pruebas estadísticas

Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de clasificación simple y la prueba de Duncan con un 95% de confianza.

RESULTADOS

Implementación del bioensayo *in vitro*, utilizando células disociadas de hepatopáncreas de *P. serratus* y *P. bouvieri*.

1. Condiciones óptimas de difusión basal de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus* y *P. bouvieri*.

Después de realizar la disociación de las células es indispensable lograr una alta sobrevivencia en las mismas con el objetivo de disponer de un medio de incubación adecuado para probar posteriormente diferentes factores que estimulen la respuesta biológica de las células.

La calidad de los medios de incubación se definirán según dos criterios fundamentales: la sobrevivencia celular y la secreción basal mínima de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas en el medio de incubación.

a) Utilización de diferentes medios de incubación.

Dos soluciones salinas fueron utilizadas en los bioensayos para *P. serratus*, el medio Van Harreveld (VH) y el medio Tampón Disociación (TD). La secreción de la α -amilasa medida fue la secreción basal. El aumento de esta secreción puede ser debido a la destrucción de algunas células o a la liberación pasiva de la enzima o a la influencia de algunos iones sobre esta liberación.

La figura 1 indica el porcentaje de la amilasa dentro de estos dos medios después de 30 min de incubación. El porcentaje observado para el medio VH es más débil que el observado para el TD con relación al porcentaje total. Como resultado se utilizara el medio VH para las próximas experiencias (respuesta basal mínima).

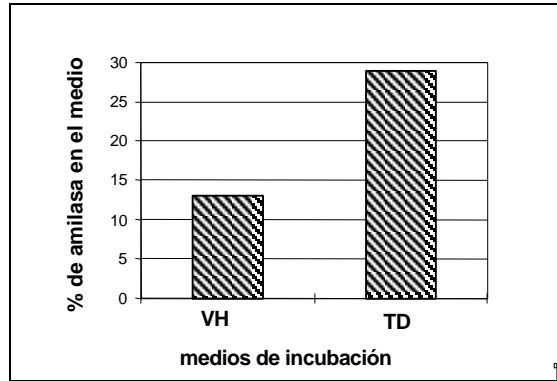


Figura. 1. Porcentaje de liberación de α -amilasa (basal) en los dos medios de incubación celular: Medio Van Harreveld (VH) y medio Tampón Disociación (TD) en *P. serratus*. Tiempo de incubación 30 min. VH difiere estadísticamente de TD después de haber utilizado la prueba ANOVA, para un 95% de confianza.

La figura 2 refleja la influencia de diferentes medios de incubación sobre la secreción basal de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. bouvieri*. De los medios utilizados para la secreción basal, los valores más débiles se encontraron en el medio 199 + 1% de albúmina.

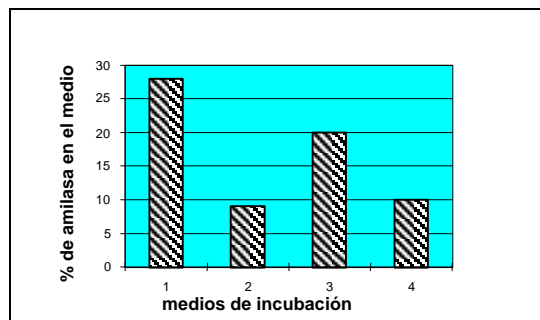


Figura. 2. Porcentaje de liberación de la amilasa (basal) en diferentes medios (1. Medio 199, 2. Medio 199+ 1% de albúmina, 3. Medio VH, 4. Medio VH + 1% de albúmina) en *P. bouvieri*. Tiempo de incubación 30 min. 1 difiere estadísticamente de 2,3 y 4 después de haber utilizado la prueba ANOVA, para un 95% de confianza.

Los valores de sobrevivencia celular determinados después de 30 min de incubación (Fig. 3) indican que los medios más favorables para la incubación de las células del hepatopáncreas de *P. bouvieri* son el medio 199 y el medio 199 + 1% de albúmina.

Estos resultados indican que el medio 199 + 1% de albúmina es el aconsejado para las incubaciones celulares de *P. bouvieri* debido a la alta sobrevivencia encontrada (mas del 95%) y la débil secreción basal de la α -amilasa en 30 minutos de incubación.

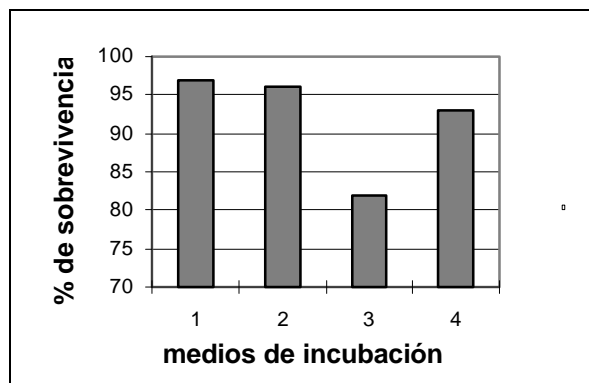


Figura. 3. Sobrevivencia de las células del hepatopáncreas de *P. bouvieri* en diferentes medios (1. Medio 199, 2. Medio 199+ 1% de albúmina, 3. Medio VH, 4. Medio VH + 1% de albúmina). Tiempo de incubación 30 min, 16°C. 1 y 2 difieren estadísticamente de 3 y 4 después de la aplicación de la prueba ANOVA y Duncan al 95% de confiabilidad.

La tabla 1 muestra el porcentaje de la amilasa en los diferentes medios de incubación (el medio VH, el medio VH + 1% de albúmina, el medio 199 y el medio 199 + 1% de albúmina) y dentro de las células. Los resultados indican que el porcentaje de amilasa medido en el medio aumenta en el transcurso de 60 min de incubación, mientras el porcentaje de la amilasa medido en las células disminuye.

En el transcurso de 30 min la respuesta de las células a la liberación de la amilasa es detectada para ambas especies estudiadas.

Tabla 1. Porcentaje de liberación de la amilasa (basal) por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. bouvieri* en diferentes medios de incubación y a diferentes tiempos (0, 30 y 60 min).

MEDIOS	% de amilasa determinada en los medios de incubación a diferentes tiempos		
	0 minutos	30 minutos	60 minutos
medio VH	3	20	24
medio VH + 1% de albúmina	8	10	14
medio 199	10	28	38
medio 199 + 1% de albúmina	3	9	26

b) Efecto de la temperatura.

Tan importante como la selección del medio de incubación resulta la temperatura apropiada para obtener una buena respuesta de las células sobre la secreción de la amilasa (basal).

Diversas temperaturas fueron ensayadas (5, 10 y 20°C) sobre las células de *P. serratus*. El efecto de la temperatura se relacionó con la sobrevivencia celular y la actividad basal de la

amilasa liberada por las células en el medio salino TD, para tiempos de incubación de 60 y 120 min (Fig. 4).

La sobrevivencia celular es del 97% para las diferentes temperaturas estudiadas en todas las incubaciones. La actividad de la amilasa es detectada desde 5°C . Se observa un aumento a 20°C con relación a 10 y 5°C después de 120 min de incubación. Este resultado indica la posibilidad de medir el efecto secretor de las células disociadas del hepatopáncreas a temperaturas comprendidas entre 5 y 20°C .

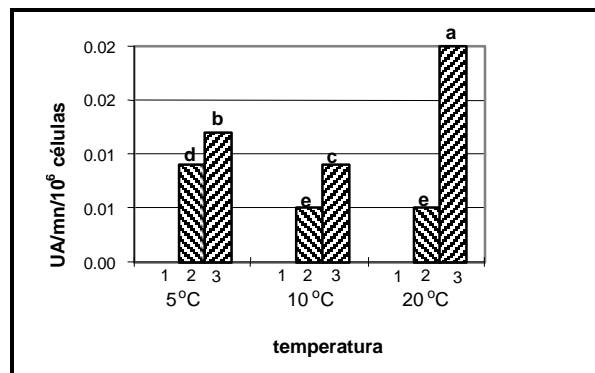


Figura. 4. Actividad de la amilasa medida en el medio VH de incubación de las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus* a diferentes temperaturas de incubación durante 0(1), 30(2) y 60(3) minutos. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

En *P. bouvieri* la temperatura de la incubación óptima de las células se encontró entre 15 y 20°C donde la sobrevivencia obtenida es alta.

2. Efecto del AMP cíclico y del ionoforo de calcio A 23187 sobre la secreción de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus*.

En los crustáceos no existe ninguna referencia relacionada con la secreción de la amilasa a nivel celular.

a) Efecto del AMP cíclico.

La influencia del AMP cíclico sobre la respuesta de las células con relación a la secreción de la amilasa se observa en la figura 5. La actividad de la amilasa medida en el medio de incubación VH a concentraciones de 5, 50 y 200 μ M de AMP cíclico y en 60 min de incubación estimulan la secreción de la amilasa de las células disociadas, observándose un efecto dosis-respuesta significativo.

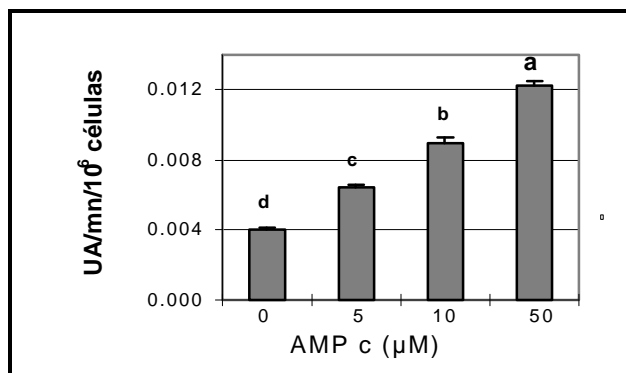


Figura. 5. Efecto del AMP cíclico a diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 50 μ M) sobre la secreción de la amilasa *in vitro* por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus*. Tiempo de incubación 60 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

b) Utilización del ionoforo de calcio A 23187.

El ionoforo A 23187 (C 7522) ha sido probado en las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus* a concentraciones de 10 y 50 μ M. La Fig. 6 muestra que el ionoforo de calcio C 7522 estimula la liberación de la amilasa dentro del medio. El efecto dosis-respuesta encontrado es significativo.

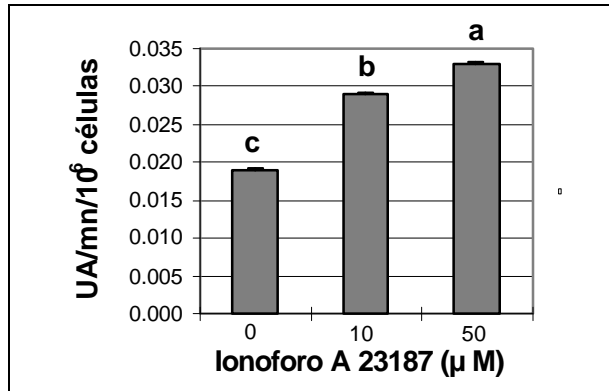


Figura. 6. Efecto de diferentes concentraciones de ionoforo A 23187 (C 7522) sobre la secreción de la amilasa *in vitro* por las células disociadas de hepatopáncreas de *P. serratus* Tiempo de incubación 30 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

El porcentaje de secreción de la amilasa obtenido en el medio de incubación con ionoforo de calcio es semejante al obtenido con el AMP cíclico, 20, 31 y 35 % para 0, 10 y 50 μ M. Estos resultados indican que el ionoforo de calcio y el AMP cíclico estimulan la secreción de la amilasa de las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus* y además se encuentra en relación con la concentración utilizada.

3. Secreción de la amilasa por las células incubadas en presencia de fracciones purificadas del pedúnculo ocular.

Este trabajo tiene como objetivo verificar el comportamiento de las células disociadas de hepatopáncreas (en *P. serratus* y en *P. bouvieri*) incubadas con extractos de pedúnculos oculares, glándulas sinusales y hormonas purificadas de la familia de la cHH.

a) Influencia de diferentes extractos del pedúnculo ocular de *P. notialis* sobre la secreción de la amilasa de las células disociadas de *P. serratus*.

La actividad de la amilasa es medida en el medio VH de incubación, el cual contenía diferentes equivalentes de extractos de pedúnculos oculares (0.4; 0.6 y 0.8 equivalentes) (1 equivalente = extracto correspondiente a 1 pedúnculo ocular). La figura 7 muestra la curva dosis-respuesta de la secreción de la enzima con relación al control.

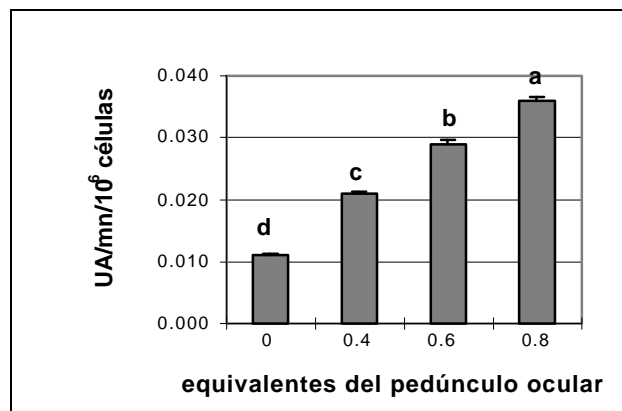


Figura. 7. Actividad de la amilasa en el medio de incubación celular (en células de *P. serratus*) en presencia de diferentes equivalentes del pedúnculo ocular (0; 0,4; 0,6 y 0,8 equivalentes de *P. notialis*). Extracto con ácido acético. Tiempo de incubación 60 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

Los porcentajes de secreción en el medio son de 18%, 34%, 45% y 60% para las concentraciones de 0, 0.4, 0.6, y 0.8 equivalentes del pedúnculo ocular. respectivamente.

Diferentes cantidades de extractos del pedúnculo ocular fueron obtenidos con acetato de amonio 10 mM (0, 1 y 2 equivalente) fueron utilizados para las incubaciones celulares. La figura 8 muestra la respuesta de la actividad de la enzima en el medio a 60 min de incubación. La actividad secretora es proporcional a la cantidad de equivalentes del pedúnculo ocular en el medio donde las células son incubadas.

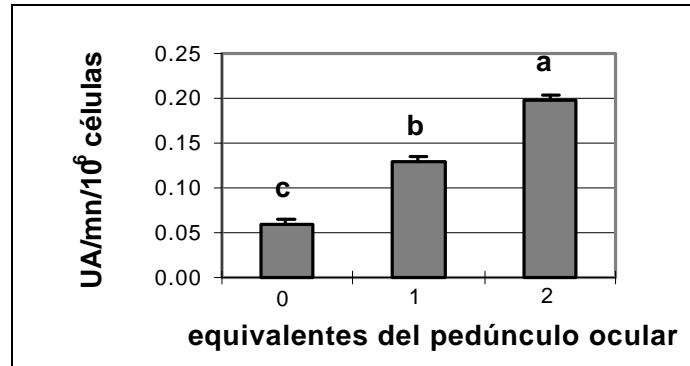


Figura. 8. Actividad de la amilasa en el medio de incubación celular (en células de *P. serratus*) en presencia de diferentes equivalentes del pedúnculo ocular (0, 1 y 2 equivalentes de *P. notialis*). Extracto con acetato de amonio 10 mM. Tiempo de incubación 60 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

El porcentaje de secreción liberada por la células del hepatopáncreas de *P. serratus* es de 16 %, 35% y 51% para 0, 1 y 2 equivalentes del pedúnculo ocular respectivamente.

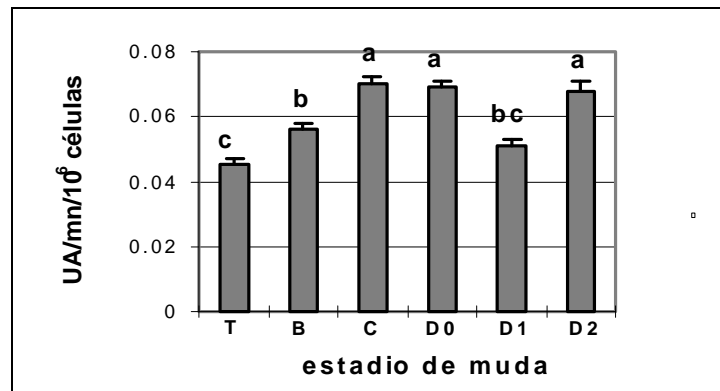


Figura. 9. Actividad de la amilasa en el medio de incubación celular (*P. serratus*) con 0.8 equivalentes de extracto de pedúnculo ocular provenientes de camarones (*P. notialis*) en diferentes estadios del ciclo de muda (B, C, D0, D1 y D2 con relación al testigo (T)).

Extracto con acetato de amonio 10 mM. Tiempo de incubación 60 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

La figura 9 indica la variación de la actividad de la amilasa por las células (*P. serratus*) incubadas con 0.8 equivalentes de extracto de pedúnculo ocular proveniente de camarones (*P. notialis*) en diferentes estadios del ciclo de muda. La incubación celular con los extractos en C, D0 y D2 muestran una actividad de la enzima mayoritaria. Estos resultados ponen en evidencia la reacción cruzada entre las especies *P. serratus* y *P. notialis*.

El porcentaje de secreción encontrado es de 33% para el estadio B, 41% para el estadio C, 40% para el estadio Do, 30 % para el estadio D1, 39% para el estadio D2 con relación al testigo (26%).

b) Primeros estudios del efecto de extractos de la glándula sinusal y de hormonas purificadas sobre la secreción de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas de *Procambarus bouvieri*.

Las incubaciones de las células disociadas del hepatopáncreas de *P. bouvieri* en presencia de diferentes concentraciones de la glándula sinusal se presentan en la figura 10. Un efecto dosis respuesta es obtenido a partir de 0.5 equivalente hasta 6 equivalente de la glándula, utilizando el medio 199 + 1% de albúmina.

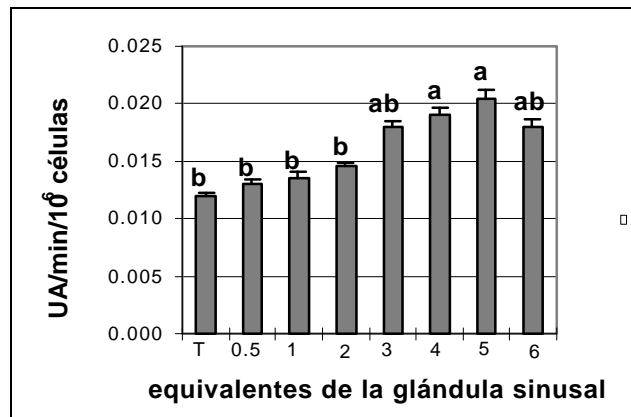


Figura. 10. Actividad de la amilasa medida en el medio 199 + 1% de albúmina secretada por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. bouvieri* e incubadas a diferentes equivalentes de la glándula sinusal (*P. bouvieri*) (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6). Tiempo de incubación de 30 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

El porcentaje de liberación de la amilasa al medio de incubación por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. bouvieri* es significativo a partir de 3 equivalentes de glándula sinusal, con un valor máximo de secreción del 18% con relación al testigo (10%).

La secreción de la amilasa por las células incubadas con hormonas purificadas a partir de la glándula sinusal de *P. bouvieri* fue determinada. La figura 11 muestra que la incubación de las células con las dos isoformas de la hormona hiperglucemiante (cHH-I y cHH-II) estimulan la secreción de la amilasa con relación al testigo, siendo la estimulación producida por la cHH-II superior a la de la cHH-I.

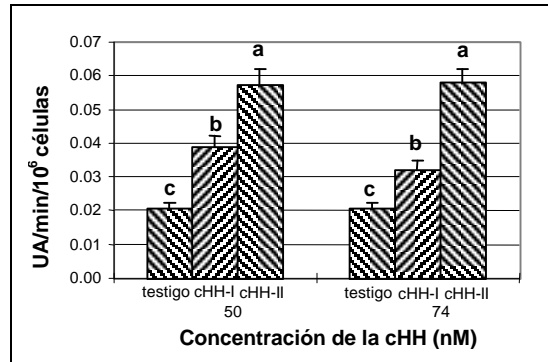


Figura. 11. Actividad de la amilasa medida en el medio 199 + 1% de albúmina, secretada por las células del hepatopáncreas de *P. bouvieri* e incubadas en concentraciones diferentes de las dos isoformas de la hormona hiperglucemiante de *P. bouvieri* (cHH-I y cHH-II). Tiempo de incubación de 30 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

Los resultados muestran que las concentraciones de 50 nM (que se corresponden con 208ng/500 μ l y 4 glándulas sinusales) y 74 nM (que se corresponden con 312 ng/500 μ l de medio y 6 glándulas sinusales) tienen un efecto similar con relación al porcentaje de liberación de la amilasa. La isoforma cHH-II estimula un 43% la secreción de la amilasa con relación a la isoforma cHH-I (30% a 50 nM y un 24% a 74 nM). Ambas isoformas estimulan la secreción de la enzima con relación al testigo (15%).

La actividad de la amilasa en presencia de la hormona inhibidora de la muda (Fig. 12) y de la hormona inhibidora de las gónadas (Fig. 13) es medida en el medio de incubación de las células del hepatopáncreas de *P. bouvieri*. Los resultados muestran que la secreción de la amilasa no es estimulada ni por la hormona inhibidora de la muda (MIH) ni por la hormona inhibidora de las gónadas (GIH). Las concentraciones de proteínas son equivalentes a 2, 4, 6 y 8 glándulas sinusales (en 500 μ l de medio de incubación).

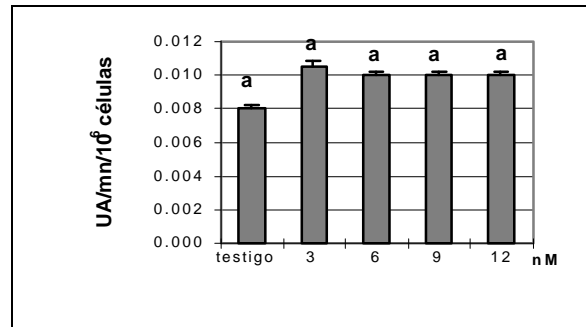


Figura. 12. Actividad de la amilasa medida en el medio 199 + 1% de albúmina, secretada por las células del hepatopáncreas de *P. bouvieri* e incubadas en concentraciones diferentes de la hormona inhibidora de la muda (MIH) de *P. bouvieri* (3 nM=12.4 ng/500 μ l= 2 glándulas; 6 nM= 24.8 ng/500 μ l= 4 glándulas; 9 nM= 37.2 ng/500 μ l= 6 glándulas; 12 nM= 49.6 ng/500 μ l= 8 glándulas) Tiempo de incubación de 30 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

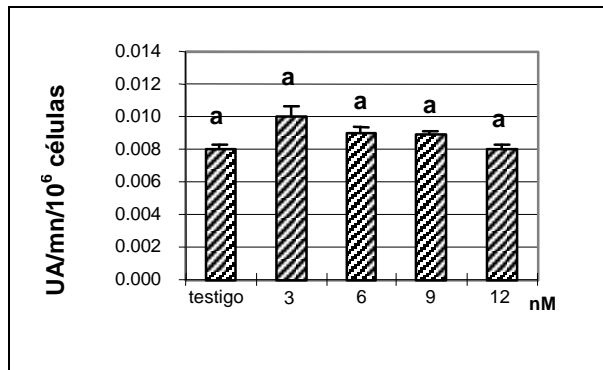


Figura. 13. Actividad de la amilasa medida en el medio 199 + 1% de albúmina, secretada por las células del hepatopáncreas de *P. bouvieri* e incubadas en concentraciones diferentes de la hormona inhibidora de las gónadas (GIH) de *P. bouvieri* (3 nM= 25.4 ng/500 μ l= 2 glándulas; 6 nM= 50.8 ng/500 μ l= 4 glándulas; 9 nM= 76.2 ng/500 μ l= 6 glándulas; 12 nM= 101.6 ng/500 μ l= 8 glándulas) Tiempo de incubación de 30 min. Las diferencias entre las medias se indican por letras diferentes (Prueba de Duncan).

Este resultado indica de una parte, la existencia de una respuesta estimulatriz de la cHH en la secreción de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas y de otra parte que la estimulación que produce la isoforma cHH-II es superior a la estimulación que produce la isoforma cHH-I. Sin embargo, las hormonas inhibitoras de la muda (MIH) y de las gónadas (GIH) no estimulan la secreción de la amilasa.

DISCUSIÓN

Implementación del bioensayo in vitro con células disociadas del hepatopáncreas.

La utilización de células disociadas de hepatopáncreas de *P. serratus* o de *P. bouvieri* a permitido determinar la secreción de la amilasa en el medio. Hasta la fecha, en crustáceos solamente se conoce el trabajo de Sedlmeier (1988), donde utiliza el hepatopáncreas para los bioensayos *in vitro*. La implementación de un bioensayo con células disociadas del hepatopáncreas tiene como ventajas: que los tejidos (muscular, nervioso y hemolinfático) presentes alrededor de las células son eliminados (Gibson y Baker, 1979), particularmente el hemolinfático donde se han detectado enzimas digestivas (Amiard *et al.*, 1982; Kono *et al.*, 1995). También se eliminan los efectos que produce la acción de ciertos péptidos (los neuromediadores influyen sobre la contracción muscular de los túbulos hepatopáncreaticos y estimulan la liberación de las enzimas dentro del lumen) sobre el sistema neuromuscular.

El establecimiento de un medio de cultivo que permita una tasa basal de actividad (mínima) de la amilasa en el medio y una tasa de sobrevivencia celular alta constituyó la primera etapa de esta investigación.

Dos especies de crustáceos fueron utilizadas *P. serratus* y *P. bouvieri*. La sobrevivencia de la células de *P. serratus* disociadas del hepatopáncreas e incubadas por 86 horas en diferentes medios fue determinada por Cancre (1997) con una sobrevivencia de 98%. En este trabajo se obtuvo una sobrevivencia de 98.5% para el medio TD y de 97.5 para el medio VH, lo que

confirma los resultados obtenidos por Cancre (1997). Con relación a *P. bouvieri*, la sobrevivencia mas alta se obtuvo para el medio 199 + 1% de albúmina.

La difusión de la amilasa en el medio de incubación mas débil (como respuesta de las células disociadas) se encontró en *P. serratus* en el medio VH y en *P. bouvieri* en el medio 199 + 1% de albúmina.

Diversas temperaturas fueron estudiadas con el objetivo de lograr un mínimo de difusión de la enzima por las células en el medio de incubación. Los mejores resultados fueron obtenidos entre 20 y 10°C para *P. serratus*. En este rango de temperatura se obtuvieron igualmente buenos resultados para la incubación de las células de *P. bouvieri*.

Devillez y Fyler (1985) incubaron células disociadas de *Orconectes rusticus* en 22°C. Toullec *et al.*, (1992) y Cancre (1997) indican una temperatura de incubación para las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus* de 15°C, mientras que Frerichs (1996) reporta 28°C para *Macrobrachium rosenbergii*. Estas deferencias de temperaturas para las incubaciones se corresponden con las temperaturas habituales de cada especie en su medio.

La validación del bioensayo fue obtenida al estudiar el efecto de diferentes factores sobre la secreción de la amilasa. El AMP cíclico en diferentes concentraciones mostró un papel estimulador sobre la secreción de la enzima por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus* coincidiendo con lo planteado por Cancre (1997) pero con respecto a la síntesis de proteínas.

En los crustáceos, solamente Sdlmeier (1988) demostró la estimulación de la secreción de la amilasa en hepatopáncreas de *Orconectes* incubado en 100 µM de AMP cíclico.

En los bivalvos, una respuesta similar con relación a la secreción de la amilasa fue detectada por las células disociadas del complejo estomago-glándula digestiva de *Pecten maximus*, donde el AMP cíclico estimula la secreción de la α-amilasa de forma semejante a lo observado en vertebrados (Giard *et al.*, 1995).

El calcio está igualmente implicado en los mecanismos que controlan la liberación de la amilasa por las células disociadas del hepatopáncreas de *P. serratus*. Concentraciones de 10 y 50 µM de ionoforo A 23187 muestran una respuesta estimulatriz en la secreción de la amilasa por las células disociadas. La influencia del ionoforo A 23187 fue estudiada por Sedlmeier (1988). La amilasa del hepatopáncreas (*in vitro*) es igualmente estimulada en *Orconectes limosus* por el calcio. El Ca²⁺ extracelular parece ser necesario para la secreción de amilasa por el hepatopáncreas.

Estos resultados evidencian que puede ser utilizado como prueba biológico en futuras experiencias la secreción de la amilasa por las células disociadas.

Secreción de la amilasa por las células de hepatopáncreas incubadas en presencia de diferentes extractos de pedúnculo ocular y de hormonas purificadas.

La utilización del bioensayo a permitido de poner en evidencia la influencia de diferentes extractos del pedúnculo ocular (extracto ácido y extracto con acetato de amonio), así como extractos de la glándula sinusal sobre la secreción de la amilasa por las células aisladas del hepatopáncreas de *P. serratus* y *P. bouvieri*.

Estas respuestas difieren según el estadio de muda. Es en los estadios C, Do y D2 que las células incubadas presentan una secreción máxima de la amilasa. Este resultado indica la presencia de un factor estimulante de la secreción de la enzima, presente mayoritariamente en intermuda y en premuda temprana (Van Wormhoudt *et al.*, 1972). La baja de la actividad enzimática en D1 es atribuida a la ausencia de ese factor estimulante en ese estadio. El aumento de la actividad en D2 pudiera provenir de una nueva estimulación de las células de hepatopáncreas por otros mecanismos, ya sea por la acción de metabolitos que intervienen en el crecimiento o más directamente por la acción de la ecdisona sobre la RNA polimerasa o de la acción de una hormona o de pequeñas moléculas activas secretada por los pedúnculos.

La disminución de la secreción de la amilasa en D1 coincide con la disminución de la actividad específica *in vivo* (Van Wormhoudt *et al.*, 1972) y con una disminución del número de células inmunoreactivas por la cHH en D1 (Van Herp *et al.*, 1984). En efecto, estos autores localizaron utilizando métodos inmunocitoquímicos la localización de los sitios de síntesis, de transporte, de almacenamiento y de liberación de la cHH dentro del pedúnculo ocular de *P. serratus*. Durante el ciclo de la muda, el número de células inmunopositivas aumenta del estadio C al estadio Do, el mínimo de células inmunoreactivas se encuentra en el estadio D1. Posteriormente un ligero aumento es observado en D2.

Este trabajo muestra la capacidad biológica de las células aisladas del hepatopáncreas (en dos crustáceos) de responder a efectores de la secreción de la amilasa. En *P. bouvieri*, se probaron diferentes concentraciones de la cHH (50 y 74 nM) correspondiente a concentraciones fisiológicas determinadas de la glándula sinusal. Sin embargo, las concentraciones probadas de la hormona inhibidora de la muda y de la hormona inhibidora de las gónadas no ejercen ningún efecto sobre la secreción de la amilasa, no obstante estas hormonas pudieran influir en otras funciones metabólicas del hepatopáncreas.

La presencia de receptores dentro de las células del hepatopáncreas ha sido demostrada únicamente para la cHH. Kummer y Keller (1993) evidenciaron la existencia de receptores en la membrana del hepatopáncreas para la cHH de *Carcinus maenas* y de *Orconectes limosus*. Estos autores sugieren que la especificidad de la actividad biológica de la cHH esta ligada a la fijación de la hormona sobre su receptor.

Las células incubadas con las dos isoformas de la hormona hiperglucemiante responden con la secreción de la amilasa. Se distingue que la respuesta de las células de hepatopáncreas incubadas con la isoforma cHH-II es dos veces superior a la respuesta de las células incubadas con la cHH-I (Fig. 14), al ser medida esta respuesta en el medio de incubación con relación al testigo (0%).

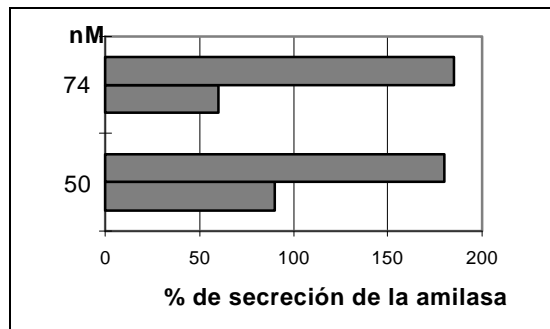


Figura. 14. Porcentaje de secreción de la amilasa de las células incubadas a concentraciones diferentes de las dos isoformas de la hormona hiperglucemiante (cHH-I y cHH-II), medido en el medio de incubación con relación al testigo (0%).

Estas dos moléculas tienen el mismo peso molecular (8388 Da), la única diferencia entre ellas es que la cHH-II posee un tercer residuo de aminoácido diferente, la D-fenil alanina, mientras que la cHH-I tiene la L-fenil alanina.

La inyección de cada isoforma de la cHH de *P. bouvieri* provocó la misma respuesta hiperglucemiante. En *C. maenas* y *C. pagurus* (Chung y Webster, 1996), las dos isoformas de la cHH producen igualmente respuestas hiperglicémicas semejantes. Soyez *et al.*, (1994) mostraron que las isoformas de la cHH de *Homarus americanus*, (la "cHHA [D-Phe³]" (minoritaria) y la "cHHA [L-Phe³]" mayoritaria) producen respuestas hiperglicémicas entre 3 y 4 horas respectivamente después de la inyección en *Orconectes limosus*.

Diversos bioensayos han sido realizados con el objetivo de demostrar la presencia dentro de los extractos del pedúnculo ocular, de la cHH y de sus isoformas. Sin embargo, los criterios y los bioensayos utilizados muestran divergencia con relación a la identificación biológica de esta hormona y de sus isoformas (Santos y Stefanello, 1991; Soyez *et al.*, 1994; Yasuda *et al.*, 1994; Aguilar *et al.*, 1995; Chung y Webster, 1996; Sefiani *et al.*, 1996).

Conclusión

1. Implementación de un bioensayo *in vitro* teniendo en cuenta el medio y la temperatura adecuada para realizar las incubaciones de las células de *P. serratus* y *P. bouvieri* de tal forma que se logre una secreción basal de la amilasa y un alto porcentaje de sobrevivencia en las células.

2. La relación dosis respuesta encontrada en la secreción de la α -amilasa por las células incubadas a diferentes concentraciones de extractos del pedúnculo ocular y de la glándula sinusal indica la presencia dentro de esos extractos de factores estimuladores para la secreción de la enzima por las células disociadas y que dependerá del estadio de muda en que se encontraba el animal cuando se disecó el pedúnculo ocular. La incubación celular con hormonas purificadas evidenció una respuesta estimulatriz de la secreción de la amilasa cuando la incubación se realizó con la cHH-I y la cHH-II, siendo la respuesta de las células superior cuando era incubada con la cHH-II, sin embargo no se detectó respuesta cuando las células eran incubadas con la MIH y la GIH.

Referencias:

- Aguilar, M. B., Soyez, D., Falcheto, R., Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Huberman, A.** (1995). Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (cHH-II) of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Presence of D-amino acid. *Peptides*, 16(8): 1375-1383.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A. & Lane, D. J. W.** (1985 a). M. < Midget> cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Hann. *Crustaceana*, 48: 260-268.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A. & Lane, D. J. W.** (1985 b). Mitotic E- and F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 65: 901-910.
- Al-Mohanna, S. Y. & Nott, J. A.** (1987 a). M. < Midget> cells and moult cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 67: 803-813.
- Al-Mohanna, S. Y. & Nott, J. A.** (1987 b). R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 95: 129-137.
- Barker, P. & Gibson, R.** (1977). Observations on the structure of mouthparts, histology of the alimentary tract, and digestive physiology of the mud crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 32: 177-196.
- Cancre, I.** (1997). Recherche de Facteurs de croissance chez les invertébrés marins: Approche biologique *in vivo* et *in vitro*, immunologique, biochimique et moléculaire. Thèse d'Université de Bretagne Occidentale. Mention: Chimie Marine. 191p.
- Chung, J. S. & Webster, S. G.** (1996) Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological significance for crab hyperglycemic neuropeptides? *Eur. J. Biochem*, 240 (2): 358-364.
- De Villez, E. & Fyler, D. J.** (1985). Isolation of hepatopancreatic cell types and enzymatic activities in B cells of the crayfish *Orconectes rusticus*. *Can. J. Zool.*, 64: 81-83.
- Fingerman, M., Dominiczak, T. Oguro, C. & Yamamoto, Y.** (1967). Neuroendocrine control of the hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiol. Zool.*, 40: 23-30.
- Gardner, J. D.** (1979). Regulation of pancreatic exocrine function *in vitro*: initial steps in the actions of secretagogues. *Ann. Rev. Physiol.*, 41: 55-66.
- Giard, W., Favrel, P. & Boucaud-Comou, E.** (1995). *In vitro* investigation of alfa-amylase release from the digestive cells of the bivalve mollusc *Pecten maximus*: Effect of second messengers and biogenic amines. *J. Comp. Physiol.*, 164(7): 518-523.
- Gibson, R. & Baker, P. L.** (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 17: 285-346.
- Hazra, A. K. , Chock, S. P. & Albers, R. W.** (1984). Protein determination with trinitrobenzene sulfonate: A method relatively independent of amino acid composition. *Anal. Biochem.*, 137: 437-443.
- Huberman, A., Aguilar, M. B., Brew, K., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F.** (1993). Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycaemic hormone (cHH-I) from the sinus gland of Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Interspecies comparison. *Peptides*, 14: 7-16.
- Huberman, A., Aguilar, M. B. & Quakenbush, L. S.** (1995). A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Aquaculture*, 135: 149-160.
- Knight, D. E. & Koh, E.** (1984). Ca²⁺ and cyclic nucleotide dependence of amylase release from isolated rat pancreatic acinar cells rendered permeable by intense electric fields. *Cell Calcium*, 5: 401-418.
- Kono, M., Wilder, M. N., Matsui, T., Furukawa, K., Koga, D. & Aida, K.** (1995). Chitinolytic enzyme activities in the hepatopancreas, tail fan and hemolymph of kuruma prawn *Penaeus japonicus* during the molt cycle. *Fish. Sci.*, 61(4): 727-728.
- Kummer, G. & Keller, R.** (1993). High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides*, 14: 103-108.
- Lowry, O. M., Rosbrougt, M. J., Farr, A. L. & Andrandall, R. J.** (1951). Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 267-275.
- O'doherty, J. & Stark, R. J.** (1982). Stimulation of pancreatic acinar secretion: increases in cytosolic calcium and sodium. *Am. J. Physiol.*, 242: G513-521.

- Santos, E. A. & Stefanello, T. M.** (1991). The hemolymph of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae) as a target tissue of crustacean hyperglycemic hormone. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24(3): 267-270.
- Sedlmeier, D.** (1988). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory Peptides*, 20: 91-98.
- Sefiani, M., Le Caer, J. P. & Soye, D.** (1996). Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 103(1): 41-53.
- Soyez, D., Van Herp, F., Rossier, J., Le Caer, J-P., Tensen, C. P. & Lafont, R.** (1994). Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. *J. Biol. Chem.*, 269: 18295-18298.
- Toullec, J. Y., Chikhi, M. & Van Wormhoudt, A.** (1992). *In vitro* protein synthesis and amylase activity in F cells from hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea; Decapoda). *Experientia*, 48: 272-277.
- Van Harreveld, A.** (1936). A physiological solution for fresh water crustaceans. *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 34: 428-432.
- Van Herp, F.; Van Wormhoudt, A.; Van Venroy, W. A. J. & Bellon-Humbert, C.** (1984). Immunocytochemical study of crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalks of prawn *Palaemon serratus* (Pennant) and some other palaemonidae, in relation to variation in the blood glucose level. *J. Morphol.*, 182: 85-94.
- Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, H. J. & Le Gal, Y.** (1972). Activité des proteases et amylases chez *Penaeus kerathurus* : existence d'un rythme circadien. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 274: 1208-1211.
- Van Wormhoudt, A.** (1980). Regulation d'activité de l' α -amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 8: 193-203.
- Van Wormhoudt, A., Van Herp, F., Bellon, C., Ceccaldi, H. J. & Keller, R.** (1984): Changes and Crustacean hyperglycemic hormone in *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda, Natantia) during the different steps of purification. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B(31): 353-360.
- Vogt, G.** (1994). Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology*, 114: 83-101.
- Vonk, H. J.** (1960). Digestion and metabolism. In: *Physiology of Crustacea*. Vol. I. Metabolism and growth (Edited by Waterman T. H.) Academic Press. N. Y.: 291-316.
- Webster, S. G.** (1986). Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by *Carcinus maenas* Y-organs *in vitro*, and preliminary characterisation of the putative molt-inhibiting hormone (MIH). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61(2): 237-247.
- Yasuda, A.; Yasuda, Y.; Fujita, T. & Naya, Y.** (1994). Characterisation of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse function. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95: 387-398.