

Subramoniam, 1980; Talbot, 1981; Tom *et al.*, 1987a,b; Yano y Chinzei, 1987; Tan-Fermin, 1991; Medina *et al.*, 1996). En particular, las técnicas de PAS (glicoproteínas) y SBB (lípidos) han sido utilizadas en la histoquímica ovárica del cangrejo ermitaño *Clibanarius clibanarius* (Varadarajan y Subramoniam, 1980), en los camarones *Penaeus japonicus* (Yano, 1988), *Parapenaeus longirostris* (Tom *et al.*, 1987b), y *Penaeus semisulcatus* (Browdy *et al.*, 1990) y en el cangrejo *Paratelphusa hydrodromis* (Adiyodi, 1969).

#### **3.4.10.1.- Determinación de glicoproteínas por la técnica de PAS**

Utilizando esta técnica se observó la presencia de finos gránulos inmersos en el citoplasma de los ovocitos en todos los estadios de desarrollo, y que corresponden a glicoproteínas. La técnica de H y E no evidencia en forma clara a estos gránulos, en particular en cortes de las mismas gónadas de los primeros estadios. A este respecto, Kulkarni *et al.* (1991), observó solamente gránulos de vitelo en ovocitos de *P. clarkii* al inicio de la etapa vitelogénica, estos gránulos fueron numerosos en el estadio vitelogénico intermedio, probablemente estos resultados se debieron a que la técnica histológica utilizada fue H y E, la cual no es específica para una identificación clara de gránulos de vitelo. Sin embargo, Tobías-Chavana (1991), utilizando la técnica H y E observó que en las gónadas de los estadios II y III de *Procambarus clarkii*, los ovocitos ya presentaban gránulos de vitelo. En otro estudio, Tom *et al.* (1987b), mencionan que los ovarios del camarón *Parapenaeus longirostris*, presentan dos fases de desarrollo citoplasmático que corresponde al crecimiento y la etapa vitelogénica, desde la primera etapa hubo una gradual reacción positiva a la técnica de PAS. Esta misma reacción positiva al PAS, también se observó desde el estadio I al III en *Clibanarius clibanarius* (Varadarajan y Subramoniam, 1980).

La técnica de PAS es utilizada generalmente para determinar la presencia de carbohidratos, ya que existen otras técnicas más específicas para la observación de glicógeno, como es la técnica de Carmin de Best (Varadarajan y Subramoniam, 1980).

#### **3.4.10.2.- Determinación de lípidos por la técnica de BSB**

Los ovocitos en estadio III y IV presentaron una reacción positiva a la técnica de BSB, de acuerdo a la coloración azul intensa de los gránulos de vitelo. En un estudio similar, Tom *et al.* (1987b), observaron que el material PAS (+) gradualmente desapareció del citoplasma en la fase vitelogénica y se presentaron grandes glóbulos de lípidos fuertemente teñidos por la técnica de BSB. Además, esta técnica permitió reconocer una disminución notable en la cantidad de vitelo de los ovocitos del estadio IV en reabsorción, lo cual coincide con las observaciones hechas por Kulkarni *et al.* (1991). A este respecto,

A pesar de que la técnica de BSB sirvió para identificar claramente la presencia de lípidos en el ovoplasma en comparación a la técnica convencional de H y E. Sin embargo, esta técnica tiene sus limitaciones o desventajas para su utilización, por ejemplo, la reacción o tinción positiva a esta técnica tuvo una corta duración y todo el procedimiento de tinción involucra una gran cantidad de tiempo (más de cuatro días).

### 3.5. CONCLUSION

- ◆ Se registraron cuatro estadios gonadales basados en las características de color y tamaño de los ovocitos.
- ◆ En el acocil rojo, la reproducción se lleva a cabo principalmente durante el periodo de Intermuda.
- ◆ Las hembras colectadas presentan un rango promedio de LC de 26.72 a 35.3 mm, incrementándose del estadio I al IV, sin embargo, de acuerdo a los resultados observados estos parámetros morfométricos no se consideran buenos indicadores del desarrollo gonadal.
- ◆ El peso ovárico se incrementa del estadio gonadal I (0.0043 g) al IV (1.4819 g) y está influenciado por los parámetros ambientales y la época del año en el sitio de colecta.
- ◆ En las hembras de *Procambarus clarkii* el IGS representativo de la madurez gonadal presenta el mayor promedio en el mes de Agosto y en Octubre se observa el mínimo.
- ◆ El incremento del diámetro de los ovocitos y el núcleo está relacionado con el incremento del peso gonadal y el estadio, además la forma de los ovocitos también varía de acuerdo al estadio gonadal.
- ◆ Existe una fuerte variación del número de nucleolos por estadio registrándose la mayor variabilidad en el estadio IV.
- ◆ La presencia de vacuolas característica de la fase vitelogénica se presentó en el estadio III, mientras que la zona perinuclear no resulta un buen indicador de la madurez gonadal ya que se observa en todos los estadios.
- ◆ La presencia de espacios citoplasmáticos (estadio IV) indican la reabsorción del ovario y la finalización del ciclo de maduración.
- ◆ En cada estadio gonadal se pueden observar ovocitos en más de un estadio debido a que el proceso de maduración es continuo.
- ◆ La presencia de glicoproteínas es evidente en todos los estadios gonadales, mientras que la aparición de lípidos se observa principalmente en los estadios III y IV.

## **CAPITULO 4.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA VITELOGENINA PLASMATICA Y VITELINA OVARICA DEL ACOCIL ROJO *Procambarus clarkii***

### **4.1.- INTRODUCCION**

Los estudios sobre fisiología reproductiva, maduración y desarrollo de las gónadas en crustáceos decápodos son diversos, y de estos destacan los realizados con **camarones peneidos** (Tom *et al.*, 1987a; Tom *et al.*, 1987b; Shafir *et al.*, 1992; Fainzilber *et al.*, 1992; Chen y Chen, 1993; Chang *et al.*, 1993a; Cariolou y Flytzanis, 1993; Chen y Chen, 1994; Courtney *et al.*, 1995), **acociles** (Kulkarni *et al.*, 1991), **langostinos** (Chang *et al.*, 1993b) y **cangrejos** (Lee y Puppione, 1988; Quackenbush y Keeley, 1988; Paulus y Laufer, 1987; Lee y Watson, 1995).

Como en la mayor parte de los invertebrados acuáticos, los crustáceos decápodos como el acocil *Procambarus clarkii*, ovopositan una gran cantidad de huevos dependiendo de la talla de la hembra, los cuales dispondrán de las reservas de vitelo necesarias para cubrir sus requerimientos energéticos durante el desarrollo embrionario (Meusy, 1963). Es conocido entre los Crustáceos Malacostrácos que las hembras en etapa reproductiva producen vitelo, el cual es una sustancia nutritiva constituida principalmente de proteínas, lípidos y carbohidratos, que se presenta en cantidades variables en la mayoría de los ovocitos formando una reserva necesaria para su desarrollo embrionario (Charniux-Cotton, 1985).

### **4.2.- ANTECEDENTES**

#### **4.2.1.- Recrudescimiento Gonadal**

La maduración gonadal, se desarrolla en la mayor parte de los animales, de manera continua y regular. Sin embargo, es común que algunas hembras presenten anomalías tales como la reabsorción de los ovarios en ciertos estados del desarrollo gonadal. Estos ciclos abortivos y la rapidez a la que se desarrolla este proceso explican en parte el diferente número de individuos observados en cada estadio de maduración.

De aquí que resulte necesario recurrir a criterios precisos tanto histológicos como morfológicos, para establecer la etapa de maduración en que se encuentran los

organismos. La gónadas de los decápodos cambian de talla y color durante el desarrollo de los ovarios, desde su inicio hasta la madurez, variando durante los ciclos de vitelogénesis y oviposición (Aiken y Waddy, 1980). El seguimiento de estas modificaciones morfológicas ha sido utilizado por varios autores para caracterizar la evolución gonadal de diferentes crustáceos (King, 1948; Tuma, 1967; Aquacop, 1977; Woo-Khoo, 1988). En el caso particular de *Procambarus clarkii*, De La Brettone y Avault (1976), consideraron cuatro estadios para describir el desarrollo gonadal, basado en el color y tamaño de los ovocitos.

#### **4.2.2.-Vitelogénesis**

Actualmente, está bien comprendido que durante la reproducción de los crustáceos malacostrácos, los ovocitos requieren grandes cantidades de vitelo para su crecimiento y desarrollo (Charniaux-Cotton, 1985). De aquí, la definitiva importancia del papel del vitelo en el desarrollo larvario. Esto ha propiciado que originen diversas investigaciones sobre aspectos de vitelogénesis en diferentes crustáceos desde los años 60's y en los últimos años las investigaciones se han orientado al estudio de la biosíntesis del complejo proteína-vitelo, aspecto que ha sido cuidadosamente tratado por varios autores (Adiyodi y Subramoniam, 1983; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986; Meusy y Payen, 1988; Charniaux-Cotton y Payen, 1988 y Quackenbush, 1991). Sin embargo, aún existen muchos puntos oscuros acerca del o los sitios de producción de vitelo exógeno y de la hormonas involucradas en la estimulación y coordinación de síntesis de vitelo.

De manera sucinta se puede decir que durante el proceso fisiológico de la ovogénesis, se presentan una serie de cambios graduales que implican el crecimiento, diferenciación y maduración ovocitaria de las células germinales.

El proceso de vitelogénesis en los crustáceos, está caracterizado durante el ciclo reproductivo femenino, por la acumulación de una extensa cantidad de vitelo y es por consiguiente de particular interés dentro del mismo ciclo reproductivo (Quinitio *et al.*, 1989). Durante esta fase el vitelo completa todos sus componentes orgánicos e inorgánicos, necesarios para el crecimiento de los ovocitos (Adiyodi y Subramoniam, 1983; Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986)

En el desarrollo ovocitario en los crustáceos, principalmente en los malacostráceos se distinguen las siguientes fases o estados:

- a) Fase inicial (crecimiento o multiplicación ovocitaria)
- b) Previtelogénesis
- c) Vitelogénesis Primaria
- d) Vitelogénesis Secundaria

**a).- Fase inicial.-** El crecimiento ovocitario ocurre en la zona germinativa donde las ogonias están completamente rodeadas por células mesodérmicas, las cuales impiden que un factor andrógeno (6-hidroxi-farnesil-cetona) actúe sobre ellas. Durante esta fase ocurre numerosas divisiones mitóticas ogoniales y continuamente las ogonias salen por mecanismos desconocidos (Aiken y Waddy, 1980; Adiyodi y Subramoniam, 1983; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985; Woo-Khoo, 1988); en esta fase los ovocitos se preparan para la vitelogénesis.

Al liberarse del emprisionamiento del tejido mesodérmico, las células quedan expuestas a la eventual influencia del efector andrógeno, el cuál si llegara a actuar sobre estas determinaría su conversión en espermatoцитos, por lo cuál sino se ejerce la influencia de este efector (hormona andrógena= 6-hidroxifarnesil-cetona), las células germinales se convertirían espontáneamente en ovocitos (autodiferenciación).

Posteriormente estas ogonias entran en meiosis para detenerse en profase y convertirse en ovocitos primarios (Payen, 1980; Charniaux-Cotton, 1985); esta fase de descanso es a veces denominada previtelogénesis (vitelogénesis primaria) (Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985). Durante este proceso se deposita material vitelino endógeno en el seno de ovocitos, (Kessel, 1968; Lui y O'Connor, 1976; Woo Khoo, 1988), a raíz del establecimiento de vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) en el citoplasma ovocitario el cual contribuye a la síntesis de glicoproteínas (vitelo endógeno), (Payen, 1980; Adiyodi, 1985; Charniux-Cotton, 1985).

**b).- Previtelogénesis.-** El termino previtelogénesis es un termino confuso en el sentido de que en muchos casos, el deposito de vitelo comienza en este particular estado (Adiyodi y Subramoniam, 1983). La fase de descanso de los ovocitos previtelogénicos es estimulada por factores externos para proceder de una meiosis a una vitelogénesis primaria, fase durante la cual se deposita el material vitelino endógeno por

los ovocitos (Beams y Kessel, 1963; Kessel, 1968; Lui *et al.*, 1974; Lui y O'Connor, 1977; Yano y Chizei, 1987; Woo Khoo, 1988).

**c).- Vitelogénesis Primaria.- (Vitelogénesis I)** Este estado fue llamado así por Aiken y Waddy (1980), Charniaux-Cotton (1985) y Quackenbush (1986) o Vitelogénesis I por Adiyodi (1985). Durante la vitelogénesis primaria existe una gran formación de vesículas del retículo endoplásmico rugoso (RER) en los ovocitos primarios y que contiene glicoproteínas (síntesis de vitelo endógeno), este compuesto y las lipoproteínas son de origen endógeno o autóctono (Nelson, no publicado). Esto se va traducir en un ligero incremento en el tamaño de la gónada, al aumentar el volumen de los ovocitos, los cuales adquieren el material necesario para la síntesis de proteínas (Zerbib, 1976). Otra característica, es que las células foliculares primarias que posiblemente se originaron en la zona germinativa rodean a cada ovocito (Payen, 1980; Adiyodi y Subramoniam, 1983; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986).

La ovogénesis desde ogonias hasta el final de la vitelogénesis primaria es un proceso continuo (Payen, 1980; Charniaux-Cotton, 1985) y no existe factores externos o internos, como un control endocrino conocido, que pudieran controlar o influenciar esta fase (Fauvel, 1986). Esta es permanente durante toda la vida de la hembra (Charniaux-Cotton, 1978).

En el transcurso de esta citodiferenciación los ovocitos más jóvenes reemplazan a los ovocitos más maduros, que se encuentran en el centro del ovario, dirigiéndolos progresivamente hacia la periferia de este.

#### **d) Vitelogénesis Secundaria.- ( Vitelogénesis II)**

Durante el reposo genital los ovocitos permanecen estacionados en vitelogénesis primaria, pero en épocas de reproducción, los ovocitos en las etapas finales de la vitelogénesis primaria van sincrónicamente van hacia vitelogénesis secundaria, que se caracteriza por un desarrollo muy rápido, selectivo y sincronizado de estos. Esta segunda fase, es un fenómeno cíclico con dependencia hormonal y de factores externos (Charniaux-Cotton, 1978; Meusy y Payen, 1988). La vitelogénesis secundaria también es conocida como la fase de maduración por los acuacultores.

La vitelogénesis secundaria empieza con la formación de folículos secundarios, que rodean completamente a los ovocitos (Payen, 1980; Nelson, no publicado). Esto es una condición necesaria para la internalización de la Vitelogenina (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

En esta segunda fase continua el depósito de vitelo, incrementándose masivamente la vitelogénesis y existe un incremento sustancial en el volumen y peso gonadal. El vitelo es de origen endógeno y exógeno (Kerr, 1968; Aiken y Waddy, 1980; Charniaux-Cotton, 1985; Tom *et al.*, 1987a)

Existen evidencias para sostener que existe un secuestro de proteínas extra-ovocitarias (Vitelogenina) por endocitosis tomada de la hemolinfa desde el sitio de producción hasta el ovario (Payen, 1980; Woo-Khoo, 1988; Nelson, no publicado). La Vitelogenina (VTG) o proteína específica de las hembras (FSP) es un precursor plasmático de la Vitelina (VTL) ovocitaria, constituyente principal del vitelo (Payen, 1980; Adiyodi y Subramoniam, 1983, Charniaux-Cotton, 1985; Nelson, no publicado), que es inmunológicamente idéntica a este vitelo endógeno y solo se presenta en hembras que han entrado en su fase reproductiva (puberal) (Aiken y Waddy, 1980; Meusy, 1980; Payen, 1980).

El sitio de origen de la vitelogenina (VTG) se ha discutido y se mencionan a los siguientes tejidos: hepatopáncreas (Lui *et al.*, 1974; Fyffe y O'Connor, 1974; Aiken y Waddy, 1980; Charniaux-Cotton, 1985), tejido graso subepidérmico (cuerpo graso) (Tom *et al.*, 1987a; Woo-Khoo, 1988) y los hemocitos (Kerr, 1969). La contribución de la vitelogénesis exógena varía de especie a especie aparentemente y no todos los crustáceos requieren vitelina exógena (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

Durante la vitelogénesis secundaria el RER continua sintetizando glicoproteínas, las cuales son inmunológicamente diferentes de la vitelogenina (Meusy, 1980). Además, aparecen gotaletas de lípidos en la periferia del ooplasma llenándolo. En el caso de los palaemónidos cada ovocito está rodeado por una capa de células foliculares secundarias y que los microvellos del oocito cruzan la envoltura vitelina con la función aparente de secuestrar al precursor hemolinfático del vitelo, al final de la vitelogénesis secundaria estos microvellos se retractan (Adiyodi y Subramoniam, 1983). La foliculogénesis secundaria que es un fenómeno probablemente general en malacostrácos, separa a los



ovocitos en dos poblaciones; a) ovocitos rodeados por células foliculares primarias y estratificadas en zonas que corresponden a los diferentes estados de la ovogénesis hasta el final de la vitelogénesis primaria b) ovocitos rodeados por células foliculares secundarias, que están en el mismo estado de la vitelogénesis secundaria (Charniaux-Cotton, 1985).

El final de la vitelogénesis secundaria se caracteriza por la ruptura de la vesícula germinativa (-*Germinal Vesicle Break Down*-GVBD), la cual tiene lugar antes de la ovulación (Quackenbush, 1991)

#### **4.2.3.- Tipos de vitelo**

Durante la reproducción de los crustáceos malacostráceos, los ovocitos requieren grandes cantidades de vitelo Charniaux-Cotton, (1985). Sin embargo esto parece depender de la ontogenia de cada grupo. A este respecto, Mendoza, (1992), encontró una cantidad mínima de vitelo en los ovocitos de los peneidos con respecto a la determinada en ovocitos de otros crustáceos, atribuyendo esto al breve periodo larvario de los peneidos.

El depósito de vitelo comienza durante la vitelogénesis primaria (Adiyodi y Subramoniam, 1983), proceso que se caracteriza por la acumulación de glicoproteínas en el ovocito, mientras que la vitelogénesis secundaria se distingue por la acumulación de lípidos y proteínas en el vitelo, (Cuzin-Roudy y O'Leary, 1991). Esto es debido a que durante esta fase un precursor hemolinfático, la vitelogenina (VTG), se internaliza en el ovocito mediante un proceso mediado por receptores el cual permite el transporte de la molécula al interior de los ovocitos (Mendoza y Fauvel, 1989). Así, durante la vitelogénesis secundaria esta molécula al concentrarse en los ovocitos se transforma en vitelina (VTL), la cual constituye la proteína mayoritaria del vitelo.

Los estudios relativos a la composición del vitelo han sido enfocados principalmente a las proteínas que son sintetizadas externamente y que posteriormente son conducidas por la hemolinfa y acumuladas en el ovocito (Muñoz *et al.*, 1990; Shafir *et al.*, 1992).

El vitelo es el material nutritivo que una vez acumulado en cantidades sustanciales en el ooplasma podrá satisfacer los requerimientos básicos para el desarrollo embrionario. El tipo y composición de vitelo varía de especie a especie, y depende del tipo de dieta (Adiyodi y Subramoniam, 1983). Existen dos tipos de vitelo, la vitelina (VTL) o lipovitelina, que es la proteína más abundante en el huevo y la vitelogenina (VTG) (Aiken y Waddy, 1980; Adiyodi, 1985; Quackenbush, 1986). Ambos tipos de vitelo contribuyen en el crecimiento de las células ovocitarias.

Las proteínas y lípidos constituyen la mayor parte de las reservas orgánicas del vitelo. El papel de los carbohidratos está aún por elucidar, pero muy probablemente participen en aportar energía durante la eclosión. Las proteínas proveen el material básico necesario para la creación de tejidos, mientras que los lípidos, especialmente los neutros sirven como fuente de energía (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

En el caso de las lipo-glico-proteínas, como la VTL, están asociadas a pigmentos carotenoides, estas uniones son altamente sensibles. Se ha sugerido que el pigmento sirve como un escudo contra las radiaciones para proteger al embrión (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

Una de las particularidades de la molécula de la VTG en los crustáceos es su alto peso molecular consecuencia de la asociación de las proteínas con lípidos, glúcidos y grupos prostéticos carotenoides originados durante la vitelogénesis (Meusy, 1980). Por otra parte, la VTL, inmunológicamente indistinguible de la VTG, presenta también un elevado peso molecular y se caracteriza por ser la proteína más abundante en el huevo, constituida por 28% y 35% de lípidos, 4.8% de carbohidratos, y carotenoides. A dichas asociaciones se les identifica como lipo-glico-carotenoproteínas (Meusy, 1980; Fyffe y O'Connor, 1974).

La lipovitelina consiste de algunas subunidades que se asocian y se disgregan, en *Procambarus*, el vitelo puede disociarse en cinco subunidades (Lui y O'Connor, 1976). El peso molecular tanto de VTG y VTL (Tabla 4.1) varía de acuerdo a las especies, y en términos generales se ha estimado que varía entre los  $300 \times 10^3$  y los  $600 \times 10^3$  Daltons (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

En *Procambarus* sp. se estimó el peso molecular de la VTL en 500,000 Daltons con un porcentaje de lípidos del 35% (Fyffe y O'Connor, 1974). En el anfípodo *Orchestia*

*gammarella* los pesos moleculares para la LVI fue 348,200 y de 498,600 para la LVII y en esta misma especie el peso molecular de la VTG fue de 397,000 Daltons (Junera *et al.*, 1977).

**Tabla 4.1.- Estimaciones del peso molecular de las subunidades de VTL, en diferentes especies de crustáceos.**

ESPECIE	SUBUNIDAD DE VITELINA	PESO MOLECULAR EN kDa	AUTOR	AÑO
<i>Penaeus monodon</i>	5 Polipéptidos	540 (VTL). 74, 83, 90, 104, 168 (Subunidad)	Quinitio <i>et al.</i> ,	1990
<i>Penaeus monodon</i>	8 Polipéptidos (lipo-glico-carotenoproteínas)	492 (VTL) 35, 45, 49, 58, 64, 68, 82, 91. (Subunidad)	Chang <i>et al.</i> ,	1993a
<i>Penaeus chinensis</i>	2 Polipéptidos	191 y 85	Chang y Jeng	1995
<i>Penaeus chinensis</i>	5 VTL1 (lipo-glyco-caroteno-fosfo-proteína) 3 VTL2 (glico-fosfo-proteína)	380 (VTL1) 105, 85, 78, 58, 40 (Subunidad). 500 (VTL2) 155, 85, 78 (Subunidad).	Chang <i>et al.</i> ,	1996
<i>Penaeus monodon</i>	4 Polipéptidos (glicoliproteínas)	168, 104, 83 y 74	Chen y Chen	1993
<i>Parapenaeus longirostris</i>	2 Glicoproteínas	45 y 66	Tom <i>et al.</i> ,	1987 <sup>a</sup>
<i>Armadillium vulgare</i>	VTL1 - VTL4 (glicoliproteínas) VTL4 con 3 polipeptidos.	700,000 620,00 540,000 4470,000 (VTL) 80,000, 99,000, 127,000 (VTL4)	Susuki <i>et al.</i> ,	1987
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	3 VTL con 2 lipo-glicocarotenoproteína. 1 VTL con un mínimo	240, 450, 800 (VTL). 90 y 104 (Subunidad) 194 (VTL con un mínimo peso molecular).	Chang <i>et al.</i> ,	1993b
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	2 Lipoglycoproteínas	700 (Vn) 100 y 89 (Subunidades)	Lee <i>et al.</i> ,	1997
<i>Pandulus kesleri</i>	VTL1 - VTL2 con 2 lipo-caroteno-proteína.	560 (VTL1-VTL2) 81 y 110 (Subunidades)	Quinitio <i>et al.</i> ,	1989
<i>Potamon potamios</i>	3 Polipéptidos	115, 105 y 85	Pateraki y Stratakis	1997
<i>Callinectes sapidus</i>	2 lipoproteínas y 1 proteína	109 y 86 188.	Lee y Watson	1994
<i>Callinectes sapidus</i>	4 Proteínas	188, 168, 109 y 86	Lee y Watson	1995

#### 4.2.4.-Origen y Síntesis del Vitelo

La síntesis endógena del vitelo ha sido confirmada en varios estudios por medio de la incubación de ovarios *in vitro*, lo que ha sido constatado por medio de la

incorporación de aminoácidos marcados (Dhen *et al.*, 1983; Eastman-Reks y Fingerman, 1985; Yano y Chinzei, 1987; Quackenbush, 1989a; Browdy *et al.*, 1990).

Sin embargo, se ha demostrado igualmente la existencia de una síntesis de vitelo exógeno en crustáceos, que incluye al hepatopáncreas, el tejido adiposo subepidérmico y los hemocitos (Kerr, 1969; Meusy, 1980; Meusy *et al.*, 1983; Souty y Piccaud, 1984; Paulus y Laufer, 1987; Tom *et al.*, 1987a; Quackenbush y Keeley, 1988; Woo-Khoo, 1988; Quackenbush, 1989a; Qunitio *et al.*, 1990). Aiken y Waddy (1980), sugiere que el hepatopáncreas sería el blanco de una hormona ovarica estimuladora de la vitelogenina (VSOH). Paulus y Laufer (1987), presento la evidencia de células especializadas del hepatopáncreas que estarían implicadas en la síntesis de VTG, a estas células se les denominó como vitelogenocitos. En isópodos y anfípodos, se ha emitido la hipótesis de que el cuerpo graso es el sitio extraovárico de la síntesis de vitelo (Piccaud, 1980; Piccaud y Souty, 1980; Meusy *et al.*, 1983b).

Adicionalmente, han sido varios los autores que han podido detectar y medir la VTG en la hemolinfa (Derelle *et al.*, 1986; Yano, 1987; Lee y Puppione, 1988; Quackenbush, *op.cit*; Mendoza *et al.*, 1993). La presencia de VTG en la hemolinfa aumenta los cuestionamientos sobre los sitios extra ováricos para la síntesis de la VTL o de los precursores moleculares (Fainzilber *et al.* 1992).

Estas contradicciones aparentes se deben sin duda a diferencias: entre las especies, a los métodos de incubación utilizados, a las técnicas de purificación de la VTG y la VTL y a la preparación de anticuerpos (Browdy, 1992).

Adiyodi y Subramoniam (1983), mencionan que la presencia de una fracción de vitelo (VTG) en la hemolinfa, que serológicamente es idéntica a la lipovitelina (VTL), se podría explicar en dos formas; 1) Puede ser el resultado de la lisis del vitelo y su posterior liberación hacia la hemolinfa 2) Síntesis activa de una proteína específica (VTG = FSP) fuera del ovario y su subsecuente liberación a la hemolinfa, posiblemente para facilitar su incorporación selectiva por los ovocitos.

Estas hipótesis variadas y evidencias alternativas de los diferentes sitios de vitelogénesis en crustáceos no está completamente esclarecida, mucho menos aún la comprensión del control endocrino y regulación de la vitelogénesis en crustáceos (Woo-

Khoo, 1988). No obstante que estos resultados sean aún objeto de controversia parece muy posible vislumbrar una dualidad en las modalidades de elaboración de la VTL, en algunos crustáceos. En efecto, de acuerdo a Adiyodi (1985), la proporción de síntesis endógena/exógena variaría según la especie. De esta manera, algunos trabajos realizados recientemente en algunos peneidos han conducido a resultados que han llevado a reconsiderar estas interpretaciones indicando que los dos orígenes son posibles, sin embargo, el principal lugar de síntesis sería el ovario (Yano y Chinzei, *op cit.*; Faínzilber *et al.*, 1989; Rankin *et al.*, 1989). Quackenbush (1989a), considera un origen mixto del vitelo (tanto endógeno como exógeno), argumentando que diferentes partes de la molécula de la VTG serían sintetizadas en distintos órganos y probablemente ensamblada en el hepatopáncreas, para de ahí dirigirse al ovario. A este propósito, se ha postulado que la coordinación endocrina de la producción de vitelo a partir de la síntesis de proteínas en los diferentes tejidos, sería un mecanismo para optimizar la energía invertida que se requiere para la producción de un gran número de huevos (Quackenbush, *op.cit.*).

Por otra parte, hay evidencias en diferentes especies de crustáceos, que el ovario es el sitio exclusivo de síntesis de VTL y la presencia de VTG en la hemolinfa en diversas especies debe ser explicado por otro mecanismo, donde se señale sobre la síntesis extraovárica y la posterior liberación del precursor de proteína vitelina (Lee *et al.*, 1996).

En la siguiente Tabla (4.2), se muestran los distintos sitios propuestos para la síntesis de la VTG y VTL en diferentes especies de crustáceos.

**Tabla 4.2.- Síntesis de la VTL y VTG, en diferentes especies de crustáceos**

ESPECIE	ORIGEN	SÍNTESIS DE VTL	SÍNTESIS DE VTG	AUTOR	AÑO
<i>Penaeus mondon</i>	Ovario	*		Chen y Chen	1994
<i>Penaeus semisulcatus</i>	Ovario		*	Fainzilber <i>et al.</i>	1992
<i>Penaeus mondon</i>	Ovario	*		Quinitio <i>et al.</i>	1990
<i>Penaeus japonicus</i>	Ovario		*	Yano y Chinzei	1987
<i>Pandalus kessleri</i>	Ovario Hepatopáncreas	*		Quinitio <i>et al.</i>	1989
<i>Callinectes sapidus</i>	Ovario pedúnculo ocular	*		Lee y Watson	1994
<i>Callinectes sapidus</i>	Ovario	*		Lee y Watson	1995
<i>Callinectes sapidus</i>	Ovario	*		Lee <i>et al.</i>	1996
<i>Garcinus maenas</i> y <i>Libinia emarginata</i>	Ovario hepatopáncreas.		*	Paulus y Laufer.	1987
<i>Armadillidium vulgare</i>	Ovario cuerpo graso		*	Susuki <i>et al.</i>	1989
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Extraovárico.	*		Tom <i>et al.</i>	1987 <i>b</i>
<i>Palaemon poudens</i>	Ovario	*		Tsumura y Nakagawa.	1989

#### **4.2.5.- Factores que influyen en la vitelogénesis de crustáceos**

El desarrollo de la vitelogénesis secundaria en crustáceos decápodos se produce gracias a la integración de diversos factores externos (temperatura, fotoperíodo, salinidad y otros) y factores internos, esta integración se realiza por medio de los órganos de los sentidos, principalmente de los ojos, y por medio de un complejo neurohormonal presente en el pedúnculo ocular (Charniaux-Cotton, 1985).

##### **4.2.5.1.- Factores externos (ambientales)**

Existe una variedad de factores que repercuten en el control de la reproducción (maduración ovárica) de los camarones peneidos, tal es caso de la temperatura,

salinidad, fotoperíodo, sustrato, dieta, fase lunar, ablación peduncular y tratamiento con hormonas exógenas incorporadas a través de inyecciones o de sus dietas (Chamberlain y Gervais, 1984; Woo-Khoo, 1988). Por otra parte, Adiyodi y Subramoniam (1983, 1985), mencionan que los factores involucrados en la vitelogénesis de crustáceos, no solo son físico-químicos y hormonales, sino también genéticos.

Aiken y Waddy (1980), señalan que la temperatura y fotoperíodo son factores que regulan la vitelogénesis secundaria en la langosta *Homarus*. En condiciones de oscuridad constante se puede inducir la maduración del ovario en *Orconectes virilis* sin reabsorción (Aiken, 1969). En *Pachygrapsus marmoratus*, el incremento del fotoperíodo (de 0-20 horas) indujo un ciclo de maduración más rápido y reabsorción de ovocitos en hembras maduras e inmaduras y el descenso de fotoperíodo estabilizó la condición madura del ovario (Perryman, 1969).

En la langosta espinosa *Panulirus argus* existió una interacción significativa entre el fotoperíodo y la temperatura sobre la maduración de las hembras, donde fotoperíodos mayores y temperaturas más altas tienen un efecto sobre la maduración y desove (Lipcius y Herrnkind, 1987).

Fauvel (1986), señala que la nutrición de los crustáceos tiene un papel importante sobre la vitelogénesis secundaria, influyendo en el metabolismo de hormonas y la calidad de vitelo. Además, menciona que la temperatura y la luz son otros factores importantes en estos eventos fisiológicos. En el caso del camarón *Penaeus japonicus*, la temperatura óptima es de 26 a 32<sup>o</sup> C y es posible que con un incremento de luz asociado a incrementos progresivos de temperatura, se propicie la maduración y desove en hembras ablacionadas de esta especie. Para el camarón *Penaeus vannamei*, la maduración y desove puede ser frenadas por un ligero decremento de la temperatura.

Las hembras del acocil *Orconectes limasus* expuestas a condiciones de temperatura de 10 a 12<sup>o</sup> C y oscuridad, aceleró la maduración ovárica (Dube y Portelance, 1992). En otra especie de acocil (*Procambarus clarkii*), Daniels et al. (1994), determinaron que los valores máximos del Índice Gonadosomático fueron a un fotoperíodo de 10horas-luz:14 horas-oscuridad y a una temperatura de 27<sup>o</sup> C.

Quackenbush (1994), encontró una interacción del fotoperíodo y temperatura, los cuáles regulan el proceso de biosíntesis de vitelo en hembras de la langosta americana (*Homarus americanus*).

#### **4.2.5.2.- Factores internos**

##### **4.2.5.2.1.- Control Endocrino de la Muda y la Reproducción**

Los eventos de muda y reproducción en crustáceos decápodos y su respectivo control hormonal, están estrechamente relacionados (Aiken y Waddy, 1980). Estos sistemas de control residen en gran parte en complejos neurosecretores presentes en el sistema nervioso central (Nelson, no publicado). Este sistema neuroendócrino en crustáceos consiste de glándulas endocrinas propiamente y estructuras neuroendocrinas (las células neurosecretoras y órganos neurohemales) (Fingerman, 1987). La mayor parte del conocimiento de la influencia o mecanismos de control endocrino en crustáceos derivan de estudios hechos en malacostrácos (Adiyody, 1985; Fingerman, 1987).

Las estructuras endocrinas en crustáceos se pueden clasificar en los siguientes tipos:

- a) Complejo Organo X-Glandúla del Sinus**
- b) Organo Postcomisural**
- c) Organo Pericardio**
- d) Organo Y**
- e) Glandúla Andrógena**
- f) Ovario**
- g) Organos Mandibulares**

##### **a) Complejo Organo X-Glandúla del Sinus**

Este complejo es el más importante centro de control neuroendocrino de los crustáceos, sin embargo, en los crustáceos entomostrácos este complejo está ausente. Este glándula fue por primera vez descrita por Hanstrom (1933), y se localiza en el pedúnculo ocular y presenta una extensión fuera del cuerpo propio del pedúnculo, que consta de la lamina ganglionaris, medulla externa, medulla interna y medulla terminalis.



Es un hecho que la glándula del seno no produce las hormonas que contiene, debido a que es un *órgano neurohemal* que almacena y libera estas neurohormonas. Esta glándula está constituida por axones terminales y la mayoría de estos pertenecen o provienen de los cuerpos celulares que descansan en una porción de la *Medulla Terminalis* conocida como *órgano X*, que es el centro productor de hormonas (Fingerman, 1987; Woo-Khoo, 1988). Esta glándula afecta el proceso de reproducción al liberar a la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH), que inhibe tanto el proceso de la captación de la VTG como su síntesis (Charniaux-Cotton, 1985).

#### **b) Órgano Postcomisural y c) Órgano Pericardio**

Hay órganos neurohormonales adicionales, el *órgano Postcomisural* (PCO) y el *órgano Pericardio* (PO). El PCO es una conjunción de axones terminales de nervios, su papel es almacenar y liberar hormonas que controlan la coloración (Fingerman, 1987).

#### **d) Órgano Y**

Es una glándula epitelial no neural, esta fue descrita para 58 especies de malacostrácos. Se localiza en el segmento máxilar del cuerpo y es sitio de producción de la hormona de la muda. Al parecer las células del *órgano Y* absorbe colesterol de la hemolinfa y convierten este en la hormona de la muda a medida que sea necesario (Fingerman, 1987).

#### **e) Glandúla Andrógena**

Esta glándula está presente solo en los machos y al parecer es exclusiva de los malacostrácos, su posición es subterminal en la región eyaculatoria del vaso deferente. Su función es la de secretar una hormona (6-Hidroxi-Farnesi-Cetona) que interviene en la diferenciación y funcionamiento del sistema reproductor de machos (Fingerman, 1987).

#### **f) Ovario**

El ovario de isópodos y anfípodos es el sitio de producción de una o más hormonas que controlan la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios, esto

similarmente se presenta en los decápodos (Fingerman, 1987). Por otra parte, durante la durante la foliculogénesis secundaria, se ha postulado que las células foliculares pueden ser endocrinas, secretando la hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis (VSOH) (Charniaux-Cotton, 1985).

#### **g) Organos Mandibulares**

Es un enigma, el posible origen endocrino de los órganos mandibulares, se presentan cerca del Organo Y, y ha sido incluso mal identificado y confundido con este. Su papel esta relacionado con la muda y/o reproducción, ya que sus células cambian en apariencia a nivel de ultraestructura durante la vitelogénesis y en algunas especies también durante el ciclo de muda (Aoto *et al.*, 1974; Taketomi y Kawano, 1985). Hasta hace poco se descubrió en cinco especies de decápodos, como en *Libinia emarginata*, la producción de Metil Farnesoato, que se puede convertir en hormona juvenil (J-III y Acido Farnesoico) (hormona bien definida en insectos); este compuesto es altamente lipofílico, y al parecer su papel endocrino, esta vinculado con aspectos de reproducción y su concentración es seis veces más alta en hembras vitelogénicas que en hembras no vitelogénicas y juveniles (Borst *et al.*, 1985; Laufer *et al.*, 1987; Woo-Khoo, 1988). En langostas ablacionadas, los niveles de esta hormona se incrementa hasta 30 ng/ml (Tsukimura y Borst, 1992).

#### **4.2.5.2.2.- Hormonas involucradas en el proceso de la Muda**

El aislamiento y características de las hormonas peptídicas del pedúnculo ocular, que regulan la muda y el desarrollo gonadal, han sido ampliamente estudiadas para algunos decápodos (Adiyodi, 1985; Fingerman, 1987).

El termino de muda es usado para referirse al proceso entero del ciclo de muda. Al ocurrir la exuviación hay un notorio incremento en talla debido a la absorción de agua y la formación y endurecimiento del nuevo exoesqueleto, este termino de muda es sinónimo con el de ecdisis (Fingerman, 1987). El ciclo total de muda se divide en cinco principales estados, con algunos subestados que fue propuesto originalmente por Drach (1939) y ha sufrido diversas modificaciones entre los diferentes grupos de decápodos.

Estos estados son reconocidos por letras (A-E); el estado A empieza después de la propia ecdisis, en este ya existe la nueva epicutícula y la exocutícula. El estado B, empieza pocos días después, durante este empieza la síntesis de la endocutícula que continúa hasta C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>; con la formación de la capa membranosa se considera el subestado C<sub>3</sub>; para que posteriormente el animal pase a la anaecdisis (C<sub>4</sub>). La duración de la anaecdisis es tan largo como un año. En la proecdisis (D<sub>0</sub>-D<sub>4</sub>), la vieja cutícula empieza a ser degradada hasta en un 75%, además el calcio y pigmentos como astaxantinas son almacenados en los gastrolitos y en la hemolinfa, respectivamente. La nueva epicutícula y exocutícula son sintetizadas y la exuviación ocurre en el estado E (Skinner, 1985).

Los factores hormonales que controlan el ciclo de muda, corresponden a la hormona de la Muda ( $\beta$ -Ecdisona) y la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH), esta última es producida en el complejo Organo X-Glandúla del Seno (Skinner, 1985; Fingerman, 1987). La MIH es un neuropeptido y los esfuerzos por purificarla, la han realizado Quackenbush (1985) y Chang (1985), El peso molecular estimado para la MIH esta entre los 1,000 y 5,000 Daltons (Freeman y Bartell, 1976).

La acción de la MIH fue originalmente considerada como un factor en la inhibición de la  $\beta$ -ECD producida por el Organo Y, sin embargo, hay evidencias que actúa antagónicamente con la  $\beta$ -ECD, en células periféricas (epidermales), por lo que regulan la respuesta de la  $\beta$ -ECD (Fingerman, 1987). La liberación de la MIH esta regulada por un neurotransmisor, 5-Hidroxitriptamina (5-HT).

Las hormonas de la muda son ecdisteroides, que son sintetizados a partir del colesterol en el **Organo Y** y posteriormente liberadas a la hemolinfa. El Organo Y produce una alfa-ecdisona (Ecdisona, esteroide Polihidroxilada), la cuál es convertida periféricamente (en otros tejidos) a 20-Hidroxiecdisona (Beta Ecdisona, Ecdisterona) (Skinner, 1985; Fingerman, 1987). Evidencias de que el Organo Y es el lugar de producción de la ecdisona y el papel de la 20-OH-ecdisona en el control de la muda se han acumulado por diversos estudios, estos han incluido, la estimulación de la muda precoz por tratamientos de animales anacecdisiales con ecdisteroides, medición del incremento de los títulos de los ecdisteroides en la hemolinfa en animales proecdisiales,

secreción de la ecdisona por el Organo Y *in vitro* (Chang y O'Connor, 1977; Skinner, 1985).

La cantidad de ecdisteroides circulantes parece ser variable entre los crustáceos, por ejemplo, los cangrejos liberan mucho menos ecdisterona que las langostas homáridas, estas diferencias pueden ser debidas a las técnicas de medición o la diferencia entre las especies. Se han encontrado ecdisteroides en otros tejidos, además del Organo Y, pero su funcionamiento es desconocido (Hopkins, 1983; Chang, 1984, 1985 en Quackenbush, 1986).

Los ecdisteroides de algunos insectos controlan la vitelogénesis, lo anterior supone que estos compuestos regulan algunos aspectos de la reproducción de crustáceos, ya que han sido encontradas en gónadas de algunas especies (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

Hay registros que en adición de la MIH y la  $\beta$ -ECD, hay otra hormona involucrada en el proceso de muda, denominada hormona aceleradora de la muda (MAH), que posiblemente sea producida en el pedúnculo ocular, cerebro o ganglio torácico (Nelson, no publicado) y posiblemente estimula la producción de ecdisteroides por el Organo Y.

#### **4.2.5.2.3.- Hormonas involucradas en la Reproducción**

El control endocrino de la reproducción ha sido investigado en una amplia variedad de crustáceos, particularmente los isópodos y anfípodos han recibido una considerable atención. Las neurohormonas también como las hormonas son el producto de glándulas endocrinas (Fingerman, 1987).

Adiyody y Adiyodi (1970), mencionan que seis hormonas están involucradas en aspectos de la reproducción de crustáceos decápodos, que a continuación se señalan:

- MIH** (Hormona inhibidora de la muda)
- $\beta$ -ECD** (Hormona de la muda)
- GIH** (Hormona inhibidora de la gónada)
- GSH** (Hormona estimuladora de la gónada)
- AH** (Hormona andrógena)
- FH** (Hormona de la hembra?)

Posteriormente, Junera *et al.* (1977), incluyo en esta lista a la **VSOH** (Hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis).

#### **$\beta$ -ECD** (Hormona de la muda)

En anfípodos e isópodos, los ecdisteroides parecen tener un papel reproductivo, en adición a la muda, evento necesario para la síntesis de vitelogenina (Meusy *et al.*, 1977; Blanchet-Tournier, 1982). En anfípodos, bajos títulos de 20-OHecdisona es requerida para la vitelogénesis (Charniaux-Cotton, 1985). Por otra parte, en *Orchestia gammarella* las inyecciones exógenas de ecdisteroides acortan o prolongan el ciclo de muda, cuando la vitelogénesis esta ocurriendo y altos títulos de ECD en la premuda tardía evitan la foliculogénesis secundaria y la síntesis de la VTG por el cuerpo graso (Nelson, no publicado).

#### **GIH** (Hormona inhibidora de la gónada)

Es una neurohormona que se origina en el complejo Organo X-Glandúla del Sinus, es un neuropéptido con pesos moleculares de 2,000 (Bomirski *et al.*, 1981), 5,000 (Quackenbush y Herrnkind, 1983) y 7,000 Daltons (Fauvel, 1986), y pertenece a la familia de los neuropeptidos que incluye a la MIH y dos isoformas de las hormona hiperglicémica y la CCH (Aguilar *et al.*, 1992).

La GIH esta involucrada en el descanso genital, porque inhibe la vitelogénesis secundaria (Charniaux-Cotton, 1978, 1980) y previene la toma de vitelogenina por los ovocitos a través de una competencia de "enlace" con los receptores de membrana, los cuáles reconocen y capturan las moléculas antes de la internalización (toma activa) (Jugan y Soyez, 1985). La liberación de la VSOH puede ser controlada por la GIH (Fauvel, 1986).

La GIH y la GSH ocurren en ambos sexos, y la primera esta presente tanto en hembras inmaduras como maduras. Algunos estudios sobre la identificación y caracterización de esta hormona fueron realizados por Bomirski *et al.*, (1981), Charniaux-Cotton (1985) y Aguilar *et al.*, (1992).

#### **GSH** (Hormona estimuladora de la gónada)

La GSH es una neurohormona producida en el protocerebro y ganglio torácico (Fauvel, 1986; Fingerman, 1987). La acción de la GSH podría ser doble: 1).- estimulación directa al ovario y 2).- la inhibición de la GIH (Adiyodi, 1985); además, suprime la entrada del animal a la premuda (Aiken y Waddy, 1980). La cantidad de esta hormona esta relacionada con el estado reproductivo, siendo mayor su concentración en fases reproductivas.

#### **VSOH (Hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis)**

Los estudios con el anfipodo *Orchestia gammarella* realizados por Junera *et al*, (1977), concluyen que el ovario produce un factor que estimula la síntesis de vitelogenina. El tejido folicular secundario del ovario, se le atribuye la función endocrina y secretora de la VSOH (Charniaux-Cotton, 1985). La síntesis de VSOH es suprimida por la GIH y promovida por la GSH, sin embargo, esto es especulativo (Aiken y Waddy, 1980).

#### **4.2.5.2.4.- Control Hormonal**

La vitelogénesis secundaria se encuentra bajo el control de factores externos (temperatura, luz, salinidad, pH, etc.), que son integrados por el sistema nervioso central y que a su vez regulan la maduración por medio de un balance hormonal (Figura 4.1). Este equilibrio se debe, por una parte a dos hormonas que favorecen la síntesis de la VTG: una de origen nervioso, la VSH (*Vitellogenesis Stimulating Hormone*) y otra que proviene de los ovarios, sintetizada por las células foliculares, la VSOH (*Vitellogenesis Stimulating Ovarian Hormone*) que actuaría de la misma manera que los estrógenos en los vertebrados para estimular la síntesis de la VTG.

Por otra parte, una regulación negativa es ejercida por medio de una hormona de origen peduncular, inhibidora de la vitelogénesis secundaria, la VIH (*Vitellogenesis Inhibiting Hormone*). Por último, una serie de hormonas esteroídicas, sesquiterpenoides, (metil fernezoato, ácido fernezoico, hormona juvenil) y de péptidos

(-Moulting Inhibiting Hormone-MIH) parecen participar en los procesos de inducción, de inhibición, y de mantenimiento de la vitelogénesis (Mendoza, 1992).

La muda es inducida solo cuando los niveles de MIH y VSH son bajos en la hemolinfa y altos en MH (-Moulting Hormone-) que actúa directamente desde el órgano-Y, situado cerca de las mandíbulas y VIH. Esto se explica por que la MIH, de origen peduncular, la cual inhibe a la MH mientras que la VIH suprime la acción de la VSH. Esta interacción hormonal adquiere mayor importancia en la reproducción debido al antagonismo existente entre el crecimiento somático (en el cual depende de la muda) y la vitelogénesis.

En el caso particular de la VIH, esta hormona ha sido caracterizada como un neuropéptido sintetizado por el órgano X- glándula del sinus (Fainzilber *et al.*, 1992). Dicha hormona es la responsable del reposo genital, ya que inhibe la vitelogénesis secundaria (Charniaux-Cotton, 1978), previendo la captación de vitelogenina por los ovocitos a través de una competencia de "enlace" con los receptores de membrana, los cuales reconocen y capturan las moléculas de VIH antes de la internalización (toma activa) de la VTG (Jugan y Soyez, 1985). Se ha postulado que esto es debido a que la VIH tiene mayor afinidad que la VTG misma por los receptores de esta última y posiblemente intervenga igualmente, impidiendo la acción de las hormonas estimuladoras de la vitelogénesis (VSH, VSOH), (Meusy, 1980; Fauvel, 1986). Finalmente, se ha demostrado la inhibición *in vitro* de la síntesis de proteínas precipitables por anticuerpos contra una subunidad de VTL y VTG (Lee y Watson, 1994).

En lo que concierne a la VSH, se trata de una neurohormona producida en el protocerebro y ganglio torácico (Fauvel, 1986; Fingerman, 1987), cuya acción podría ser doble: 1).- estimulando directamente al ovario y 2).- contrarrestando la acción de la VIH (Adiyodi, 1985). Adicionalmente, puede intervenir suprimiendo la entrada del animal a la premuda (Aiken y Waddy, 1980). La cantidad de esta hormona está relacionada con el estado reproductivo, siendo mayor su concentración en las fases

avanzadas de la vitelogénesis. Por otra parte la VSH, se estimularía a la VSOH, siendo esta de origen ovárico, la cual propiciaría directamente la síntesis de la VTG (Aiken y Waddy, 1980).



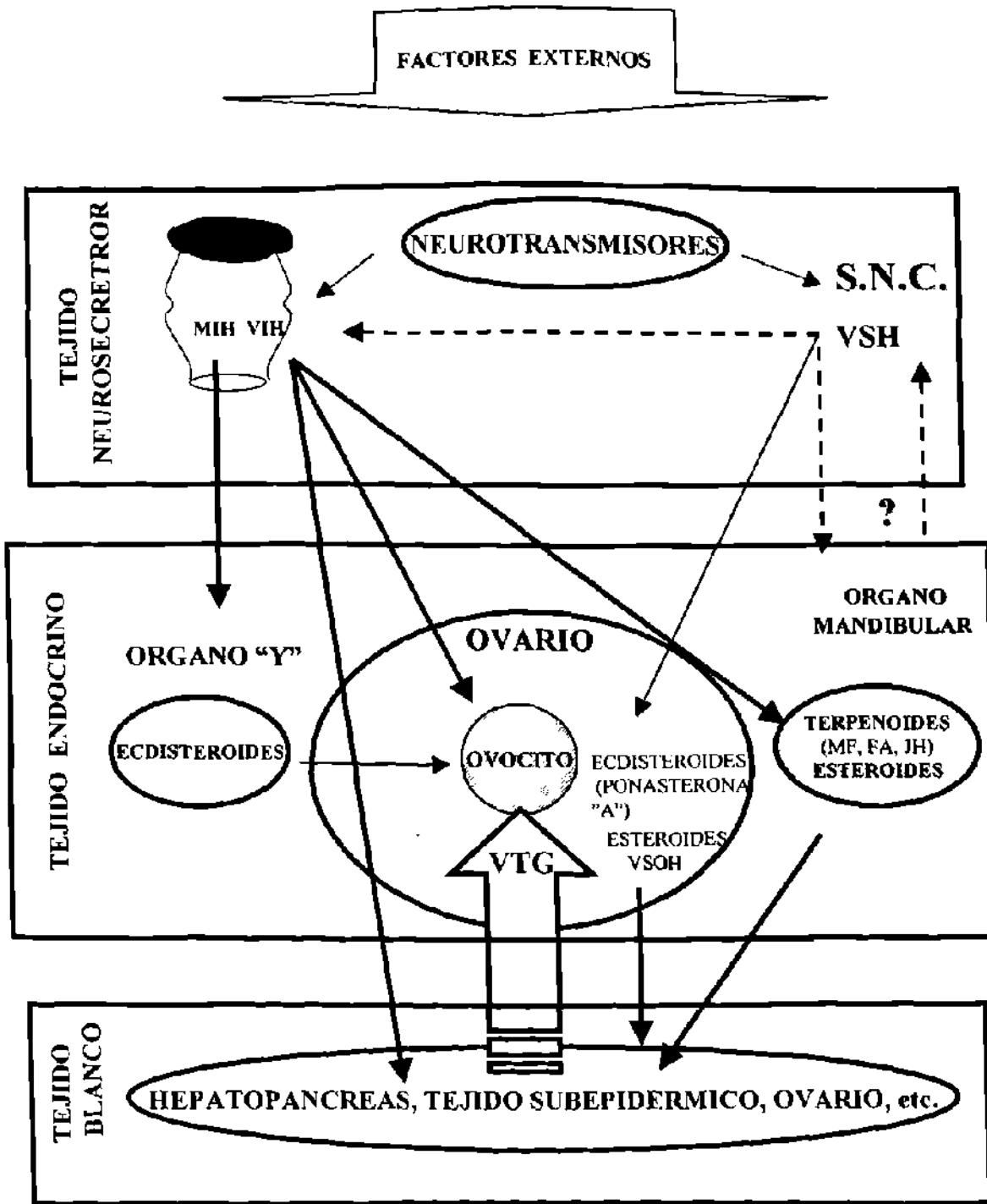


Figura 4.1. Diagrama esquemático del control hormonal (Tomado de Mendoza, 1992).

#### **4.2.5.3.- Ablación Pedúncular**

Existen varios métodos para inducir la maduración ovocitaria y desove en camarones, que podrían también ser referidos para otros decápodos, como es la manipulación ambiental, nutrición, tratamiento con hormonas exógenas a través de inyecciones o inclusiones en la dieta y la ablación pedúncular (Woo-Khoo, 1988). Todas estas técnicas relacionadas a la producción tecnológica de crustáceos.

Es ampliamente conocido que la ablación pedúncular en crustáceos decápodos, elimina parte del sistema neuroendocrino que produce las neurohormonas como la MIH y VIH, esta técnica favorece el proceso de muda, la biosíntesis del vitelo, en casi todas las especies de crustáceos (Quackenbush, 1986) y la maduración ovárica (Koo-Whoo, 1988).

El efecto de la ablación pedúncular es dependiente de la especie y estado de muda. Así, cuando la extirpación del pedúnculo ocular se realiza durante la etapa de premuda inicia súbitamente el proceso de muda, de aquí que, la ablación solo sea efectiva después de la exuviación, pero es preferible que se realice durante la etapa de intermuda. Los efectos no solo se reflejan en la muda, crecimiento y reproducción, sino además en la tasa cardíaca, metabolismo de proteínas y azúcares, balance del agua y pigmentación (Aiken y Waddy, 1980).

En especies de decápodos como *Cangron crangon*, *Rhithropanopeus harnisii*, *Penaeus monodon* y *Panulirus argus*, se ha observado el efecto de la ablación pedúncular sobre la maduración gonadal (Bomirski y Klek, 1974; Quackenbush y Herrkind, 1981; Tan-Fermin, 1991).

#### **4.2.6.- Técnicas y métodos utilizados en el estudio de la vitelogénesis**

##### **4.2.6.1.- Caracterización y Purificación**

La frecuente utilización de diversas técnicas de cromatografía y electroforesis se ha llevado acabo para aislar y separar moléculas, medir su peso molecular, distinguir diferentes aspectos de su estructura y evaluar la pureza de los compuestos aislados. Así, en estudios recientes se ha purificado y caracterizado la VTL en ovarios maduros

de distintos crustáceos, utilizando diversas técnicas bioquímicas como la filtración en gel, intercambio de iones, electroforesis en gel de poliacrilamida, agarosa e Inmunolectroforesis. Se han obtenido como resultado moléculas nativas y subunidades de polipéptidos de alto peso molecular variando según la especie (c.f. Figura 4.1). Un patrón común dentro de estas investigaciones es que la purificación de la VTL y VTG se ha basado en la de sus constituyentes principales: lípidos, carbohidratos y carotenoides, como se mencionó anteriormente.

#### **4.2.6.2.-Cromatografía**

La separación por cromatografía se basa en las fuerzas competitivas de dos fases, una fija o estacionaria que consta de diminutas partículas esféricas de gel que funcionan como cribas moleculares; y otra continuamente renovada o móvil, que se establece por las moléculas de un soluto. El fundamento para la filtración en gel se basa en la mayor o menor posibilidad de penetrar las moléculas en los poros de las partículas de relleno. Según su tamaño, se introducirán en los poros; cuanto menores sean, más profundamente entrarán y más tardarán en ser eluidas de la columna, permitiendo así la separación de moléculas en función de su masa molecular.

#### **4.2.6.3.- Electroforesis**

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es un método analítico, de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través del gel de corrida, siendo una poderosa herramienta para efectuar separaciones, aislamientos, evaluaciones de pureza y cuantificaciones del peso molecular. Las ventajas de la PAGE son su facilidad y rapidez de operación, la alta precisión de sus detecciones, el hecho de que no se dañen sustancias tan delicadas como las proteínas y los ácidos nucleicos, y sobre todo el hecho de que se logre separar los componentes individuales de mezclas complejas.

#### **4.2.6.4.- Ultracentrifugación**

La ultracentrifugación permite el aislamiento y la caracterización de las proteínas. La aplicación de la fuerza centrífuga a las moléculas en solución les permite

una velocidad de sedimentación que permite separar las proteínas dependiendo de su tamaño, masa y densidad relativa al solvente.

**Tabla 4.3.- Técnicas empleadas para la purificación y caracterización de la VTL y la VTG en diferentes especies de crustáceos.**

ESPECIE	TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	RESULTADO	AUTOR	AÑO
<i>Penaeus mondon</i>	Cromatografía Inmunolectroforesis	Extracción y Caracterización de la vitelina.	Quinitio <i>et al.</i>	1990
<i>Penaeus mondon</i>	Cromatografía PAGE Inmunolectroforesis.	Purificación y extracción de vitelina	Chang <i>et al.</i> ,	1993 a
<i>Penaeus chinensis</i>	PAGE, Electroelucion.	Purificación	Chang y Jeng	1995
<i>Penaeus chinensis</i>	Cromatografía (SDS)-PAGE	Purificación y Caracterización de la vitelina.	Chang <i>et al.</i> ,	1996
<i>Penaeus mondon</i>	PAGE Inmunolectroforesis	Extracción y Caracterización de vitelina.	Chen y Chen	1993
<i>Penaeus vannamei</i>	Ultracentrifugación Filtración en gel Cromatografía de intercambio iónico	Purificación y Determinación de la VTG y VTL.	Mendoza <i>et al.</i> ,	1993
<i>Penaeus japonicus</i>	Electroforesis (SDS)- PAGE.	2 Polipeptidos de la vitelogenina.	Yano y Chinzei	1987
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Cromatografía (intercambio iónico) Electroforesis discontinua Inmunolectroforesis	Purificación y Caracterización de vitelina.	Tom <i>et al.</i> ,	1987 a
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Cromatografía (DEAE- Sephacel) PAGE Inmunolectroforesis Inmunofluorescencia	Material inmunológicamente similar a la vitelina del tejido adiposo, subepidermal, hemolinfa y en glóbulos del vitelo de los ovocitos.	Tom <i>et al.</i> ,	1987 b
<i>Armandillidium vulgare</i>	PAGE Inmunolectroforesis	4 formas de VTL y 4 formas de VTG	Suzuki	1987
<i>Pandalus kesleri</i>	Cromatografía Inmunolectroforesis	Identificación y Caracterización de la vitelina	Quinitio <i>et al.</i> ,	1989
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Filtración en gel (DEAE- Sephacel) HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) PAGE	Purificación y Caracterización en tres vitelinas	Chang <i>et al.</i> ,	1993 b
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Cromatografía (columna, DEAE, hidroxylapatite), SDS-PAGE, ELISA,	Purificación y Caracterización de vitelina.	Lee y Chang	1997

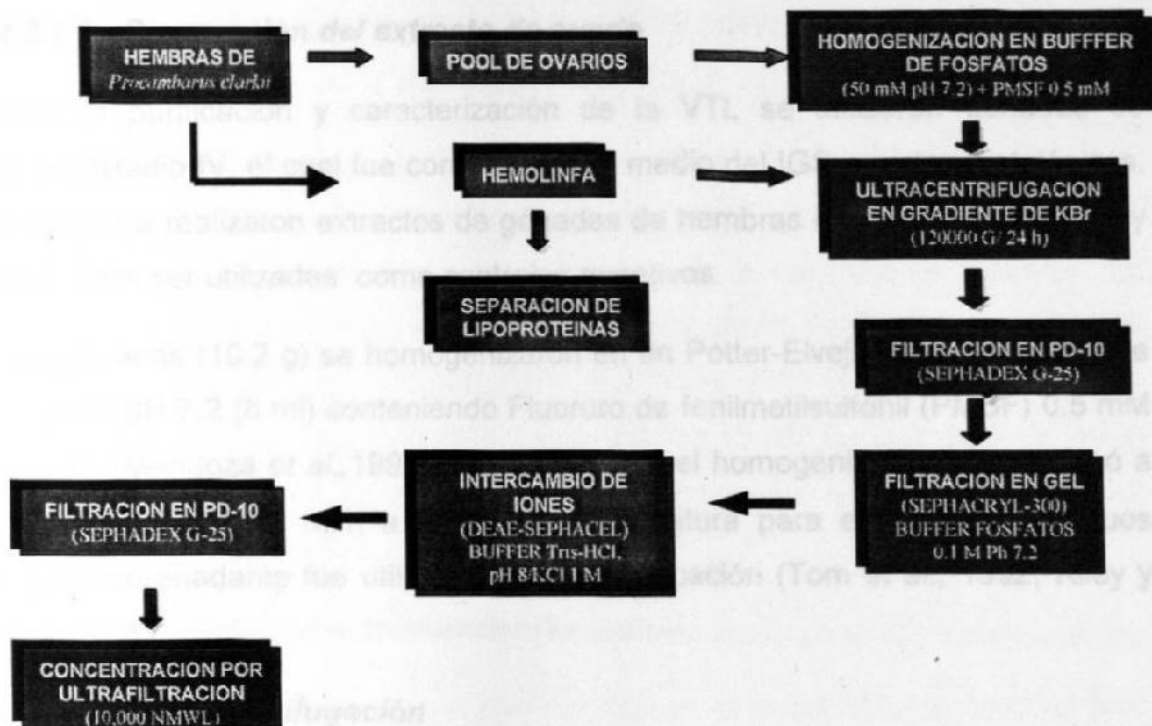
	Western-blotting.			
<i>Callinectes sapidus</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida	Cuatro subunidades de vitelina	Lee y Watson	1995
<i>Potamon potamios</i>	Cromatografía, SDS-PAGE, Western blotting	Identificación, Determinación y Purificación de Vn y Vg	Pateraki y Stratakis.	1997
<i>Periplaneta americana</i>	Cromatografía de intercambio de iones PAGE, Filtración en gel (DEAE-Sephadex y Sepharose)	Purificación y Caracterización de la vitelina	Kim y Lee	1994

### 4.3.- METODOLOGIA

#### 4.3.1.- Caracterización y Purificación de la VTG y VTL

En la siguiente figura (4.2) se presenta el diseño experimental utilizado para la caracterización y purificación de VTL y VTG.

## PURIFICACION DE LA VTG Y DE VTL



#### 4.2.- Diagrama de flujo para la purificación de VTG y VTL

#### **4.3.1.1.-Obtención de hemolinfa**

Para la extracción de la hemolinfa se utilizó una jeringa de 1 ml., previamente enjuagada con oxalato de potasio al 5%, para evitar la coagulación de la misma. Las punciones se realizaron en la cara ventral del primer segmento abdominal. Las muestras se centrifugaron a 15,000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C, separando el plasma de las células sanguíneas. Todas las muestras fueron mantenidas en congelación a -20°C, para ser utilizadas en la purificación y caracterización de la VTG.

#### **4.3.1.2.- Preparación del extracto de ovario**

Para la purificación y caracterización de la VTL se utilizaron gónadas de hembras en estadio IV, el cual fue confirmado por medio del IGS y cortes histológicos. Por otra parte, se realizaron extractos de gónadas de hembras impúberes (estadio I) y de machos, para ser utilizadas como controles negativos.

Las gónadas (10.2 g) se homogenizaron en un Potter-Elvehjem con un buffer de fosfatos 50mM pH 7.2 (8 ml) conteniendo Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.5 mM (5 µl.) a 4°C. (Mendoza *et al.*, 1993). Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 15 min. a la misma temperatura para eliminar los residuos sólidos, y el sobrenadante fue utilizado para la purificación (Tom *et al.*, 1992; Riley y Tsukimura, 1998).

#### **4.3.1.3.- Ultracentrifugación**

Se ultracentrifugaron los extractos de ovario a 120,000 g durante 24 h a 4°C, en un gradiente de densidad a base de Bromuro de Potasio (KBr  $\rho=1.33\text{g/ml}$ ) (Mendoza *et al.*, 1993; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995).

#### **d) Precipitación**

Tanto la hemolinfa como los extractos de ovario (5 ml) se precipitaron con una solución de EDTA 20mM, pH 7.7 (20 ml). Posteriormente, se adicionó MgCl<sub>2</sub> 0.5M (1.6 ml), y se mezclaron por inversión. El precipitado resultante se centrifugó a 2,500 g durante 15 min. El sobrenadante fue desechado, y el pellet fue rediseuelto con un buffer TRIS-Cl 50mM, NaCl 1M pH 7.5 (3 ml) (Wiley *et al.*, 1979).

Igualmente se probó un protocolo alternativo consistente en disolver la hemolinfa y los extractos de ovario en un buffer TRIS-Cl 50mM, NaCl 1M pH 7.5 (3 ml), con Fluoruro de fenimetilsulfonil (PMSF) 3 mM. Posteriormente se precipitó por la adición de una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . (De Vlaming *et al.*, 1980).

#### **4.3.1.4.- Filtración en gel**

Para la filtración en gel e intercambio de iones se utilizó un cromatógrafo modelo Gradi Frac (PHARMACIA BIOTECH). Las muestras fueron inyectadas en una columna (XK/26) de 51 cm de altura con 270 ml. de SEPHACRYL-300 HR (PHARMACIA BIOTECH), a un flujo de 1 ml./min. (Mendoza *et al.*, 1993)

La columna se empacó con buffer de fosfato 0.1M pH 7.2, iniciando con un flujo de 4 ml/min durante 2 h, para posteriormente incrementarlo a 6 ml/min. durante 1h. El eluente se monitoreó a 280 nm. Para la calibración de la columna se utilizaron las siguientes moléculas de referencia: anhidrasa carbónica (29,000 Da), albúmina (66,000 Da), alcohol deshidrogenasa (150,000 Da),  $\beta$ -amilasa (200,000 Da), apoferritina (443,000 Da), tiroglobulina (669,000 Da) y azul dextran (2,000,00 Da) (MW-GF-1000 KIT, SIGMA). Las fracciones de extracto de ovario obtenidas fueron incubadas con Negro Sudan y se registró la absorbancia a 466nm.

#### **4.3.1.5.- Cromatografía de Intercambio Ionico**

Por medio de la filtración en gel mencionada en el inciso d) se obtuvo un pico proteico, el cual fue introducido a una columna (XK/16) de 20 cm de alto con 41 ml. de DEAE-Sephacel (SIGMA), equilibrada con buffer TRIS HCl 50 mM pH 8, a un flujo de 1ml/min. (Mendoza, 1992). Para la elución de las moléculas retenidas se utilizó un gradiente lineal de 0 - 50 % de KCl.

#### **4.3.1.6.- Determinación de Lípidos**

Los lípidos presentes en el ovario y la hemolinfa se determinaron por medio de la técnica de Negro Sudan B, la cual consiste en incubar 250  $\mu\text{l}$ . de muestra, con 250  $\mu\text{l}$  de Negro Sudan en tubos eppendorf incubados a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 h en obscuridad.



Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 15 min. (Allen y Budowle, 1994).

#### **4.3.1.7.- Determinación de carotenoides**

Para determinar la longitud de onda de mayor absorbancia para los carotenoides presentes en la VTG y VTL se realizó un barrido del extracto de ovario en el espectrofotómetro (SPECTRONIC GÉNESIS 2) a longitudes de onda entre 300 y 700 nm. Posteriormente, se utilizó esta longitud de onda (466 nm), para identificar las fracciones con carotenoides obtenidas en las diferentes muestras obtenidas por cromatografía.

#### **4.3.1.8.- Determinación de Proteínas**

La concentración de proteínas presentes en el ovario y hemolinfa se determinó mediante de la técnica descrita por Bradford (1976). Las muestras se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC GÉNESIS 2). Se utilizó BSA como proteína de referencia a partir de una solución de 1 mg/ml.

#### **4.3.1.9.- Concentración de Proteína**

Después de la cromatografía de intercambio iónico la fracción fue desalada en una columna PD-10 (SEPHADEX G-25, PHARMACIA) (Mendoza, 1992). Finalmente, la proteína fue concentrada por medio de ultrafiltración en una membrana de celulosa (unidad de centrifugación por filtración) de 10,000 NMWL a 4,000 r.p.m. durante 30 min. (Figura 4.2).

#### **4.3.2- Determinación del Peso Molecular**

Para la determinación del peso molecular de la VTG y VTL, se realizó un análisis de regresión considerando el parámetro de elución  $K_{av}$ , y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar

$$X = \frac{Y - A}{B}$$

Donde X: Antilogaritmo del peso molecular

Y: Kav

A: Intercepto

B: Coeficiente de regresión

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde Vo: Volumen muerto

Ve: Volumen de elución de la molécula

Vt: Volumen total de la columna

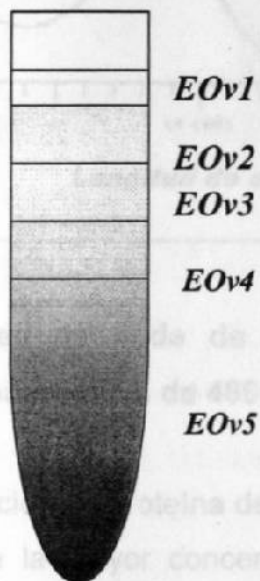
Esta determinación fue ajustada por medio de una regresión exponencial, utilizando los radios de Stokes de las moléculas, considerando que estos deben ser utilizados al tratarse de proteínas no globulares como ha sido reportado para la VTL y VTG (Mendoza, 1992).

#### **4.4.- RESULTADOS**

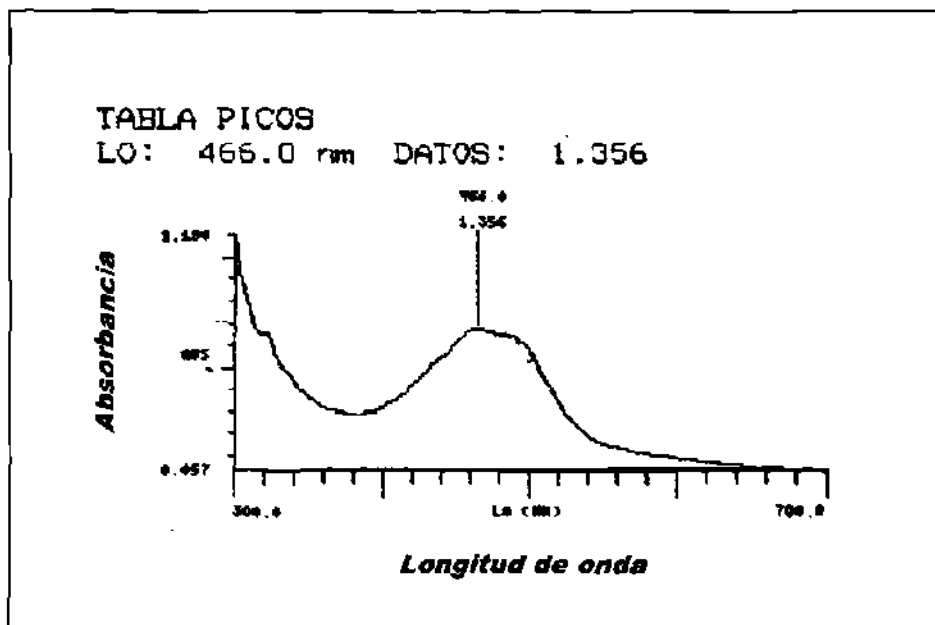
##### **4.4.1.- Caracterización y Purificación de la VTG y VTL**

###### **4.4.1.1.- Ultracentrifugación**

La ultracentrifugación de 7 ml. de extracto de ovario (Eov) permitió la obtención de 5 fases (Figura 4.3). Únicamente la fase EOv5 presentó una coloración anaranjada. Considerando la naturaleza caroteno-proteica de la VTL, se realizó un barrido en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 300 a 700 nm, obteniéndose un pico de absorbancia de 466nm para esta última fracción (Figura 4.4).



**Figura 4.3.- Representación de las fases obtenidas de la ultracentrifugación (120,000 g X 24h) de extracto ovario maduro.**



**Figura 4.4.- Barrido longitudes de onda de 300-700 nm de la fase EOv5, observándose un pico a una absorbancia de 466nm.**

Se determinó la concentración de proteína de las fases resultantes a partir de la ultracentrifugación, obteniéndose la mayor concentración (0.301 mg/ml) en la fase EOv5 (Figura 4.5).

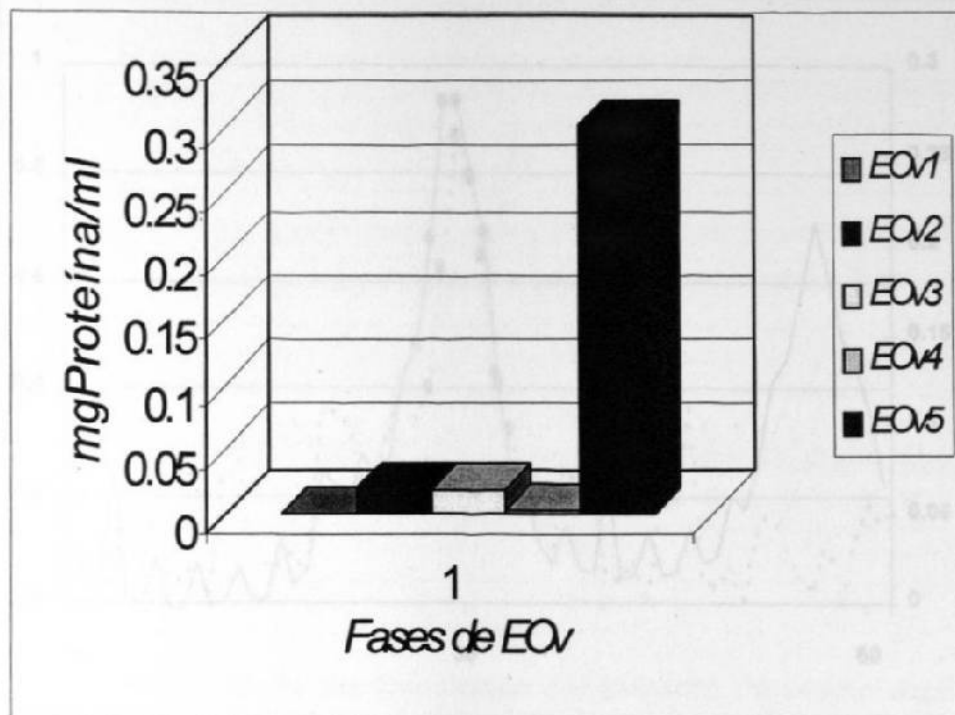


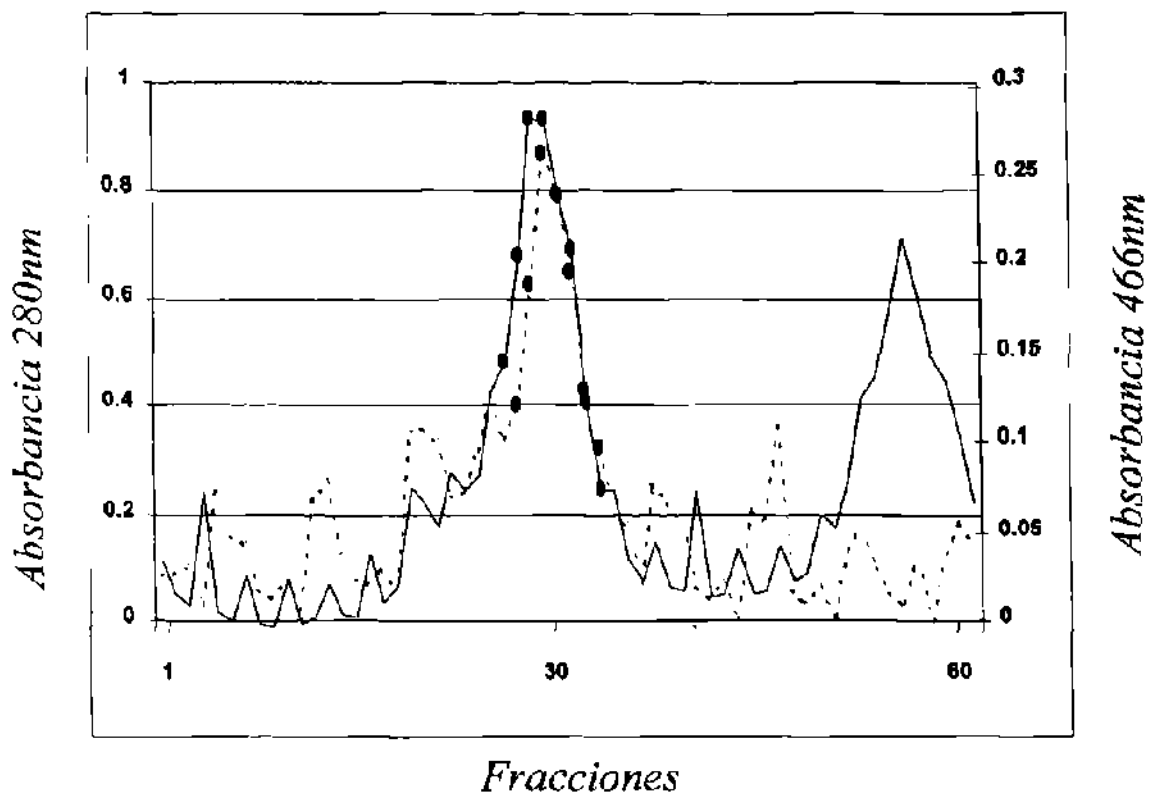
Figura 4.5.- Concentración de proteína en las fases de la centrifugación de ovario maduro.

#### 4.4.1.2- Filtración en gel

En la Figura 4.6, se muestra el cromatograma de extractos de ovario no centrifugado (EOvNc) filtrado, en la que se pueden apreciar dos picos principales de proteínas detectados a 280 nm. El primer pico proteico comprendido entre las fracciones 25 a 36 presentó valores similares a los registrados a 466 nm, indicando que la proteína obtenida estaba asociada a carotenoides.

Por otra parte, se comprobó la naturaleza lipoproteica de las fracciones 26 a 33 mediante la técnica de Negro Sudan B (Figura 4.6).

Al mismo tiempo, se pudo observar que los espectros de elución de la fracción proteica del EOv5 y de la hemolinfa de hembra madura, coincidían, sin embargo la fracción proteica correspondiente al EOv5 presentó una menor concentración (Figura 4.7).



**Figura 4.6.- Fracciones proteicas del extracto de ovario maduro a 280nm (azul) después de filtración en Sephacryl 300, absorbancia a 466nm (rojo) y reacción positiva de las fracciones con Negro Sudan (+).**

Un aspecto interesante es que estas fracciones proteicas no se encontraron en los extractos de ovario de hembras impúberes (*Eoimp.*) ni en los extractos de testículo (*Etest.*) (Figura 4.8), indicando que esta molécula únicamente se presenta en los ovarios y la hemolinfa de hembras maduras.

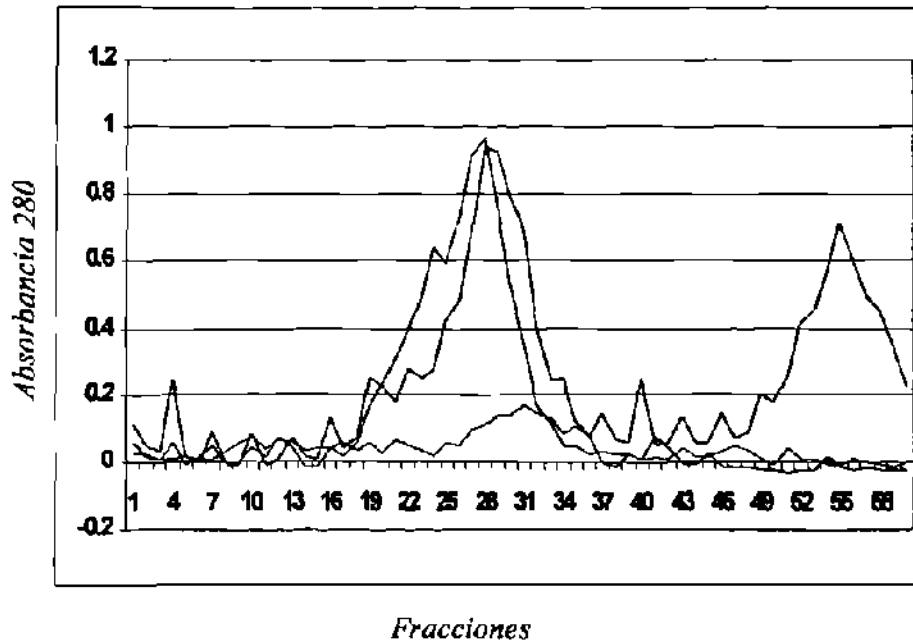


Figura 4.7.- Comparación de las fracciones del extracto de ovario maduro (azul), hemolinfa de hembra madura (rojo) y fase EOV5 (verde) en Sephacryl 300 a 280 nm.

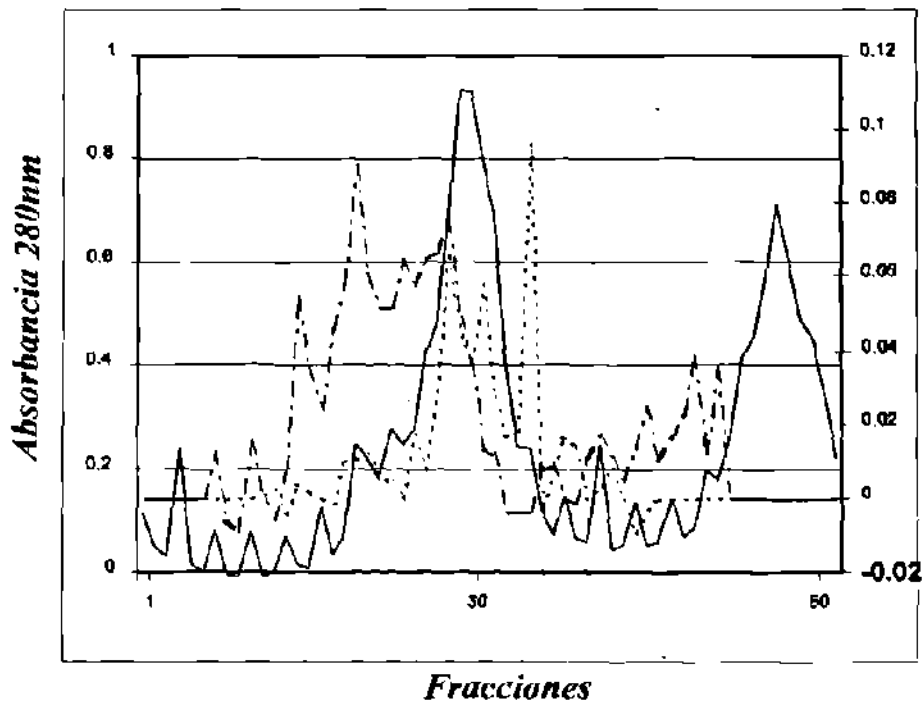


Figura 4.8.- Fracciones de extractos de ovario maduro (azul), ovario impúber (rojo) y extracto de testículo (verde) en Sephacryl 300.

#### 4.4.1.3.- Intercambio de Iones

El pool de las fracciones de ovario maduro con características lipocarotenoproteicas (EOv5) fue sometido a cromatografía de filtración de intercambio de iones utilizando un gradiente de KCl de 0-50% (Figura 4.9) lo que permitió obtener un pico simétrico a nivel de las fracciones 24-32, indicando que se trataba de la proteína mayoritaria.

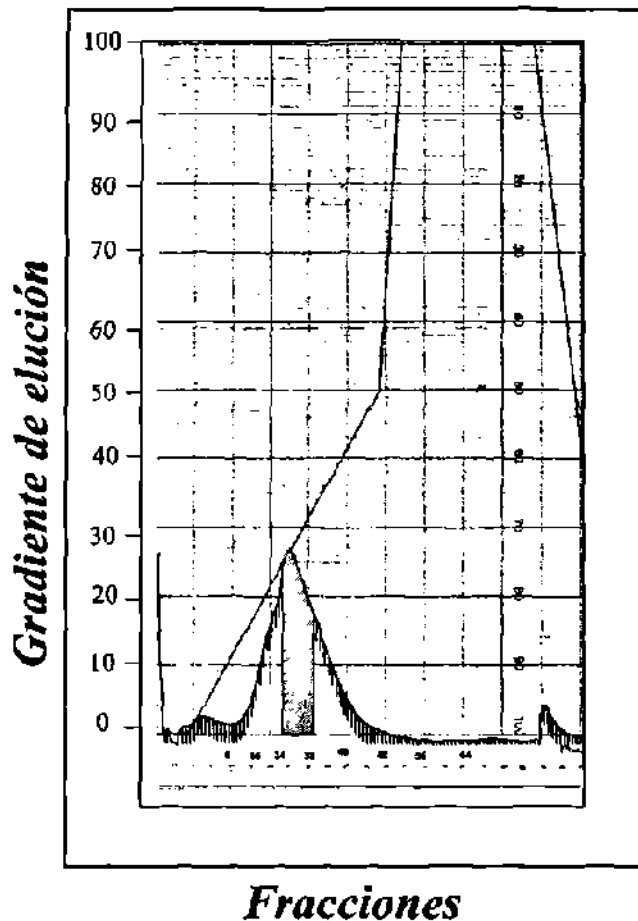


Figura 4.9.- Fracciones de pool de ovario maduro (EOv5) después de someterlos a cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) (·). Gradiente lineal de 1M en buffer TRIS-HCL a un flujo de 1 ml/min.



#### 4.4.2- Determinación del Peso Molecular

En base a la calibración de la columna y mediante el análisis de regresión lineal entre el factor de elución  $K_{av}$  y logaritmo de peso molecular, se logró determinar un peso molecular de 562,431 daltons para la VTL y de 594,259 daltons para la VTG (Figura 4.10)

Los datos necesarios para el calculo del  $K_{av}$  de las proteínas se encuentran detallados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Valores utilizados en el análisis de regresión lineal.

	MW	Log. MW	Ve	Ve-Vo	Kav
Tiro globulina	669,000	5.825	94.5	18.5	0.1076
Apoferritina	443,000	5.646	109	33	0.1919
$\beta$ -Amilasa	200,000	5.301	122	46	0.2575
OH- Deshidrogenasa	150,000	5.176	132.5	56.5	0.3286
Albúmina	66,000	4.819	152	76	0.4421
Anhidrasa Carbónica	29,000	4.462	170	94	0.5468
VTL	562,431	5.755	100	24	0.1396
VTG	594,259	5.773	99	23	0.1340

\*  $V_o = 76$   $V_t = 247.9$   $V_t - V_o = 171.9$

### ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR

$$K_{av} = 1.9649 + (-0.3171)(\text{Log P.M.})$$

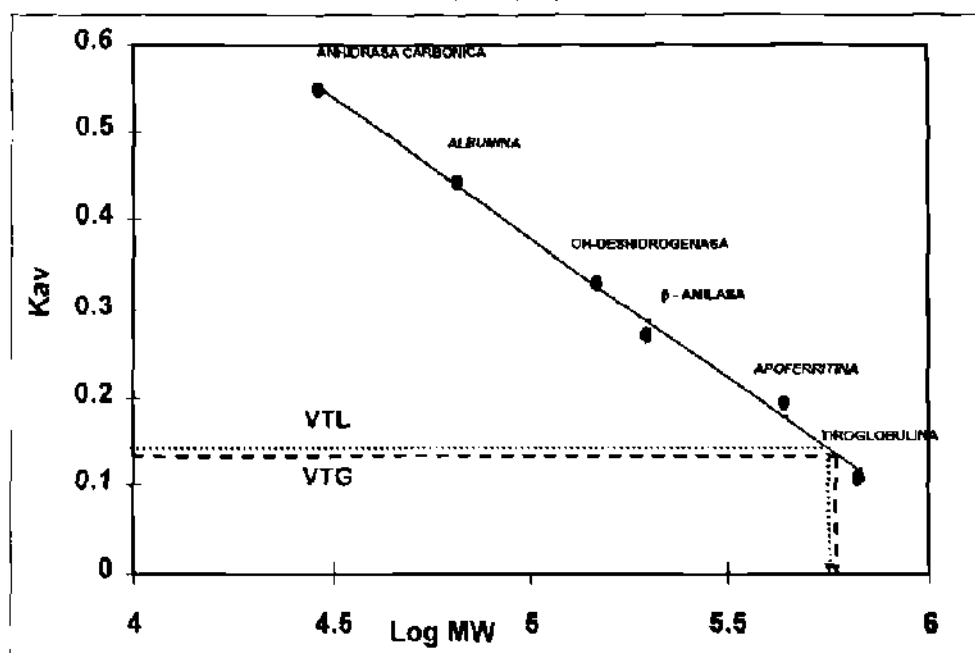
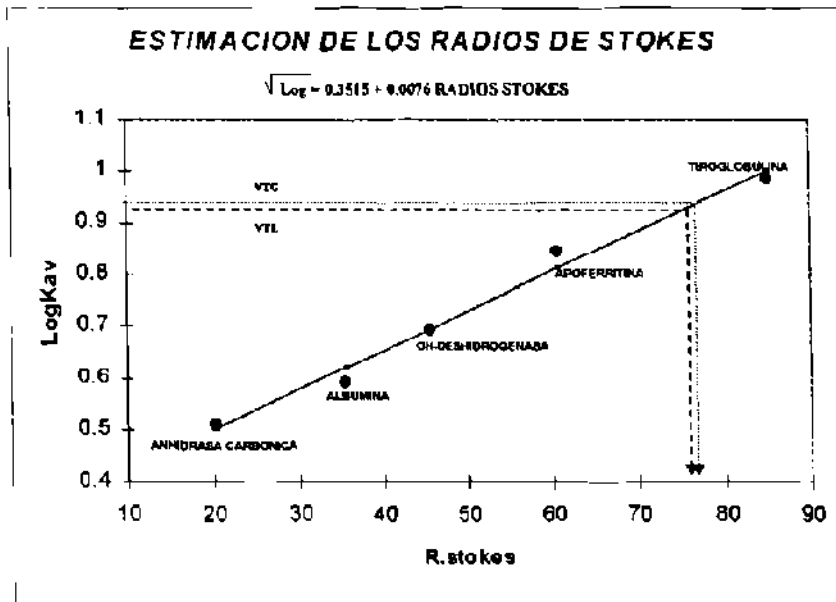


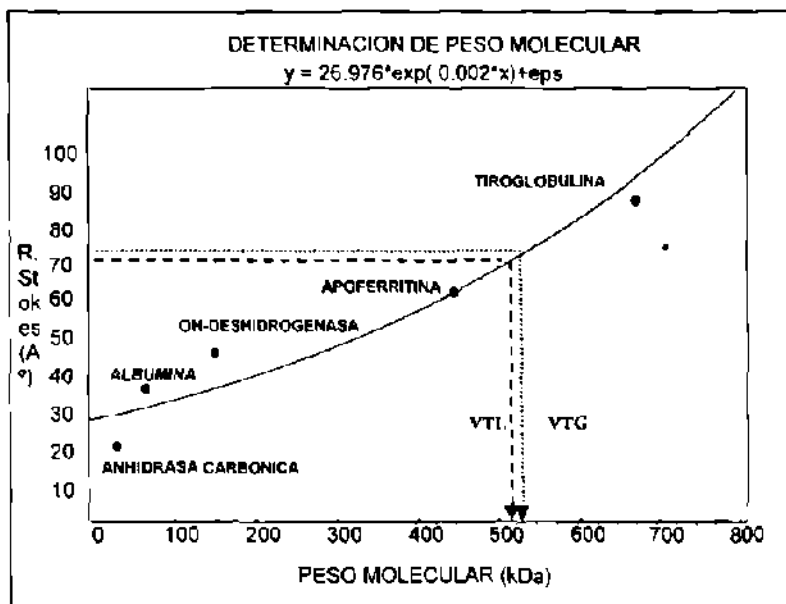
Figura 4.10.- Estimación del logaritmo del peso molecular de proteínas, mediante el análisis de regresión lineal del  $K_{av}$  y LogMW.

Sin embargo, como ya se había mencionado, al no ser estas moléculas proteínas globulares fue necesario recurrir a un análisis de regresión lineal en el cual se consideran los radios de stokes calculando los valores de  $75.2 \text{ \AA}^0$  y de  $76.6 \text{ \AA}^0$  para la VTL y VTG respectivamente ( Figura 4.11 ). Los radios de stokes de las moléculas de referencia del mismo kit de peso molecular fueron proporcionados por el servicio de asistencia técnica de SIGMA .



**Figura 4.11.- Determinación de los radios de stokes de la VTL y VTG.**

Tomando en cuenta a los radios de stokes se realizó una nueva estimación del peso de la VTL y VTG, para lo cual se utilizó la regresión exponencial que se presenta en la Figura 4.12. De esta forma, se obtuvieron los pesos moleculares de 512.6 kDa para la VTL y de 521.8 kDa para la VTG.



**Figura 4.12.- Determinación de peso molecular de la VTL y VTG mediante los radios de stokes.**

## 4.5.-DISCUSION

### 4.5.1.- Purificación de la VTG y VTL

Hasta el momento, se han utilizado diversos procedimientos para purificar la VTG y la VTL de diferentes organismos acuáticos, destacando aquellos que implican una etapa de separación inicial basada en la precipitación de estas moléculas por medio del empleo de diversas sales (Wiley *et al.*, 1978; De Vlaming *et al.*, 1980; Norberg y Haux, 1988; Mendoza, 1987). Siendo el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y el  $\text{MgCl}_2$  los más comunes para precipitar las proteínas, debido a su gran solubilidad en agua, lo que permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas. Estos procedimientos son importantes para la separación de mezclas de proteínas, ya que las diferentes proteínas varían en su respuesta frente a la concentración de sales neutras. La ventaja de este procedimiento es que las proteínas precipitadas por salado ("salting out") retienen su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización (Lehninger, 1979).

No obstante, este tipo métodos aplicados a nuestro material no dieron resultados satisfactorios por lo que fue necesario recurrir a una adaptación del protocolo.

Unas de las principales modificaciones consistió en intercalar una etapa de separación inicial, con el fin de aumentar la eficacia del procedimiento. De esta manera, se recurrió a la separación por ultracentrifugación como primera etapa. Esta técnica reveló ser mejor que las utilizadas en experimentos clásicos, tales como las precipitaciones por EDTA- $\text{MgCl}_2$  o por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La primera ha sido habitualmente utilizada para purificar la VTG de vertebrados, incluyendo peces, así como de algunos crustáceos (Wiley *et al.*, 1978; De Vlaming *et al.*, 1980; Norberg y Haux, 1988; Mendoza, 1987). Mientras que la segunda es un procedimiento común para separar y concentrar prácticamente cualquier proteína en solución (Jason y Rydén, 1989).

Existen al menos dos hipótesis para explicar que el fenómeno de desnaturalización reversible en presencia de EDTA- $\text{MgCl}_2$ , no haya dado resultados satisfactorios con nuestro material

a) Parecería que, las cargas en la superficie de la proteína, que están implicadas en la precipitación, están ligadas a la presencia de los grupos fosfatos, y en el caso de la VTG de los crustáceos existe una mínima cantidad de grupos fosfatos debido a la baja cantidad de serina presente en la molécula (Quinitio *et al.*, 1990), contrariamente a la abundante presencia de estos grupos en la VTG de peces (Campbell y Idler, 1980; Nath y Sundararaj, 1981; Norberg y Haux, 1988).

b) Además, este tipo de precipitación suele ser particularmente eficaz cuando se presentan concentraciones elevadas de la VTG como en el caso de salmónidos, contrariamente a lo que sucede en el caso del goldfish (Norberg y Haux, 1988). En este sentido cabe señalar que, las concentraciones de VTG registrada en diferentes crustáceos son relativamente bajas (Derelle *et al.*, 1986; Mendoza y Fauvel, 1989; Quackenbusch, 1989a).

Con respecto a la precipitación por el sulfato de amonio, a pesar de ser de amplia utilización y presentar la ventaja de poder conservar intacta la molécula de VTG, esta técnica, no se retuvo en nuestro caso debido a problemas de resolubilización encontrados.

Las otras modificaciones aportadas a la purificación fueron la utilización de una columna por filtración en gel de gran tamaño (2.6 x 51 cm) para obtener una mejor separación, y la adaptación de ciertas condiciones señaladas por Wiley *et al.* (1979) para la etapa de intercambio iónico, ya que los resultados obtenidos con otros buffers (etanolamina, pH 9) y con el uso de otras sales (NaCl) ofrecieron resultados pocos resolutivos con nuestro material.

Hasta el momento, diversos autores han purificado la VTL y la VTG de crustáceos por una combinación de cromatografía de exclusión molecular y de intercambio de iones (Saiag *et al.*, 1979; Tom *et al.*, 1987 a; Andrieux y Freshville, 1992). La cromatografía se ha seleccionado ya que ofrece la ventaja de disponer de la molécula en fase líquida, lo que permite continuar con su ulterior purificación por medio de diferentes técnicas (cromatografía de afinidad, cromatoenfoco, electroforesis, etc.). Entre los medios de filtración en gel que han producido mejores resultados para la *al.*, 1990; Tom *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993 a y b; Chang *et al.*, 1996; Pateraki y purificación de VTG y la VTL en crustáceos se encuentra la Shepharosa CL (Quinitio *et*

Stratakis, 1997). Sin embargo, el Sephacryl, un medio que presenta características similares a la Shepharosa, presenta una mejor estabilidad química a diferentes amortiguadores en un mayor rango de pH (Farmacia Biotech, 1999) y soporta una presión más elevada, lo cual permite procesar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo. Este medio también ha sido utilizado exitosamente en la purificación de la VTG y VTL de *Penaeus vannamei* (Mendoza, 1992), por lo cual se decidió utilizarlo para la purificación de la VTG y VTL del acocil rojo.

Es pertinente notar que el perfil de elución de las proteínas después de su paso por cromatografía de intercambio de iones muestra que la etapa de la filtración en gel no resultaba suficiente en sí, ya que otras proteínas hemolinfáticas con un peso molecular equivalente eran eluidas al mismo tiempo que la VTG. Sin embargo, la carga de la VTG a pH 8 permitió separarla. Este protocolo de purificación permitió la obtención de una fracción de VTG a partir de la hemolinfa, y de VTL a partir del ovario, cuya pureza y las principales propiedades pudieron ser estudiadas. La pureza de la VTG y VTL aisladas en el transcurso de este trabajo pudo ser demostrada en base a la obtención de un solo pico simétrico obtenido al finalizar el segundo paso a través de la columna de intercambio de iones. Después de estas diferentes etapas, la pureza de la VTG y la VTL resultó satisfactoria sobre todo después de las diferentes pruebas de caracterización a las que fueron sometidas.

#### **4.5.2.- Caracterización**

Una parte esencial del estudio radicó en la caracterización de estas moléculas.

##### **4.5.2.1.- Evaluación del peso molecular**

Las proteínas purificadas se caracterizaron primeramente por su peso molecular. Al evaluar los factores de elución ( $K_{av}$ ) de las fracciones consideradas como VTG y VTL, se encontró que estas presentaban un peso molecular de 594 kDa y 562 kDa respectivamente, los cuales se ajustaron mediante los radios de Stokes de estas moléculas, proporcionando una estimación de la masa molecular real para proteínas no globulares de: 521.8 kDa para la VTG y 512.6 kDa para la VTL. Como se mencionó anteriormente, estos elevados pesos moleculares son consecuencia de la asociación de las proteínas con lípidos, glúcidos y grupo prostéticos carotenoides

originados durante la vitelogénesis (Meusy, 1980). Es interesante notar que estos valores resultan cercanos al de 500 kDa determinados en el caso de la lipovitelina de *Procambarus sp.*, estimados mediante ultracentrifugación en gradiente, reportado por Fyffe y O'Connor (1974). Y además concuerdan con el rango de valores de aquellas moléculas reportadas para otras especies de crustáceos decápodos, los cuales fueron determinadas mediante electroforesis en poliacrilamida y en agarosa. A este respecto, Lee *et al.*, (1997) reportaron valores de 700 kDa para la VTG en *Macrobrachium rosenbergii*; Tsumura y Nakagawa, (1989), reportaron un peso molecular de 800 kDa para la VTL y 860 kDa para la VTG de *Palaemon paucidens*; Chang y Jeng, (1995) reportaron un valor de 276 kDa para la VTG de *Penaeus chinensis*. Mientras que otros autores han reportado pesos moleculares más elevados, Chang *et al.*, (1996) reportaron dos moléculas de VTL para la misma especie con peso molecular de 380 kDa y 500 kDa; Pateraki y Stratakis, (1997) encontraron un valor de 551 kDa y 510 kDa para la VTG y VTL de *Potamon potamon* respectivamente; Quinitio *et al.*, (1990) reportaron 540 kDa para la VTL de *Penaeus monodon* y Chang *et al.*, (1993 a) reportaron para la misma especie un peso molecular de 492 kDa para la VTL; Mendoza, (1992) reporta un peso molecular de 575 kDa y 527 kDa para la VTG y VTL de *Penaeus vannamei* respectivamente; Quinitio *et al.*, (1989) reportaron un peso molecular de 560 kDa para la VTL de *Pandalus kessleri*.

Cabe agregar que la naturaleza estructural de la VTG y la VTL observada en el curso de la purificación y los valores de los pesos moleculares registrados, es común para la mayor parte de los artrópodos. De este modo, ha sido señalado que la VTL y VTG en lepidópteros y ortópteros tienen un peso molecular comprendido entre los 500 y 600 kDa (Wyat y Pan, 1974; Yamashita y Indirasith, 1988). De esta misma manera, los peces la vitelogénina plasmática (VTG) lo cual ha sido químicamente definida como una lipoglicofosfocarotenoproteína (Campbell y Idler, 1990; Ho, 1987; Hori *et al.*, 1979; Nuñez *et al.*, 1996) similar a las de otros vertebrados (Mommensen y Walsh, 1988), presenta un rango de pesos moleculares que van de los 326 kDa a los 550 kDa (Campbell y Idler, 1980; Nath y Sundararaj, 1981; Norberg y Haux, 1988). Esto parece indicar que la naturaleza de la molécula esta altamente conservada, aún en los vertebrados ovíparos.



Cabe señalar que, la técnica de estimación de la masa molecular por cromatografía nos ha parecido más apropiada, aún con las correcciones adaptadas para las proteínas no globulares, que el método alternativo de SDS-PAGE. En efecto, las estimaciones obtenidas por el tratamiento en SDS, conducen a una sobrestimación artificial de peso molecular, dado que el SDS solo se une a la parte proteica de las glicoproteínas por lo que no actúan sobre los eventuales residuos glicosídicos, esto resulta en una disminución de la movilidad de las glicoproteínas por lo cual parecen tener una masa molecular aparentemente más grande (Milleret, 1985). Por otra parte, el gran número de sub-unidades reportado para estas moléculas en diferentes especies bajo condiciones desnaturalizantes es aún objeto de controversia. Así, en el caso particular de la VTG y VTL, difícilmente podíamos establecer un criterio de pureza por SDS-PAGE, pues el número de sub-unidades es con frecuencia elevado -2-11- (Lui y O'Connor, 1977; Meusy y Junera, 1979; Zagalasky, 1985; Eastman-Reks y Fingerman, 1985; Tom *et al.*, 1987 a; Quintio *et al.*, 1989). Adicionalmente, la constatación del grado de pureza por esta técnica no parece satisfactoria puesto que las proteínas son separadas en función de una combinación de su carga y de su peso molecular, sin embargo, la suma de estas propiedades no proporciona una medida absoluta, considerando que una zona electroforetica puede cubrir proteínas con la misma movilidad, pero con un peso molecular y cargas diferentes, y por consecuencia pueden presentar propiedades inmunológicas diferentes (Engelman, 1979; Clausen, 1988).

Un aspecto notable observado durante esta investigación es que al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio, los resultados de otras investigaciones indican que la VTG, presenta una masa molecular más elevada en comparación con la VTL, (Junera *et al.*, 1977; Picaud, 1978; Tsumura y Nakagawa, 1989; Mendoza *et al.*, 1993). La diferencia encontrada en los pesos moleculares de ambas moléculas no es atribuible a una posible desnaturalización de estas en el transcurso de su purificación, considerando que ambas fueron purificadas por el mismo procedimiento y tomando la precaución de trabajar siempre a bajas temperaturas y en presencia de inhibidores enzimáticos (PMSF) para evitar cualquier tipo de degradación. Esta ligera diferencia de peso molecular indicaría que la VTG es efectivamente el precursor de la VTL, siendo

sintetizada extraovariamente y posteriormente transportada hacia el ovario a través de la hemolinfa (Suzuki, 1987; Tsumura y Nakagawa, 1989). Y una vez en el ovario sería procesada enzimáticamente, como en el caso de otros organismos, lo cual explicaría la menor masa molecular de la VTL después de ser internalizada (Campbell y Idler, 1980; Nath y Sundararaja, 1981; Norbergh y Haux, 1988; Mendoza *et al.*, 1993). En efecto durante mucho tiempo se consideró que la transformación de la VTG a VTL era un fenómeno exclusivo de vertebrados, sin embargo un fenómeno similar a sido señalado en el caso de algunos insectos (Chino *et al.*, 1977; Chinzei *et al.*, 1981), anélidos (Porchet *et al.*, 1989) y varios autores lo han señalado en los crustáceos (Suzuki *et al.*, 1989; Tsumura y Nakagawa, 1989; Meusy y Junera, 1979).

Este aspecto ha sido reportado en otros estudios en los cuales dentro de un sistema competitivo para llevar a cabo el desplazamiento de la vitelogenina, se ha requerido una cantidad mayoritaria de vitelina, lo que deja visualizar la eventualidad de un reconocimiento parcial de esta proteína por el anticuerpo anti-VTG. Las dos moléculas tendrían entonces conformaciones similares pero el anticuerpo estaría más adaptado a la vitelogenina. La energía de enlace implicada en el complejo anticuerpo-VTG sería entonces superior a la del complejo anticuerpo-VTL, de aquí un número mayor de moléculas VTL sería necesario para desplazar el enlace VTG-anticuerpo (Bolton y Hunter, 1986). Otros casos similares han sido registrados en los peces, así por ejemplo Campbell y Idler, (1980) al utilizar un anticuerpo anti-VTL, en un RIA necesitaron emplear una cantidad menos importante de VTG plasmática para desplazar la VTL. En este sentido, también Mendoza *et al.*, (1993) encontraron que se requería una cantidad mayor de VTL, para el desplazamiento de la VTG al utilizar un ELISA competitivo.

En los crustáceos, varios inmunoensayos han sido realizados utilizando estándares preparados a partir de extractos de ovarios, mientras que la molécula que se pretendía cuantificar era de origen hemolinfático. Es evidente la probabilidad de que las constantes de asociación (ó de disociación) de los dos complejos serian diferentes y relativamente elevadas en este caso. Esto viene a confirmar la importancia de trabajar en un sistema homólogo, en el cual, el mismo antígeno sea utilizado para

generar los anticuerpos además de su utilización como estándar y como competidor (Nicoll, 1975; Maitre *et al.*, 1985).

#### **4.5.2.2.- Caracterización de la VTG y la VTL por sus grupos prostéticos**

En una segunda etapa las moléculas de la VTG y la VTL se caracterizaron por su naturaleza compleja de glicolipocarotenoproteínas, lo cual nos permitió identificarlas como las proteínas buscadas en el presente estudio. En efecto, los extractos de ovario de crustáceos separados mediante filtración en gel generalmente presentan dos fracciones proteicas mayoritarias (Mendoza, 1992; Chang *et al.*, 1993 a y b; Pateraki y Stratakis, 1997), presentándose en el caso de *P. clarkii* un patrón similar (Figura 4.6). Una característica de la lipovitelina ovárica es la presencia de una fracción de naturaleza carotenoica, la cual proporciona una coloración característica para cada especie, siendo en *Homarus sp.* de color verde (ovoverdina), en *Callinectes sapidus* amarilla (crustoquina), en *Pagurus hemhardus* morado (crustaxanina) y en *Penaeus monodon* de color verde oscuro (ovoverdina) (Quinitio *et al.*, 1990; Zagalazky *et al.*, 1990). Esta coloración permite que estas moléculas puedan ser detectadas mediante espectrofotometría, dentro de rangos de longitud de onda cercanos a 470 nm siendo estos los que proporcionan la mayor absorbancia (Fyffe y O'Connor, 1974; Zagalaski *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993a y b; Chang *et al.*, 1996; Pateraski y Stratakis, 1997). En el caso de los extractos de ovario maduro del acocil rojo, estos presentaban una coloración naranja característica atribuible a la zeaxantina. Esta molécula que se acumula en el transcurso de la maduración gonadal es el producto de la oxidación de la zeaxantina monoéster de origen hepatopancreático que sería vehiculada por las lipoproteínas en la hemolinfa (Vincent *et al.*, 1988). Por medio de un barrido en el espectrofotómetro se logró determinar que la mayor absorbancia se presentaba a una longitud de onda de 466 nm (Figura 4.4). Considerando este valor, fue posible identificar y separar solo aquellas fracciones proteicas (Figura 4.3), obtenidas después de la etapa preliminar de ultracentrifugación. Este mismo criterio fue utilizado para separar una fase que presentaba una coloración anaranjada por medio de filtración en gel correspondiente a una sola fracción proteica con un volumen de elución similar, y con una absorbancia a 466 nm (Figura 4.6).

Por otra parte, el complejo molecular que constituye tanto a la vitelogenina como la lipovitelina implica la presencia de grupos prostéticos lipídicos. Esta es una de las características principales de estas moléculas ya que son las responsables del transporte de diversas clases de lípidos y su translocación al sistema circulatorio en los animales (Hunerland y Bowers, 1989). La fracción lipídica llegan a representar del 9 % en *Pontamon pontamios* hasta un 35 % en *Procambarus sp.* (Fyffe y O'Connor, 1974; Pateraki y Stratakis, 1997). Considerando esta característica y aprovechando la afinidad del Negro Sudan B por los lípidos, esta fracción lipídica pudo ser detectada fácilmente, en la fracción proteica obtenida de la filtración en gel, así como en la fase con coloración anaranjada de la ultracentrifugación (Fig. 15).

De esta forma, al observar que en el cromatograma de la fase anaranjada (EOv5) de ultracentrifugación se presentó un solo pico proteico similar a la fracción del extracto de ovario maduro con características lipídicas y de carotenoide (Figura 4.7), se consideró que estas fracciones correspondían a la molécula de la vitelina ovárica.

Por otra parte, al tomar en cuenta que la VTL y VTG son moléculas no solo muy similares, sino inmunológicamente indistinguibles, se asumió, a raíz de lo anterior, que la presencia de una fracción con características similares a las de la VTL en el cromatograma de hemolinfa de hembras maduras, correspondía a la VTG (Figura 4.7).

#### **4.5.2.3.- Caracterización por el rol fisiológico de las moléculas**

Finalmente, en una tercera etapa como una constatación adicional, al analizar de manera comparativa los cromatogramas de hemolinfa de machos y de ovarios de hembras impúberes se observó la ausencia de la fracción lipocarotenoproteica referida anteriormente (Figura 4.8), confirmando de esta forma que esta fracción se presentaba exclusivamente en hembras maduras. Por lo cual, es posible considerar que esta fracción corresponde a la molécula de la vitelogenina plasmática. Ya que tanto la VTG como la VTL, son moléculas características solo de las hembras y únicamente se presentan en el estado reproductivo, marcando así el inicio de la pubertad.

Otro aspecto que viene a aportar cierta validación a la presente investigación es el hecho de que tanto la presencia como la abundancia de las moléculas de vitelina y

vitelogenina estén relacionadas con el ciclo de muda, siendo observadas principalmente en el estado de intermuda, al igual que en *Rynchocinetes typus* (Muñoz *et al.*, 1990), *Paratelphus hydromonous* (Adiyodi, 1985) y en *O. Gammarella* (Meusy, 1980).

La ausencia de estados de maduración avanzados durante la pre-muda y la baja frecuencia observada durante la post-muda nos conducen a considerar la existencia de un posible antagonismo entre estos dos fenómenos. De acuerdo a AQUACOP, (1977) y Adiyodi, (1985) dicho antagonismo estaría causado por la desincronización de las hormonas responsables de la muda y de la maduración; entre las maduraciones que se producirían aleatoriamente, solo aquellas que iniciaran en un estado de muda favorable llegarían a su término, a condición de que las reservas del hepatopáncreas fueran suficientes. Esto viene a explicar los fenómenos de reabsorción del ovario en aquellos ejemplares en estado de post-muda al sucitarse de forma inminente el fenómeno de ecdisis. La racional de este argumento ha sido basada en el desbalance energético producido por dos procesos cuya demanda energética es muy alta: crecimiento somático y reproducción.

La interacción de los procesos de muda y maduración estaría también ilustrada por una duración más extendida del periodo de intermuda en el caso de las hembras como lo señala Bizot-Espiard, (1980).

El protocolo de purificación adaptado y el hecho de disponer la vitelogenina nativa para la producción de anticuerpos, son factores que sin duda alguna contribuirá a su especificidad. Contrariamente a otros estudios en donde los anticuerpos han sido generados a partir de extractos de ovario (Derelle *et al.*, 1986), o bien a partir de subunidades de vitelina (Quackenbush, 1989).

A este respecto, ha sido demostrado, por una parte, que la desnaturalización de los antígenos disminuye la inmunogenicidad con respecto a las formas nativas, como consecuencia de una falta de anticuerpos contra los epitopes conformacionales y de una pérdida posible de determinantes (Tijssen, 1985). De hecho, existe una relación entre la complejidad estructural y la aptitud para inducir una inmunología (Maurer y Callahan, 1980).

Por otra parte, ha sido constatado en el caso de los peces que los inmunoensayos desarrollados para medir fragmentos proteolíticos pueden dar rendimientos sobre-estimados o falsas determinaciones (Copeland y Thomas, 1988). La causa de esta sobre-estimación sería que al ser necesario un solo epitope del antígeno para ser reconocido por el anticuerpo, las fracciones o metabolitos del antígeno portadores del epitope, pudieron ser reconocidas como la molécula entera (Barbier, 1989).

#### **4.5.2.4.- Corolario**

La aportación principal de este estudio es la disponibilidad de moléculas puras tanto de origen plasmático como ovárico, que serán utilizadas para generar anticuerpos y establecer su cuantificación, lo cual es de gran importancia ya que la calidad de cualquier inmunoensayo reposa sobre la pureza del antígeno (Oellerich, 1980; Kurstak, 1985), esto es un parámetro capital en las etapas claves de la cuantificación. Primeramente, en el momento de la inmunización, la pureza del antígeno es primordial para evitar los riesgos de una respuesta inmunitaria hacia otras proteínas contaminantes (Tijssen, 1985). En segundo término, en el momento de la calibración los estándares y competidores deben corresponder estrechamente a los antígenos que se pretenden dosificar. Finalmente, en el caso de los inmunoensayos en fase sólida, la fijación de los antígenos a la superficie (e.g. pozos de placas ELISA) puede verse impedida por moléculas contaminantes que entren en competencia con el antígeno por los sitios de fijación disponibles, enmascarando ocasionalmente los determinantes antigénicos (Voller y Bidwell, 1986).

La utilidad práctica del inmunoensayo que se pretende desarrollar con estas moléculas radica en una evaluación precisa y sensible de los estadios de maduración de *Procambarus clarkii* sin llegar a sacrificar el animal y ofrece además la ventaja adicional de ser de gran utilidad durante el sexado precoz de los individuos en los nuevos sistemas de producción de larvas basados en la constitución de un lote de reproductores generados a partir de organismos juveniles.

#### **4.6.- CONCLUSION**

El protocolo utilizado para la purificación de la VTL ovárica y la VTG hemolinfática resultó apropiado ya que se logró obtener un solo pico proteico, en ambos casos.

Las proteínas obtenidas presentan características bioquímicas correspondientes a la de otras VTG y VTL reportadas.

Estas proteínas son específicas de hembras en estado reproductivo, con lo que se confirma que se trata de las proteínas que se pretendían aislar y purificar.

## APÉNDICE 1

### **Procedimiento para la técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina:**

1. - Xilol I y Xilol II, 5 minutos en cada uno
2. - Alcohol etílico absoluto, 3 minutos
3. - Alcohol etílico al 96 %, 3 minutos
4. - Alcohol etílico 80 %, 3 minutos
5. - *Lavado en agua destilada*
6. - *Tinción en Hematoxilina de Harris durante 1 a 2 minutos*
7. - *Lavado en agua destilada nuevamente*
8. - 10 a 11 inmersiones en agua ácida
9. - *Lavado en agua destilada*
10. - 10 *inmersiones en agua amoniacal*
11. - *Lavado en agua destilada*
12. - *Colorear con Eosina de 1 a 2 min.*
13. - *Alcohol etílico de 80, 96 y absoluto, con 5 inmersiones rápidas en cada uno.*
14. - *Xilol I y Xilol II, 5 min. en cada uno.*
15. - *Montaje en resina.*



## APÉNDICE 2

### Procedimiento para la técnica de Acido Periodico-Reacción de Schiff

1. - Desparafinización de los tejidos en Xilol durante 15 minutos. Baños en alcohol etílico de 100 a 70 % por espacio de 4, 3, 2 1/2 y 2 minutos respectivamente.
2. - Acido periódico (fórmula alcohólica) durante 2 1/2 horas.
3. - Lavado con alcohol al 90% durante 5 minutos.
4. - Hidratación en agua rápidamente.
5. - Reactivo de Schiff durante 10 minutos.
6. - Soluciones de sulfito, realizando 3 cambios de 1 ½ a 2 minutos en cada uno.
7. - Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
8. - Deshidratación en alcohol etílico al 95% ½ minuto y 2 cambios en alcohol etílico absoluto de 1 a 2 minutos cada uno.
9. - Aclarar en xileno (2 cambios).
10. - Montaje con Bálsamo de Canadá.

## APÉNDICE 3

### Procedimiento para la técnica de Black Sudan B

1. - Fijación del tejido en formalina al 10%, realizando 3 cambios cada 24 horas.  
Conservación en butanol para incluir posteriormente en parafina.
2. - Obtención de cortes por duplicado, los cuales se hidrataron en alcohol etílico de 96 a 70% y agua durante 20 minutos en cada uno.
3. - Dicromato de potasio de 60 a 90 minutos.
4. - Agua de la llave durante 10 minutos.
5. - Deshidratación en alcoholes de 20, 40, 60 y 70%, 30 minutos en cada uno.
6. - Black Sudan B por un periodo de 16 horas.
7. - Lavado en alcohol etílico al 70% (rápidamente).
8. - Rojo neutro durante un minuto.
9. - a) Lavar una laminilla en agua corriente de 5-10 minutos.  
b) Incluir la segunda laminilla en acetona durante 8 horas.
10. - Introducir rápidamente la primera laminilla en agua destilada y montar en gelatina-glicerina.
11. - Retirar la segunda laminilla de la acetona, lavar rápidamente en agua destilada y montar en gelatina-glicerina; comparar con la primera laminilla.
12. - Remover la gelatina-glicerina de la segunda laminilla y repetir los pasos del 5 al 10, omitiendo el paso 8.

## 5.- LITERATURA CITADA

- Abdo de la Parra, I. 1991. Análisis de la fecundidad y algunos aspectos de crecimiento de *Procambarus clarkii* y *P. simulans* (Decapoda: Cambaridae) del área central del estado de Nuevo León. Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 109 pags.
- Abrahamsson, S.A.A. 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos*. 22: 373-380.
- 1972. Density growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos*. 22: 373-380.
- 1972. Fecundity and Growth of some populations of *Astacus astacus* Linné in Sweden with special regard to introductions in northern Sweden. Institute of freshwater Research. 52: 23-37.
- and G. R. Goldman. 1970. Distribution, density and production of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, in Lake Tahoe, California-Nevada. *Oikos*. 21: 83-91.
- Adiyodi, R. G. 1969. Protein metabolism in relation to reproduction and moulting in the crab, *Paratelphusa hydrodromus*: Part III-RNA Activity and protein-yolk biosynthesis during normal vitellogenesis and under conditions of acute inanition. *Indian Journal Exp. Biol.* Vol. 7, 13-16.
- and R. G. Adiyodi. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol. Rev.*, 45:121.165.
- and T. Subramoniam. 1983. Arthropoda.- Crustacea, pp. 443-496 in: K.G. Adiyodi and R.G. Adiyodi (ed.) *Reproductive biology of Invertebrates*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- 1985. Reproduction and its control, pp.147-215. in: Bliss D. E. and L.H. Mantel (ed.) *The Biology of Crustacea*, 9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes, Academic Press, Inc, New York.
- Aguilar, M.B., ,D.T. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone

- from the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102B:491-498.
- Aiken, D.E. 1969. Ovarian maturation and egg laying in the crayfish *Orconectes virilis*: influence of temperature and photoperiod, *Can. J. Zool.*, 47:931-935.
- and S.L. Waddy. 1980. Reproductive Biology, pp. 215-276 in: Stanley Cobb J. and B. F. Phillips (ed.) *The Biology and Management of Lobsters, I Physiology and Behavior*, Academic Press, Inc. New York.
- and ----- . 1982. Cement gland development, ovary maturation and reproductive cycles in the american lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*. 2: 315-327.
- and ----- . 1992. The growth process in crayfish. *Reviews in Aquatic Sciences*, 6:335-381.
- , S. L. Waddy, K. Moreland and S. M. Polar. 1984. Electrically induced ejaculation and artificial insemination of the american lobster *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*, 4:519-527.
- , S. L. Waddy and L. S. Uhazy. 1985. Aspects of the biology of *Pseudocarcinonemertes homari* and its association with American lobsters, *Homarus americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 351-356.
- Allen, R.C. and Budowle Bruce. 1994. Gel electrophoresis of proteins and nucleic acids; Selected techniques. Walter de Gruyter, Berlin, New York. 210 -211.
- Alunno-Bruscia, M. and B. Sainte-Marie. 1998. Abdomen allometry, ovary development, and growth of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae), in the northwestern Gulf of St. Lawrence. *Fish. Aquat. Sci.* 55: 459-477.
- Amaro Pinheiro, M. A. and A. Fransozo. 1998. Sexual maturity of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Decapoda, Brachyura, Portunidae), in the Ubatuba Littoral, Sao Paulo State, Brazil. *Crustaceana*. 71(4): 434-452.
- Andrieux, N. and J. Fresheville. 1992. Caractérisation de la vitelline secondaire chez le crustacé brachyoure *Carcinus maenas*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 314, Serie III,: 227 - 230.

- Anger, K. And G. S. Moreira. 1998. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *Journal of Crustacean biology*. 18: 823-838.
- Aoto, T, Y. Kamiguchi and S. Hisano. 1974. Histological and ultrastructural studies on the Y organ and mandibular organ of the freshwater prawn, *Palaemon paucidens*, with special reference to their relation with the molting cycle. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Series VI, Zoology* 19:295-308.
- Aquacop. 1977. Observations on the maturation and reproduction of penaeid shrimp in captivity in a tropical medium. 3<sup>rd</sup> Aquaculture Workshop, ICES, May 10 -13 Brest, France. *Actes de colloques du CNEXO 4*: 157-178
- Armitage, K. B; A. L. Buikema, Jr. and N. J. Willems. 1972. Organic constituents in the annual cycle of the crayfish *Orconectes nais* (Faxon). *Comp. Biochem. Physiol.* 41A : 825-842.
- Arrignon, J. 1979. Cría del Cangrejo de Río. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 28-29.
- Auvergne, A. 1982. El cangrejo de río. Cría y explotación. Primera edición Editorial Mundi-Prensa Madrid, España. 117 p.
- Avault, Jr. J. W. 1972. Crayfish farming in the United States. *First International Symposium on Freshwater Crayfish. Austria* 1:239-250.
- . 1976. Crawfish in Europe: Some Facts and Folklore. *Annual Meeting Louisiana Crawfish Farmers Association* 1-9.
- , L.W. de la Bretonne and J. V. Huner. 1974. Two major problems in culturing crayfish in ponds: Oxygen depletion and overcrowding. *Second International Symposium on freshwater crayfish. Louisiana.*
- and J. V. Huner. 1985. *Crawfish Culture in the United States*, chapter 1 In: *Crustacean and Mollusk aquaculture in the United States*, J. V. Huner and E.E. Brown (eds.), *AVI Publishing Company, Inc.* 1-54 pp.
- , R.P. Romaine, and M.R. Miltner. 1983. Red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, 15 years research at Louisiana State University. *Freshwater Crayfish*, 5:362-369.

- Barbier, Y. 1989. Principes généraux des immunodosages. In: Les immunodosages de la théorie à la pratique. Y.Barbier (Ed.), Editions de l'ACOMEN. Ch. 4. pp. 43 - 57.
- Bauer, R. T. 1991. Analysis of embryo production in a caridean shrimp quild from a tropical seagrass meadow. In: Wenner, A. and A. Kuris (eds.) PP. 181-192. CRUSTACEAN 7. Crustacean egg production, A. A. Balkena, Rotterdam.
- , 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: A functional and phylogenetic perspective, pp. 183-207 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), Crustacean Sexual Biology, Columbia University Press, New York.
- Beams, H. W. and R. G. Kessel. 1963. Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special references to the origin yolk, J. Cell. Biol., 18:621-649.
- Benfey, T. J., E. M. Donaldson and T. G. Owen. and An Homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other pacific salmonids. General and Comparative Endocrinology, 75:78-82.
- Bittner. G.D. and R. Kopanda. 1973. Factors influencing molting in the crayfish *Procambarus clarkii*. J. Exp. Zool. 186: 7-16.
- Bizot-Espiard, A. 1980. Croissance et reproduction de la crevette *Penaeus japonicus* en élevage: effets de l'épédonculation, histologie de l'appareil génital mâle. Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle Océanographie, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 168 pp.
- Black, J. B. 1966. Cyclic male reproductive activities in the dwarf crawfishes, *Cambarellus shufeldtii* (Faxon) and *Cambarellus puer* Hobbs. Transactions American Microscopic Society. 85: 214-232.
- and J.V. Huner. 1976. Breeding your own crayfish stock. Carolina tips 42 (4) : 1-3.
- Blanchet-Tournier, M.F. 1982. Quelques aspects des interactions hormonales entre la mue et la vitellogenèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas) . Reproduction, Nutrition, Développement 22:325-344.

- Bolton, A. and M. Hunter. 1986. Radioimmunoassay and related methods. In: *Handbook of experimental immunology*, vol. 1. Immunochemistry. D. Weir (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. Ch. 26. pp. 26.1 - 26.56.
- Bomirski, A. and E. Klek. 1974. Action of eyestalks on the ovary in *Rhithropanopeus harrisi* and *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 24:329-337.
- , M. Arendarczyk, E. Kawinska and L.H. Kleinholz. 1981. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *International Journal of Invertebrate Reproductive*, 3:213-219.
- Borst, D. W., M. Sinkus and H. Laufer. 1985. Methyl farnesoate production by the crustacean mandibular organ. *American Zoologist* 25:103.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Brankston, J. D.; T. B. Lawson and R. P. Romaine. 1988. *Crawfish Procambarus Processing Plant Wastewater Characterization*. American Society of Agricultural Engineers 31(2): 582-584.
- Browdy, C. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Wyban, J. (edi). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA.
- , M. Fainzilber; M. Tom, Y. Loya and E. Lubzens. 1990. Vitellin Synthesis in Relation to Oogenesis *In Vitro*-Incubated Ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Journal of Experimental Zoology*. 255: 205-215.
- Byard E. H. and D.E. Aiken. 1984. The relationship between molting, reproduction and a haemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A:749-757.
- Campbell, C. and D. Idler. 1980. Characterization of an estradiol - induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and

- radioimmunological crossreactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.*, 22 : 605 - 617.
- Campos-González, E. 1982. Distribución geográfica, ciclo de vida y hábitos de *Procambarus simulans regiomontanus* Villalobos, en el estado de Nuevo León, México. Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 45 pags.
- Campos E. and S. Contreras-Balderas, 1985. First record of *Orconectes virilis* (Hagen) (Decapoda: Cambaridae) from Mexico. *Crustaceana*, 49:218-219.
- and G.A. Rodríguez-Almaraz. 1992. Distribution of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda: Cambaridae) in Mexico: an update. *Journal of Crustacean Biology*, 12:627-630.
- Cariolou M. A. and C. N. Flytzanis. 1993. Biochemical characterization of gonadal development in the shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B:579-584.
- Carsen, A. E., S. Kleinman and M. A. Scelzo. 1996. Fecundity and relative growth of the crab *Platyxanthus patagonicus* (Brachyura: Platyxanthidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Crustacean Biology*. 16: 748-753.
- Castell, J. D. And J. C. Kean. 1986. Evaluation of the role of nutrition in lobster recruitmen. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 43: 2320-2327.
- Cauge, S., M. Miltner and J.W. Avault, Jr. 1982. Range Pellets as Supplemental Crayfish Feed. *Prog. Fish Cult.* 44: 23-24.
- Ceccaldi, H. J. 1998. Asynopsis of the morphology and phisiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Science*. 6: 13-39.
- Chamberlain, G. W. and N. F. Gervais. 1984. Comparison of unilateral eyestalk ablation with environmental control for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricul. Soc.* 15: 29-30.
- Chang, C. F. and S. R. Jeng. 1995. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn *Penaeus chinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 112B (2): 257-263.
- Chang, E. S. and J. D. O'Connor. 1977. Secretion of  $\beta$ -ecdysone by crab Y-organs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:615-618.



- , 1985. Hormonal control of molting in decapod crustacea. *American Zoologist* 25:179-185.
- , F. Lee and Y. Huang. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B:409-414.
- , T. Shih and H. Hong. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B:609-615.
- , S.R. Jeng, M.N. Lin, and Y.Y. Tin. 1996. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus chinensis*. *Invertebrate Reproduction and Development.*, 29,2: 87-93.
- Charlebois P.M. and G.A. Lamberti. 1996. Invading crayfish in a Michigan stream: direct and indirect effects on periphyton and macroinvertebrates. *Journal North American Benthological Society*, 15:551-563.
- Charniaux-Cotton, H. 1978. L'ovogenèse, la vitellogénine et leur contrôle chez le crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas). Comparaison avec d'autres Malacostracés. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 119:365-397.
- , 1980. Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans: Descriptions of vitellogenesis and of its endocrine control. in: W.H. Clark Jr. and T. S. Adams (eds.), *Advances in invertebrate reproduction*, pp. 177-186, Elsevier, North Holland.
- , 1985. Vitellogenesis and its control in Malacostracan Crustacea. *Amer. Zool.*, 25:197-206.
- , and G. Payen. 1988. Crustacean reproduction pp. 279-304 in: H. Laufer and R.G.H. Downer (eds.) *Endocrinology of select invertebrates types*, Alan Liss Publ., New York.
- Chen, C. and S. Chen. 1993. Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B:141-146.
- and -----, 1994. Vitellogenesis in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius, 1789. *Comp. Bioch. Physiol.*, 107B:453-460.

- Chien, Y.H. and J. W. Avault, Jr. 1980. Production of crayfish in ricefields. *The Progressive Fish Culturist*, 42:67-71.
- , 1983. Effects of flooding dates and disposals of rice straw on crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard) culture in rice fields. *Aquaculture*, 31:339-359.
- Chino, H., Yamagata, M. and S. Sato. 1977. Further characterization of lepidopteran vitellogenin from hemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.*, 7 : 125 - 131
- Chinzei, Y., Chino, H. and G. Wyatt 1981. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect. Biochem.*, 11 : 1 - 7.
- Chu, K. H. 1995. Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang estuary, China. *Journal of Crustacean Biology*. 15 (2): 214-219.
- Chu-Woong, O. and R. G. Hartnoll, 1999. Size at sexual maturity, reproductive output, and seasonal reproduction of *Philocheirus trispinosus* (Decapoda) in port Erin bay, Isle of Man. *Journal of Crustacean Biology*. 19 (2): 252-259.
- Clausen, J. 1988. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. Burdon, R. And P. Van Krippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam. 464 pp.
- Cobb, J. S. and D. Wang. 1985. Fisheries biology of lobsters and crayfishes. *In*: A. J. Provenzano (ed.), the Biology of Crustacea. Vol. 10 Economic Aspects: Fisheries and culture: pp. 168-248. New York: Academic Press.
- Contreras-Balderas, S. and M.L. Lozano-Vilano. 1996. Extinction of most Sandia and Potosi valleys (Nuevo León, Mexico) endemic pupfishes, crayfishes and snails. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 7: 33-40.
- Copeland, P.A., J. P. Sumpter, T. K. Walker and M. Croft. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B:487-493.
- and P. Thomas. 1988. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B:17-23.

- Cordero-Esquivel, B.. 1988. Evaluación de tres dietas artificiales para *Procambarus clarkii* (Girard). Tesis inédita, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), 58 pags.
- Corey, S. 1987. Intraspecific Differences in Reproductive Potential, Realized Reproduction in the Crayfish *Orconectes propinquus* (Girard, 1852) in Ontario. *The American Midland Naturalist* 118(2): 424-431
- 1991. Comparative potential reproduction and actual production in several species of North American crayfish. In: Crustacean production Wenner, A. y A. Kuris (Eds.) Vol. 7 Crustacean issues. A. A. Balkem-Rotterdam-Brookfield, pp. 69-75.
- and D.M. Reid. 1991. Comparative fecundity of decapod crustaceans I. The fecundity of thirty three species of nine families of caridean shrimps. *Crustaceana*, 60:270-294
- Courtney, A.J., S.S. Montgomery, D.J. Die, N.L. Andrew, M.G. Cosgrove and C. Blount. 1995. Maturation in the female eastern king prawn *Penaeus plebejus* from coastal waters of eastern Australia, and considerations for quantifying egg production in penaeid prawns. *Marine Biology*, 122:547-556.
- Crandall, K.A. 1999. North American crayfish species described since Hobb's (1989) checklist. Crayfish Home Page, 3 pp.
- Crocos, P. J. and J. D. Kerr. 1983. Maturation and spawning of the banana prawn *Penaeus merguensis* de Man (CRUSTACEA: PENAEIDAE) in the Gulf of Carpentaria, Australia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 69: 37-59.
- Croisille, Y; H. Junera; J.J. Meusy and H. Charniaux-Cotton. 1974. The female-specific (vitellogenic protein) in crustacea with particular reference to *Orchestia gammarela* (Amphipoda). *Amer. Zool.* 14: 1219-1228.
- Cruz, S.E. y R. Civera. 1982. Bioensayos de incubación artificial del acocil *Cambarellus montezumae* (Decapoda-Astacidae). Tesis de Licenciatura Univ. Aut. Metropolitana, 75 pp.
- Cuisset, B., C. Pelissero, F. Le Menn and J. Nuñez Rodriguez. 1991. ELISA for siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) vitellogenin. *Acipenser*, 107-111.

- Culley D.D., M.Z. Said and E. Rejmankova. 1985. Producing Soft Crawfish: a status report. Louisiana Sea Grant College Program. Louisiana State University. 16 pp.
- , M. Z. Said and P. T. Culley. 1985. Procedures Affecting the Production and Processing of Soft- Shelled Crawfish. P. 2-20.
- and L Doubins-Gray. 1987. Update of soft crawfish research. School forestry, wildlife and fisheries. Louisiana State University.
- Cuzin-Roudy, J. and M. O'leary. 1991. Ovarian development and sexual maturity staging in antarctic krill, *Euphausia superba* (Euphausiacea), *Journal of Crustacean Biology*, 11: 236-249.
- Dall, W. and D. J. W. Moriarty. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. *In: The biology of Crustaceans, Internal Anatomy and Physiological Regulation*, Academic Press, New York. 215-261.
- Damrongphol, P.; N. Eangchuan and B. Poolsanguan. 1991. Spawning cycle and oocyte maturation in laboratory-maintained giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*. Pp. 95: 347-357.
- Daniels, W. H., L. R. D'Abramo and K. F. Graves. 1994. Ovarian development of female red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as influenced by temperature and photoperiod. *Journal of Crustacean Biology*, 14:530-537.
- Davis, J. T. 1983. Biology and Life History of Crawfish. Fisheries Specialist. Texas Agricultural Extension Service 1-6.
- Dehn, P., Aiken D., and S. Waddy. 1983. Aspects of vitellogenesis in the lobster *Homarus americanus*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1161: iv+ 24p.
- De la Brettone, L. Jr. and J. Avault, Jr. 1976. Egg development and management of *Procambarus clarkii* (Girard) in a south Louisiana commercial crawfish pond. Third International crayfish symposium, Kuopio, Finland, 3:133-140.
- and J.W. Avault, Jr. 1971. Liming increases crayfish production. *Louisiana Agriculture*, 15(1):10.
- , J. W. Avault Jr. and R. O. Smitherman. 1969. Effects of soil and water hardness on survival and growth of the red swamp crawfish, *Procambarus*

- clarkii* in plastic pool. Proceedings of 23rd. Annual conference of the southeastern associations of game and fish commissioners, 626-633.
- Dendy, J.S. 1978. Preliminary experiment with photoperiod to influence crawfish spawning. *Aquaculture* (15): 379-382.
- Denise Re Araujo A. 1985. Crecimiento y sobrevivencia de *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea:Decapoda) con diferentes temperaturas y dietas isocalóricas. *Ciencias Marinas, México*. 11(2):39-68.
- Derelle, E. 1989. Etude des protéines spécifiques de la reproduction chez le crustacé décapode *Macrobrachium rosenbergii*, à l'aide des anticorps monoclonaux. Thèse de Doctorat, Université de Paris VI.
- , J. Grosclaude, J.-J. Meusy, H. Junera, M. Martin. 1986. ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody, *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B:1-4.
- De Vlaming, V. L.; H. S. Wiley; G. Delahunty and R. A. Wallace. 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 67 B: 613-623.
- De Vlaming, V. G.; Grossman and F. Chapman. 1982. On the Use of the Gonadosomatic Index. *Com. Biochem. Physiol.* 73(1): 31-39.
- Drach, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. océanog.*, 19:103-391.
- Dubé, P. and B. Portelance. 1992. Temperature and photoperiod effects on ovarian maturation and egg laying of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Aquaculture*: 102:161-168.
- Durliat, M. and R. Vranckx. 1982. Proteins of aqueous extracts from the hepatopancreas of *Astacus leptodactylus*. 1.- Changes in proteins during the molt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 155-163.
- Duronslet, M. J.; A. I. Yudin; R. S. Wheeler and W. H. Clark Jr. 1975. Light and fine structural studies of natural and artificially induced egg growth of Penaeid shrimp. *Proc. World Mariculture Society*, 6: 105-122.
- Eastman-Reks, S., and M. Fingerman. 1985. In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *J. Exp. Zool.*, 233: 111 - 116.

- Engelmann, F. 1979. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. In: *Advances in Insect Physiology*, D. Treherne, M. Berridge and V. Wigglesworth eds, Academic Press, London. 14: 49: 107
- Erickson, D. L. , J.E. Hightower and G. D. Grossman. 1985. The relative gonadal index: An alternative index for quantification of reproductive condition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81A:117-120.
- Fainzilber, M., Browdy C., Tom M., Lubzens E. and Applebaum. 1989. Protein synthesis in vitro in cultures of the subepidermal adipose tissue and the ovary of the shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Tissue and Cell*. 21(6): 911-916.
- , M. Tom, S. Shafir, S.W. Applebaum and E. Lubzens. 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in Penaeid shrimp?. *Biol. Bull.*, 183:233-241.
- Fauvel, C. 1981. Étude de l'ovaire de la Crevette d'eau douce *Machrobrachium rosenbergii* (de Man) au cours du cycle de reproduction. Première description de la folliculogénèse secondaire chez un Crustacé Décapode. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 292. Ser. III pp. 547-552.
- , 1986. *Hatcheries techniques: Control of maturation and reproduction*. International workshop on marine crustacean culture development and management, Venecia, 12 pp.
- Felgenhauer and L. G. Abele. 1991. Morphological diversity of decapod spermatozoa pp. 32-341 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York.
- Ferrero, E. A., R. Marzari, A. Mosco and D. Riggio. 1989. Effects of eyestalk ablation on vitellogenesis and molting in *Squilla mantis*. *Aquaculture.- A Biotechnonology in Progress*, 517-523.
- Fielder, D. R.; K. R. Rao and M. Fingerman. 1971. A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as revealed by disc electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 291-297.
- Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanism of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 7:1-24.

- France, R. L. 1983. Relationship of crayfish (*Orconectes virilis*) growth to population abundance and system productivity in small alogotrophic lakes in the experimental lakesarea, northwestern Ontario, Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 42: 1096-1102.
- , 1987. Reproductive impairment of the crayfish *Orconectes virilis* in response to acidification of lake 223. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44: 97-106.
- Freeman, J. A. and C. K. Bartell. 1976. Some effects of the molting-inhibiting hormone and 20-hydroxiecodysonone upon molting in grass shrimp *Palaemonetes pugio*. General and Comparative Endocrinology 28:131-142
- Fyffe, W. E. and J.D. O'Connor. 1974. Characterization and quantific of a crustacean lipovitellin. Comp. Biochem. Physiol., 47B:851-867.
- Gibson R. and P. L. Barker. 1979. The decapod hepatopancreas. Ocenogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17: 285-346.
- Gonor, J.J. 1972. Gonad Growth in the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) (Echinodermata: Echinoidea) and the Assumptions of Gonad Index Methods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 10:89-103.
- González-Aguilar, J.A. 1995. Indices Gonadosomáticos y análisis trófico de una población de *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda: Cambaridae) de Nuevo León, México. Tesis Inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 53 pags.
- Goyert, J.C. and J.W. Avault, Jr. 1978. Effects of stocking, density and subnature on growth and survival of crawfish (*Procambarus clarkii*) grown in a recirculating cultures system. Proceedings of the ninth annual meeting world mariculture society. 9:731-735.
- Grant, A. and P. A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction: I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. International of Invertebrate Reproduction, 6:259-269.
- Guerao, G., J. Pérez-Baquera and C. Ribera. 1994. Growth and reproductive biology of *Palaemon xiphias* Risso, 1816 (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology. 14: 280-288.

- Haefner, P. A. Jr. and D.H. Spaargaren, 1993. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.): I. weight and volume relationships.- *Journal of Crustacean Biology* 13: 523-531.
- Hanstrom, B. 1933. Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem des Crustaceen II. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 56:387-520.
- Harioğlu, M. M. and I. Türkgülü. 2000. The relationship between egg size and female size in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Aquaculture International*. 8: 95-98.
- Hartnoll, R. G. 1982. Growth. *In*: Abele, L. G. Editor. *The Biology of Crustacea*, Vol. 2: Embryology, morphology and genetics. Academic Press, New York. Pp. 110-196.
- Hazlett, B. A. and D. Rittschof, 1985. Variation in rate of growth in the Crayfish *Orconectes virilis*. *Journal of Crustacean Biology*. 53:341-346.
- Hill, A.M. and D.M. Lodge. 1995. Multi-trophic level impact of sublethal interactions between bass and omnivorous crayfish. *Journal North American Benthological Society*, 14:306-314.
- Hinsch, G. W. 1991. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluids of reptantian decapods, pp. 290-307 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York.
- Hirsch, G. C. and W. Jacobs. 1930. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. II.- Wachstum als primärer factor des Rhythmus eines polyphasischen, organischen Sekretions systems. *Z. Vergl. Physiol.* 12: 524-558.
- Ho, S. 1987. Endocrinology of vitellogenesis. *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. Norris D. O. and Jones R. E. (eds). Plenum Press, N. Y.; 145-169 pp.
- Hobbs, H.H. Jr. 1942. *The crayfishes of Florida*. University of Florida Publications, Biological Science Series, 3(2), 179 pp.



- , 1962. La presencia de *Procambarus clarkii* (Girard) en los estados de Chihuahua y Sonora, México. (Decapoda, Astacidae). Anales del Instituto de Biología. (Universidad Nacional Autónoma de Mexico) 23(1 y 2): 273-276.
- , 1972. Biota of freshwater ecosystems. Identification manual 9: Crayfishes (Astacidae) of North and Middle America. Water Pollution Control Series. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C., USA.
- , 1984. On the distribution of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Cambaridae). Journal of Crustacean Biology, 4:12-24.
- , 1976. Crawfishes (Astacidae) of North and Middle America. Water Pollution Control Research Series. U. S. Environmental Protection Agency. Pp. 1-73.
- , 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae and Parastacidae). Smithsonian Contributions to Zoology, 180:391-413.
- and L. J. Marchand. 1943. A Contribution toward a knowledge of the crawfishes of the Reelfoot Lake area. Journal of the Tennessee Academy of Sciences 18(1): 6-35.
- Hobbs, H.H.III. 1993. Trophic relationships of North American freshwater crayfishes and shrimps. Milwaukee Public Museum, Contributions in Biology and Geology, 85: 110 pp.
- , J.O. Jass and J.V. Huner. 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda: Cambaridae). Crustaceana, 56:299-316.
- Hopkins, P. M. 1983. Patterns of serum ecdysteroids during induced and uninduced proecdysis in the fiddler crab *Uca pugilator*, General and Comparative Endocrinology, 52:350-356.
- Hoque, M., A. Takemura and K. Takano. 1998. Annual changes development and serum vitellogenin level in the rabbitfish *Siganus canaliculatus* (Park) in Okinawa, Southern Japan., Fisheries Science., 64: 44-51.

- Hori, S., T. Kodama and K. Tanahashi. 1979. Induction of vitellogenine synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocr.*, 37 : 306-320.
- Humason, G. L. 1972. *Animal Tissue Techniques*. Third edition. Edit. W. H. Freeman and Company. U.S.A. 641 pages.
- Huner, J. V. 1975. *Observations on the life histories of recreationally important crawfishes in temporal habitats*. *Proceedings of the Louisiana Academy of Sciences*. 38: 20-24.
- 1976. The Biological feasibility of raising baitsized. Red Swamp Crawfish *Procambarus clarkii* (Girard) in Louisiana. *Dissertation Abstracts International*. 36 (7).
- 1978a. Information about population biology for crawfish pond managers in: Annual Meeting of the Louisiana Crawfish Farmer's Association, 12 pp.
- 1978b. Crawfish population dynamics as they affect production in several small, open commercial crawfish ponds in Louisiana. *Proc. of World Mariculture Society, Atlanta*, 619-640 pp.
- 1986. *Australian Crawfish*. *Farm pond Harvest* Vol. 20(3)13-14.
- 1988. *Procambarus* in North America and elsewhere, *Freshwater Crayfish Biology, Management and Exploitation*, Holdich, D. M. and Lowery, R. S. Eds., Croom Helm, London. Pp.239.
- 1990. Biology, fisheries, and cultivation of freshwater crawfishes in the U.S. *Aquatic Sciences*. Vol. 2 (2): 229-254
- 1997. The Crayfish Industry in North America. *Fisheries- American Fisheries Society*. 22: 28-31.
- and J. W. Avault, Jr. 1976a. Sequential pond flooding: A prospective management technique for extended production of bait size crawfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105:637-642.
- and ----- 1976b. The Molt Cycle of Subadult Red Swamp Crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Proceedings of the World Mariculture Society*, 7: 267- 273.
- and J.E. Barr. 1984. *Red Swamp Crawfish. Biology and Exploitation*. The

- Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University, 135 pp.
- and -----, 1991. Red Swamp Crawfish: Biology and Exploitation. Third Edition. Sea Grant No. LSU-11-80-001, LSU Center for Wetland Resources, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- and O. V. Lindqvist. 1991. Special problems in freshwater crayfish egg production 235-246. In: Crustacean production Werner, A. y A. Kuris (Eds.) Vol. 7 Crustacean Issues. A. A. Balkem-Rotterdam-Brookfield.
- , M. Moody and R. Thune. 1994. Cultivation of freshwater crayfishes in North America 5-115. In: Freshwater crayfish aquaculture in North America, Europe and Australia, families Astacidae, Cambaridae and Parastacidae. J. V. Huner (Eds.). Hawort Press. 312 pp.
- , and R. P. Romaine, 1978. Size at maturity as a means of comparing populations of *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea: Decapoda) from different habitats. In: Fourth int. Symp. On freshwater crayfish, Thononles-Bains, France.
- Hunerland, N. and W. Bowers. 1989. Comparative studies on arthropod lipoproteins. Comp. Bioch. Physiol. 92B (1): 137 - 141.
- Janson, J.C. and Rydén L., 1989. Protein purification; principles high resolution methods, and applications. VCH Publishers, Inc. 502 pp.
- Jewett, S. C., N. A. Sloan and D. A. Somerton. 1985. Size at sexual maturity and fecundity of the fjord-dwelling golden king crab *Lithodes aequispina* Benedict from Northern British Columbia. Journal of Crustacean Biology. 5: 377-385.
- Johnson, P. T. 1980. Histology of the blue crab *Callinectes sapidus* -A model for Decapoda. Publishers, New York.
- Jugan, P. and C. Zerbib. 1984. Follicle cell tubular system in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: A route for exchanges between haemolymph and vitellogenic oocytes? Biol. Cell. 51:395-398.
- and D. Soyeux. 1985. Démonstration in vitro de l' inhibition de l' endocytose ovocytaire par un extrait de glande de sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*. C. R. Acad. Sc. Paris, 300 (III):705-709.

- Junera, H., C. Zerbib, M. Martin and J.-J. Meusy. 1977. Evidence for control of vitellogenin synthesis by an ovarian hormone in *Orchestia gammarella* (Pallas), Crustacea, Amphipoda. Gen. Comp. Endocr. 31:457-462.
- Kennelly, S. J. and D. Watkins. 1994. Fecundity and reproductive period, and their relationship to catch rates of spanner crabs, *Ranina ranina*, off the East Coast of Australia. Journal of Crustacean Biology. 14: 146-150.
- Kerr, M.S. 1968. Protein synthesis by hemocytes of *Callinectes sapidus*: A study of in vitro incorporation of <sup>14</sup>C-leucine, J. Cell. Biol. 39:72-73.
- , 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes salpidus*. Dev. Biol., 20:1-17.
- Kessel, R.G. 1968. Mechanisms of protein yolk synthesis and position in crustacean oocytes, Z. Zellforsch 89:17-38.
- Kim, H. R. And S. D. Lee. 1994. Purification and characterization of vitellin-2 from the ovary of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Comp. Biochem. Physiol. 108 B: 135-145.
- King, J. E. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biol. Bull. (Woods Hole). 94(3): 244-262.
- Kulkarni, G. K. and R. Nagabhushanam. 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture., 18: 373-377.
- , L. Glade and M. Fingerman. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Journal of Crustacean Biology, 11:513-522.
- , R. Nagabhushanam, G. Amaldoss, R.G. Jaiswal and M. Fingerman. 1992. In vivo stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), by 5-hydroxytryptamine. Invertebrate reproduction and development. 21 (3): 231-240.
- Kuris, A. M. 1991. A review of patterns and causes of crustacean brood mortality. In: Wenner A. and A. Kuris (eds.) pp. 117-141. CRUSTACEAN ISSUES 7. Crustacean egg production, A. A. Balkema, Rotterdam.

- Kurstak, E. 1985. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull. W.H.O.* 63 (4): 793 - 811.
- La Caze, C. 1976. Crawfish farming. Louisiana Wildlife and Fisheries Commission Bull 7: 1-26.
- Laufer, H., D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C.C. Reuter, L. W. Tsai and D. A. Schooley. 1987. The identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235:202-205.
- Lee, C.Y. and R. D. Watson. 1994. Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin and vitellogenin of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Crustacean Biology*, 14:617-626.
- and -----, 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): Site and control of vitellin synthesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 271:364-372.
- , H. R. Umphrey and R. D. Watson. 1996. Developmental changes in the level of vitellin-immunoreactive proteins in hemolymph and tissues of the blue crab *Callinectes sapidus*: Relation to vitellogenesis. *Journal of Crustacean Biology*, 16:1-9.
- Lee, F. Y. and C. F. Chang. 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117 A (4): 433-439.
- , T. W. Shih and C. F. Chang. 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (Vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin. *General and Comparative Endocrinology*. 108: 406-415.
- Lee, R.F. and D.L. Puppione. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 248:278-289.
- and A. Walker. 1995. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology*, 271:401-412.

- Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica: bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Editorial OMEGA, S. A. Pp. 166 - 167.
- Lodge, D.M., M.W. Kershner and J.E. Aloï. 1994. Effects of an omnivorous crayfish (*Orconectes rusticus*) on a freshwater littoral food web. *Ecology*, 75:1265-1281.
- and J. G. Lorman. 1987. Reductions in submersed macrophyte biomass and species richness by the crayfish *Orconectes rusticus*. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 44:591-597.
- Lowe, M. E. 1960. The female reproductive cycle of the crayfish *Cambarellus shufeldti*: the influence of the environmental factors. *Institute of Biological Sciences*. 8 (6): 157-169.
- Lowery, R. S. and A. J. Mendes. 1977. *Procambarus clarkii* in Lake Naivasha, Kenya, and its Effects on Established and Potential Fisheries. *Aquaculture* 11: 111-121.
- Lui, C. W., B. A. Sage and J. D. O'Connor. 1974. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. *J. Exp. Zool.*, 188:289-296.
- and J. D. O'Connor. 1976. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary II. Characterization of an in vitro incorporation of amino acids into purified subunits. *J. Exp. Zool.*, 195: 41-52.
- and -----, 1977. Biosynthesis of Crustacean Lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *Pachygrapsus crassipes*. *J. Exp. Zool.* 199: 105-108.
- Lipcius R. N. and W.F. Herrnkind. 1987. Control and coordination of reproduction and molting in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Marine Biology*, 96:207-214.
- Lutz, C.G. and W. R. Wolters. 1986. The effect of five stocking densities on growth and yield of the red swamp crawfish *Procambarus clarkii*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 17: 33-36.
- and W.R. Wolters. 1999. Growth and yield of red swamp crawfish *Procambarus clarkii* stocked separately and in combination with white river crawfish *Procambarus zonangulus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 3:394-397.

- Mañanos, E., J. Nuñez, S. Zanuy, M. Carrillo and F. Le Menn. 1994a. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B:217-223.
- ,-----,-----,-----and-----,1994b. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I. Induction, purification and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B:205-216.
- Maitre, J. L., Le Quellec, C., Derrien, S., Tenniswood, M. and Y. Valotaire. 1985. Measurement of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: application to the kinetic analysis of estrogen stimulation in the male. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63 : 982 - 987.
- Mason, J. C. 1970. Eggs laying in the western North American Crayfish, *Pacifastacus trowbridgii* (Stimpson) (Decapoda, Astacidae). *Crustaceana*. 19: 37-44.
- . 1977. Reproductive efficiency of *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in culture. *Freshwater crayfish*. 3: 101-107.
- Maurer, P. and H. Callahan 1980. Proteins and polypeptides as antigens. *Methods in Enzymology*, 70 (2): 49 - 69.
- Medina, A.; Y. Vila; G. Mourente and A. Rodríguez. 1996. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 148. Pp. 63-75.
- Medina-Mantelatto, F. L. and R. Biagi-Garcia. 1999. Reproductive potential of the hermit crab *Calcinus tibicen* (Anomura) from Ubatuba, Sao paulo, brazil. *Journal of Crustacean Biology*. 19: 268-275.
- Mendoza, R. 1987. Caractérisation des stades de maturation d'une crevette péneide (*Penaeus vannamei*): évolution biochimique de l'hémolymphe. D.E.A. d'Océanologie Biologique, Université de Bretagne Occidentale. 29 pp.
- . 1992. Etude de la vitellogenèse et de sa stimulation chez des crevettes Pénéides par des facterus hétérologues et homologues. These de doctorat de L'Université de Bretagne Occidentale. pp. 68-71.

- , 1997. Blue shrimp, *Penaeus stylirostris* nauplii production from wild, cultivated and mixed populations. *Journal of Applied Aquaculture* 7(2):41-50
- and C. Fauvel. 1989. Study of crustacean vitellogenesis by vitellogenin assay: the particular case of a penaeid shrimp, *Europ. Aquac. Soc. spec. publ.*, 10:169-170.
- , J. Guillaume and C. Fauvel. 1993. Homologous ELISA procedure for the determination of penaeid shrimp vitellogenin. *Aquat. living Resour.*, 6:39-48.
- Meredith, S. S. 1952. A study of *Crangon vulgaris* in the Liverpool Bay area. *Proc. Trans. Liverpool Biological Soc.*, 58: 75-109.
- Meusy, J.J. 1963. La gamétogénèse d' *Orchestia gammarella*, Crustacé Amphipode. *Bull. Soc. Zool.*, 88: 197-220.
- , 1980. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in crustacea: A review. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20:1-21.
- , M.F. Blanchet and H. Junéra. 1977. Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarella* Pallas. II. Étude de la synthèse de la vitellogénine ("fraction protéique femelle" de l'hémolymphe) après destruction des organes Y. *General Comparative Endocrinology* 33:35-40.
- and H. Junera. 1979. Analyse préliminaire de la composition en sous-unités polypeptidiques de la vitellogénine et des lipovitellines du crustacé amphipode *Orchestia gammarella*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 288: 1415 - 1418.
- , C. Zerbib, F. Dacheux, M. P. Dubois, M. Martin and R. Pouhle. 1983. Subcellular localization of vitellogenin in crustaceans adipocytes by the unlabelled antibody enzyme method. *Tiss. Cell.* 15:301-310.
- , Junera, H., Cledon, P. and M. Martin. 1983. La vitellogénine chez un Crustacé Décapode Natantia, *Palaemon sarratus* Pennat. Mise en évidence, comparaison immunologique avec les vitellines, site de synthèse et rôle des pédoncules oculaires. *Reprod. Nutr. Develop.*, 23: 625-640.
- and H. Charniaux-Cotton. 1984. Endocrine control of vitellogenesis in malacostraca crustacea pp. 231-241 in: Engels, W., W. H. Clark, A. Fischer,



- P. J. Olive and D.F. Went (eds.) *Advances in invertebrate reproduction* 3. Elsevier Science Publishers, New York
- and G. Payen. 1988. Female reproduction in malacostracan crustacea, *Zoological Sciences* 5:217-266.
- Miltner, M and J. W. Avault, Jr. 1981. Rice and millet as forages for crawfish. *Louisiana agriculture*. 24(3)8-10.
- Milleret, V. 1985. Contribution à l'étude expérimentale de la physiologie femelle de *Palaemonetes varians*. Rapport de D.E.A., Université de Poitiers. 45 pp.
- Mills, B. J., N. M. Morrissy and J.V. Huner. 1994. 217-312 pp. Cultivation of freshwater crayfishes in Australia. *In: J. V. Huner (ed.). Freshwater crayfish aquaculture in North America, Europe and Australia: Families Astacidae, Cambaridae and Parastacidae*. Food Products Press, New York, 312 pp.
- Minagawa, M. and S. Higuchi. 1997. Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae) *Journal of Crustacean Biology*. 17 (1): 70-80.
- Mommsen, T.P. and P.J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. *in: Fish Physiology*. Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds.). Academic Press, London. 347-406 pp.
- Momot, W. T. 1978. Annual production and production/biomass of the crayfish, *Orconectes virilis* in two Northern Ontario lakes. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 96: 202-209.
- , 1984. Crawfish Production. A Reflection of Community Energetics *Journal of Crustacean Biology* 4(1): 35-53.
- 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3 (1): 33-63.
- and P.D. Jones. 1977. The Relationship between biomass, growth rate and annual production in the Crayfish *Orconectes virilis*. *Freshwater Crayfish*, 3:3-31.
- and H. Gowing. 1977. Production and population dynamics of the crayfish *Orconectes virilis* in three Michigan lakes. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34: 2041-2055.

- , ----- and P. D. Jones. 1978. The Dynamics of Crayfish and their role in ecosystems. *The American Midland Naturalist*, 99:10-35.
- and R. P. Romaine. 1981. Use of a Seine to Detect Stunted Crawfish Populations in Ponds, a Preliminary Report. *J. World Mariculture Soc.* 12(2): 384-390.
- Morrissy, N. M. 1974. The ecology of marron *Cherax tenuimanus* (Smith) introduced into some farm dams near Boscabel in the Great Southern area of the Wheatbelt Regions of western Australia. *Fisheries Research Bulletin Western Australia*, 12:1-55.
- , N. M. 1975. Spawning variations and its relationship to growth rate and density in marron, *Cherax tenuimanus* (Smith). *Fish. Bull. West. Aust.* 16: 1-32.
- Muñoz, G., S. Donghi and H. Cerisola. 1990. Vitellogenesis in the crayfish *Rhynchocinetes typus*: role of hepatopancreas in lipid yolk biosynthesis, *Cellular and Molecular Biology.*, 36: 531-536.
- Muñoz-Ortiz, R.. 1993. Eficiencia de asimilación del acocil *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea: Cambaridae) a tres alimentos naturales. Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, UANL, 34 pags.
- Nagamine, C. and A. W. Knigh, 1987. Masculinization of female crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *International Journal of reproduction and development* 11: 77-87.
- Nakagawa, H., A. Salam and S. Kasahara. 1982. Female-specific lipoprotein level in hemolymph during egg formation in freshwater shrimp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48:1073-1080.
- Nakamura, K. 1994. Maturation. In: B. F. Phillips, J. S. Cobb y J. Kittaka (Eds.). *Spiny Lobster Management*. Pp. 374-383.
- Nath, P. and B. Sundararaj. 1981. Induction of vitellogenesis in the hypophysectomized catfish, *Heteropneutes fossilis*: effects of piscine and mammalian hormones. *Gen. Comp. Endocrin.*, 43: 191-200.
- Nelson, K. (unpublished). Scheduling of molting, growth and reproduction in malacostracans crustaceans.

- Nelson R.G. and J. S. Dendy. 1979. Conditions for holding and propagating crawfish brood stock (*Procambarus clarkii*). Proc. World Maricul. Soc. 10:503-509.
- Nicoll, C. 1975. Radioimmunoassay and radioreceptor assays for Prolactin and Growth Hormone: a critical appraisal. Amer. Zool. 15: 881 - 903.
- Norberg, B. and C. Haux. 1988. An homologous radioimmunoassay for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. Fish Physiology and Biochemistry, 5:59-68.
- Nuñez-Rodríguez, J., O. Kah, M. Geffard and F. Le Menn. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. Comp. Biochem. Physiol., 92B:741-746.
- Nuñez, J., E. Bon and F. Le Menn. 1996. Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The Journal of Experimental Zoology; 274
- O'Donovan, P; M. Abraham and D. Cohen. 1984. The ovarian cycle during the intermolt in ovigerous *Machrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. Pp. 347-358.
- Oellerich, M. 1980. Enzyme immunoassays in clinical chemistry: present status and trends. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 18: 197-208.
- Oh, Ch.-W. and R. G. Hartnoll. 1999. Size at sexual maturity reproductive output seasonal reproduction of *Philocheras trispinosus* (Decapoda) in Port Erin Bay, Isle of Man. Journal Crustacean of Biology. 19: 252-259.
- Pacoli, C. Q., J. M. Grizzle and J. T. Bradley. 1990. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 90:353-367.
- Pateraki, L. and E. Stratakis. 1997. Characterization of vitellogenin and vitellin from Land Crab *Potamon potamios*: Identification of a precursor polypeptide in the molecule. The Journal of Experimental Zoology. 279: 597 - 608.
- Paulus, J. E. and H. Laufer. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda: Brachyura). International Journal of Invertebrate Reproduction and Development, 11:29-44.

- Payen, G.G..1974. Morphogènese sexuelle de quelques Brachyours (cyclométopes) au cours du développement embryonnaire, larvaire et postlarvaire, *Bull. Mus. Hist. Nat.*, 209, Zool., 139:201-262.
- , 1980. Aspects fondamentaux de l'endocrinologie de la reproduction chez les crustacés marins. *Oceanis*, 6:309-339.
- Payne, J. F. 1978. Aspects of the life histories of selected species of North American Crayfishes. *The Fisheries Bulletin*. 3: 5-8.
- Pelcastre, V. M. 1996. Desarrollo de Co-extraídos de Pasta de Soya (*Glycine max*) y Subproductos de Carpa Herbívora (*Ctenopharindon idella*) para Nutrición de Bagre (*Ictalurus punctatus*). Tesis de Maestría en Ciencias. F.C.B., U.A.N.L. 76 pp.
- Penn, G.H.. 1943. A study of the life history of the Louisiana red crawfish, *Cambarus clarkii* Girard. *Ecology*, 24:1-18.
- Pennak, R. W. 1953. *Freshwater invertebrates of the United States*. The Roland Press Company, Nueva York. 447-461.
- Perez, L. E. and I. P. Callard. 1993. Regulation of hepatic vitellogenin synthesis in the little skate (*Raja erinacea*): Use of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Experimental Zoology*, 266:31-39.
- Perryman, E. K. 1969. *Procambarus simulans*: Light-induced changes in Neurosecretory cells and in ovarian cycle. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 88:514-524.
- Pharmacia Biotech. 1999. Gel filtration; theory and practice. Sixth edition. Pp.103.
- Picaud, J. L. 1978. Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques des protéines spécifiques femelles de *Porcellio dilatatus*. *C.R. Soc. Biol.* 172: 299 - 303.
- , 1980. Vitellogenin synthesis by the fat body of *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacea, Isopoda), *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 2:341-349.
- and C. Souty. 1980. Démonstration immunohistochimique de la présence de vitellogénine dans le tissu adipeux et l'hépatopancréas du Crustacé Isopode Oniscoïde *Porcellio dilatatus* (Brandt). *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D* 290:123-125.

- Pochon-Mason, J.; G. G. Payen; C. Portemer and F. Chatagner. 1984. Variations of Taurine concentration in the ovaries and hepatopancreas of the females crab *Carcinus maenas* L. (Decapoda: Brachyura) during the different phases of its genital activity. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 7: 127-133.
- Pollock, D. E. 1991. Population regulation and stock-recruitment relationships in some crayfish and lobster populations. *In: Crustacean egg production. Werner, A and A. Kuris (eds.) Vol. 7 Crustacean Issues. A.A. Balken-Rotterdam-Brookfield.*
- Putt, F. A. 1972. *Manual of Histopathological Staining Methods.* John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 335 pp.
- Quackenbush, L.S. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay of black pigment dispersing hormone from the fiddler crab *Uca pugilator*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57:438-444.
- , 1986. Crustacean endocrinology, A review. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 43:2271-2282.
- 1989a. Vitellogenesis in the shrimp *Penaeus vannamei*: in vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B:253-261.
- , 1989b. Yolk protein production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*. 9 (4): 509-516.
- 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp pp. 125-140 in: P. DeLpach, W. J. Dougherty and M.A. Davidson (eds.), *Frontiers in Shrimp Research*, Elsevier, Amsterdam.
- and W.F. Herrnkind. 1981. Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea: Palinuridae): Effect of eyestalk ablation. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A:523-527.
- and -----, 1983. Partial characterization of eyestalk hormones controlling molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology*, 3:34-44.
- , 1994. Lobster Reproduction: A review. *Crustaceana*, 67:82-94.
- , and L.L. Keeley. 1988. Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Biol. Bull.*, 175:321-331.

- Quinitio, E. T., A. Hara., K. Yamauchi., T. Mizushima and A. Fuji. 1989. Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*, Comp. Biochem. Physiol., 94B (3): 445-451.
- , A. Hara, K. Yamauchi and A. Fuji. 1990. Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus mondon*. Invertebrate Reproduction and Development, 17:221-227.
- Rankin, S.M., J. Y. Bradfield and L.L. Keeley. 1989. Ovarian protein synthesis in the south American white shrimp *Penaeus vannamei*, during the reproductive cycle. Invertebrate Reproduction and Development, 15:27-33.
- Reid, D. M. And S. Corey. 1991. Comparative fecundity of decapod crustaceans III. The fecundity of fifty-three species of decapoda from tropical, subtropical and boreal waters. Crustaceana 61: 308-316.
- Riley, G. L. and B. Tsukimura. 1998. Yolk protein synthesis in the rice land tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*, Measured by in vitro incorporation of <sup>3</sup>H-Leucine. The Journal of Experimental Zoology., 281: 238-247.
- Rodríguez-Almaraz, G.A. 1992. Tamaño poblacional, morfometría y crecimiento de *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea: Cambaridae) del área central de Nuevo León, México. Tesis inédita, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, México, 107 pags.
- y G. Campeán- Jiménez. 1991. Crecimiento mensual de *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda: Cambaridae) en condiciones de laboratorio. Publicaciones Biológicas, F.C.B./U.A.N.L., 5:45-48.
- , M. A. Coronado-Magdaleno y E. Campos. 1993. Distribución y Notas Ecológicas de los Acociles (Cambaridae: *Procambarus*) del Estado de Tamaulipas, México. The Southwestern Naturalist 38(4): 390-393.
- and E. Campos. 1994. Distribution and status of the crayfishes (Cambaridae) of Nuevo León, México. Journal of Crustacean Biology, 14:729-735.
- and R. Mendoza-Alfaro. 1997. Biological and ecological notes of *Palaemonetes suttkusi* (Crustacea: Palaemonidae) from Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. The Southwestern Naturalist., 42: 501-504.

- and R. Mendoza-Alfaro, 1999. Crustáceos nativos de agua dulce: conocimiento y utilización. 3ª. Reunión Nacional de Redes de Acuicultura, Cuernavaca, Morelos.
- Rodríguez-Serna, M., C. Carmona-Osalde, M. A. Olvera-Nouoa and J. L. Arredondo-figuero. 2000. Fecundity, egg development and growth of juvenile crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* (Villalobos, 1955) under laboratory conditions. *Aquaculture research*. 31: 173-179.
- Rodríguez-Virgen, I.T. 1999. Ecología poblacional de *Procambarus bouvieri* en la presa Caltzontzin, Uruapan, Michoacán. XV Congreso Nacional de Zoología, Tepic, Nayarit, México, pag. 125.
- Rojas, Y. 1999. Importancia de los caracteres sexuales secundarios en la taxonomía de las especies del subgénero *Austrocambarus* en México. XV Congreso Nacional de Zoología, Tepic, Nayarit, México, pag. 83.
- , F. Alvarez and J.L. Villalobos. 1999. A new species of crayfish of the genus *Procambarus* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) from Veracruz, Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 112:396-404.
- Romaire, R.P. 1986. Water and soil quality criteria for *Procambarid* crawfish farms (red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* and white river crawfish, *Procambarus acutus acutus*). School of Forestry, Wildlife and Fisheries Louisiana State University.
- , 2000. *Procambarid* crawfish aquaculture in forage-based systems. *Aquaculture America 2000*. New Orleans. Pp. 285.
- , J. S. Forester and J. W. Avault. 1976. Length-weight relationships of two commercially important crawfishes of the genus *Procambarus*. Third International Crayfish Symposium, Finlandia.
- , J.S. Forester and J. W. Avault, Jr. 1978. Growth and survival of stunted red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*) in a feeding-stocking density experiment in pool. 4<sup>th</sup>. International Symposium of the International Association of Astacology, France.

- and C. G. Lutz. 1989. Populations dynamics of *Procambarus clarkii* (Girard) and *Procambarus acutus acutus* (Girard) (Decapoda: Cambaridae) in commercial ponds. *Aquaculture*, 81:253-274.
- Sagi, A; I. Khalaila; A. Barki; G. Hulata and I. Karplus. 1996. Intersex red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens): Functional males with pre-vitellogenic ovaries. *Biol. Bull.* 190:16-23.
- Saiag, B., Mustel, J. J. and Y. Croisille. 1979. Female specific protein (Vitellogenin and lipovitellin) in *O. gamarella*: Isolation and identification by means of glutaraldehyde-polymerized antibodies. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B: 285 - 288.
- Sarojini, R; R. Nagabhusanam and M. Fingerman. 1995. Mode of action of the neurotransmitter 5-Hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. An in vivo and in vitro study. *The Journal of experimental zoology.* 271: 395-400.
- Sandoval-Quintero, M. E. and A. Gracia. 1998. Stages of gonadal development in the spotted pink shrimp *Penaeus brasiliensis* *Journal of Crustacean Biology.* 18(4): 680-685.
- Shafir, S., M. Tom, M. Ovadia and E. Lubzens. 1992. Protein, vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biol. Bull.* 183:394-400.
- Shields, J. D. 1991. The reproductive ecology and fecundity of *Cancer* crabs. *In: In: Wenner A. and A. Kuris (eds.) pp. 193-213. CRUSTACEAN ISSUES 7. Crustacean egg production, A. A. Balkena, Rotterdam.*
- Skinner, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle, *Biol. Bull.* 123:635-647.
- , 1985. Molting and regeneration. *In: D. E. Bliss (ed.) The Biology of Crustacea.* 9: 44-146. New York: Academic Press.
- Smart, G. C. 1962. The life history of the crayfish *Cambarus longulus longulus*. *Amer. Midl. Nat.* 68: 83-94.
- Smith, D. G. 1981. Life history parameters of the crayfish *Orconectes limosus* (Ret) in southern New England. *Ohio J. Sci.* 81: 169-172.



- Snyder, D. E. 1983. Fish eggs and larvae. *In*: L. A. Nielsen and D. L. Johnson (eds.), Fisheries Techniques. Bethesda: American Fisheries Society.
- Sommer, T.R. 1984. The biological response of the crayfish *Procambarus clarkii* to transplantation into California ricefields. *Aquaculture*, 41:373-384.
- Somers, K. M. 1991. Characterizing size-specific fecundity in crustaceans. *In*: Wenner A. and A. Kuris (eds.) pp. 357-378. CRUSTACEAN ISSUES 7. Crustacean egg production, A. A. Balkema, Rotterdam.
- Somerton, D. A. and W. S. Mayers. 1983. Fecundity differences between primiparous and multiparous female Alaskan tanner crab (*Chionoecetes w bairdi*). *Journal of Crustacean Biology*. 3: 183-186.
- Soumoff, C. and D. M. Skinner. 1983. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other crustacea, *Biol. Bull.* 165:321-329.
- Souty, C. and J. L. Piccaud. 1984. Effet de l'injection d'une gonadotropine humaine sur la synthèse et la libération de la vitellogénine par le tissu adipeux du Crustacé Isopode marin *Idotea balthica* basteri Audouin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 54: 418-421.
- Spaargaren, H. D. and P. Haefner, Jr. 1994. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II Biochemical relationships. *Journal of Crustacean Biology*. 14 (1): 6-19.
- , and P. A. Haefner Jr. 1998. Quantitative changes during ovarian development in the brown shrimp *Crangon crangon* (L., 1758) (Decapoda-Natantia). *Crustaceana*., 71(3): 247-257.
- Stephens, G. J. 1951. Mechanisms regulating the reproductive cycle in the crayfish, *Cambarus*. I. The female cycle. *Tulane Studies in Zoology*. Pp. 70-83.
- Subramoniam, T. 1991. Chemical and composition of spermatophores in decapod crustaceans, pp. 308-321 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York.
- Suko, T. 1953. Studies on the development of the crayfish. I. The development of secondary sexual characters in appendages. *Science reports of Saitama University*. 1B: 77-96.

- , 1954. Studies on the development of the crayfish. II. The development of the egg-cell before fertilization. *Science Reports of the Saitama University*. 1B: 165-175.
- , 1956. Studies on the development of the crayfish. IV. The development of winter eggs. *Science Reports of the Saitama University*. 2B: 213-219.
- , 1958. Studies on the development of the crayfish. VI. The reproductive cycle. *Science Reports of the Saitama University*. 3B: 79-91.
- Suzuki, S. 1987. Vitellins and Vitellogenins of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Biol. Bull.*, 173:345-354.
- , K. Yamasaki and Y. Katakura. 1989. Vitellogenin synthesis by fat body and ovary in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *General and Comparative Endocrinology*, 74:120-126.
- Talbot, P. 1981. The ovary of the lobster, *Homarus americanus*. I. Architecture of the mature ovary. *Journal of Ultrastructure. Research*. 76: 235-248.
- , C. Thaler and P. Wilson. 1986. Artificial insemination of the american lobster *Homarus americanus*. *Gamete Research*, 14:25-31.
- Tan-Fermin, J. 1991. effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture*, 93:77-86.
- Takemura, A., A. Hara and K. Takano. 1991. Immochemical identification and partial characterization of female-specific serum proteins in white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*. *Environmental Biology of Fishes*, 30:49-56.
- Taketomi, Y. and Y. Kawano. 1985. Ultrastructure of the mandibular organ of the shrimp *Penaeus japonicus*, in untreated and experimentally manipulated individuals. *Cell Biology International Reports*, 9:1069-1074.
- Teisser, G. 1960. Relative growth, 537-560 pp. *In: The Physiology of Crustacea*. Vol. I. Metabolism and Growth (T. H. Waterman, ed. ). Academic Press, New York, 6to. Pp.
- Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Burdon, R. and P. van Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam. 549 pp.

- Tobías- Chavana, J. A. 1991. Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre la muda y el desarrollo gonadal en hembras del cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). Tesis Inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 75 pags.
- Tom M, M. Goren and M. Ovadia. 1987a. Purification and partial characterization of vitellin from ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda, Penaeidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 87B:17-23.
- , ----- and ----- . 1987b. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda, Penaeidae). *Int. J. Inv. Rep. and Dev.*, 12:1-13.
- , M. Fingerman, K. Hayes, V. Johnson, B. Kerner and E. Lubzens. 1992. A comparative study of the ovarian proteins from two penaeid shrimps, *Penaeus semisulcatus* de Haan and *Penaeus vannamei* (BOONE). *Comp. Biochem. Physiol.* 483-490.
- Tsuchida, S. and S. Watanabe. 1997. Growth and reproduction of the grapsid crab *Plagusia dentipes* (Decapoda:Brachyura) *Journal of Crustacean Biology.* 17 (1): 90-97.
- Tsumura, S. and H. Nakagawa. 1989. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 92: 59 - 66.
- and ----- . 1989. Studies on vitellin accumulation in freshwater shrimp, *Palaemon paucidens*. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, 28:7-14.
- Tsukimura, B. and D. W. Borst. 1992. Regulation of the methyl farnesoate levels in the lobster *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 86:287-303.
- Tuma, D. 1967. A description of the development of primary and secondary sexual characters in the banana prawn *Penaeus merguensis*, (Crustacea, Decapoda, Natantia). *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 18: 73 - 88.
- Tyler, C. R. and J. P. Sumpter. 1990. The development of a radioimmunoassay for carp, *Cyprinus carpio* vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8:129-140.

- , 1993. *Electrophoretic patterns of yolk proteins throughout ovarian development and their relationship to vitellogenin in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B:321-329.
- Van Beek, E. V., M.V. Brussel, G. Criel and A. D. Loof. 1987. A possible extra-ovarian site for synthesis of lipovitellin during vitellogenesis in *Artemia* sp. (Crustacea: Anostraca). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 12:227-240.
- Varadarajan, S. and T. Subramoniam. 1980. Histochemical investigations of vitellogenesis of an anomuran crab, *Clibanarius clibanarius*. *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 2: 47-58.
- Vey, A., K. Soderhall and R. Ajaxon. 1983. Susceptibility of *Orconectes limosus* Raff. To the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* 5: 284-291.
- Villalobos-Figueroa, A. 1955. *Cambarinos de la Fauna Mexicana*. (Crustacea: Decapoda) Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México 290 pp.
- , 1982. Decapoda, 215-239 pp. *In*: Hulbert, S. H. and A. Villalobos-Figueroa, A. Decapoda, 215-239. *In*: *Aquatic Biota of México, Central America and the West Indies*. 1982. Hurlbert S. H. and A. Villalobos-Figueroa (eds.). San Diego State University, San Diego, California. 529 pp.
- Villalobos-Hiriart, J.L., A. C. Díaz-Barriga y E. Lira-Fernández. 1993. Los crustáceos de Agua Dulce de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, Vol Esp. (XLIV): 267- 290.
- Vincent, M. L. Ramos and M. Oliva. 1988. Variations quantitatives des pigments caroténoïdes dans l'ovaire et l'hépatopancreas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16 : 431 - 436.
- Voller, A. and D. Bidwell. 1986. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *In*: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose, N., Friedman, H. and J. Fahey (Eds.), American Society for Microbiology, Washington. Ch.17 pp. 99 - 115.

- Waddy, S. L. and D. E. Aiken. 1985. Fertilization and egg retention in artificially inseminated female american lobsters, *Homarus americanus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42:1954-1956.
- Webb, H. M. 1977. Eyestalk regulation of molt and vitellogenesis in *Uca pugilator*. Biol. Bull. 153: 630-642.
- Wiley, H, L. Opresko and R. Wallace. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. Anal. Biochem. 97: 145 - 152.
- Woo-Khoo, H. 1988. Shrimp maturation in captivity: Its control and manipulation. Seafood Asia, 1-37 , Singapore.
- Wyatt, G. and M. Pan. 1974. Insect plasma proteins, Ann. Rev. Biochem. 47:779-817.
- Yamashita, O. and L. S. Indirasith. 1988. Metabolic fates yolk proteins during embryogenesis in Arthropods. Develop. Growth & Differ., 30 (4):337-346.
- Yano, I. 1987. Effect of 17-hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 61: 49-57.
- , 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus* , Marine Biology , 99:547-553.
- and Y. Chinzei. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol., 86B:213-218.
- Yepiz-Plascencia, G., R. Sotelo-Mundo, L. Vazquez-Moreno, R. Ziegler and I. Higuera-Ciapara. 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Bboone. Isolation and partial characterization. Comp. Biochem. Physiol. 181 - 187.
- Zagalasky, P. 1985. A study of the astaxantin - lipovitellelin, ovoverdin, isolated from the ovaries of the lobster, *Homarus gammarus*. Comp. Bioch. Physiol. 80B (3): 589 - 597.
- , E. Eliopoulos and J. B. Findlay. 1990. The architecture of invertebrate carotenoproteins. Comp. Biochem. Physiol. 97B: 1 - 18.
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Third edition. Prentice-Hall, Inc., New Jersaey. 662 pp.

Zerbib, C. 1976. Nature chimique de l'ovocyte en vitellogénèse chez les Ecrevisses *Astacus astacus* et *A. leptodactylus*. *Int. Reprod.*, 1: 289-295.



