

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**Regulación del Crecimiento en Moluscos
Gasterópodos: *Haliotis* sp. y *Lithopoma undosa* y sus
Implicaciones en Acuicultura y Pesquerías**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

RAQUEL PEDRÍN CABALLERO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA MÉXICO, AGOSTO, 2010.

RESUMEN

El presente trabajo versa sobre la regulación del crecimiento en dos moluscos gasterópodos de importancia comercial, *Haliotis* spp. cuya pesquería está en declive y su acuacultura atraviesa por un periodo de consolidación y *Lithopoma undosa*, con una pesquería relativamente nueva y en la cual existe un interés por desarrollar la acuacultura.

El principal objetivo del trabajo fue documentar los mecanismos por medio de los cuales el crecimiento es regulado o afectado desde diferentes niveles de organización: Ecológico, Endócrino y Molecular.

En el primer capítulo se relacionó el porcentaje de cobertura de organismos endolíticos y la relación con el crecimiento de *Haliotis corrugata* en las Islas Benitos B. C. Los resultados mostraron que la cobertura de la concha igual o mayor a 50 % de organismos endolíticos, tiene un impacto en el crecimiento ya que éstos son menores a la talla mínima legal de captura y no pueden ser extraídos para la pesca. Lo anterior tiene repercusiones para la pesquería del recurso en Baja California.

En el segundo capítulo se hizo una revisión sobre la regulación del crecimiento en diferentes organismos que se han utilizado como modelo en el desarrollo y con énfasis en moluscos marinos. Se encontró que el crecimiento es regulado por la ruta de señales de la insulina y que este proceso es conservado en las diferentes especies hasta donde se tiene conocimiento.

En el tercer capítulo se probó el efecto de la insulina en la estimulación del crecimiento de postlarvas de 15 días del caracol *L. undosa*. Se probaron dos condiciones de nutrición las cuales consistieron en la adición de diatomeas y sin la adición de las mismas, y 3 concentraciones de insulina 0.1 U/ml, 1U/ml y 5U/ml. Al término de 48 días de experimentación, 5U/ml de insulina sin la adición de diatomeas causó una mortalidad del 100%; en contraste 0.1U/ml de insulina con la adición de diatomeas favoreció la mayor tasa de crecimiento.

Por último, en el cuarto capítulo se describe el trabajo realizado para la identificación fragmentos de cDNA relacionados con péptidos tipo insulina en ganglios cerebrales de *H. corrugata* y *H. rufescens*, y durante el desarrollo de *H. rufescens*. Se obtuvo un producto de 274 pb a partir de ganglios cerebrales de *H. corrugata*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y 9 fragmentos relacionados con péptidos tipo insulina a partir de músculo y cabeza de *H. rufescens*, mediante la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE). La secuencia del fragmento de 274 pb mostró 100% de similitud con la secuencia de insulina reportada para *Aplysia californica* y estuvo presente en el desarrollo de *H. rufescens* en los estadios de huevo sin fertilizar, larva trocófora y larva veliger.

La identificación de secuencias de cDNA de péptidos tipo insulina en *Haliotis* sp. sugiere que utiliza una ruta conservada de señales en la regulación del crecimiento y que la regulación comienza desde las primeras etapas de vida de *Haliotis* sp.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Posgrado en Oceanografía Costera

**REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN MOLUSCOS
GASTERÓPODOS: *Haliotis sp.* Y *Lithopoma undosa* Y
SUS IMPLICACIONES EN ACUICULTURA Y
PESQUERÍAS**

TESIS

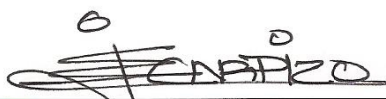
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

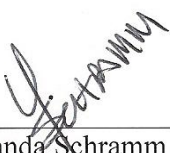
PRESENTA

RAQUEL PEDRÍN CABALLERO

Aprobado por:



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Director



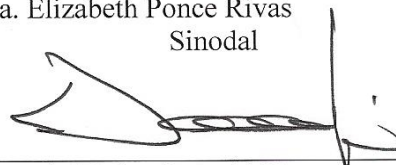
Dra. Yolanda Schramm Urrutia
Sinodal



Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Sinodal



Dra. Roxana Rico Mora
Sinodal



Dr. Luis Walter Daesslé Heuser
Sinodal

Ensenada B. C. México, Agosto 2010.

BIENAVENTURADO EL HOMBRE QUE
HALLA LA SABIDURÍA Y QUE OBTIENE
LA INTELIGENCIA, PORQUE ES MEJOR LA
SABIDURÍA QUE LAS PIEDRAS
PRECIOSAS; Y TODO CUANTO SE PUEDA
DESEAR NO ES DE COMPARARSE CON
ELLA (Pr 3:13,8-11).

DEDICATORIA

A Díos.....

A Ivana, por ser la fuerza que me empujó a iniciar este viaje

A Santiago por ser la fuerza que me ayudó a terminarlo

A mis Padres y Hermanos por ser la sal y pimienta

A la memoria de Jorge de la Rosa....

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través del programa de becas de doctorado.

A la 9na y 11va convocatorias de los proyectos internos de la UABC.

A mi Director de Tesis, Gracias por todas tus aportaciones y consejos, esperanzas y desesperanzas para mejorar este trabajo.....pero más importante aún por tu comprensión, consejos y el apoyo que recibí a nivel personal. Deseo que Dios te conserve siempre así.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones: Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dra. Yolanda Schramm Urrutia, Dra. Roxana Rico Mora y Dr. Luis Walter Daesslé Heuser

Al Dr. Roger P. Croll por su dedicación y colaboración.

Al Dr. Jorge de la Rosa Veléz, por su enseñanza.

Al Dr. Alfredo Salas por proveer las postlarvas de caracol

Al M.C Alberto Gálvez, por su asistencia en la utilización del microscopio invertido.

Al M.C Enrique Vázquez y M.C Leticia Badillo y Productores Marinos S.A de C.V, por proveer larvas y juveniles de 1 año de abulón.

A la Familia Carpizo Lugo por abrirme las puertas de su casa.

A la familia Amador Sáenz, porque encontré buenos amigos.

A Paola y Polo, Gracias por las Pato-aventuras.

A mis amigos, Gerardo-Varinka, Paola-Lum, Polo-Esme, Miki, Linda-Jorge, George, Amayaly-Héctor, Edna y Beto....Por el Risk, Dominó Cubano, Avaricia, el cine, el café, las sangrías, el vino, la comida.....etc.

A mis compañeros de laboratorio Gerardo, Mónica, Dora, Vero, Paola, Juan Carlos, Paola, Polo, Montse, Carlos, Claudia, Luvia, Tatiana, Roberto, Marcos.

Gente del cubo, gracias por hacer más amena la concentración.

Arturo gracias por ayudarme con la figura...no habría artículo sin tu ayuda.

Pao, Amayali, Linda.....Gracias por alivianarme la carga

Madre te amo.....Gracias por el empujón en esta última recta.

Padre.....te amo.

Gracias hermanos por su deseos y porque sé que el silencio fue simplemente compañía.

A Ivana Gracias por tu sacrificio, por tu tolerancia y comprensión...Te amo.

Santiago, por la nueva Ilusión.

A Dios...por todas estas cosas y por permitirme llegar hasta aquí.

CONTENIDO

	Pag.
Contenido.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVO PARTICULARES.....	4
CAPÍTULO I	
EFFECTO DE ORGANISMOS ENDOLÍTICOS EN LA CICATRIZ Y	
CRECIMIENTO DEL ABULÓN AMARILLO <i>Haliotis corrugata</i>	5
1.1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.2 MÉTODO.....	10
1.2.1 Obtención de las muestras.....	10
1.2.2 Correlación entre la talla y la cicatriz muscular en conchas	
sanas.....	10
1.2.3 Análisis estadístico.....	12
1.3 RESULTADOS.....	13
1.3.1 Correlación entre la cicatriz muscular y la longitud de la	
concha en organismos sanos.....	13
1.3.2 Correlación entre el porcentaje de organismos endolíticos y	

las características de las conchas.....	15
1.4 DISCUSIÓN.....	27
CAPÍTULO 2	
¿QUE SE SABE DE LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN MOLUSCOS MARINOS?: REVISIÓN.....	31
2.1 INTRODUCCIÓN.....	31
2.2 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS.....	32
2.3 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN INVERTEBRADOS... ..	35
2.4 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN MOLUSCOS.....	39
CAPÍTULO 3	
ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Lithopoma undosa</i> (antes <i>Astrea undosa</i>) CON INSULINA HUMANA RECOMBINANTE.....	47
3. 1 INTRODUCCIÓN.....	47
3.2 MATERIALES Y MÉTODO.....	50
3.3 RESULTADOS.....	53
3.3.1 Crecimiento.....	53
3.3.2 Supervivencia.....	57
3.4 DISCUSIÓN.....	61
CAPÍTULO 4.	
IDENTIFICACIÓN DEL RNA MENSAJERO DE PÉPTIDOS RELACIONADOS A INSULINA EN <i>Haliotis</i> spp.....	66
4.1 INTRODUCCIÓN.....	66

4.2 MATERIALES Y MÉTODO.....	67
4.2.1 Obtención de las muestras.....	67
4.2.2. Identificación del gen de insulina.....	68
4.2.3 Obtención fragmentos de RNAm de péptidos relacionados a insulina en <i>H. rufescens</i>	70
4.3 RESULTADOS.....	72
4.3.1 Identificación de un fragmento del gen de insulina.....	72
4.3.2 Identificación de la expresión de fragmentos de RNAm relacionados a péptidos de insulina durante el desarrollo de <i>H.</i> <i>rufescens</i>	73
4.3.3 Amplificación del extremo 5'.....	75
4.5 DISCUSIÓN.....	77
DISCUSIÓN FINAL.	
PRINCIPALES APORTACIONES A LA PESQUERÍA Y ACUICULTURA DE MOLUSCOS GASTERÓPODOS.....	79
CONCLUSIONES.....	82
LITERATURA CITADA.....	84

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag.
I	Criterios de evaluación para la clasificación en grupos de las conchas de <i>H. corrugata</i>	12
II	Matriz de correlación de Spearman.	25
III	Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en la amplificación rápida de los extremos del cDNA.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Localización de las islas San Benito.	11
2	Estadios de desarrollo de la cicatriz muscular en conchas sanas.	14
3	Correlación de Pearson's entre la cicatriz muscular y la longitud de la concha en conchas sanas.....	15
4	Porcentaje de organismos sanos e infestados con diferentes estadios de desarrollo de la cicatriz muscular.....	16
5	Relación entre presencia de < 50 % de organismos endolíticos en la concha, la cicatriz muscular y la longitud de la concha.....	18
6	Relación entre presencia de > 50 % de organismos endolíticos en la concha, la cicatriz muscular y la longitud de la concha.....	19
7	Relación entre presencia de < 50 % de organismos endolíticos y la presencia de la banda de CaCO ₃ al borde de la concha.....	20
8	Relación entre presencia de > 50 % de organismos endolíticos y la presencia de la banda de CaCO ₃ al borde de la concha.....	22
9	Relación entre la presencia de epibiontes perforadores, daño a la concha, cicatriz muscular y longitud de la concha.....	23
10	Daños producidos por organismos endolíticos en conchas de <i>H. corrugata</i>	26
11	Ruta de transducción de señales de insulina e IGF-I en mamíferos.....	34
12	Ruta de transducción de señales de insulina en <i>D. melanogaster</i>	36
13	Ruta de transducción de señales de insulina, para <i>C. elegans</i>	38
14	Alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a la superfamilia de insulina de moluscos marinos (Clustal W).....	41
15	Dendrograma que relaciona las secuencias de aminoácidos pertenecientes a la superfamilia insulina de moluscos marinos.....	41
16	Alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a las proteínas Ras de moluscos marinos (Clustal W).	44
17	Dendrograma que relaciona las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las proteínas Ras de moluscos marinos.....	44
18	Comparación de la ruta de señales de insulina en mamíferos, mosca de la fruta (<i>D. melanogaster</i>), nemátodo (<i>C. elegans</i>) y moluscos marinos (este trabajo, 2010).....	45
19	Diseño experimental de la estimulación del crecimiento de postlarvas de <i>Lithopoma undosa</i>	52

20	Crecimiento de poslarvas de <i>Lithopoma undosa</i>	54
21	Tasa de crecimiento específico para postlarvas de <i>Lithopoma undosa</i> en las condiciones nutricionales experimentadas.....	56
22	Supervivencia de postlarvas de <i>Lithopoma. undosa</i> en dos condiciones de alimentación y en presencia de insulina.....	59
23	Supervivencia de postlarvas de <i>Lithopoma undosa</i> con las condiciones de nutrición experimentadas y en presencia de insulina.....	60
24	Supervivencia de postlarvas de <i>Lithopoma undosa</i> con diferentes concentraciones de insulina a través del tiempo de experimentación.....	61
25	Amplificación del fragmento del gen de insulina para <i>Aplysia californica</i> y <i>Haliotis corrugata</i>	74
26	Alineamiento múltiple de secuencias Clustal W.(1.81).....	74
27	Expresión de insulina en el desarrollo del abulón <i>H. rufescens</i>	75
28	Expresión del extremo 5' de los transcritos de péptidos relacionados a insulina de <i>H. rufescens</i> en juveniles de un año.	76

INTRODUCCIÓN

La sobreexplotación de los bancos naturales de abulón (*Haliotis* spp.) ha ocasionado que las poblaciones naturales hayan disminuido teniendo como consecuencia una escasez en la disponibilidad del recurso (Salas y Searcy, 1992, Rodríguez *et al.*, 2002.). Por otro lado el lento crecimiento de *H. corrugata* limita la recuperación de las poblaciones naturales que actualmente padecen de organismos endolíticos, que perforan la concha y no alcanzan la talla mínima de captura (Caballero *et al.*, 2004). Como recurso similar al abulón, existe en Baja California, la pesquería del caracol *Lithopoma undosa*, la cual es relativamente nueva con respecto a la del abulón y la especie tarda entre 5.5 y 9.5 años para alcanzar la talla comercial (Gluyas-Millán *et al.*, 1999; Gluyas-Millán *et al.*, 2000). Estudios durante la última década realizados por Rodríguez *et al.*, (2002); revela que, aun para esta pesquería del caracol, existen zonas con indicios de sobreexplotación al no encontrarse organismos con la talla mínima comercial

Los estudios sobre el desarrollo del caracol *L. undosa*, son recientes debido al creciente interés que ha despertado su cultivo. Sus larvas requieren de 6 a 7 días en alcanzar la competencia (Salas *et al.*, 2009). Comparativamente, el desarrollo embrionario y larval de *Haliotis* spp. tiene una duración de 4 a 7 días y su crecimiento después de la metamorfosis es de 10 a

40 años, pero para alcanzar la talla comercial dura entre 5 y 7 años, (Jaeckle y Manahan, 1989; Leet *et al.*, 2001)).

La sobreexplotación sumada al lento desarrollo de los organismos tiene repercusiones negativas de tipo ecológico y económico. En el sentido económico afecta el desarrollo de las pesquerías y la acuicultura en Baja California. Esta problemática no ha sido resuelta a pesar de diversos esfuerzos como la elaboración de dietas y la optimización de las condiciones de cultivo en abulón (Britz *et al.*, 1994; Flemming *et al.*, 1998; Guzmán y Viana 1998; Rosen *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2001; Durazo y Viana 2001, Correa-Reyes *et al.*, 2009).

Una de las soluciones para incrementar el rendimiento de los cultivos de *Haliotis* spp. es acelerar el crecimiento de los organismos en cautiverio utilizando hormonas de crecimiento de otros organismos, como la hormona de crecimiento recombinante de salmón (Moriyama y Kawauchi, 2004). Otra alternativa a esta opción es manipular los mecanismos que regulan el crecimiento en forma directa en el organismo de interés (*Haliotis* spp. y *Lithopoma undosa*), evitando así el uso de hormonas exógenas.

Antes de lograr manipular los mecanismos que regulan el crecimiento es necesario entenderlo. Aún cuando se han identificado algunos de los genes de las hormonas y factores de crecimiento en moluscos gasterópodos, principalmente péptidos relacionados a insulina, no se ha caracterizado la expresión de los mismos durante el desarrollo. Sin embargo, el uso de insulina en el cultivo y mejoramiento de dietas principalmente en peces ha generado

organismos mas grandes en menor tiempo (Montserrat *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2000).

El entendimiento de la regulación del crecimiento en *Haliotis* spp. y *L. undosa* será útil para abordar problemas de crecimiento en el medio natural de organismos sanos e infestados de abulón, así como la generación de biotecnologías que mejoren el cultivo de estas especies que pertenecen a la misma clase arqueogasterópoda, comparten el mismo hábitat y tienen el mismo tipo de desarrollo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar los factores que regulan y/o afectan el crecimiento en *Haliotis* spp y *Lithopoma undosa*

OBJETIVO PARTICULARES.

1. Relacionar el desarrollo de la cicatriz muscular con la longitud en organismos sanos en *Haliotis corrugata*
2. Relacionar el porcentaje de organismos endolíticos con la cicatriz muscular, la longitud, depositación de bandas de carbonato de calcio y lesiones en la concha de una muestra al azar de las Islas Benitos.
3. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de insulina en el crecimiento y supervivencia de *L. undosa*.
4. Determinar el efecto de insulina en el crecimiento y sobrevivencia de *L. undosa* con diferentes condiciones de nutrición.
5. Identificar la presencia del gen de insulina en el género *Haliotis* spp.
6. Identificar la expresión de los fragmentos de RNAm relacionados a péptidos de insulina durante el desarrollo de *H. rufescens*.
7. Aislar los fragmentos de RNAm relacionados a péptidos de insulina en juveniles de *H. rufescens*.

CAPÍTULO I.

Efecto de Organismos Endolíticos en la Cicatriz y Crecimiento del abulón amarillo *Haliotis corrugata*

1.1 INTRODUCCIÓN

La pesquería del abulón amarillo *Haliotis corrugata*, Gray 1828, se encuentra en recuperación después de sufrir un declive causado por la pesca legal, la pesca furtiva y enfermedades en un periodo de más de 100 años (Ponce *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2008;). Es un recurso de alto valor y demanda en el mercado internacional y las dos especies que soportan la pesquería en Baja California son el abulón azul *H. fulgens* y el abulón amarillo *H. corrugata* (Gluyas y Talavera, 2003). Algunas veces las conchas del abulón azul pueden ser tan caras como la carne, sin embargo las conchas del abulón amarillo no tienen esta ventaja por la acumulación de altas densidades de organismos endolíticos, que perforan el nácar (Caballero *et al.*, 2004). Lo anterior impacta de manera directa a la pesquería del abulón amarillo, ya que los organismos con gran cantidad de organismos perforadores en la concha, no alcanzan la talla legal mínima de captura de 140 mm y no pueden ser capturados.

Los organismos endolíticos caracterizados en las conchas de *H. corrugata* y el abulón azul, *H. fulgens*, son almejas perforadoras de los géneros *Lithophaga* y *Penitella*, las cuales afectan considerablemente la estructura de la concha, así como esponjas perforadoras del género *Cliona* spp. Asimismo, se

han encontrado diferentes poliquetos de las familias *Serpulidae* y *Spirorbidae* y del género *Polydora*. Este último, afecta en menor grado la concha de los abulones. Otros epibiontes como algas coralinas, balanos y briozoarios, son comunes en las conchas de abulón y producen un mínimo efecto sobre la estructura de las conchas (Alvarez-Tinajeros *et al.*, 2000).

En las Islas Benitos, la identificación de bancos de abulón amarillo, infestados con epibiontes perforadores con tallas por debajo de la mínima legal fue reportado por Ortiz-Quintanilla (1974). En 1988, el 60% de los abulones capturados estuvieron infestados, y el 96% de los abulones infestados fueron menores a la talla mínima legal de captura. En 1989, el 98% de la captura comercial fueron abulones infestados y el 89% fueron menores a la talla mínima legal de captura. Como consecuencia de esto, de 1990 a 1992, se otorgó un permiso especial para capturar abulones infestados, lo que ocasionó que la abundancia de este tipo de abulones infestados disminuyera y la contribución de éstos a la captura comercial se redujo del 40% al 4%. Sin embargo en un muestreo del 2001, la abundancia de los abulones infestados se incrementó nuevamente hasta el 57% (Caballero *et al.* 2004).

La concha es una característica de los moluscos y sus funciones son la de brindar protección mecánica contra los depredadores y como soporte para los órganos internos. Se considera que la diversificación de las conchas de los moluscos ocurrió en el Cámbrico temprano y actualmente la evolución de las conchas y los mecanismos que las forman siguen siendo tema de debate

(Takeshi *et al.*, 2009). La concha de los moluscos es ensamblada extracelularmente con CaCO_3 y macromoléculas orgánicas (proteínas, glicoproteínas, lípidos y polisacáridos) que son secretados por el epitelio del manto (Jackson *et al.*, 2006).

La concha inicial del abulón es la protoconcha, una estructura semi-espiral que protege a la larva veliger y está compuesta de aragonita con una fina y homogénea estructura granular formada durante la fase planctónica. En *Haliotis asinina*, los primeros eventos de mineralización ocurren poco después de la eclosión, con la fabricación de la concha larval (protoconcha), lo que ocurre dentro de un periodo de 10 horas. Estas estructuras permiten a la larva veliger retraerse completamente en un ambiente protector y migrar verticalmente en la columna de agua (Shepherd *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 2007).

Después del asentamiento la concha juvenil se desarrolla la protoconcha con una estructura distinta (teloconcha). El crecimiento subsecuente genera tres diferentes capas en la concha. La capa externa es llamada periostraco, después una capa prismática de calcita, aragonita ó ambas, y una capa interna nacarada de aragonita en la cual se encuentran los anillos de la estructura prismática. Además, el incremento del crecimiento en el margen anterior de la concha, se incrementa en grosor por la depositación periódica de capas alternas de aragonita y material prismático. El periostraco es una membrana orgánica de 0.1-0.2 μm de grosor que protege la concha y provee una base sobre la cual las capas interiores son depositadas. La capa prismática exterior es de especial interés porque muestra variaciones mineralógicas entre

especies. La capa interior esta compuesta de una hoja, formada por una película de nácar con una única estructura laminada. Las tabletas de aragonita son de 0.5 a 1 μm de grosor y están colocadas o dispuestas en una matriz de material orgánico de 50 μm de grosor y muestran secciones verticales de manera apilada simulando una estructura de pared-ladrillo (Shepherd *et al.*, 1995; Shepherd y Avalos, 1997).

La concha del abulón sirve como refugio a otros organismos como almejas (*Lithophaga*) y esponjas perforadoras (*Cliona*) principalmente. En ocasiones, el daño ocasionado por estos organismos perforadores impide a los abulones alcanzar la talla comercial de captura (Cáceres y Tinoco, 2001).

Los abulones con conchas infestadas de epibiontes perforadores, presentan características diferentes a las conchas normales, por ejemplo, en ocasiones solo tienen un poro respiratorio abierto o los bordes de la concha en la cara ventral carecen de una marca de carbonato de calcio, la cual es un indicador de que la concha se encuentra en crecimiento. En el abulón amarillo, el tamaño de la cicatriz muscular sobre la cara ventral se incrementa a medida que el organismo envejece, por lo tanto, ejemplares sin cicatriz o con cicatriz pequeña, son más jóvenes, que aquellos con cicatrices más grandes y bien definidas. En un intento inicial por asociar la cicatriz a la edad del organismo Caballero *et al.*, (2004) generaron 3 grupos de edades relativas que incluyeron, Juveniles I: ejemplares con conchas que carecen de cicatriz muscular; Juveniles II: organismos que tienen conchas con cicatrices pequeñas, y Adultos:

organismos que tienen conchas con cicatrices grandes y bien definidas (Caballero *et al.*, 2004).

Asimismo, Hansen (1970) determinó el valor de la actividad comensal como una función de edad relativa en conchas de dos especies de abulón, *H. rufescens* y *H. cracherodii*. La talla índice es derivada de la suma del diámetro máximo, el diámetro mínimo y la altura de cada concha. El autor encontró que fue el mejor criterio con el cual pudo clasificar las conchas en una escala indicativa de edades sucesivas. La correlación entre la talla índice y la tasa de infección de estas conchas por *Cliona celata californiana* y *Penitella conradi* fue positiva, sin embargo la correlación fue diferente en ambas especies comensales porque a medida que se incrementó la talla índice, la correlación fue lineal para *Penitella conradi* y logarítmica para *Clione celata*.

Se ha observado que los abulones de talla menor a 140 mm, con alto grado de epibiosis presentan una cicatriz muscular igual a la de los organismos sanos con una talla igual o mayor a 140 mm. Lo anterior indica que la epibiosis afecta el crecimiento del abulón, generando organismos de talla chica pero con características de organismo adultos de mayor edad. El presente trabajo presenta evidencias de la relación entre la talla de los organismos y el porcentaje de epibiosis, con las características de la cicatriz del músculo aductor de organismos adultos. Los resultados indican, que muy posiblemente un alto grado de epibiosis, en particular de las especies que logran penetrar la concha, tienen un efecto en el crecimiento y la talla final que alcanzan los organismos.

1.2 MÉTODOLOGÍA

1.2.1 Obtención de las muestras

Se realizaron un total de 5 muestreos de septiembre de 2006 a junio de 2008 en las Islas Benitos en Baja California, de los cuales se seleccionaron al azar organismos de *H. corrugata*, para analizar el estado de las conchas en relación con el porcentaje de organismos endolíticos y la talla de los organismos (Fig. 1). Las muestras se obtuvieron como parte de los muestreos de evaluación del recurso abulón que realiza el CRIP-Ensenada periódicamente. De cada organismo se obtuvo, la longitud mayor de la concha, el peso total y el peso del músculo. Para cuantificar el porcentaje de organismos endolíticos, la parte exterior de la concha se dividió en cuadrantes y en estos se estimó el porcentaje de cobertura de los organismos incrustados. Asimismo, de la cara ventral, se registró la cicatriz muscular, la presencia de carbonato de calcio y las lesiones generadas en la parte interior de la concha (Tabla I).

1.2.2 Correlación entre la talla y la cicatriz muscular en conchas sanas

Para determinar si existe una correlación entre el desarrollo de la cicatriz muscular y la talla, se analizó una muestra de 192 conchas con menos del 50% de organismos endolíticos a partir de una colección de conchas pertenecientes al CRIP. Se describió y elaboró una escala de las características de la cicatriz muscular, además de estimar la longitud de la concha.

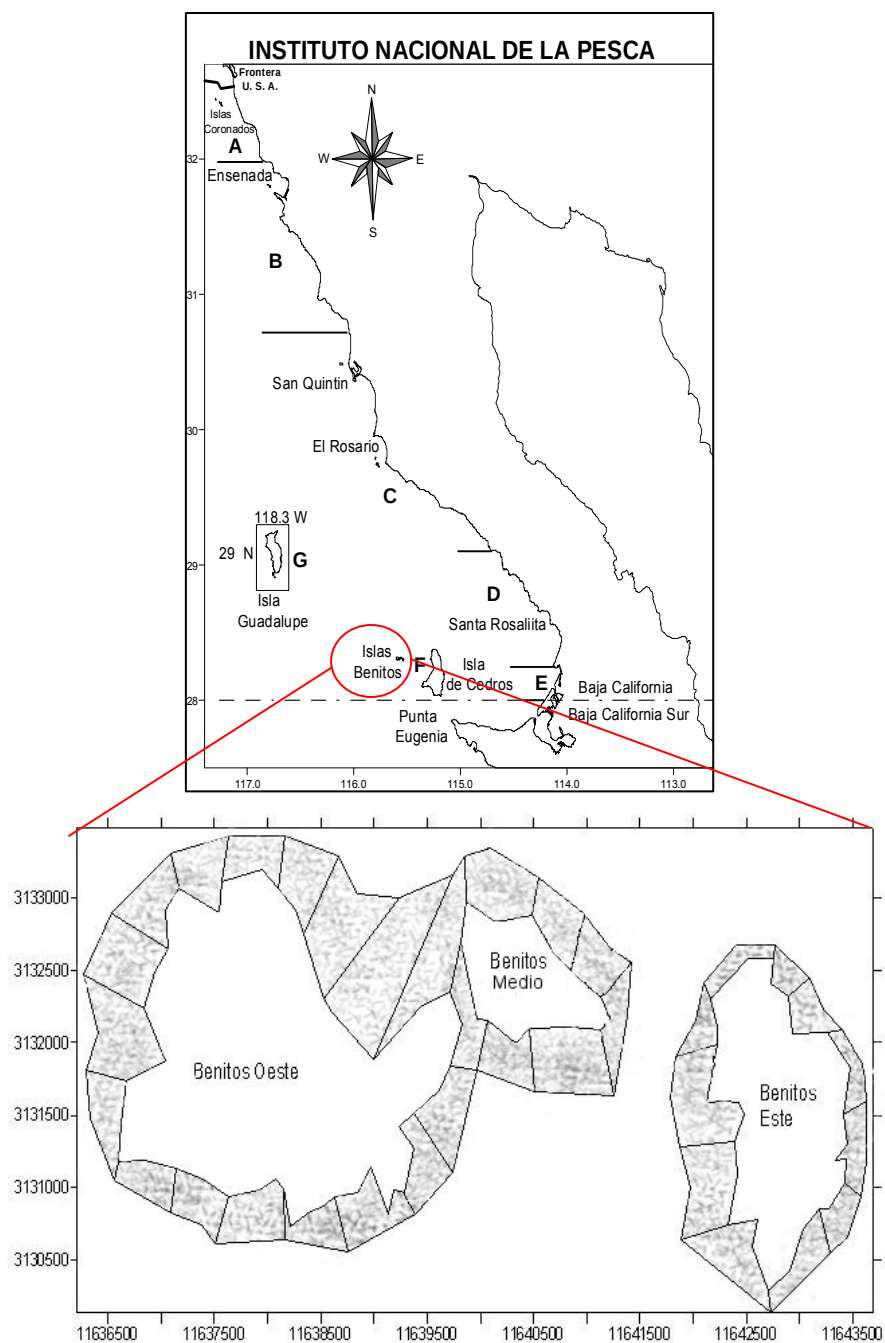


Figura 1. Localización de las islas San Benito. Los polígonos con sombra gris representan los 30 m isobáticos en donde las muestras de *H. corrugata* fueron tomadas al azar (Modificado de Rodríguez y Caballero, 2002).

Tabla I. Criterios de evaluación para la clasificación en grupos de las conchas de *H. corrugata*

Grupo	Código	Criterio
% organismos endolíticos	1	< 50%
	2	> 50 %
Cicatriz Muscular	0	Sin cicatriz
	1	Incipiente
	2	Inmadura
	3	Madura
Talla Legal de Captura (TLC)	4	Vieja
	1	< 140 mm
	2	≥ 140 mm
Banda CaCO ₃	1	Ausencia
	2	Presencia
Lesiones	1	Ausencia
	2	Presencia

1.2.3 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de correlación de Pearson, para comprobar si las características de la cicatriz muscular correspondientes a la escala elaborada, se relacionaban con la talla en conchas de organismos sanos. Para probar la correlación de las características morfométricas en organismos con diferente porcentaje de organismos endolíticos, se hizo una prueba de correlación de Spearman. Los análisis y gráficos se hicieron con la ayuda de los programas SigmaPlot 10.0 y Excel 2007.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Correlación entre la cicatriz muscular y la longitud de la concha en organismos sanos.

Se identificaron cinco grados de desarrollo de la cicatriz muscular y se les asignó un código del 0 al 4 de acuerdo a su apariencia. Cero (0) corresponde a la ausencia de cicatriz y se observó el nácar de color blanco. Uno (1) representa una cicatriz incipiente con vetas color café, 2 representa una cicatriz inmadura con la formación de una mancha de color café con forma de abanico. Tres (3) correspondió a una cicatriz madura, en ella se observaron abanicos superpuestos, con vetas café de apariencia ligeramente rugosa y el área delimitada alcanza la máxima saturación. Cicatriz 4 correspondió a una cicatriz vieja y rugosa en donde múltiples manchas en forma de abanicos están superpuestas y es difícil identificarlas (Fig. 2). La correlación entre los diferentes tipos de cicatriz y la longitud fue significativa (Fig. 3; Pearson, $R=0.815$, $p=8.226E-047$,).

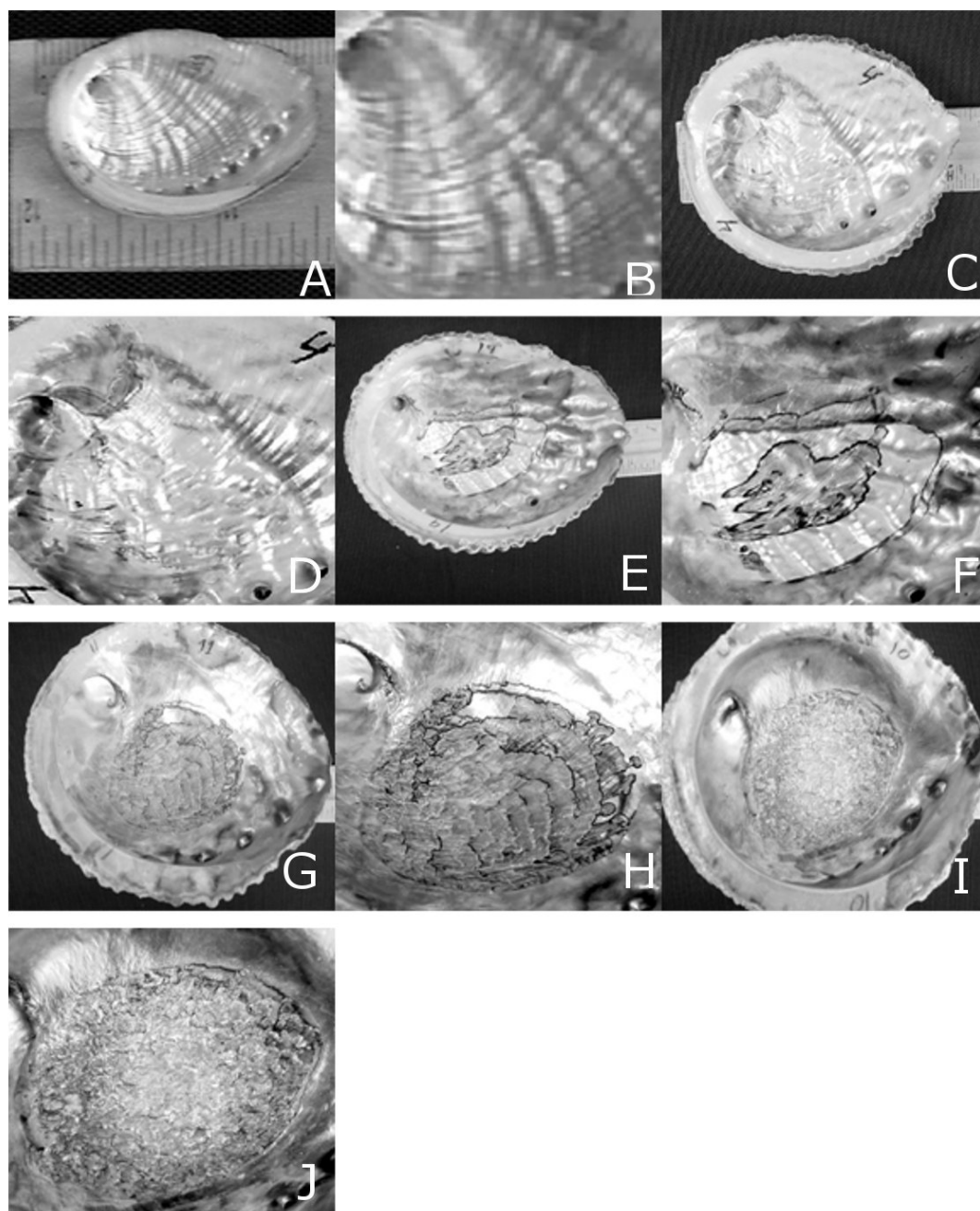


Figura 2. Estadios de desarrollo de la cicatriz muscular en conchas sanas. A-B. Ausencia de cicatriz (0). C-D Cicatriz incipiente (1), E-F, Cicatriz inmadura (2). G-H, Cicatriz madura (3), I-J, Cicatriz vieja (4).

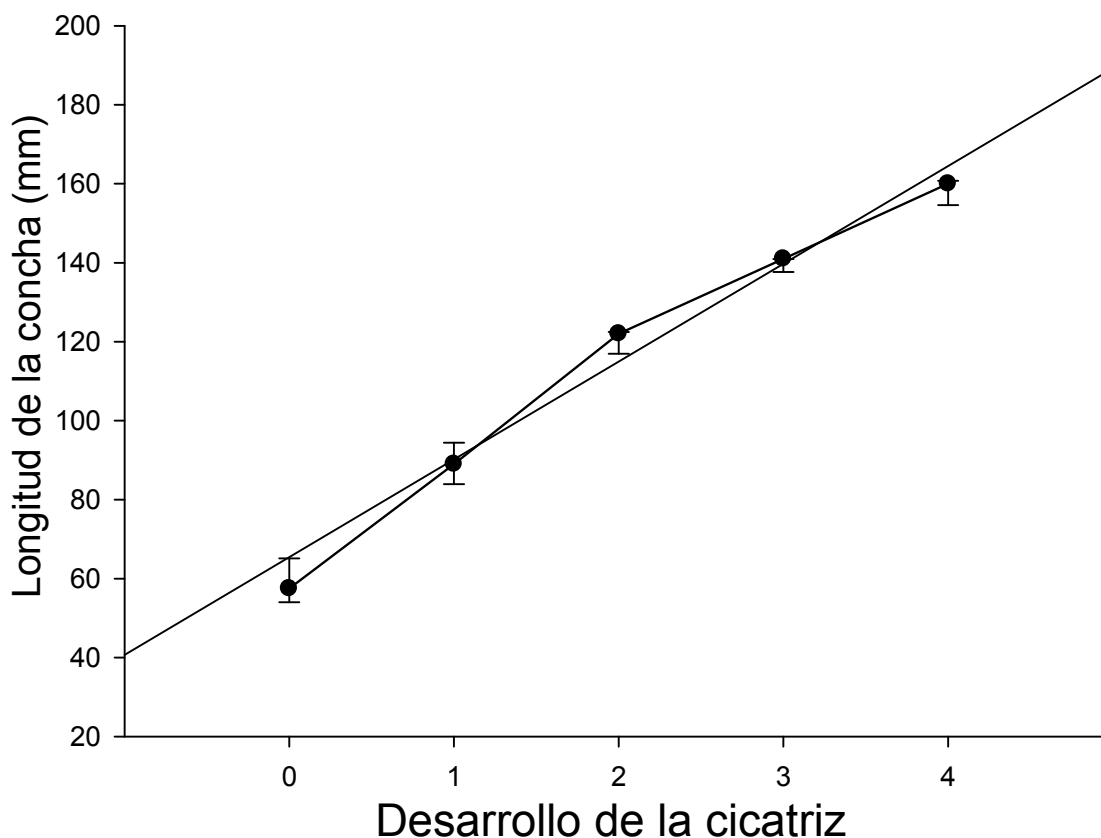


Figura 3. Correlación de Pearson's entre la cicatriz muscular y la longitud de la concha en conchas sanas ($n=192$, $R=0.815$, $p=8.226E-047$). Cada punto corresponde al estadio de desarrollo de la cicatriz. Ausencia de cicatriz (0). Cicatriz incipiente (1), Cicatriz inmadura (2). Cicatriz Madura (3), Cicatriz vieja (4). Las líneas verticales indican el error estándar.

1.3.2 Correlación entre el porcentaje de organismos endolíticos y las características de las conchas

El 49% del total de la muestra ($n = 102$) estuvo representada por conchas con más del 50% de organismos endolíticos (Grupo I, $> 50\%$). El 51 % restante de la muestra estuvo representada por conchas con menos del 50% de organismos endolíticos (Grupo II, $< 50\%$). El grupo II mostró los 5 tipos de cicatriz muscular. La proporción más grande de este grupo (42.3%) presentó

conchas sanas con cicatriz en estadio 3, el 13.46% presentó cicatriz en estadio 4.

El 99% de los abulones que pertenecieron al Grupo I, mostraron cicatriz 4 y sólo el 1 % mostró cicatriz en estadio 3. Prácticamente todos los abulones del grupo I tuvieron conchas altamente infestadas con cicatrices viejas (Fig. 4).

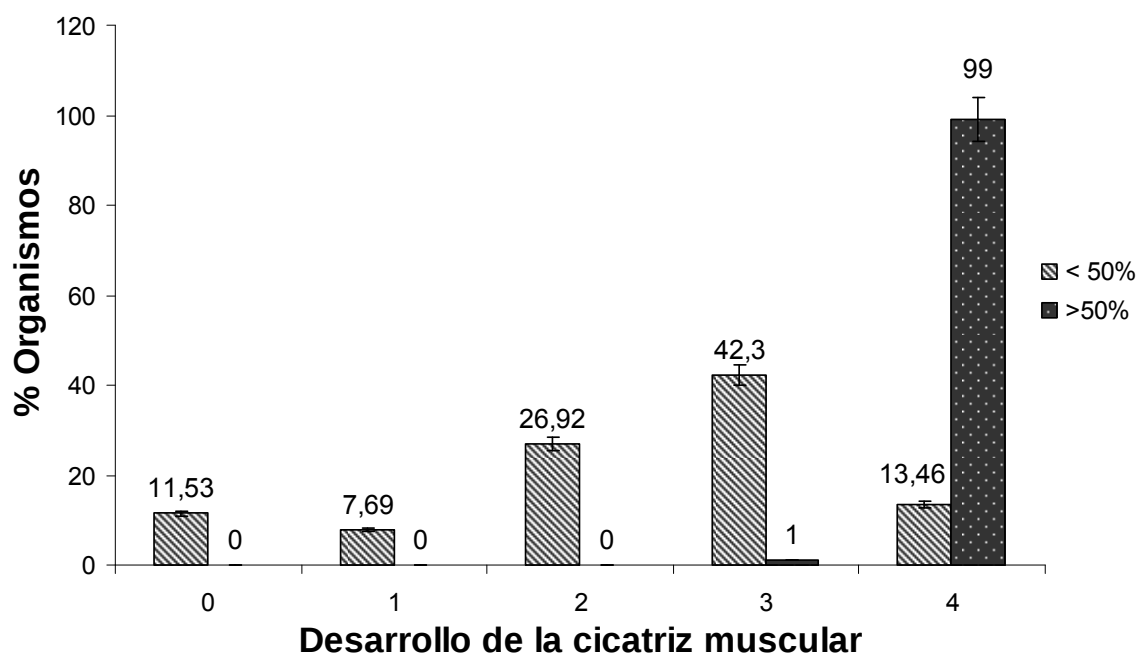


Figura 4. Porcentaje de organismos sanos (barras en líneas gris) e infestados (barras punteada en negro) con diferentes estadios de desarrollo de la cicatriz muscular. < 50% y > 50% representan la proporción de cobertura organismos endolíticos en las conchas. Las líneas verticales indican el error estándar y los números sobre las barras corresponden al porcentaje de organismos.

Conchas menores a la talla mínima legal de captura (TMLC) y con <50% de organismos endolíticos mostraron los 5 estadios de desarrollo de la cicatriz muscular (Fig. 5A). Sin embargo, aquellos con >50% de organismos endolíticos sólo presentaron cicatrices en estadio 3 y 4 (Cabe mencionar que la cicatriz 3 sólo estuvo en un solo organismo que representó el 1% de la muestra, Fig. 6A).

El mayor porcentaje estuvo representado por conchas menores a la talla mínima legal de captura (TMLC) y altamente infestadas (26.46% del total de la muestra, mediana = 120 mm) (Fig. 6B). Conchas mayores a la TMLC con < 50% de organismos endolíticos, (consideradas como sanas) mostraron cicatrices en estadios de desarrollo 2, 3 y 4 (sólo un organismo mostró la cicatriz en estadio de desarrollo 2, Fig. 5B). Conchas con >50% de organismos endolíticos, sólo mostraron cicatrices en estadio 4. Conchas altamente infestadas, con cicatriz en estadio 4 y mayores a la TMLC, representaron el 21.57% del total de la muestra y la mediana de la longitud de su concha fue de 160 mm (Fig. 5B). El 41.17% de las conchas con <50% de organismos endolíticos mostraron la banda de carbonato de calcio con una mediana de 122 mm y el 9.8% no la presentaron (151 mm) (Fig. 7A y 7B).

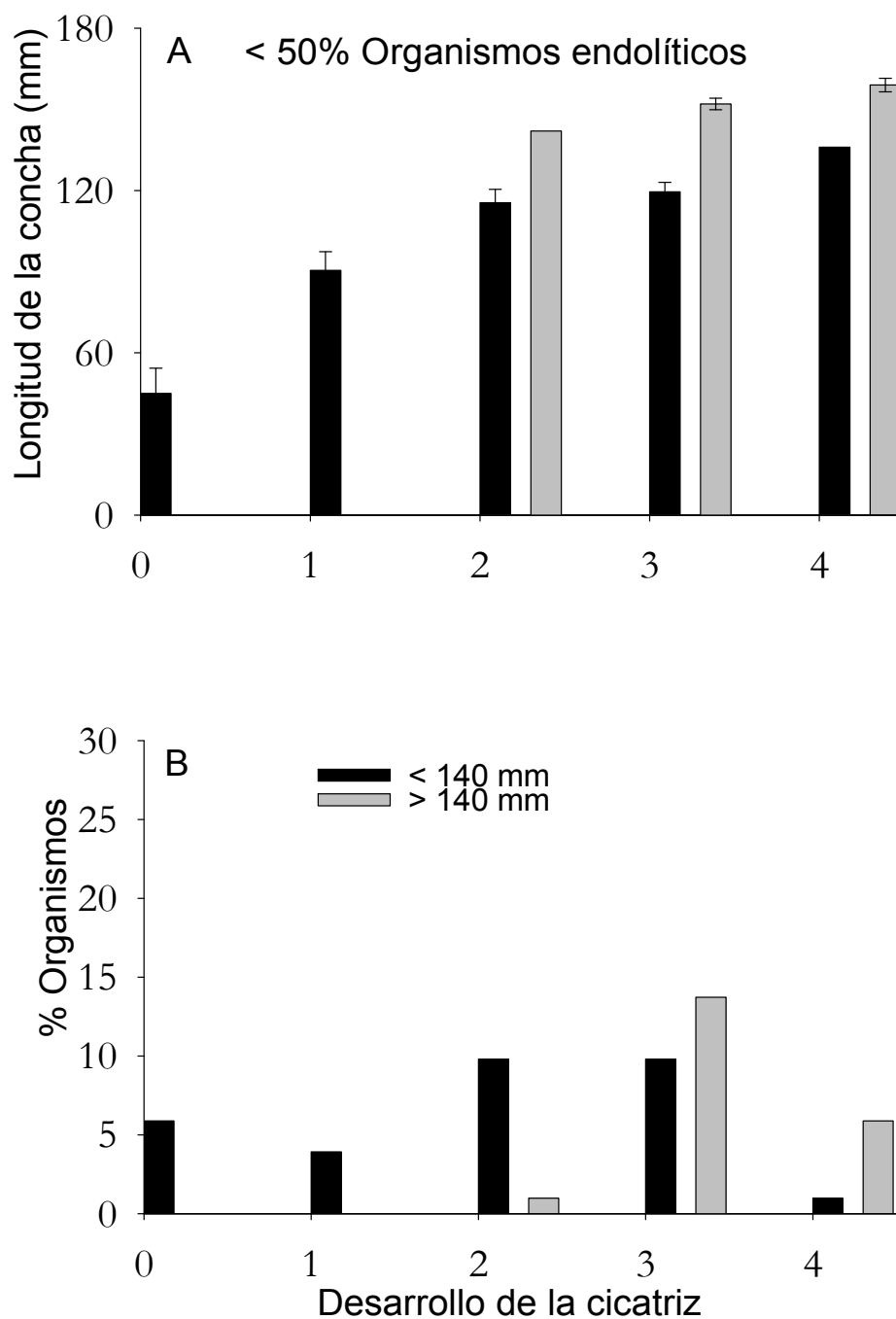


Figura 5. Relación entre presencia de < 50 % de organismos endolíticos en la concha, la cicatriz muscular y la longitud de la concha. 0=ausente, 1=incipiente, 2=inmadura, 3=madura, 4=vieja. A, longitud de la concha y B, porcentaje de organismos. Las barras negras representan conchas menores al TMLC y las barras grises representan conchas mayores a la TMLC. Las líneas verticales indican el error estándar.

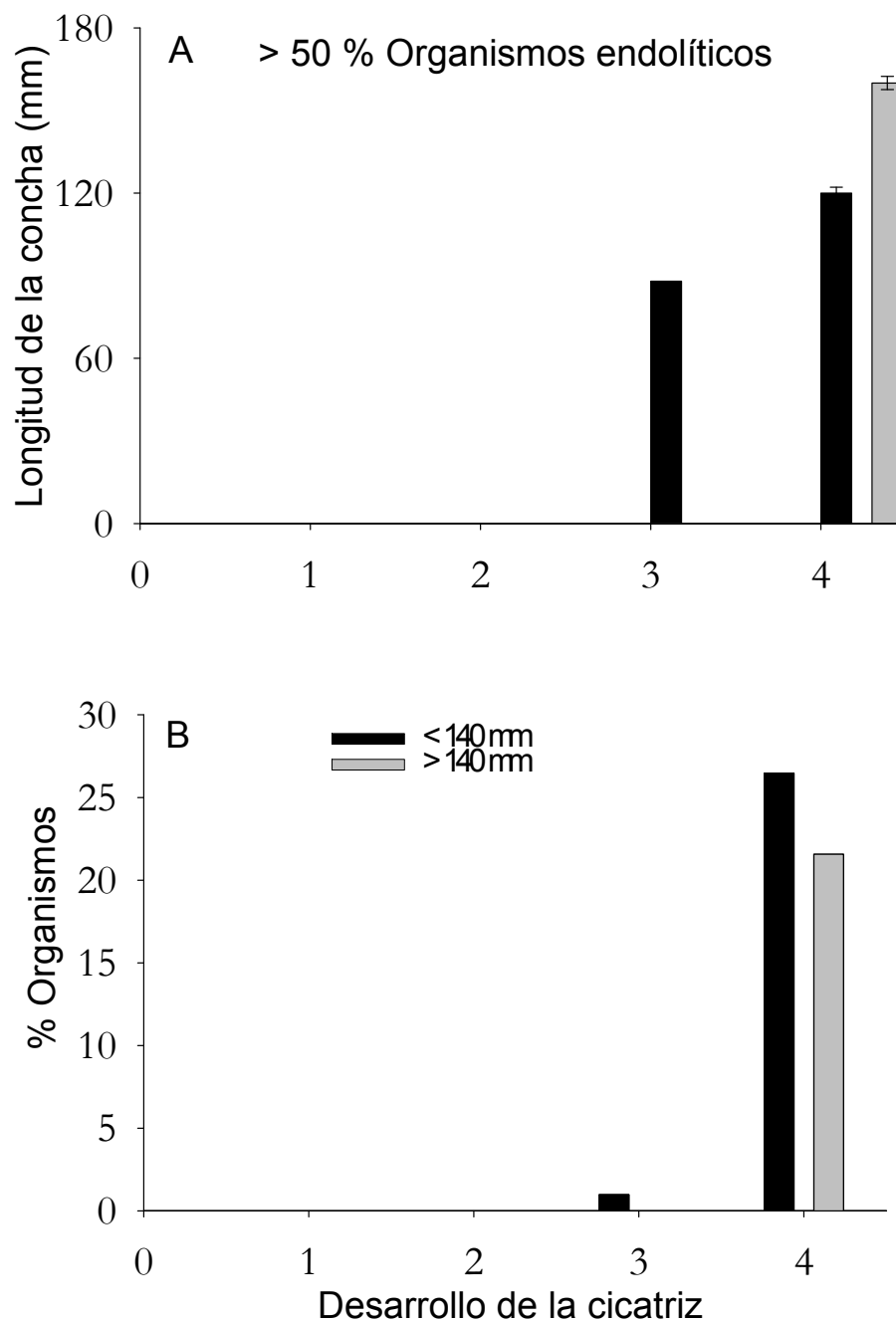


Figura 6. Relación entre presencia de > 50 % de organismos endolíticos en la concha, la cicatriz muscular y la longitud de la concha. 0=ausente, 1=incipiente, 2=inmadura, 3=madura, 4=vieja. A, longitud de la concha y B, porcentaje de organismos. Las barras negras representan conchas menores al TMLC y las barras grises representan conchas mayores a la TMLC. Las líneas verticales indican el error estándar.

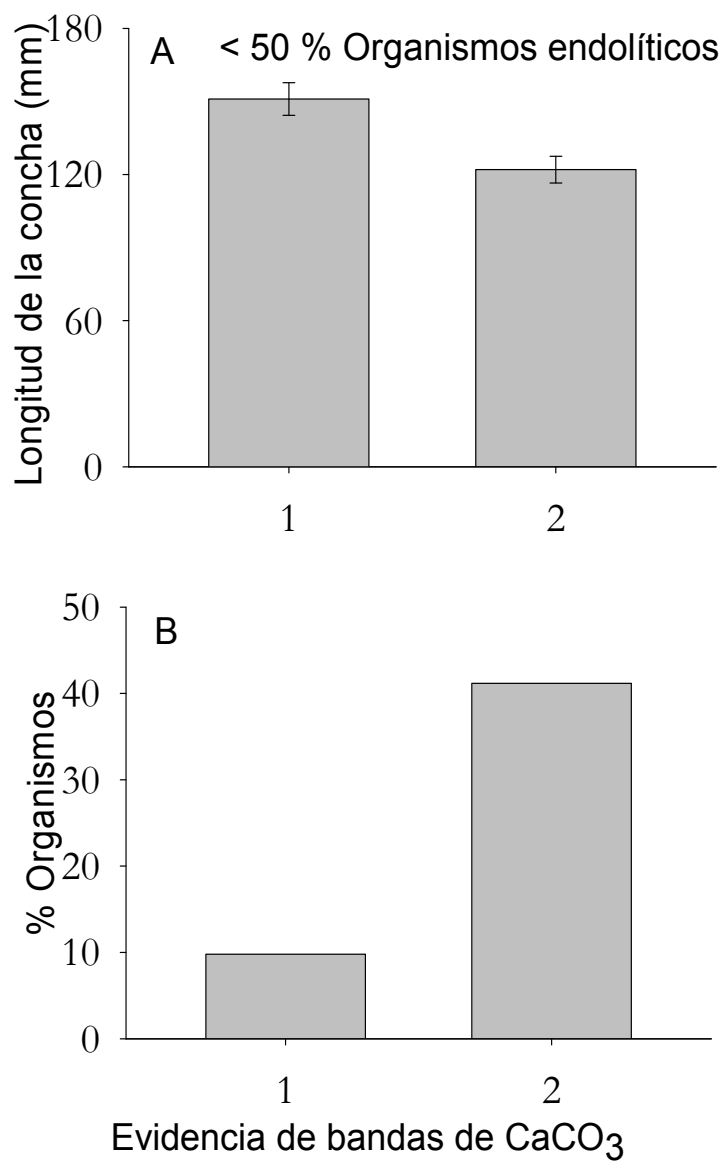


Figura 7. Relación entre organismos endolíticos y la presencia de la banda de CaCO_3 al borde de la concha. A = longitud de la concha; B = % de organismos. Banda 1= ausente, 2= presente. Líneas verticales indican el error estándar.

Las conchas con >50% de organismos endolíticos y que no presentaron la banda de carbonato de calcio tuvieron una longitud de 133 mm, mientras que aquellas que presentaron la banda de carbonato de calcio, midieron 120 mm de longitud (42.15% y 6.8%, respectivamente, Fig. 8A y 8B)

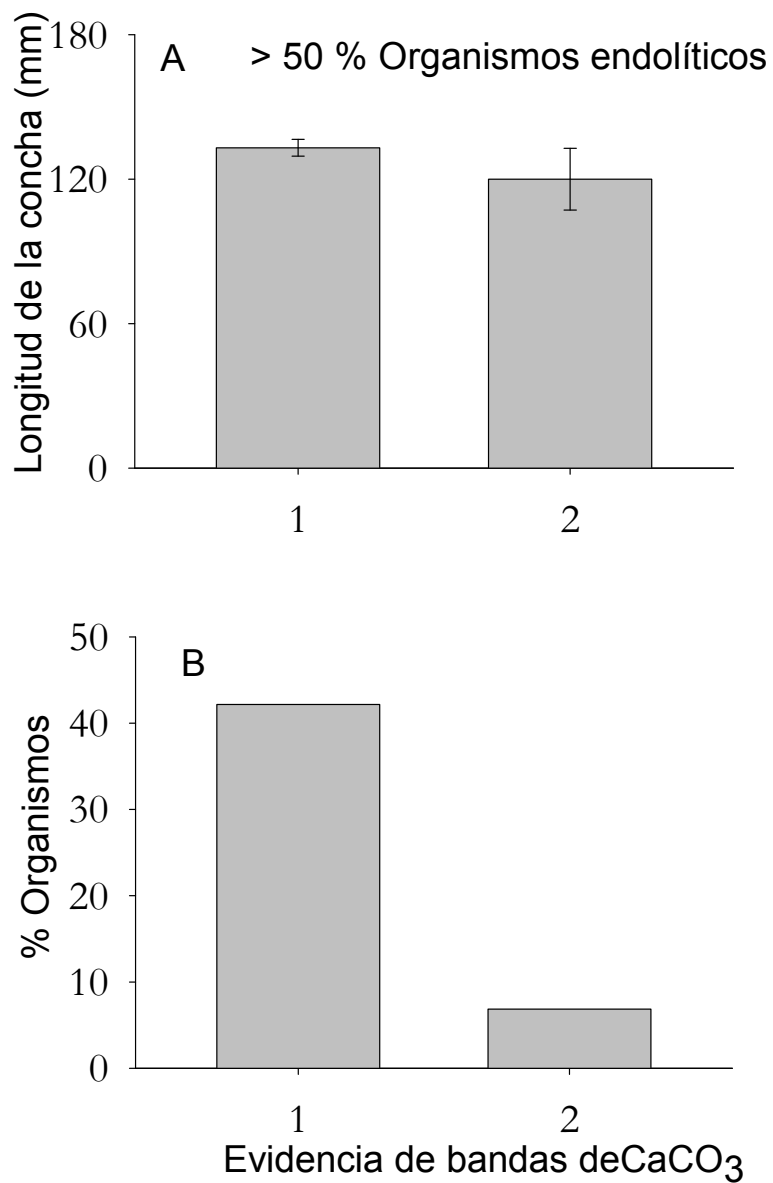


Figure 8. Relación entre organismos endolíticos y la presencia de la banda de CaCO_3 al borde de la concha. A = longitud de la concha; B = % de organismos. Banda 1= ausente, 2= presente. Líneas verticales indican el error estándar.

Algunas de las conchas con >50% de organismos endolíticos presentaron lesiones severas en la cara interna de la concha (ámpulas de nácar y conquiolina) y sólo mostraron cicatriz en estadio de desarrollo 4. La longitud de estas conchas (126.5 mm) fue menor que las conchas sanas sin daño en el nácar y tuvieron cicatriz en estadios de desarrollo 3 y 4 (141 mm y 158 mm, respectivamente); y fueron más pequeñas que las conchas con porcentajes de organismos endolíticos mayores del 50% sin daño en el nácar y con cicatriz muscular en estadio 4 (158mm) (Fig. 9).

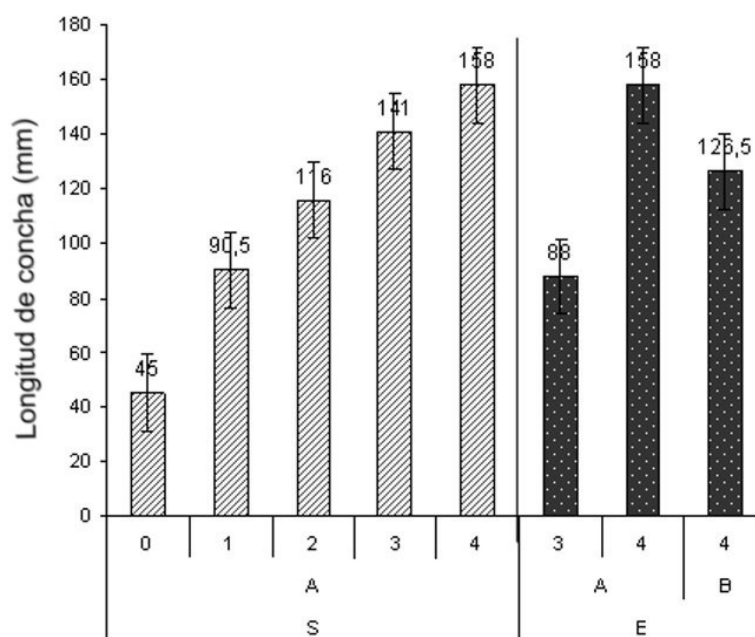


Figura 9. Relación entre la presencia de epibiontes perforadores, daño a la concha, cicatriz muscular y longitud de la concha. S= porcentaje de organismos endolíticos en <50% sobre la superficie de la concha (barras en líneas gris), E= porcentaje de organismos endolíticos en >50% sobre la superficie de la concha (barras punteadas en negro). A= Ausencia de lesión en la concha, B= Presencia de lesión en la concha. Cicatriz Muscular: 0= ausente, 1= incipiente, 2= inmadura, 3= madura, 4= vieja. Las líneas verticales indican el error estándar y los números sobre las barras la mediana de la longitud de la concha de las muestras analizadas.

El porcentaje de organismos endolíticos en la concha, estuvo altamente asociada al desarrollo de la cicatriz muscular (Spearman, $R = 0.817$, $p = 0.000$) (Tabla II). Variables moderadamente asociadas fueron, el porcentaje de organismos endolíticos con las lesiones en la concha (Spearman $R = 0.658$, $p = 0.000$); así como la cicatriz muscular con la longitud de la concha, peso del músculo, peso total y las lesiones en la concha (Spearman: $R = 0.474$, $p = 0.000$, $R = 0.567$, $p = 0.000$, $R = 0.591$, $p = 0.000$ y $R = 0.557$, $p = 0.000$ respectivamente).

Las variables negativamente asociadas fueron la presencia de la banda de carbonato de calcio y el porcentaje de organismos endolíticos y la cicatriz muscular (Spearman: $R = -0.668$, $p = 0.000$, $R = -0.627$, $p = 0.000$, respectivamente).

Tabla II. Matriz de correlación de Spearman. Talla mínima legal de captura. R es el coeficiente de correlación de Spearman, p la probabilidad y n, el tamaño de muestra.

		Porcentaje de organismos endolíticos	Cicatriz Muscular	Bandas de CaCO_3	Lesiones	Logitud de concha	Peso del músculo	Peso Total
TMLC	R	0.0366	0.271	-0.145	-0.202	0.856	0.845	0.848
	P	0.714	0.00600	0.145	0.0414	0.000	0.000	0.000
	n	102	102	102	102	102	80	81
Porcentaje de organismos endolíticos	R		0.817	-0.668	0.658	0.197	0.298	0.326
	P		0.000	0.000	0.000	0.0478	0.00741	0.00304
	n		102	102	102	102	80	81
Cicatriz muscular	R			-0.627	0.557	0.474	0.567	0.591
	p			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	n			102	102	102	80	81
Bandas de CaCO_3	R				-0.362	-0.277	-0.337	-0.363
	p				0.000	0.00499	0.00236	0.000
	n				102	102	80	81
Lesiones	R					-0.0581	0.0442	0.0700
	p					0.561	0.696	0.533
	n					102	80	81
Longitud de la concha	R						0.956	0.968
	p						0.000	0.000
	n						80	81
Peso del músculo	R							0.980
	p							0.000
	n							80

Las lesiones detectadas en las conchas debido a las perforaciones por almejas y *Cliona* sp., fueron ámpulas de nácar y conchas perforadas. Algunas de las conchas con más del 50% de organismos endolíticos, presentaron lesiones severas en la cara interna de la concha, como ámpulas de conquiolina y nácar, y conchas perforadas (Fig 10).

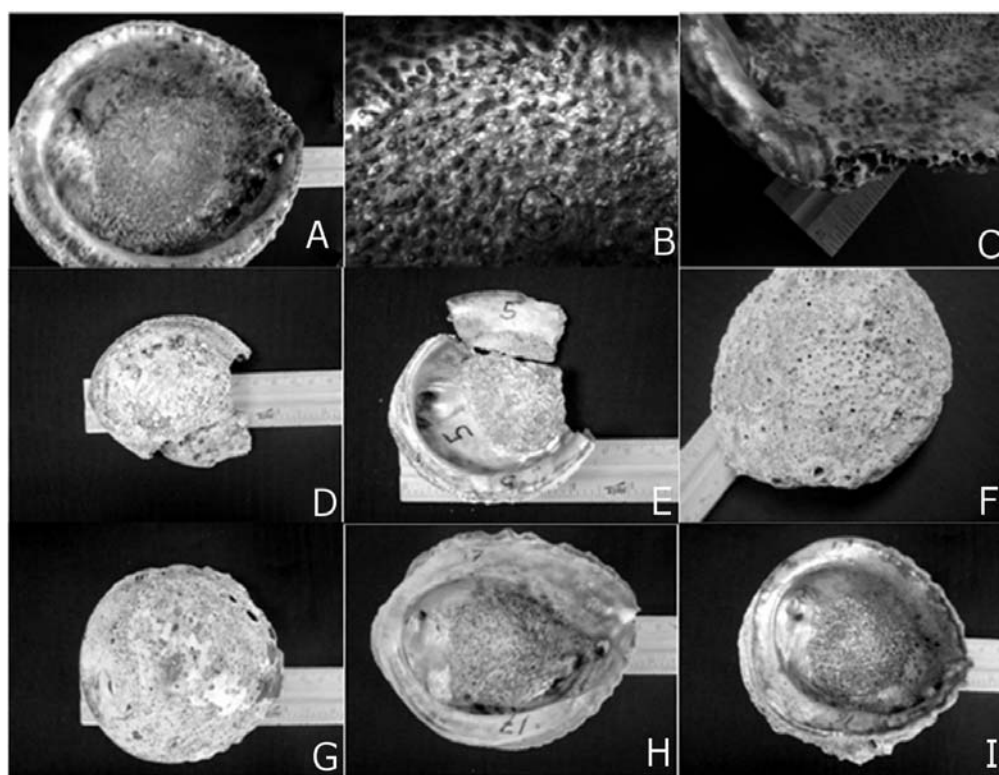


Figura 10. Daños producidos por organismos endolíticos en conchas de *H. corrugata*. A) Concha dañada (160 mm de longitud). B) Acercamiento de ámpulas de nácar. C) Poros derivados de perforaciones. D) Concha con organismos endolíticos en >50% de su superficie (longitud de la concha=102 mm). E) Cicatriz muscular en estadio de desarrollo 4 de la concha mostrada en D. F) Poros respiratorios obstruidos por organismos endolíticos (longitud de la concha 105 mm). G-H. Cicatriz muscular en estadio de desarrollo 4 (longitud de la concha 96 mm). I. Cicatriz muscular en estadio de desarrollo 4 y crecimiento irregular (longitud de la concha barras punteada en negro 109 mm).

1.4 DISCUSIÓN

El análisis de las características de la cicatriz muscular indicó que ésta crece de manera linear con la longitud de la concha en abulones de bancos naturales sanos. En el presente trabajo, se proponen 5 categorías de clasificación para el desarrollo de la cicatriz muscular. Esta nueva caracterización incrementa en detalle el daño de la concha, en comparación con el trabajo previo de Caballero *et al.* (2004). La cicatriz muscular podría ser útil para poder inferir la edad del abulón pero de manera relativa, ya que las perforaciones en la espira interrumpen las líneas de crecimiento y dificultan la lectura.

Los resultados demuestran que los organismos endolíticos afectan el desarrollo de la cicatriz muscular, la longitud de la concha y que tiene repercusiones en la talla mínima legal de captura (TMLC). Esta afirmación está basada en el entendimiento de las características de desarrollo de la cicatriz en organismos sanos, comparados con los organismos altamente infestados con alteraciones en la estructura de la cicatriz muscular.

Las muestras de abulón obtenidas en el presente trabajo, entre 2006 y 2008, presentaron menos conchas infestadas en un 8% en comparación con la muestra obtenida en la misma área por Caballero *et al.*, (2004) en 2001.

La diferencia encontrada podría estar relacionada a los sitios de muestreo. Las muestras colectadas en 2001 fueron en su totalidad de la Isla Benito de En Medio, mientras que las muestras colectadas para el presente estudio fueron obtenidas a lo largo de dos años en las tres islas del archipiélago.

Es muy importante resaltar, que el 99% de las conchas infestadas mostró cicatriz muscular en estadio de desarrollo 4, típica de adultos viejos, pero en este caso correspondieron a adultos de talla pequeña, menor a la de captura.

Estos abulones probablemente permanecen pequeños debido a la energía que tienen que derivar para reparar la concha incluyendo el nácar en la superficie interna. En *H. tuberculata* (Linnaeus, 1758), este proceso implica la producción de gránulos de carbonato de calcio en el tejido conectivo, la generación de células sanguíneas y la activación del sistema inmune para la translocación de CaCO_3 . Se ha estimado que este proceso requiere de al menos 2 meses en organismos adultos (Fleury *et al.*, 2008). La alta concentración de organismos perforadores causa un estrés fisiológico generalizado y una desviación de energía. A medida que la lesión de la concha se incrementa, la proliferación de hemocitos se incrementa, las células madre y los hialocitos declinan, los niveles de glucosa sérica se incrementan, y el glicógeno en tejido y las concentraciones de urea disminuyen (Hendrik *et al.*, 2004).

El abulón amarillo de las Islas Benitos constantemente perforados por organismos endolíticos podría no alcanzar la TMLC por la pérdida de CaCO_3 mediante procesos químicos y mecánicos de bioerosión por esponjas y almejas (Hatch, 1980; Lee-Shing and Pouyan, 1988; Lauren *et al.*, 2005; Shöenberg, 2008;). Además, el incremento de CO_2 en el océano hace que las condiciones sean más corrosivas para los organismos calcificadores como el abulón,

haciendo más difícil para ellos la construcción y mantenimiento de las estructuras de carbonato, con el correspondiente efecto negativo en la pesquería (Pörtner, 2008; Vezina y Hoegh-Guldberg, 2008).

Las lesiones causadas por *Cliona* sp. generan conchas con perforaciones y con poros respiratorios obstruidos. Esto afecta negativamente la expulsión de las excretas y de los gametos y podría requerir un gasto energético adicional, reducir la condición fisiológica y reducir el crecimiento (Nollens *et al.*, 2003). Los abulones enanos o “Petite” pueden ser la expresión de una patología causada por organismos endolíticos (*Cliona*, *Lithopaga* y *Penitella* entre otros), los cuales pueden ser clasificados como parásitos del abulón amarillo.

Hasta el momento no se conoce si la presencia de organismos endolíticos (que afectan evidentemente la estructura y morfología de la concha) también tiene consecuencias directas en la regulación endocrina del crecimiento, fecundidad u otras respuestas fisiológicas del abulón. La información generada en el presente trabajo podría ser un instrumento de apoyo para los tomadores de decisiones en el manejo de la pesquería, ya que las características de la cicatriz de la concha, pudieran relacionarse con zonas de captura en donde la presencia de epibiontes perforadores sea favorecida.

Por otro lado, resulta interesante entender cuáles son las señales ambientales que dirigen a los epibiontes perforadores a asentarse en la concha en esta especie en los sitios de estudio y entender su dinámica temporal y espacial. En el contexto del cambio climático las fluctuaciones sobre la disponibilidad de larvas de los principales grupos de organismos endolíticos,

combinados con otros estresores asociados a anomalías térmicas en el océano podría llevar a periodos de eventos de infestaciones masivas, con periodos donde las larvas son menos abundantes.

El entendimiento de esta dinámica ayudará a tener mejores estrategias en el manejo de la pesquería y un desarrollo apropiado en los programas de conservación para estas especies.

CAPÍTULO 2.

¿Qué Se Sabe de la Regulación del Crecimiento en Moluscos Marinos?: REVISIÓN

2.1 INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos crecen y su crecimiento es el resultado de un incremento en el número y tamaño de sus células. Pero, ¿Cómo son controlados esta proliferación y crecimiento? En la transición a la multicelularidad durante la evolución, las células individuales cedieron el control autónomo sobre si crecer y dividirse, vivir o morir, a un proceso regulado por una variedad de señales intercelulares y la red de rutas de transducción que activan. Por lo tanto la proliferación de una población de células puede ser regulada orquestadamente en respuesta a las señales que reflejan las necesidades del organismo entero, tales como estadios de desarrollo, y condiciones ambientales, debido a que el crecimiento en organismos multicelulares depende de la integración de claves genéticas y ambientales. La hormona insulina y factores de crecimiento tipo insulina juegan un papel crítico en este proceso. Insulina y péptidos relacionados a insulina que tienen homología estructural y funcional, forman la superfamilia insulina que incluye más de 50 péptidos de origen endócrino y neuroendócrino de vertebrados e invertebrados que participan en la regulación del crecimiento, diferenciación, metabolismo y apoptosis. Estas moléculas inician mecanismos de transducción

de señales mediante la unión a receptores tirosina-cinasa (Jia *et al.*, 2004; Moore, 2003; Neufeld, 2003; Claeys *et al.*, 2002; Pertseva y Shpakov, 2002).

2.2 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS

En vertebrados, el sistema endócrino produce la hormona de crecimiento (GH) que juega un papel central en el control del metabolismo y crecimiento. GH es solo un factor en una compleja serie de eventos, los cuales son descritos como el eje somatotrópico. La secreción de GH está bajo un control dual por dos neuropéptidos del hipotálamo, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la cual estimula la liberación de GH y somatostatina (SRIH), la cual tiene un efecto inhibitor. GH ejerce muchas de sus acciones *vía* factores de crecimiento tipo insulina (Insulin-like growth factors : IGF-I y -II), los cuales son liberados de los tejidos blanco en respuesta a GH (Renaville *et al.*, 2002). GH se une a un receptor de la familia citosina, el cual transduce la señal *vía* JAK2 (Janus activated kinase por sus siglas en inglés), el substrato asociado a JAK2 es STAT5 (Signal transducer an activator of transcription por sus siglas en inglés) (Herrington y Carter. 2001; Ribaux *et al.*, 2002).

El factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) e insulina (INS) se unen a receptores con actividad tirosina-cinasa (IR) que fosforila a un substrato denominado IRS (Insulin receptor substrate por sus siglas en inglés), IRS interactúa con fosfatidilinositol-3-OH-cinasa (PI3K) y se inicia la ruta de señales proteín-cinasa B (Akt/PKB). La activación de Akt inicialmente involucra la

conversión rápida del lípido de la membrana plasmática, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.(PIP3) mediante PI3K. PIP3 se convierte en un segundo mensajero que subsecuentemente activa a PDK1 y que a su vez activa a Akt (Fig. 11) (Lant y. Storey, 2010; Claeys et al., 2002).

Akt fosforila diversas moléculas entre ellas FoxO (por sus siglas inglés FOrkhead boX subclase O) el cual detiene el ciclo celular y tiene un efecto negativo en el crecimiento. Estas proteínas son reconocidas como un grupo importante, en el cual su actividad está ligada a rutas de señales de respuesta a estrés oxidativo, proliferación celular, y apoptosis. Los factores de transcripción FoxO son fosforilados en tres sitios, uno de ellos es el sitio de localización nuclear y causa el reclutamiento de la proteína de unión 14-3-3, e inhibe su entrada al núcleo y cambia la conformación de FoxO, lo cual causa la expulsión del factor de transcripción si éste se encuentra en el núcleo. (Burgering BM y Kops GJ., 2002; Jünger *et al.*, 2003; Van der Host y Burgering, 2005; Silhan *et al.* 2009; Graham y Shanley, 2010). Se ha propuesto una ruta de activación alterna de AKT mediante Ack1, una molécula no receptora con actividad tirosina-quinasa, la cual fosforila en el aminoácido tirosina 176, dando como resultado la traslocación al citoplasma en donde es fosforilado por PDK1 y2, permitiendo la activación óptima de Akt-quinasa, para fosforilar a FoxO (Mahajan *et al.*, 2010).

Por otro lado IRS interactúa con una molécula denominada Grb2 (De sus siglas en inglés, Growth factor receptor bound protein-2), La activación de Grb2 promueve la formación de un complejo activo IRS-Grb2-Sos (Son of sevenless).

Este complejo activa la ruta MEK (MAPK/ERK, de sus siglas en inglés Mitogen Activated Kinase y Extracelular regulated kinase), a través de las proteínas Ras (Rat sarcoma) (Fig 11) (Claeys et al., 2002).

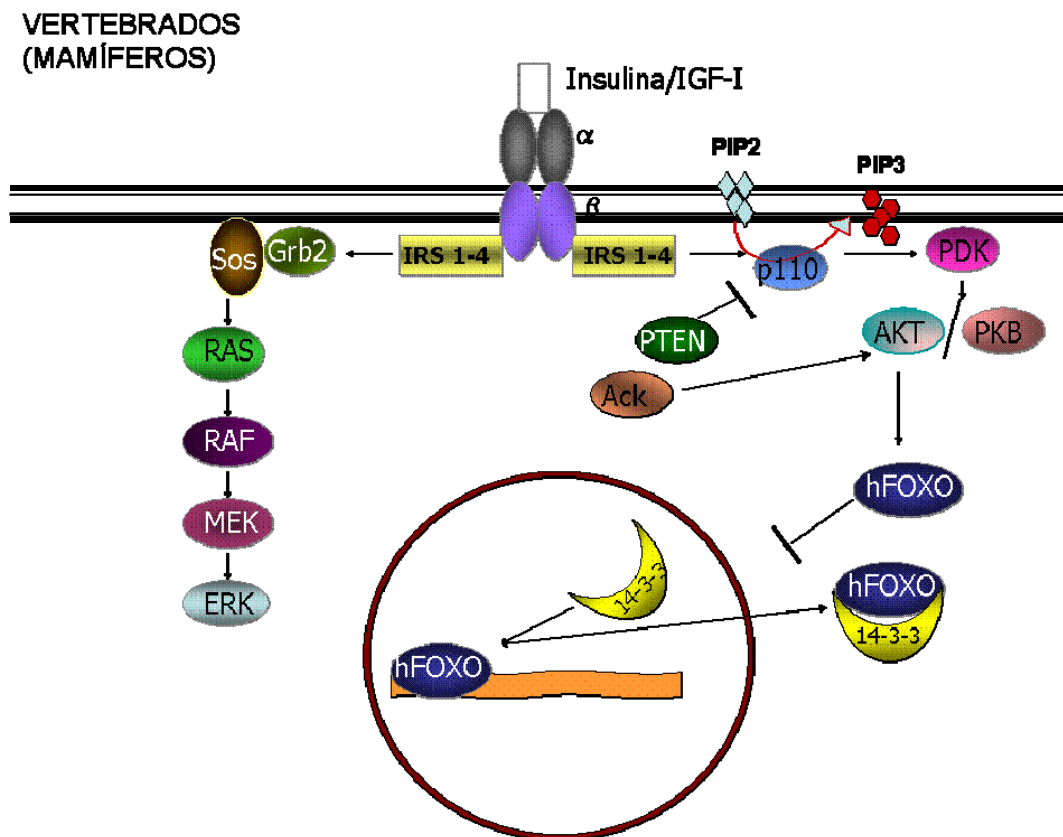


Figura 11. Ruta de transducción de señales de insulina e IGF-I en mamíferos, las moléculas son nombradas de acuerdo con la nomenclatura utilizada para este grupo de vertebrados. Al unirse el ligando al receptor se inicia la cascada de señales mediante el fosfatidil inositol 3-fosfato cinasa por un lado, y por otro lado mediante la ruta de MAPK (De sus siglas en Inglés Mitogen Activated Kinase). IGF-I (Insulin Growth Factor-I), α : Sub-unidad alfa del receptor de insulina, β : Sub-unidad beta del receptor de insulina, IRS 1-4 (Insulin Receptor Substrate 1-4), PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate), PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate), p110 =PI3K ((Phosphatidylinositol-3 kinase), PDK (3'-phosphoinositide dependent kinase) Akt (Protein Kinase B), PTEN (Phosphatase and Tensin homologue), Ack (Activated Tyrosin Kinase), hFoXO (Human Forkhead Box, type O), Grb2 (Growth factor receptor bound protein-2), SOS (Son of sevenless), Ras (Rat sarcoma) Raf (Transforming gene), MEK (MAPK/ERK, Mitogen Activated Kinase y Extracelullar regulated kinase).

2.3 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN INVERTEBRADOS

Los estudios sobre el control del crecimiento en invertebrados se han realizado en organismos modelo como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en los cuales se han caracterizado péptidos tipo-insulina (Insulin-like peptides: ILPs) y péptidos relacionados a insulina (Insulin related peptides, IRPs), respectivamente. Estas moléculas presentan la estructura de insulina de vertebrados, la cual esta bien conservada entre especies y consiste en una cadena polipeptídica A y B unida por puentes disulfuro. El precursor es similar a la insulina encontrada en mamíferos la cual consiste en un péptido señal, una cadena B, un péptido C y una cadena A. Sin embargo el péptido C no es conservado en la evolución animal. *Drosophila* presenta 7 ILPs también denominados DILPs. Los receptores de insulina de *Drosophila* (DIR o Dinr) son similares a los receptores de insulina de humanos (IR) pero los DIR parecen ser más largos ya que tienen 300 aminoácidos más que los IR. La ruta de transducción de señales de insulina de *Drosophila* regula el crecimiento y el tamaño del organismo, el desarrollo embrionario, larval y el crecimiento larval (Fig. 12). Recientemente se demostró que un incremento en la señal de insulina puede acelerar la metamorfosis (Böhni *et al.*, 1999; Leivers, 2001; Shingleton *et al.*, 2005; Walkiewicz y Stern, 2009; Grönke *et al.*, 2010).

Drosophila melanogaster

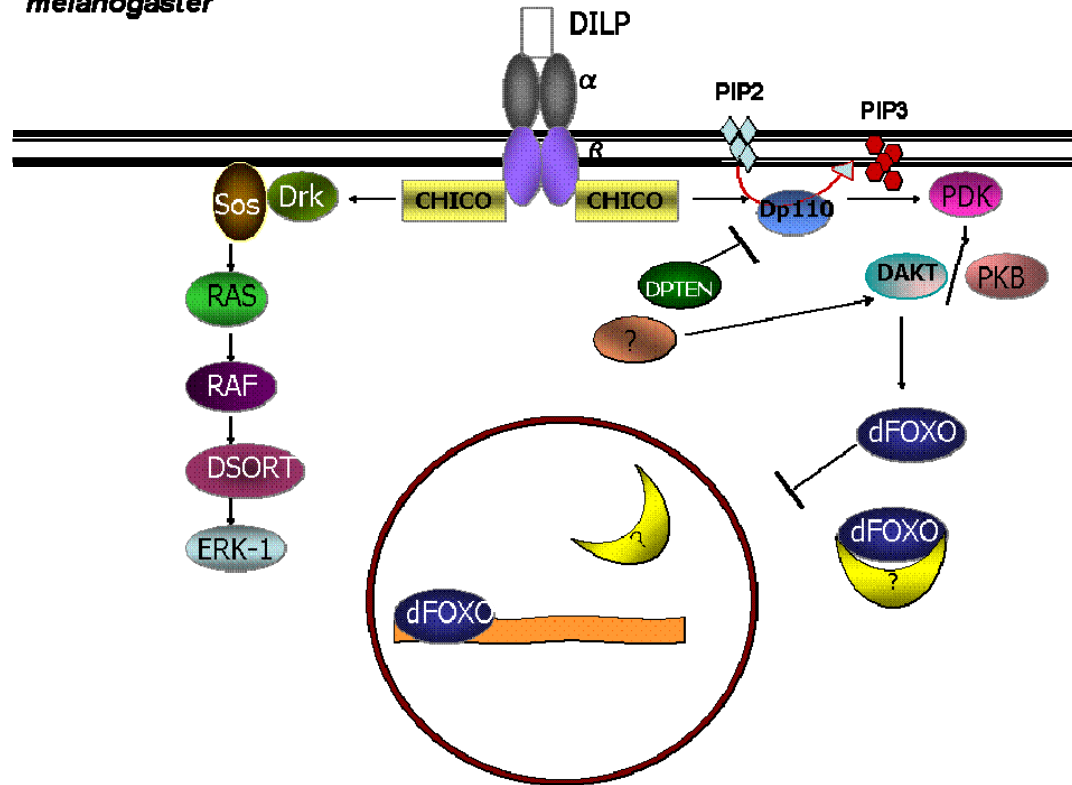


Figura 12. Ruta de transducción de señales de insulina en *D. melanogaster*, las moléculas son nombradas de acuerdo con la nomenclatura utilizada para este organismo modelo. Al unirse el ligando al receptor se inicia la cascada de señales mediante el fosfatidil inositol 3-fosfato cinasa por un lado, y por otro lado mediante la ruta de MAPK (De sus siglas en Inglés Mitogen Activated Kinase). DILP (Drosophila Insulina Like Peptides), α : Sub-unidad alfa del receptor de insulina, β : Sub-unidad beta del receptor de insulina, CHICO (Homólogo de Insulin Receptor Substrate 1-4), PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate), PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate), Dp110 =PI3K (Drosophila Phosphatidylinositol-3 kinase), PDK (3'-phosphoinositide dependent kinase) DAkt (Drosophila Protein Kinase B), DPTEN (Drosophila Phosphatase and Tensin homologue), dFoXO (Drosophila Forkhead Box, type O), Drk (Homólogo de Growth factor receptor bound protein-2), SOS (Son of sevenless), Ras (Rat sarcoma) Raf (Transforming gene), DSORT (Homólogo de MAPK/ERK, Mitogen Activated Kinase y Extracelullar regulated kinase).

C. elegans muestra una particularidad en el precursor de IRP reportado, ya que presenta una organización del péptido señal, una cadena B, un péptido C y una cadena A, como la proinsulina. Sin embargo el péptido maduro presenta una sola cadena como IGF, pero la estructura terciaria de la proteína es similar a la estructura cristalográfica de insulina. Estas características hacen suponer que esta molécula es un híbrido de insulina e IGF. Daf-2 es el receptor homólogo de *C. elegans* que también tiene una gran extensión en el lado carboxi terminal que puede tener una función análoga al sustrato del receptor de insulina reportado en mamíferos (IRS).

En *C. elegans* la respuesta de activación de la ruta de señales de insulina, regula el desarrollo y la longevidad, ya que en condiciones de estrés (sobrepoblación, carencia de alimento y cambios en la temperatura) tiene la capacidad de entrar a un periodo de desarrollo conocido como el estadio “dauer”, en donde el crecimiento es detenido. Al terminar las condiciones de estrés Akt inhibe el estadio dauer fosforilando Daf-16 que actúa como homólogo de hFoxO. En *C. elegans* existe la posibilidad de alternar la señal del receptor de insulina probablemente *via* homólogos de MAPKs, sin embargo, la activación de esta ruta solo se ha documentado en respuesta del sistema inmune y de estrés oxidativo (Fig.13) (Peyssonaux y Eychène, 2001; Claeys *et al.*, 2002; Jia *et al.* 2004; Troemel *et al.*, 2006; Inue *et al.* 2010; Lant y Storey 2010).

***Caenorhabditis
elegans***

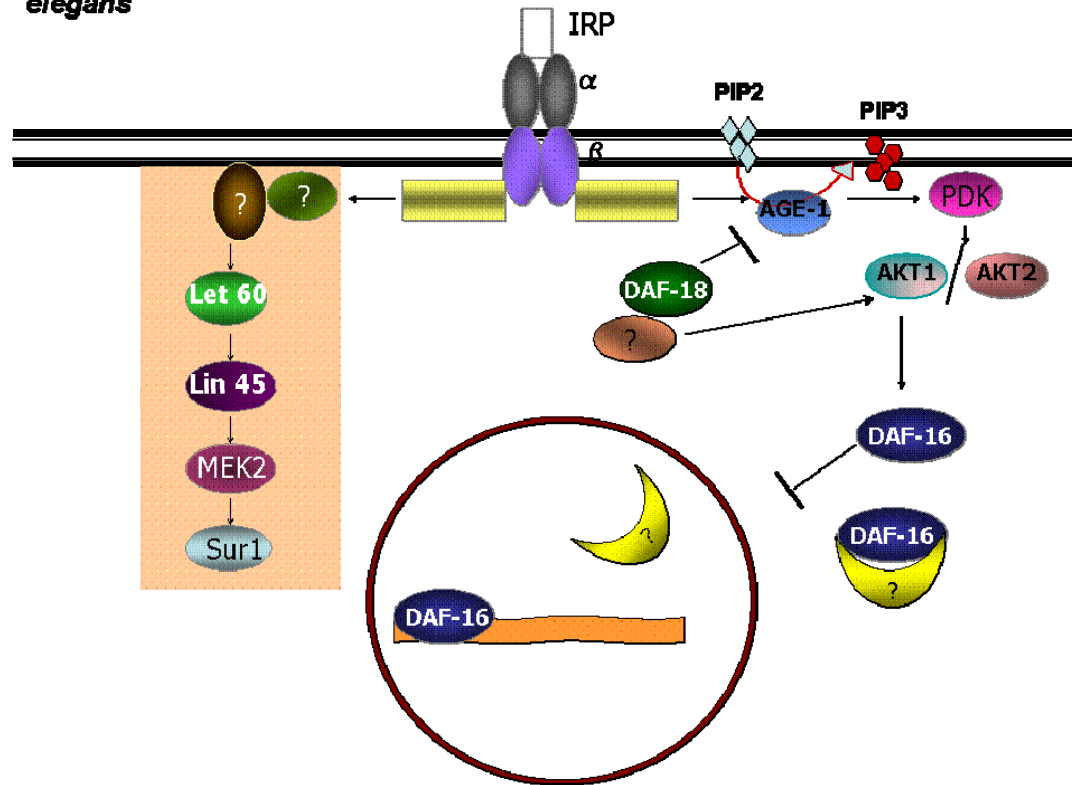


Figura 13. Ruta de transducción de señales de insulina, las moléculas son nombradas de acuerdo con la nomenclatura utilizada para *C. elegans*. Al unirse el ligando al receptor se inicia la cascada de señales mediante el fosfatidil inositol 3-fosfato cinasa por un lado, y por otro lado mediante la ruta de MAPK (De sus siglas en Inglés Mitogen Activated Kinase). IRP (Insulin Related Peptide), α : Sub-unidad alfa del receptor de insulina, β : Sub-unidad beta del receptor de insulina, PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate), PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate), AGE-1 =PI3K (Homólogo de Phosphatidylinositol-3 kinase), PDK (3'-phosphoinositide dependent kinase) Akt1/Akt2 (Protein Kinase B), Daf-18 (Homólogo dePhosphatase and Tensin homolgue), Daf-16 (Homólogo de Forkhead Box, type O), Let 60 (Homólogo de Ras) Lin 45 (Homólog de Raf), MEK2 (MAPK/ERK, Mitogen Activated Kinase y Extracelullar regulated kinase) Sur1(Homólogo de Extracelullar regulated kinase). El área sombreada en rosa indica la posible participación en la regulación del crecimiento.

2.4 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN MOLUSCOS

Existen dos organismos representativos de moluscos terrestres en donde se han identificado péptidos tipo insulina (ILP's). Uno de ellos es *Anodonta cygnea*, un molusco bivalvo de agua dulce, en donde se aislaron 10 isoformas a partir de órganos viscerales y 20 isoformas que tuvieron las mismas propiedades físico-químicas que la insulina de mamíferos y efectos biológicos equivalentes, sin embargo presenta diferencia en la composición de aminoácidos en el extremo amino terminal. Los péptidos tipo insulina de *A. cygnea* tienen efectos estimulantes del crecimiento y metabólicos (Rusakov *et al.*, 1991). En el gasterópodo terrestre *Lymnea stagnalis*, se han identificado 7 genes de péptidos tipo insulina (MIP), en los cuales las estructuras primarias de estos péptidos resultaron ser de 20 a 40% idénticos a otros péptidos de la superfamilia insulina (Smit *et al.*, 1998).

La identificación de insulina en moluscos marinos se hizo poco después del descubrimiento de la insulina (Chan y Steiner, 2000). En 1923 Collip reportó actividad tipo insulina en el molusco bivalvo *Mya arenaria*. No fue hasta 70 años después que en *Aplysia californica* se caracterizó el procesamiento de la prohormona de insulina y que los niveles de RNAm disminuyeron cuando el animal fue desprovisto de alimento (Floyd *et al.*, 1999). La secuencia en *A. californica* de insulina podría considerarse representativa de los moluscos marinos. Sin embargo, la búsqueda de secuencias similares con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschull *et al.*, 1990) mostró las secuencias de un gen tipo insulina 7 (Insulin-like 7) de *A. californica* (Moroz *et*

al., 2006), precursor del péptido tipo insulina (insuline-like peptide precursor) de *Mizuhopecten yessoensis* (Clave de acceso BAD13420) y el fragmento de insulina de *Haliotis corrugata* (Clave de acceso ACQ91106) obtenida en este trabajo (ver capítulo 4). El alineamiento de estas secuencias mostró que son conservadas en diferentes residuos de aminoácidos, principalmente residuos de cisteína (Fig. 14). Las secuencias de insulina de los moluscos marinos forman dos grupos, uno en donde la IL-7 de *A. californica* es diferente de las otras secuencias relacionadas a insulina y otro en donde se diferencian los moluscos gasterópodos como *A. californica* y *H. corrugata* de los moluscos bivalvos como *M. yessoensis* y *C. gigas* (fig 15).

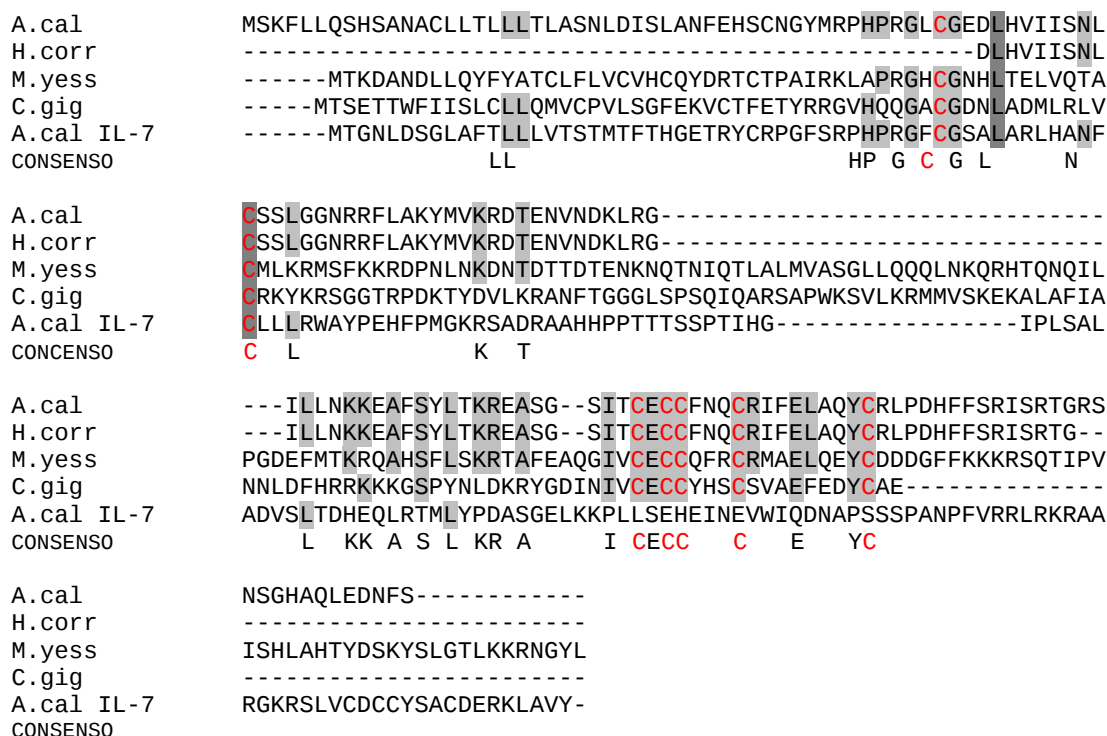


Figura 14. Alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a la superfamilia de insulina de moluscos marinos (Clustal W). La secuencia consenso se muestra para ilustrar el patrón similar de aminoácidos conservados. Los números corresponden a las claves de acceso de A cal: *Aplysia californica* (Insulin prohormone), H. corr: *Haliotis corrugata* (Insulin), M. yes: *Mizuhopecten yessoensis* (insulin-like peptide precursor), C. gig: *Crassostrea gigas* (insulina related peptide), IL-7 A.cal: *A. californica* (Insulin-like 7). Las letras en rojo muestran los residuos conservados de cisteína.

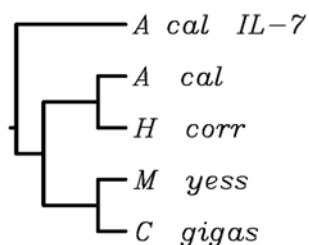


Figura 15. Dendrograma que relaciona las secuencias de aminoácidos pertenecientes a la superfamilia insulina de moluscos marinos. A cal, *Aplysia californica* (Insulin prohormone); H corr, *Haliotis corrugata* (Insulin); M yess, *Mizuhopecten yessoensis* (insulin-like peptide precursor); C gigas, *Crassostrea gigas* (insulin related peptide), A cal IL-7, *A. californica* (Insulin-like 7).

El receptor de insulina pertenece a una clase de receptores con actividad tirosina-cinasa. Después de unirse el ligando, el receptor de insulina utiliza unas moléculas adaptadoras conocidas como substratos del receptor de insulina para iniciar la cascada de señales (Claeys *et al.*, 2002). En *A. californica*, se caracterizó el receptor de insulina a nivel de DNAC y el análisis de la secuencia de proteína derivada del mismo, mostró que un dominio de 187 aminoácidos con actividad cinasa es 88% idéntico al dominio cinasa de *Drosophila* y 73% al de dominio cinasa de humano (Jonas *et al.*, 1996). El número de acceso de la secuencia de nucleótidos reportada fue U31747, sin embargo el número de secuencia corresponde al intrón 9 del gen YRRM en humanos y al hacer el análisis con el BLAST no se mostró una sola secuencia parecida a la de un receptor de insulina

Otras moléculas involucradas en la ruta de transducción de señales de insulina son las proteínas Ras. Estas proteínas, inducen el crecimiento, diferenciación celular, morfogénesis, tráfico vesicular y en la formación del citoesqueleto. Son el miembro más prominente y mejor caracterizado de esta clase de proteínas G. Son de peso molecular relativamente bajo y se presentan en forma de monómeros. Estas proteínas pueden recibir y transmitir señales, en el estado unido a GTP interactúan con efectores cadena abajo (“downstream”), que a su vez, se comunican con otras proteínas señales “downstream” (Krauss G, 2003). En el mejillón *Mytilus edulis*, se identificó la secuencia de DNAC que codifica para una proteína (AAT8117) de 184 aminoácidos y el análisis de secuencia

demostró que esta altamente conservada (Ciocan y Rotchell, 2005). En *Mytilus galloprovincialis* y en *Cassostrea angulata* se han identificado las secuencias que corresponden a una proteína tipo Ras (DQ305041 y GQ222373, respectivamente) depositadas en el Banco de Genes del NCBI (por sus siglas en inglés National Center of Biotechnology). En *Aplysia californica*, se clonaron y caracterizaron homólogos de pequeñas proteínas G pertenecientes a Ras, las cuales fueron altamente conservadas con las proteínas Ras humanas (Ye *et al.*, 2008). Las secuencias de las proteínas Ras entre los moluscos bivalvos mostraron ser altamente conservadas (Fig. 16). Su análisis muestra la formación de dos grupos, uno formado por los moluscos bivalvos y el otro formado por *A.californica* como molusco gasterópodo (Fig.17).

```

AAT81171      MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVEEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG
ABC46896      MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVEEFDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG
ACU33971      MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVEEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG
ABS87394      MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVEEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG
                *****
                .

AAT81171      QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAVNNTKSFEDINQYREQIKRVKDADEVPMVLVGNKVDL
ABC46896      QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAVNNTKSFEDINQYREQIKRVKDADEVPMVLVGNKVDL
ACU33971      QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAVNNTKSFEDINQYREQIKRVKDADEVPMVLVGNKVDL
ABS87394      QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAVNNTKSFEDINQYREQIKRVKDADEVPMVLVGNKVDL
                *****
                .

AAT81171      PTRTVGAKQARPVADSYNIPYVETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKYKERKGPKKGKKKPR
ABC46896      PTRTVDAKQARPVADSYNIPYVETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKYKERKGP-----
ACU33971      QTRTVESQAKQVADSYNIPYVETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKFEEKGNIKKGKRKL
ABS87394      PTRTVEQRQGKHVAELYHIPYVETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKYKEKKGKDRKKRKIG
                ****      :*. :  ** :  *.*****
                :*. :  ** :  *.*****

AAT81171      CLLI-----
ABC46896      -----
ACU33971      CRLF-----
ABS87394      TKGGRLSCLLL

```

Figura 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a las proteínas Ras de moluscos marinos (Clustal W). La secuencia consenso se muestra con un asterisco para ilustrar el patrón similar de aminoácidos conservados. Los números corresponden a las claves de acceso de ABC46896, *Mytilus galloprovincialis* (Ras protein); AAT8117, *Mytilus edulis* (Ras protein); ACU33971, *Crassostrea angulata* (ras family-like protein) y ABS87394, *A. californica*.



Figura 17. Dendrograma que relaciona las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las proteínas Ras de moluscos marinos. ABC46896, *Mytilus galloprovincialis* (Ras protein); AAT81171, *Mytilus edulis* (Ras protein), ACU33971 *Crassostrea angulata* (ras family-like protein). ABS87394, *A. californica*.

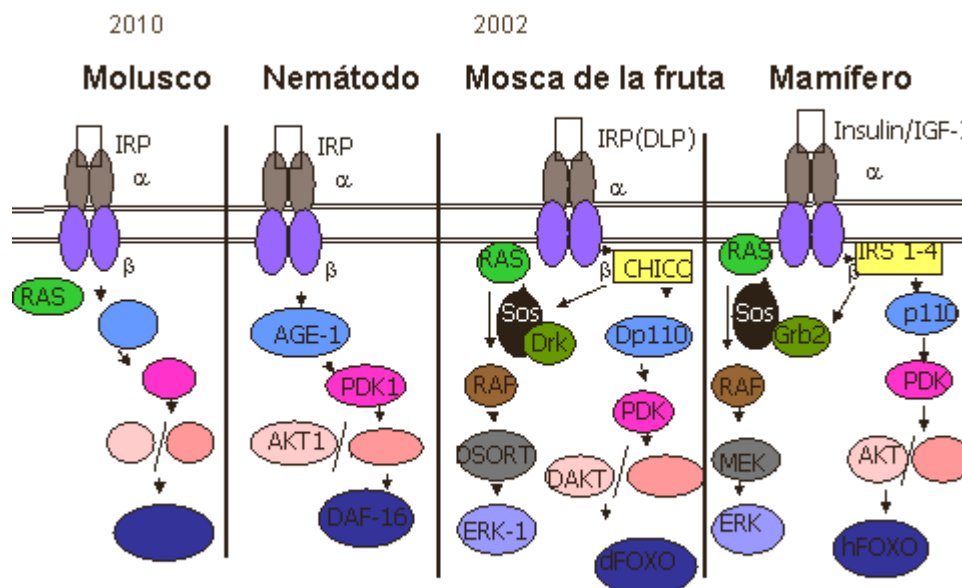


Figura 18. Comparación de la ruta de señales de insulina en mamíferos, mosca de la fruta (*D. melanogaster*), nemátodo (*C. elegans*) (Claesy *et al.*, 2002) y moluscos marinos (este trabajo, 2010).

Al comparar la ruta de transducción de señales de los moluscos marinos con respecto a las rutas identificadas en los diferentes modelos de estudio, podemos observar que la identificación de las moléculas involucradas en la regulación del crecimiento, son apenas 3: insulina como el ligando, el receptor de insulina y una molécula moduladora de la señal (Ras). La ruta de señales de insulina parece estar bien conservada entre especies tan divergentes como los mamíferos y los nemátodos. De acuerdo con los resultados de Blair *et al.* (2005), los artrópodos están genética y evolutivamente más relacionados a los vertebrados que los nemátodos, lo que sitúa a estos últimos como el grupo más cercano a los moluscos. Si consideramos a los nemátodos, como el grupo más

cercano a los moluscos, hipotéticamente la ruta de transducción de señales de moluscos marinos sería mas parecida a la del nématodo *C. elegans*. Las moléculas identificadas en los moluscos marinos son apenas el inicio de una ruta compleja en la que intervienen diferentes moléculas, todas ellas modulando señales producto de las interacciones del organismo con su medio. La caracterización de las moléculas involucradas en la ruta de señales de insulina y el entendimiento de éste proceso ayudará a resolver preguntas sobre anomalías o patologías relacionadas con el crecimiento en moluscos en el medio natural y a la optimización de biotecnologías para el cultivo de estos organismos.

CAPÍTULO 3

Estimulación del Crecimiento de *Lithopoma undosa* (antes *Astrea undosa*) Con Insulina Humana Recombinante

3. 1 INTRODUCCIÓN

A pesar de que la pesquería de *Lithopoma undosa* es relativamente nueva, la presión de pesca se dirige principalmente a los adultos, lo que fácilmente puede llegar a generar una sobreexplotación del recurso (Gluyas-Millán *et al.*, 2000). El producto de esta pesquería se vende fresco y enlatado en el mercado nacional e internacional, por lo que se ha incrementado en años recientes el interés por cultivar esta especie. Sin embargo, hasta el momento es poca la información sobre tasas de crecimiento en juveniles, edad y talla de maduración en cautiverio, requerimientos nutricionales para postlarvas y juveniles hasta que alcancen la talla comercial. Todo lo anterior se requiere para completar el ciclo de vida de estas especies en cautiverio y promover su aplicación comercial (Salas *et al.*, 2009).

El caracol *L. undosa*, es un gasterópodo típico de zonas costeras templadas y se distribuye desde Ventura, California, EU, a la Península de Baja California, México (Morris, 1966). El crecimiento de este organismo en el medio natural está determinado por la disponibilidad del alimento, sustrato, corrientes, y las diferencias de tallas por zonas se debe a un distinto patrón de crecimiento.

A diferencia de la mayoría de los moluscos gasterópodos, la mayor parte del crecimiento se da en los meses más calientes del año y las densidades más altas ocurren de 2-3 años después de eventos ENSO (por sus siglas en Inglés El Niño Southern Oscillation) (Zacharias y Kushner, 2006; Gluyas-Millán *et al.*, 1999).

L. undosa es un molusco de lento crecimiento como el abulón, lo cual hace más problemático su cultivo a nivel comercial. Para contribuir a resolver éste problema, se han utilizado varias alternativas en diversas especies, entre las que se incluyen el acelerar el crecimiento mediante la utilización de hormona de crecimiento recombinante de salmón, con resultados positivos (Moriyama y Kawauchi, 2004; Moriyama *et al.*, 2008).

Otra hormona que ha sido utilizada para promover el crecimiento en diferentes especies de peces es el Factor de crecimiento Insulina-I (IGF-I), en donde las tallas y los pesos se incrementan considerablemente con respecto a tratamientos control en ausencia de la hormona (Dian-Chang *et al.*, 2006; Jyh-Yih *et al.*, 2000). La aplicación de insulina exógena para promover el crecimiento en la acuicultura de peces incluye insulina porcina en carpa mediante inyección, en la cual la captación de aminoácidos se facilitó y por lo tanto la incorporación de éstos en la proteína corporal. Asimismo, se ha utilizado insulina bovina inyectada, la cual incrementó el peso corporal, los niveles de proteínas, lípidos y la incorporación de leucina en el músculo esquelético de la trucha, además de promover el incremento en los niveles de

hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en Inglés) después de los primeros 30 minutos de la inyección (Takahashi *et al.*, 1991; Murai y Ogata; 1990; Ablett *et al.*, 1981). En el caso de la aplicación de insulina exógena por inmersión, el trabajo de Chang y Lin (1995) reportan un incremento en el crecimiento de los peces, después de un tratamiento con insulina por inmersión durante 15 minutos.

En el caso de la tilapia *Oncorhynchus mykiss* se determinó el papel de la insulina en el crecimiento compensatorio y observaron que los niveles de insulina en plasma disminuyeron progresivamente con el tiempo de inanición y que a las 4 semanas los niveles de insulina en plasma permanecieron indetectables; sin embargo, después de restablecer las condiciones normales de alimentación los niveles de insulina en plasma fueron similares en todos los grupos (Montserrat *et al.*, 2007).

Uno de los principales intereses en el desarrollo de la acuicultura de *L. undosa* es generar información sobre su crecimiento y supervivencia, por lo que se decidió utilizar como potenciador del crecimiento a la insulina recombinante humana en combinación con diferentes condiciones de nutrición en postlarvas de *L. undosa*. Lo anterior para probar si la insulina aplicada en forma externa, tenía un efecto en el crecimiento.

3.2 MATERIALES Y MÉTODO

Los experimentos se realizaron en cajas de cultivos celulares de 6 pozos de 9.62 cm^2 con capacidad de 15 ml (fig 19). Se utilizaron dos condiciones de alimentación y tres concentraciones de insulina. Las condiciones de nutrición consistieron de inóculos de la diatomea *Navicula incerta* como alimento (D), y sin la adición de diatomeas (MF). Para la condición de nutrición D, se inocularon 250 cel/cm^2 de diatomeas en 10 ml de agua de mar filtrada ($0.22 \text{ }\mu\text{m}$) y esterilizada mediante la irradiación de luz ultravioleta, 24 horas antes de colocar a los organismos de acuerdo con lo descrito por Anguiano-Beltran (2007). Se utilizó insulina humana de origen DNA recombinante (Humulin®) y las concentraciones utilizadas fueron de 0.1 U/ml (I_1), 1 U/ml (I_2) y 5 U/ml (I_3).

Se separó un lote de 330 postlarvas de 15 días de *L. undosa* y se tomó una muestra de 74 postlarvas las cuales se midieron con ayuda de un microscopio compuesto (C. Zeiss Axioscop 200) con el objetivo 10x y se calculó la media. Para la realización de los experimentos, se colocaron 15 postlarvas por pozo y se adicionó la insulina en las concentraciones indicadas. Las postlarvas se expusieron durante 24 horas a la concentración de insulina y posteriormente se hizo un recambio al 100% con agua de mar. Se hicieron recambios al 100% todos los días y la adición de insulina se repitió cada cuatro días durante 48 días, con excepción de los días 24 y 27 en que no se agregó insulina. Cada séptimo día, los organismos se observaron con ayuda de un microscopio invertido C. Zeiss con el objetivo 5x.

Las imágenes se capturaron y se analizaron con el programa Axiovision 4.7.2 de C. Zeiss.

Se calculó la tasa de crecimiento específico (TCE) para cada una de los tratamientos mediante la fórmula $(\ln L_{\text{final}} - \ln L_{\text{inicial}}) * 100 / D$. En donde L es la longitud en micrómetros y D los días transcurridos al momento de la medición.

Las longitudes son expresaron como la media $\pm$ error estándar (ES) y los resultados de TCE se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (DE). Previo al análisis estadístico, se probó la normalidad de los datos con la prueba Komolgorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Para determinar las diferencias significativas se hizo una ANDEVA factorial con una prueba a posteriori de Bonferroni.

Los datos de supervivencia son expresados como el número de individuos vivos entre el total de individuos al inicio del experimento y fueron transformados con la función arcoseno para su análisis estadístico. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se aplicaron a los residuales de los datos transformados con las pruebas Kolmogorov-Smirnov y de Levene respectivamente. Para determinar las diferencias significativas se hizo una ANDEVA factorial con una prueba a *posteriori* de Tukey.

Los gráficos de la longitud y supervivencia se hicieron con la ayuda del programa Sigma Plot 10.0 y el análisis de varianza se realizó con el programa Statistic 6.0.

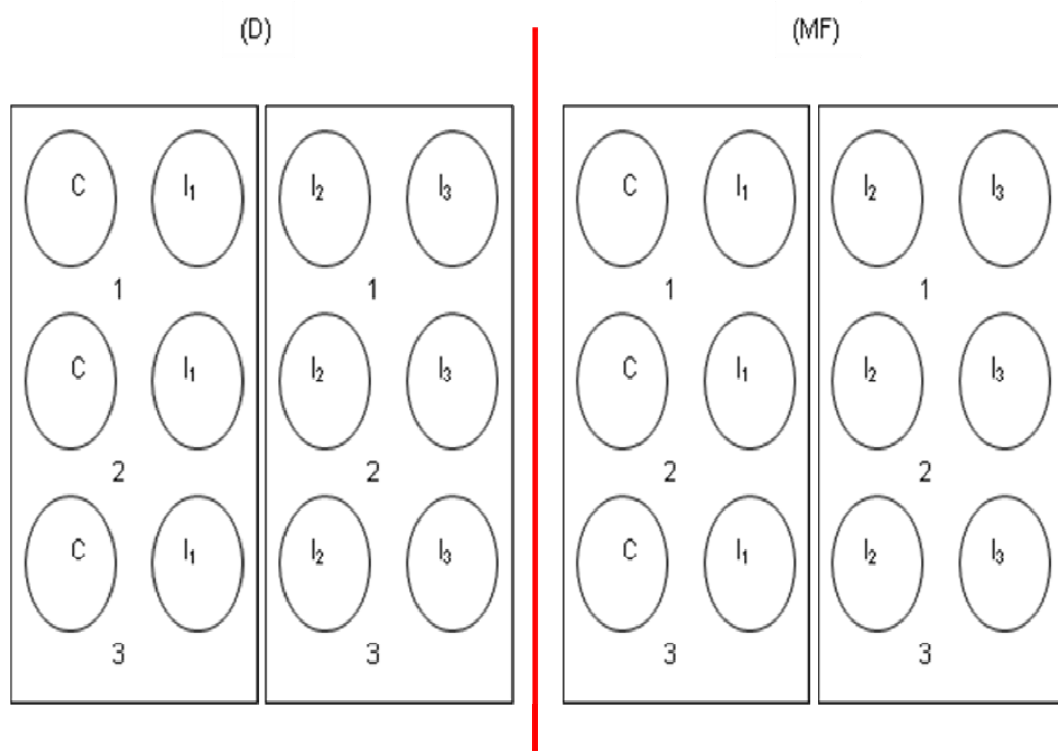


Figura 19. Diseño experimental de la estimulación del crecimiento de postlarvas de *Lithopoma undosa*. Cada rectángulo con sus 6 círculos representan el esquema de una unidad experimental. Las letras fuera de las unidades experimentales indican la condición de nutrición, D: Adición de diatomeas, MF: Sin la adición de diatomeas. Las claves en los círculos representan la concentración de insulina: C: Control (Sin adición de insulina). I₁. (0.1U/ml), I₂: (1U/ml) e I₃: (5U/ml).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Crecimiento

La talla media inicial para todos los tratamientos fue de 443.02 ± 7.77 micrómetros. En la condición con adición de diatomeas (D), se pudo observar que con la concentración de insulina igual a 0.1 U/ml (ID1), el crecimiento fue mayor con respecto a la control a partir de los 21 días y la talla final fue de 627.38 ± 14.76 ; sin embargo con las concentraciones de insulina de 1 U/ml (ID2) y 5 U/ml (ID3) el crecimiento fue menor con respecto al control (566.32 ± 16.63 y 575.9783 ± 22.04 , respectivamente) (fig 20A).

En la condición sin la adición de diatomeas (fig 20B) el crecimiento de los organismos con 0.1 U/ml (IMF1) fue mayor con respecto al control desde los 7 días y la talla final fue de 597.08 ± 22.14 micrómetros, y al igual que en la condición de nutrición óptima la concentraciones con 1 (IMF2) y 5 (IMF3) U/ml fueron menores con respecto al control. A los 48 días de tratamiento con la concentración más alta de insulina (IMF3) la mortalidad de las postlarvas fue del 100%. La talla final a los 48 días fue de 513.06 ± 14.04 para 1 U/ml y la talla final a los 34 días para la concentración de 5 U/ml fue de 506.78 ± 18.70 .

Los datos de la tasa de crecimiento específico cumplieron con una distribución normal ($D = 0.6469$, $p > 0.05$), pero no fueron homocedásticos ($F = 2.9361$, $p < 0.05$).

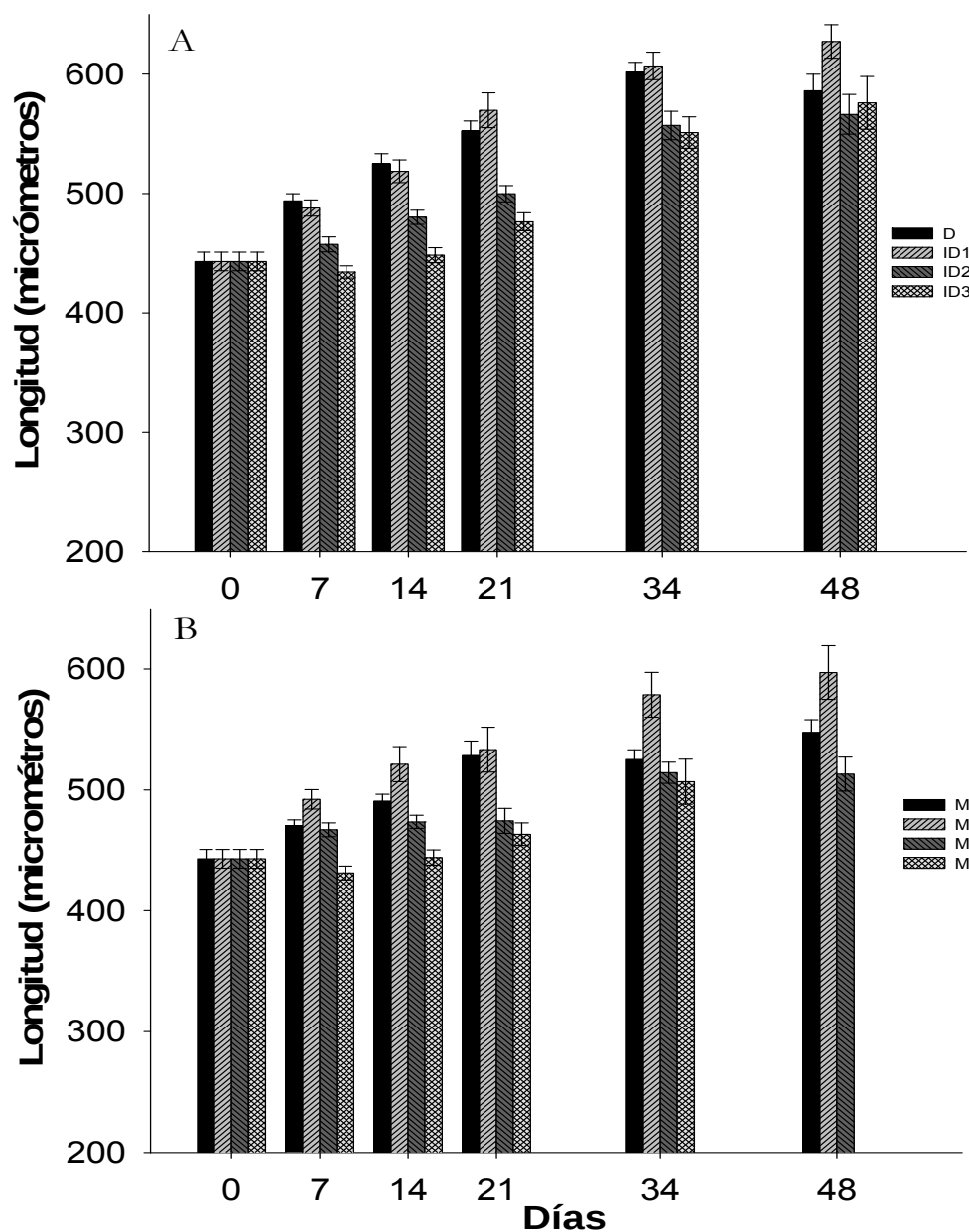


Figura 20. Crecimiento de postlarvas de *L. undosa*. Las barras representan la longitud en micrómetros en: A) condición de nutrición óptima, con D = control, ID1 = 0.1 U/ml, ID2, 1 U/ml e ID3 5 U/ml de insulina. B) condición de nutrición restringida con MF = control, IMF1 = 0.1 U/ml, IMF2 = 1 U/ml, IMF3 = 5 U/ml. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar.

Sólo existieron diferencias significativas entre la condición de nutrición (con y sin adición de diatomeas) y la concentración de insulina (I_3), ($F = 4.0485$, $p = 0.02134$). La tasa de crecimiento fue mayor para la condición D (adición de diatomeas), con la concentración de 0.1 U/ml a pesar de no haberse detectado diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo los organismos que tuvieron la menor tasa de crecimiento fueron aquellos que estuvieron expuestos a 5 U/ml de insulina en ambas condiciones de nutrición. En la condición de nutrición restringida a los 48 días los organismos no sobrevivieron (Fig. 21). En ambas condiciones, se observó que la tasa de crecimiento se incrementa en todos los tratamientos en el día 34, como una respuesta a la ausencia de las dosis de insulina en los días 25 y 29.

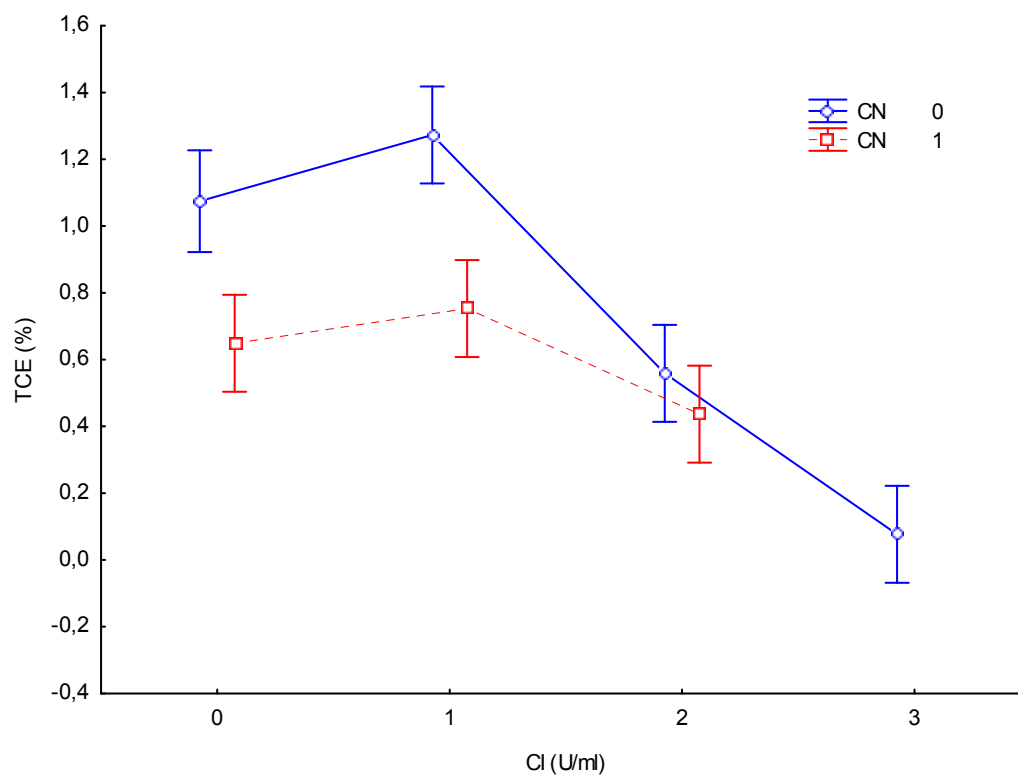


Figura 21. Tasa de crecimiento específico para postlarvas de *L. undosa* en las condiciones nutricionales experimentadas. TCE (Tasa de crecimiento específico), CI (Concentración de Insulina) Los puntos en la gráfica representan la tasa de crecimiento específica (TCE) con adición de diatomeas (CN = 0) y sin adición de diatomeas (CN =1) ($F=4,0485$, $p=,02134$). La líneas verticales representan la desviación estándar.

3.3.2 Supervivencia

En contraste con los resultados de crecimiento, a medida que el tiempo transcurrió en el experimento, la supervivencia disminuyó a partir del día 7 en la condición en donde las diatomeas fueron inoculadas y en donde se administraron 0.1 U/ml y 1U/ml de insulina, esta respuesta se mantuvo hasta el día 14 (Fig.22A). Sin embargo a los 21 días, estas diferencias comenzaron a desaparecer y al día 48 los organismos expuestos a concentraciones de insulina de 0.1 U/ml y 1U/ml mostraron el 50% de supervivencia.

Para la condición sin la adición de diatomeas, observamos que la supervivencia fue menor en los tratamientos con insulina con respecto al control (Fig. 22B). A los 7 y 14 días la supervivencia en el tratamiento con 0.1U/ml fue menor que con 1 y 5 U/ml, pero a los 21 días los organismos expuestos a una concentración de 1 U/ml de insulina presentaron el 50% de supervivencia y los que estuvieron expuestos con 5 U/ml presentaron menos del 50% de supervivencia. A los 48 días de cultivo, la mortalidad fue del 100%. La supervivencia con 0.1 U/ml menor al 50% se presentó a los 48 días.

Las datos residuales fueron normales según la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($D=0.069$; $p > 0.020$), pero no presentaron homocedasticidad ($F = 2.60$; $p < 0.001$). Como en el caso de los datos de crecimiento, se aplicó el mismo criterio y se hizo un ANDEVA factorial. Existieron diferencias significativas entre la condición de nutrición y la concentración de insulina ($F = 17.801$; $p = 0.0000$) (Fig. 23A); entre la condición de nutrición y el tiempo ($F = 5.630$; $p = 0.000486$) (Fig. 23B) y entre la concentración de insulina y el tiempo

($F = 4, 326$, $p = 0,000030$) (Fig. 24). Entre la condición de nutrición y la concentración de insulina las diferencias fueron entre el control en donde no se agregó insulina y en la concentración más alta de insulina. La mayor supervivencia en el grupo control fue para los organismos con nutrición restringida. En contraste, los organismos con nutrición óptima tuvieron mayor supervivencia que los organismos con nutrición restringida al final del experimento (Fig. 15A). Las diferencias entre la condición de nutrición con respecto al tiempo fueron a los 7 y 21 días, pero no existieron diferencias entre las dos condiciones de nutrición hasta el día 48 en donde la supervivencia fue mayor en condiciones de nutrición óptima (Fig. 23B). En el caso de la concentración de insulina con respecto al tiempo, la mayor supervivencia fue a los 7 y 48 días para el grupo control, y la menor supervivencia fue para la concentración 5 U/ml de insulina a los 48 días (Fig. 24).

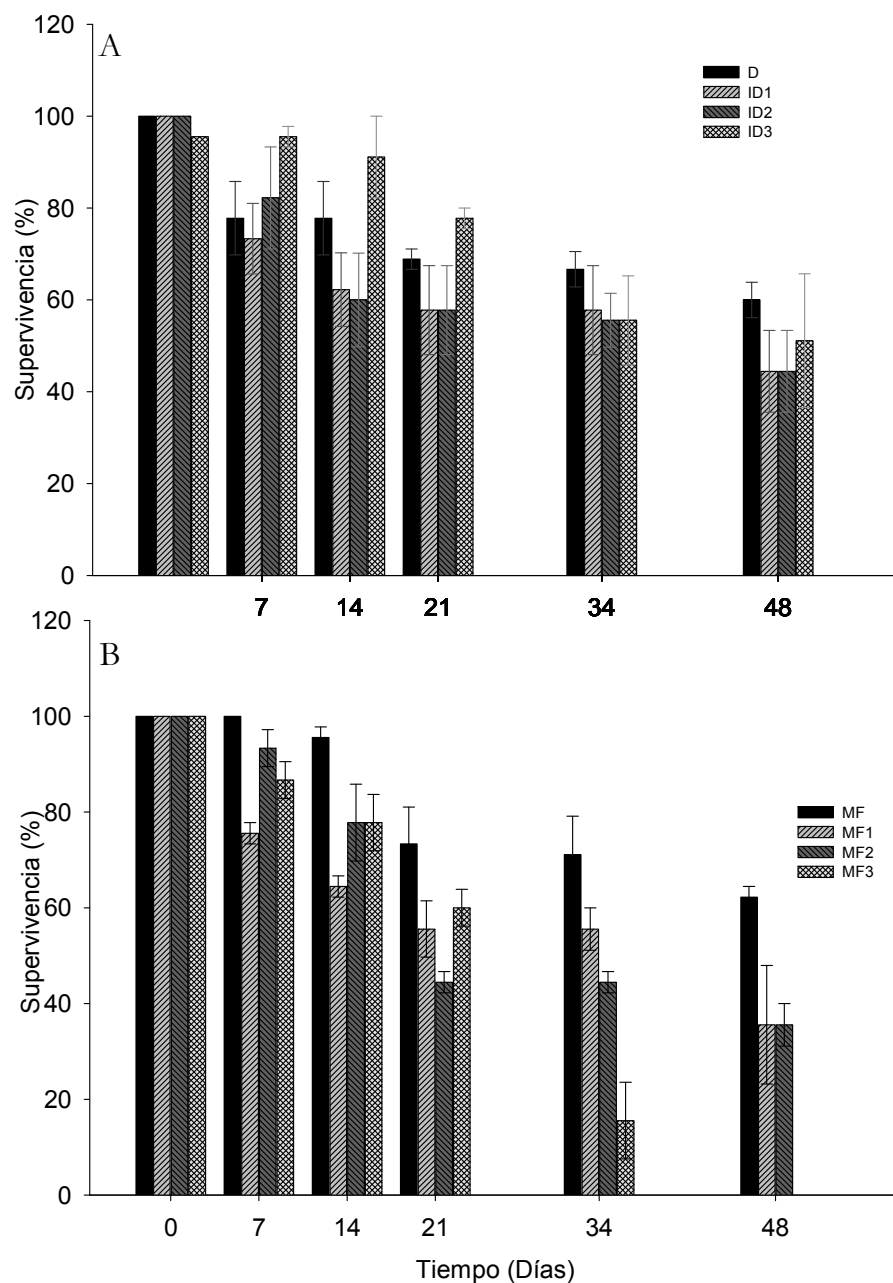


Figura 22 Supervivencia de poslarvas de *L. undosa* con A) condición de nutrición óptima, con D = control, ID1 = 0.1 U/ml, ID2, 1 U/ml e ID3 5 U/ml de insulina y B) condición de nutrición restringida con MF = control, IMF1 = 0.1 U/ml, IMF2 = 1 U/ml, IMF3 = 5 U/ml. Las barras representan el error estándar con un $\alpha = 0.05$.

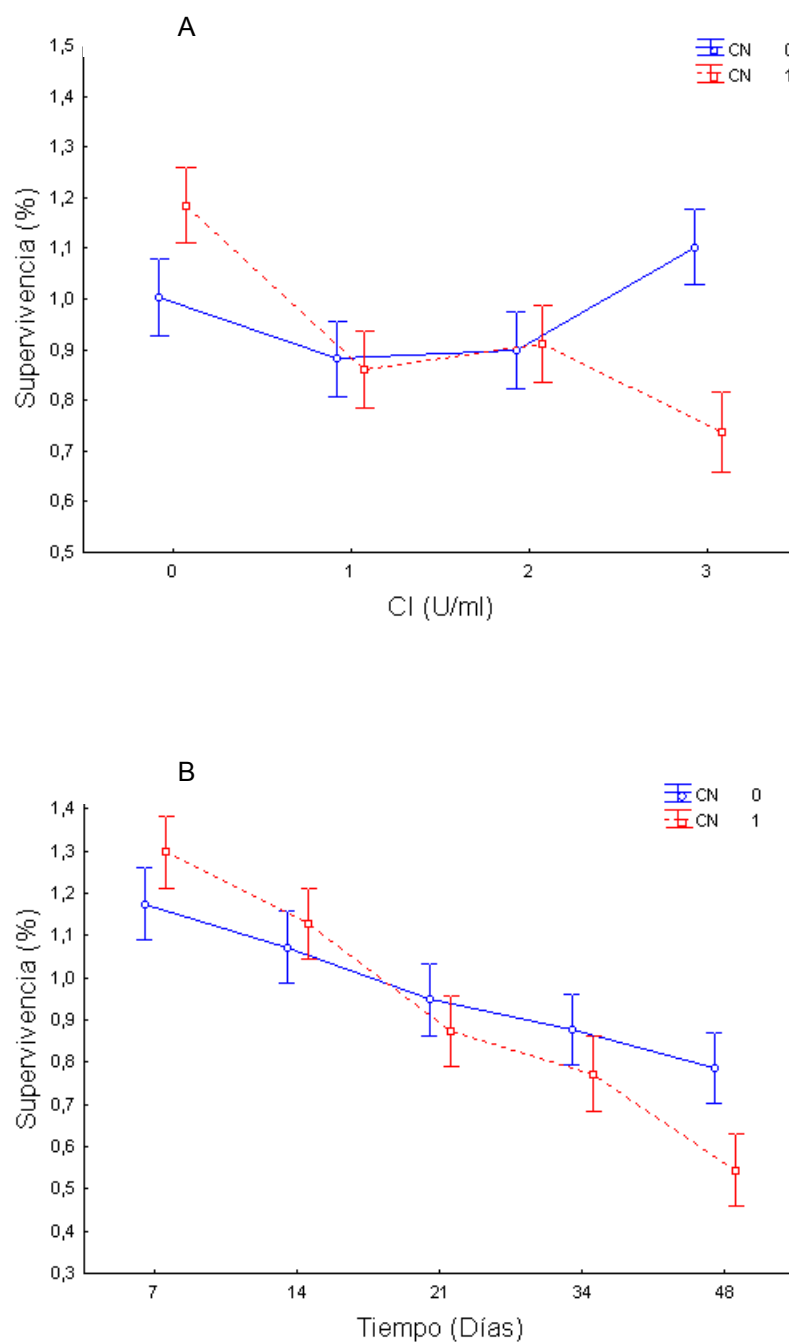


Figura 23. Supervivencia de postlarvas de *L. undosa* con adición de diatomeas (CN=0), sin adición de diatomeas (CN=1) y con A) Diferentes concentraciones de insulina, 0 = Control, 1 = 0.1 U/ml, 2 = 1 U/ml, y 3 = 5 U/ml ($F=17,801$, $p=,00000$) y B) el tiempo ($F=5,6301$, $p=,00049$). La barras representan el estándar error estándar

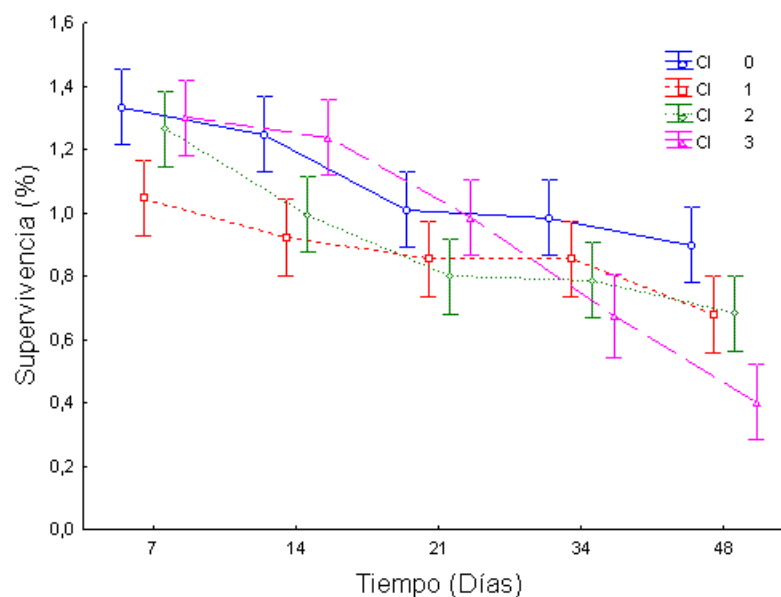


Figura 24. Supervivencia de postlarvas de *L. undosa* ($F=4,3260$, $p=,00003$) con diferentes concentraciones de insulina a través del tiempo de experimentación. CI 0 = control, CI 1 = 0.1 U/ml, CI 2 = 1 U/ml y CI 3 = 5 U/ml. Las líneas verticales representan el error estándar.

3.4 DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que con la adición de diatomeas y con 0.1 U/ml de insulina, la tasa de crecimiento fue mayor que el control aún cuando no hubo diferencias significativas. La concentración de 0.1 U/ml fue la dosis más baja administrada en este experimento y concuerda con los resultados obtenidos en peces por Chang y Lin (1995), en donde la dosis más baja de insulina fue más eficaz que la dosis más alta en el consumo de alimento y en la tasa de crecimiento. A este respecto, se ha documentado que la insulina tiene un efecto en el estímulo del consumo de alimento dependiendo de la dosis (Morley,

1987), y aún cuando en este estudio no se midió el consumo de alimento, la tasa de crecimiento fue mayor en los organismos en donde se adicionó insulina, que en aquellos en donde no se agregó. Estas respuestas podrían deberse a que al adicionar insulina los niveles de glucosa y aminoácidos en plasma disminuyen drásticamente para incorporarse en los tejidos en los que sea necesaria la síntesis de proteínas, tal como reportan Takeshi y Ogata, (1990), en donde la inyección de una dosis de insulina porcina en carpas facilitó la utilización de aminoácidos que a su vez pudo haber estimulando la síntesis de proteínas para incorporarse a los tejidos. Bajo la influencia de insulina, una cadena de señales es activada y el resultado es la activación de las proteínas-quinasas específicas serina/treonina (Akt/PKB) y la fosforilación de la molécula 4E-BP1. La liberación de esta molécula es la señal para liberar a la molécula eIF-4E que se asociará al complejo que se unirá en la región 5' del RNA mensajero para iniciar la traducción. Cuando existen suficientes nutrientes disponibles, la traducción se activa por otra vía en donde la activación de mTOR genera una señal que fosforila a 4E-BP1 y la traducción se inicia (Krauss G, 2003). Aún cuando en este trabajo no se identificaron ni se midieron la concentración de estas proteínas, es probable que *L. undosa* utilice este mecanismo. Será importante en el futuro corroborar esta hipótesis mediante la localización y función de las señales que regulan esta ruta.

En relación con las concentraciones de 1 y 5 U/ml de insulina con adición de diatomeas, los organismos tuvieron una tasa de crecimiento menor que con

0.1 U/ml y con el control. Al existir un exceso en la concentración de insulina en el medio es posible que se hayan generado condiciones de hiperinsulinemia en los organismos, que pudo ser la causa de una probable reducción en las concentraciones de glucosa y aminoácidos en plasma. En condiciones normales, un incremento en los niveles de glucosa, la secreción de insulina se activa para promover la glucólisis y la formación del glucógeno, pero al disminuir los niveles de glucosa, disminuye la secreción de insulina y se activa el glucagon que estimula el rompimiento del glucogéno y la formación de glucosa a partir de aminoácidos. Insulina y glucagon se regulan por retroalimentación negativa (Nussey y Whitehead, 2001), y entonces al existir la condición de hiperinsulinemia es posible que se haya generado una condición de hipoglucemia en los organismos, ya que posiblemente el glucagon probablemente no pudo secretarse para permitir la recuperación de los niveles de glucosa y de aminoácidos al estar en exceso la insulina. Algunos de los síntomas de hipoglucemia en humanos son los mareos, pérdida del conocimiento, coma y muerte. Después de agregar la concentración de 5 U/ml, las postlarvas caían a su costado y permanecían así hasta el recambio de agua. Lo anterior nos hace suponer, que se generaron las condiciones de hipoglucemia; sin embargo, será necesario comprobarlo en el futuro. A pesar de que en la concentración de 0.1 U/ml, se presentó la mayor tasa de crecimiento, ésta dosis todavía podría ser letal, ya que a los 48 días la supervivencia fue por debajo del 50% en comparación con el control que fue del 60% aproximadamente. Este resultado sugiere que deberían aplicarse dosis por

debajo de ésta para determinar la concentración óptima en generar la mayor tasa de crecimiento con la mayor supervivencia.

En el caso de la condición en la cual no se adicionaron diatomeas, la tasa de crecimiento fue en general menor que con la condición de nutrición en presencia de diatomeas. A pesar de que no evaluamos la utilización de nutrientes con las diferentes condiciones de nutrición, ensayos realizados en *Haliotis fulgens* se documentó la utilización de nutrientes durante la privación de alimento en 27 días. Las proteínas y los carbohidratos fueron las principales fuentes de energía a diferencia de los lípidos que no fueron utilizados; existió un ligero incremento de éstos nutrientes. El incremento de los lípidos es atribuido a dos aminoácidos esenciales, lisina y leucina (Durazo-Beltrán, 2004). Es posible que en las postlarvas de *L. undosa*, la utilización de nutrientes en condiciones en donde el alimento estuvo limitado sea similar a la de *H. fulgens*, y la liberación de leucina permita que mTOR fosforile a 4E-BP1 y la traducción de proteínas se lleve a cabo, sin embargo al agregar insulina en exceso se genera las condiciones de hipoglicemia y podría haber una disminución de leucina. Por lo anterior, sería interesante medir la concentración de leucina, y medir la expresión de las proteínas mTOR y 4E-BP1 con las condiciones de nutrición y dosis de insulina utilizadas en este trabajo, para probar si la hipótesis presentada tiene sustento.

En ausencia de leucina se reduce la actividad de mTOR y por lo tanto se inhibiría la traducción (Krauss G, 2003).

Los organismos expuestos a 5 U/ml presentaron una mortalidad al 100 % a los 48 días. En *H. kamtschakana* la mortalidad se observó después de 27 días de inanición y en *H. fulgens* la mortalidad se observó después de los 60 días (Viana *et al.*, 2007). La respuesta de la supervivencia es generalmente caracterizada por una reducción en la tasa metabólica para sobrevivir después de que las condiciones normales son restituidas (Navarro y Gutiérrez, 1995). Aún cuando se incrementó la tasa de crecimiento a los 34 días la mortalidad superó al 50 % de los individuos, en condiciones en donde posiblemente la hipoglucemia fue constante al administrarse una dosis muy alta de insulina, y al no haber alimento suficiente para compensar los nutrientes perdidos.

Aún cuando quedan muchas preguntas por contestar, entre ellas los perfiles de macronutrientes en ambas condiciones de nutrición, la regulación hormonal entre insulina y glucagon, la expresión de los receptores de insulina y expresión de genes en la ruta de transducción de señales del crecimiento; se pudo determinar que la insulina en 0.1 U/ml es capaz de potenciar el crecimiento en postlarvas de 15 días.

CAPÍTULO 4

Identificación del Mensajero de Péptidos Relacionados a Insulina en *Haliotis* spp.

4.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de abulón es desarrollado en varios países, incluyendo a México, y en particular la costa de Baja California. Su alimentación en cultivo se basa en la utilización de macroalgas y alimento artificial; sin embargo, el crecimiento en cautiverio es lento. (Britz *et al.*, 1994; Fleming *et al.*, 1996; Guzman y Viana, 1998; Rosen *et al.*, 2000; Durazo y Viana, 2001; Yan *et al.*, 2001; García-Esquivel y Horst, 2006; García-Esquivel *et al.* 2007; Hara y Sekino, 2007; Viana *et al.*, 2007).

La insulina es una hormona que participa en la regulación del crecimiento como ya se mencionó anteriormente, y al unirse a los receptores de membrana, activa una ruta de señales que como respuesta final inducen al crecimiento del organismo, ya sea por el aumento en el tamaño de las células o por proliferación celular (Claeys *et al.*, 2002).

Actualmente, el crecimiento en respuesta a la ruta de señales de insulina está ampliamente caracterizado a lo largo de la escala filogenética, particularmente en mamíferos, artrópodos y nemátodos. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que regulan el crecimiento en moluscos gasterópodos. En este sentido, es necesario documentar la expresión de las

moléculas involucradas en el crecimiento de *Haliotis* spp., para entender este proceso en organismos sanos y poder abordar de mejor forma a aquellos organismos con el síndrome de bajo crecimiento y de su crecimiento en condiciones de cultivo. Esto podría ayudar a proponer estrategias en el manejo del recurso en los bancos naturales y a la creación de biotecnologías para mejorar el crecimiento en condiciones de cultivo de este recurso.

4.2 MATERIALES Y MÉTODO

4.2.1 Obtención de las muestras

Para la obtención del RNA y detectar la presencia de genes tipo insulina en abulón, se utilizaron ganglios cerebrales de *Aplysia californica* como control. En esta especie, ya se han identificado genes tipo insulina. Los organismos se colectaron en la Bahía de Todos Santos, en Ensenada, B. C. (31.8615°N, 116.6678°O) y fueron anestesiados con una solución de cloruro de magnesio (370 mM). Una vez anestesiados, la extracción de los ganglios cerebral y pedal se realizó mediante una incisión en la base de la región cefálica por medio de un bisturí, lo que permitió acceder directamente al ganglio cerebral. Los ganglios cerebrales de *A. californica* se almacenaron en RNAlater a -20°C hasta su procesamiento.

Para la identificación del gen de insulina se utilizó el ganglio cerebral de *H. corrugata*, proporcionado por el Centro Regional Pesquera en Ensenada (CRIP-Ensenada). El ganglio cerebral fue disectado en campo y almacenado en RNAlater® a -20°C hasta su procesamiento.

Para identificar fragmentos del RNA mensajero del gen de insulina durante el desarrollo larvario, se obtuvieron muestras de huevos sin fertilizar, larvas trocóforas y juveniles de tres meses y un año de edad de abulón rojo *Haliotis rufescens*, proporcionadas por la granja de cultivo Productores Marinos, S. A. de C. V. Las muestras se concentraron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, se eliminó el agua de mar y se conservaron en RNAlater a -20°C, hasta su procesamiento.

Los organismos de un año se trasladaron al laboratorio y se mantuvieron en una pecera con un sistema abierto de agua de mar y se alimentaron con *Macrocystis pyrifera* hasta su utilización.

4.2.2. Identificación del gen de insulina.

La extracción de RNA total se realizó agregando 1 ml de Trizol (Invitrogen) a las muestras de ganglios cerebrales de *A. californica* y a *H. corrugata*, así como a muestras de huevos sin fertilizar, larvas trocóforas, y juveniles de tres meses de *H. rufescens*. La extracción de RNA se realizó de acuerdo con las instrucciones de del proveedor, y se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro a 260 nm. El DNA genómico se removió utilizando DNase I grado amplificación (1 U/μl) (Invitrogen).

Posteriormente se utilizó RNA total para hacer una retro-transcripción con el fin de obtener DNA complementario (cDNA), con la utilización del enzima Super Script III RT (Invitrogen).

Para la identificación de un fragmento de 274 pb del gen de insulina se diseñaron cebadores (INS 274) a partir de la secuencia que codifica para el de insulina, depositada en el GenBank de *Aplysia californica* (número de acceso AF160192) (Tabla III). Se prepararon 50 µl de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa con las siguientes concentraciones finales: *Tfi* DNA Polimerasa (5 U), Buffer de reacción PCR (1X), mezcla de dNTPs (200 mM cada uno), MgCl₂ (1.5 mM), cebador sentido y antisentido (0.2 µM, cada uno) y cDNA (1µl). La amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C 45 segundos, 61 °C 30 seg. y 72 °C 1 minuto, y un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla III. Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en la amplificación rápida de los extremos del cDNA.

Nombre	Sentido	Antisentido
INS 274	5'ACCTGCACGTCATCATTTCC3'	5'TTCCGGTTCTGGATATTCTGG3'
GeneRacer™ RNA Oligo	5'CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUG GACUGAAGGAGUAGAAA3'	
GeneRacer® oligo dT		5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGA CAGTG(T) ₂₄₃ '
GeneRacer® 5' Primer	5'CGACTGGAGCACGAGGACACTGA3	
INS 900		5'CCTTCTATTCTGCGGGTAT3'
GeneRacer® 5' Nested	5'GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA3'	

Los fragmentos obtenidos de los ganglios cerebrales se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos obtenidos de las muestras durante el desarrollo larvario de *H. rufescens* se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 7.5% teñido con nitrato de plata.

Los productos a secuenciar se aislaron y se purificaron con el kit Pure Link® Quick Gel Extraction de Invitrogen. Las secuencias se alinearon con el programa Clustal W disponible en línea (<http://align.genome.jp/>).

4.2.3 Obtención fragmentos de ARNm de péptidos relacionados a insulina en *H. rufescens*.

Abulones rojos (*H. rufescens*) de 1 año de edad fueron relajados al colocarlos en hielo. Una vez relajados, se removieron las conchas y se descartaron las vísceras. La cabeza y el músculo se cortaron en pequeños trozos con navajas estériles y se agregó un volumen de Trizol® (Invitrogen) por cada 100 mg de tejido. El tejido se maceró con un homogeneizador mecánico a 3000 rpm en hielo y para la extracción de ARN total se siguieron las instrucciones descritas por la casa comercial.

Para la obtención de los fragmentos de RNAm relacionados a péptidos de insulina, se utilizó el kit GeneRacer® (Invitrogen), el cual permite la amplificación de los extremos 5' y 3' del DNAC con los cuales se puede deducir la secuencia completa. Para la obtención de la secuencia del extremo 5' se desfosforilaron 5 µg de RNA total con una fosfatasa alcalina CIP (Calf Intestinal

Phosphatase). El RNA total desfosforilado después fue tratado con una pirofosfatasa ácida TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) para remover la estructura “Cap” en el extremo 5’. Una vez que la estructura “Cap” fue removida se llevó a cabo la reacción de ligación de un cebador de RNA con la ayuda de la enzima T4 RNA ligasa para facilitar la transcripción reversa. El RNA ligado fue convertido a DNAc con la enzima Super Script III RT y con los cebadores “GeneRacer® oligo dT” y de secuencia al azar.

Para la amplificación del extremo 5’ se utilizaron el cebador sentido “GeneRacer® 5’ Primer” y el cebador antisentido INS900 (Tabla III), el cual fue diseñado para amplificar un fragmento de 900 pb a partir de la secuencia depositada en el GenBank de *Aplysia californica* (Número de acceso AF160192).

Se prepararon 50 µl de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa con las siguientes concentraciones finales: *Tfi* DNA Polimerasa (5 U), Buffer de reacción PCR (1X), mezcla de dNTPs (200 mM cada uno), MgCl₂ (1.5 mM), cebador sentido y antisentido (0.2 µM, cada uno) y cDNA (1 µl).

Se siguieron las recomendaciones del proveedor para las condiciones de amplificación que consistieron en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguidas por 5 ciclos de 94°C durante 2 segundos y 72°C por 1 minuto, y 5 ciclos adicionales de 94°C durante 2 seg y 70°C por 1 min, 25 ciclos de que constaron de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 60°C durante 30 seg, y una extensión final a 68°C durante 1.5 min y finalmente un ciclo de extensión final a 68°C durante 10 minutos. Posteriormente se hizo

un PCR semi-anidado en el cual se utilizó el GeneRacer® 5' Nested Primer e INS 900 (Tabla III). Para lo anterior se utilizó un microlitro del producto de PCR anterior para preparar la mezcla de reacción con las mismas concentraciones que se describen en la amplificación anterior. Se siguieron las recomendaciones para el PCR semi-anidado que consistieron en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, 25 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C, 30 seg de hibridación a 60°C 30 seg, y una extensión final a temperatura de 68°C durante 1.5 min. Al final se aplicó un ciclo de extensión final de 68°C durante 10 minutos. Los productos se visualizaron con luz ultravioleta en un gel de agarosa teñido con SYBR Green® (Invitrogen). Los productos de la amplificación se aislaron y se purificaron con el kit Pure Link® Quick Gel Extraction de Invitrogen.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificación de un fragmento del gen de insulina

Se obtuvo un producto de amplificación de 274 pb con los cebadores INS274 tanto para *A. californica*, como para *H. rufescens* (Fig. 25), que correspondieron al tamaño esperado del fragmento de la región codificante de la parte media del gen de insulina. La secuencia del producto de *H. rufescens*, (Número de acceso FJ536845), reveló ser idéntica (100%) a la de *A. californica* a nivel nucleotídico, cuando se comparó por medio de la herramienta BLAST del GenBank (Fig. 26) (Altschull *et al.*, 1990). Esta secuencia presentó un 70 %

de homología con la secuencia del gen del péptido relacionado a insulina (III) de *Lymnea stagnalis*, y un 80% con la secuencia de *Homo sapiens*. Sin embargo, estos porcentajes de homología representan solamente el 32 y el 15 % de cobertura del gen respectivamente.

4.3.2 Identificación de la expresión de fragmentos de RNAm relacionados a péptidos de insulina durante el desarrollo de *H. rufescens*

Los productos analizados en el gel de poliacrilamida al 7.5%, de las muestras en el desarrollo temprano de *H. rufescens*, revelaron que además del producto de 274 pb, se obtuvieron dos fragmentos, uno de 600 pb y otro de 900 pb aproximadamente, en el ganglio cerebral de *A. californica* (Fig. 27). El estadio de huevo sin fertilizar presentó tres bandas adicionales al producto de 274 pb que correspondieron a un tamaño aproximado de 600, 700 y 900 pb. Los estadios de larva trocófora y juveniles de tres meses, presentaron dos bandas adicionales al producto de 274 pb con un tamaño de 600 y 700 pb.

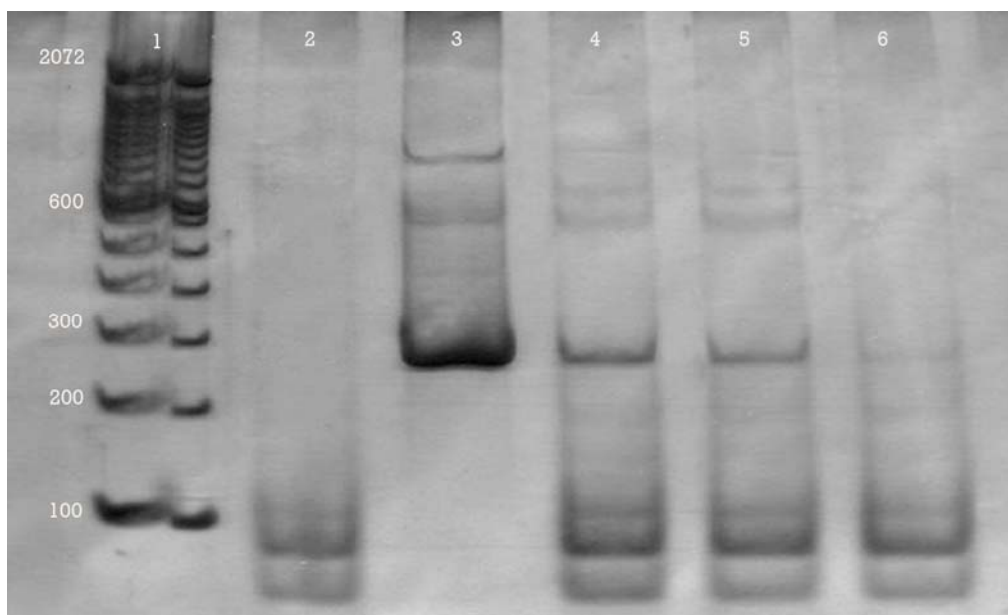


Figura 27. Expresión del gen de insulina en el desarrollo del abulón *H. rufescens*: Línea 1. Marcador 100 pb. Línea 2, Control negativo. Línea 3, Ganglio cerebral de *A. californica*. Línea 4, Huevo sin fertilizar de *H. rufescens*. Línea 5, Larva trocófora *H. rufescens* y Línea 6, Juvenil de 3 meses de *H. rufescens*.

4.3.3 Amplificación del extremo 5'

Se obtuvieron 9 productos de amplificación a partir del RNA total de músculo y cabeza de *H. rufescens* que podrían estar relacionados con péptidos relacionados a insulina (Fig. 28). El menor de los fragmentos amplificados fue de aproximadamente 300 pb y el fragmento más grande fue aproximadamente de 820 pb. No fue posible obtener las secuencias de los productos obtenidos porque se obtuvieron 3 bandas de aproximadamente 800 pares de bases, que no pudieron separarse lo suficiente una de otra para poder aislarlas del gel. El mismo caso se presentó para las bandas de aproximadamente 450 pb. Lo anterior dificultó la obtención de los productos de PCR puros y las secuencias resultantes contenían un gran porcentaje de nucleótidos que no pudieron

determinarse. Otra dificultad fue que el rendimiento de los productos de PCR fue muy bajo y no se contó con la concentración suficiente para las reacciones posteriores de secuenciación.

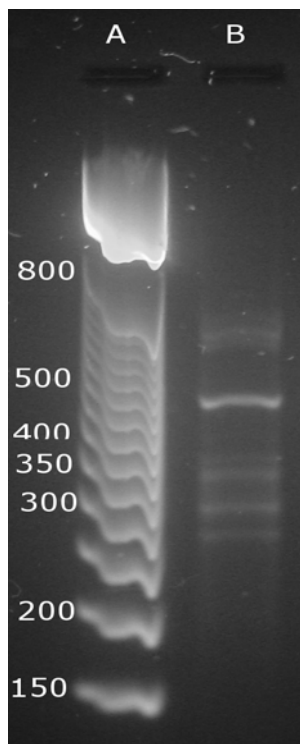


Figura 28. Expresión del extremo 5' de los transcritos de péptidos relacionados a insulina de *H. rufescens* en juveniles de un año. La Línea A representa el marcador de peso molecular. En la línea B, 15 µl del producto de RCP semi-anidado.

4.5 DISCUSIÓN

La secuencia obtenida a partir de un fragmento de péptidos relacionados a insulina, representa la primera secuencia parcial del RNAm de insulina reportada en un organismo del género *Haliotis*. La secuencia mostró 100% de homología con la secuencia de *Aplysia californica*. Podemos pensar que esta secuencia pudiera ser altamente conservada debido a que es un gen funcional y a que estas especies están relacionadas taxonómicamente.

Las diferencias en los tamaños de los productos de la PCR obtenidos en *H. rufescens* durante su desarrollo, así como en los juveniles de un año, sugieren que podrían ser el resultado de diversas copias del gen que codifica para el péptido relacionado a insulina, como sucede en *Drosophila melanogaster* en donde se ha identificado la presencia de 7 péptidos tipo insulina, o como en *Caenorhabditis elegans* que tiene 40 péptidos identificados, asimismo en *Lymnea stagnalis* hay 6 péptidos relacionados a insulina (Smit et al., 1998; Tatar et al., 2003; Grönke et al. 2009 Walkiewicz y Stern, 2010).

Otra posibilidad es que sean el producto de un gen, ya que en *Crassostrea gigas* se reportaron tres fragmentos de 750, 950 y 1,850 pb, pero las diferencias en los tamaños de los tres fragmentos se debieron a las longitudes en la región 3'-UTR del RNA mensajero por lo que los autores suponen que los transcritos son el resultado de la expresión de un solo gen. La expresión de estos tres transcritos cambiaron notoriamente durante el periodo examinado y existió una diferencia en la expresión que dependía del tamaño del transcrito. Hamano et al., (2005) especuló que los transcritos son poliadenilados alternativamente

debido a que pudieran ser expresados en tejidos específicos o estadios específicos de desarrollo, ó bien que se deba a una diversidad funcional que incluya su función como neurohormona o como neurotransmisor en el organismo (Galli *et al.*, 1988 y Smit *et al.*, 1998).

Los resultados del presente estudio representan el inicio para poder documentar y entender la expresión de la hormona insulina a lo largo del desarrollo de estas especies de moluscos y marcar la pauta para buscar las moléculas que intervienen en la regulación del crecimiento y dilucidar la ruta de señalización de este proceso en moluscos. Para lo anterior hace falta obtener la secuencia de los diferentes transcritos, determinar si los diferentes transcritos son producto de múltiples copias del gen o si son el producto de la regulación de un solo gen. Para ello se tendría que analizar la secuencia de la región 3'-UTR, así como cuantificar la expresión durante el desarrollo embrionario, larval y juvenil temprano.

DISCUSIÓN FINAL

Principales Aportaciones a la Pesquería y Acuicultura de Moluscos Gasterópodos.

El crecimiento es el resultado de una integración entre la disponibilidad de nutrientes, interacciones entre el sistema endócrino, factores genéticos y ambientales (Renaville *et al.*, 2001). La idea de que estas interacciones se lleven a cabo de manera ordenada desde los diferentes niveles de organización: ecológico, endócrino y genético clasifica al crecimiento dentro de los llamados sistemas complejos.

Los sistemas complejos están formados por un conjunto de grandes componentes individuales que interactúan entre sí y que pueden modificar sus estados internos como producto de tales interacciones, pueden ser estructuralmente simples aunque exhiben comportamientos dinámicos diversos (Miramotes, 1999).

En este trabajo identificaron los factores que regulan el crecimiento en el abulón *Haliotis corrugata*, *H. rufescens* y caracol *Lithopoma undosa*, dos moluscos gasterópodos que representan a una pesquería en declive y a una acuicultura estable, y el último de ellos, a una pesquería relativamente nueva en la cual es necesario generar información y desarrollo de biotecnologías para su cultivo.

Una de las primeras aportaciones fue proveer evidencias de problemas en el crecimiento de *H. corrugata* en las Islas Benitos, como resultado de la interacción con organismos que perforan la concha. Por lo que en este capítulo la pregunta fue abordada desde el componente ecológico. Sin embargo sólo fue estimada la interacción del organismo con el componente biológico, el cual representa a los organismos endolíticos, pero faltó estimar el efecto de los componentes oceanográficos, particularmente las oscilaciones de la temperatura y pH en el océano y la interacción de todos éstos factores con el sistema endócrino y genético de los organismos.

Otra aportación importante de este trabajo fue contextualizar la ruta de señales que regula el crecimiento en moluscos marinos en relación con otros organismos modelo. Aún cuando no se han identificado la mayoría de las moléculas en la ruta de señales que regula el crecimiento, es evidente que este proceso es altamente conservado entre especies. Lo anterior representó una gran ventaja porque permitió generar criterios para probar el efecto de hormonas exógenas como la insulina recombinante humana en el crecimiento de postlarvas de *L. undosa*. Los resultados mostraron que insulina estimuló el crecimiento en las postlarvas con la concentración más pequeña aunque las diferencias con respecto al control no fueron significativas. Esto representa una aportación inicial a la acuicultura porque este trabajo representa uno de los primeros esfuerzos en generar conocimiento acerca del crecimiento de esta

especie y que permita el desarrollo de su cultivo. En estos dos capítulos las aproximaciones se hicieron a nivel endócrino.

Por último, la identificación de secuencias de DNAC de péptidos relacionados a insulina en ganglios cerebrales de *H. corrugata* y durante el desarrollo larvario de *H. rufescens* deja el precedente de que estos genes se expresan a lo largo de su vida. Aunque este estudio fue limitado al no obtener la secuencia completa y no medir la expresión del gen, abre la pauta para determinar la ó las secuencias completas de los genes involucrados en la regulación del crecimiento. Esto permitirá en el futuro determinar cómo se modulan las señales de la ruta del crecimiento al verse afectadas las variables ecológicas y endócrinas. Resulta también interesante explorar en un futuro, en qué forma se ve alterada la expresión de las moléculas involucradas en la ruta de señales de insulina en abulones con alto grado de organismos endolíticos en su concha.

CONCLUSIONES

Se determinó el desarrollo de la cicatriz muscular en *H. corrugata* y se establecieron 5 tipos de desarrollo de la cicatriz muscular en organismos sanos que presentan menos del 50% de organismos endolíticos en la concha. Los resultados mostraron que existe una correlación positiva entre la cicatriz muscular y la longitud de la concha de los organismos con menos del 50% de epibiontes perforadores.

En los bancos naturales, los organismos endolíticos afectan el desarrollo de la cicatriz muscular, la longitud de la concha y la talla legal mínima de captura, dañan la concha y generan organismos que pueden considerarse como enanos, por lo que los 5 tipos de desarrollo de la cicatriz muscular pueden ser de utilidad al inferir la edad relativa de los organismos.

La revisión mostró que el crecimiento es regulado mediante la ruta de señales de insulina, la cual está conservada en las especies.

La aplicación de una dosis de 0.1 U/ml de insulina provocó una mayor tasa de crecimiento en poslarvas de *Lithopoma undosa* en condiciones de laboratorio. Sin embargo, concentraciones iguales ó mayores a 1 U/ml de insulina posiblemente generan condiciones hipoglucemiantes que afectan negativamente el crecimiento. Dosis de 3 U/ml de insulina sin la adición de diatomeas ocasionan una mortalidad del 100% a los 48 días.

Existe la posibilidad de que *Haliotis* spp. regule su crecimiento mediante la ruta de transducción de señales de insulina, al revelar que posee una

secuencia de RNAm 100% idéntico a insulina de *A. californica*. Asimismo, es posible que el gen detectado tenga diferentes transcritos al obtenerse 9 productos diferentes mediante la técnica RACE.

Posiblemente estos transcritos tengan funciones de regulación diferentes al ver que están presentes en las primeras etapas de vida.

LITERATURA CITADA

- Ablett R. F., R. O. Sinnhuber, R.M. Holmes y D. P. Selivonchick. 1981. The effect of prolonged administration of bovine insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). *Gen Comp. Endocrinol.* 43:211-217.
- Ali M., A. Nicieza y R. J. Wootton. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depresión. *Fish and Fisheries.* 4: 147-190.
- Altschull S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology,* ; 215,:403-410
- Alvarez-Tinajeros M. C., J. Caceres-Martinez y J. G. Gonzalez-Aviles. 2000. Shell boring clams in the blue abalone *Haliotis fulgens* and the yellow abalone *Haliotis corrugata* from Baja California, México. *J. Shellfish Res.* 20:889-893.
- Anguiano-Beltran C. 2007. El papel de las bacterias en la supervivencia y crecimiento de poslarvas del abulon rojo *Haliotis rufescens*. Tesis doctoral. UABC 100 pp.
- Blair E. J. y B. Hedges. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol. Biol. Evol.* 22:2275-2284.
- Böhni R., J. Riesgo-Escovar, S. Oldham, W. Brogiolo, H. Stocker, B. F. Andruss, K. Beckingham y E. Hafen. 1999. Autonomous Control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* Homolog of Vertebrate IRS 1-4. *Cell.* 97:865-875.

- Britz, P. J., T. Hecht, J. Hanuerm, y M. G. Dixon. The development of an artificial feed for abalone farming. S. Afr. J. Sci., 1994 90:70-8.
- Brogiolo W., H. Stocker, T. Ikeya, F. Rintelen, R. Fernandez y E. Hafen. 2001. An evolutionary conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. Current Biology. 11:213-221.
- Burgering B. M. y G. J. Kops. 2002. Cell cycle and death control: long live forkheads. Trends Biochem Sci. 27:352-360.
- Caballero F., J. Rodríguez y J. Castro. 2004. Data on pink abalone, *Haliotis corrugata* (Gray 1828) with infested shells from the San Benito Archipelago, Baja California, México. J. Shellfish Res. 23:1189-1194.
- Cáceres-Martínez J. y G. D. Tinoco-Orta. 2001. Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, México. J. Shellfish Res. 20:875-881.
- Castro G. J., AF. Caballero y U. J. Rivera 2008. Evaluación y manejo del recurso de abulón (*Haliotis* spp.), Caracoles (*Astrea* spp.) y concha lapa (*Megthura crenulata*) en el estado de Baja California, México. Informe de Investigación Interno. Instituto Nacional de la Pesca (INP). 19 pp.
- Chan S. J. y D. F. Steiner. 2000. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. Amer. Zool. 40: 213-222.
- Chang C. F. y S. J. Lin. 1995. Immersion in bovine insulin stimulates growth of tilapia. Repeod Nutr Dev. 35:95-103.

- Ciocan C. M, y J. M. Rotchell. 2005. Conservation of cancer genes in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. Environ. Sci. Technol. 39: 3029-33.
- Claeys I., G. Simonet, J. Poels, T. Van Loy, L. Vercammen, A. De Loof y J Vanden Broeck. 2002. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. Peptides. 23:807-816.
- Collip J. 1923. The demonstration of an insulin-like substance in the tissues of the clam (*Mya arenaria*). J. Biol. Chem. 55:39.
- Correa-Reyes J.G., M. P. Sánchez-Saavedra, M.T. Viana, N. Flores-Acevedo y C. Vásquez-Peláez. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. J. Appj. Phycol. 21:387-393.
- Dian-Chang Z., H. Yan-Qin, S. Yan-Quing y J. Shi-Gui. 2006. Molecular cloning, recombinant expresión, and growth-promoting effect of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) insulin-like growth factor-I. General and Comparative Endocrinology. 148:203-212.
- Durazo-Beltran, E. y M. T. Viana. 2001. Efecto de la concentración de agar, alginato y carragenano en la estabilidad, dureza y lavado de nutrientes en alimentos balanceados para abulón. Ciencias Marinas. 27:1-19.
- Fleming A. E., R. J. Van Barneveld y W. O. Hone. 1996. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. Aquaculture. 140:5-53.

- Fleury C., F. Marin, B. Marie, G. Luquet, J. Thomas, C. Josse, A. Serpentine y J. M. Lebel. 2008. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study. *Tissue and Cell*. 40:207-218
- Floyd P., L. Li, S. Rubakhin, J. Sweedler, C. Horn, I Kupfermann, V. Alexeeva, T. Ellis, N. Dembrow, K. Weiis y F. Vilim. 1999. Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *Journal of Neuroscience*. 19:7732-7741.
- Galli, G., J. Guise, P. W. Tucker y J. R. Nervin. 1988. Poly(A) site choice rather than splice site choice governs the regulated production of IgM heavy-chain RNAs. *PNAS*. 85:2439-2443.
- García-Esquivel, Z. y H. Felbeck. 2006. Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, fed natural and balanced diets. *Aquaculture*. 261:615-625.
- García-Esquivel, Z., S. Montes-Magallón y M. Gonzáles-Gómez. 2007. Effect of temperature and photoperiod on the growth, feed consumption, and biochemical content of juvenile green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *Aquaculture*. 262:129-141.
- Gluyas Millán M. G., C. Quiñones-Velázquez y J. Talavera-Maya. 2000. Parámetros poblacionales del caracol *Astrea undosa* (Word, 1828) en la costa occidental de la península de Baja California. *Ciencias Marinas*. 24:643-658.

- Gluyas-Millán M. G. y J. Talavera-Maya. 2003. Composición por tallas y edades de las poblaciones de abulón *Haliotis fulgens* y *H. corrugata* de la zona de Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencia Marinas*. 29:89-101.
- Gluyas-Millán M. G., C. Quiñones-Velázquez, J. A. Massó-Rojas y F. P. Melo-Barrera. 1999. Diferencias en la relación talla-edad del caracol panocha *Astrea undosa* (Wood, 1828) entre dos localidades de Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*. 25: 91-106.
- Graham R. S. y D. P. Shanley. 2010. Modelling the response of FOXO transcription factors to multiple post-translational modifications made by ageing-related signalling pathways. *PLoS ONE* 5(6): e11092. doi:10.1371/journal.pone.0011092.
- Grindley R. M., J. A. Keogh y C. S. Friedman. 1998. Shell lesions in New Zealand *Haliotis* spp. (Mollusca Gastropoda). *J of Shellfish Res.* 17:805-811.
- Grönke S., D. F. Clarke, S. Broughton, T. D. Andrews y L. Partridge. 2010. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptide. *PLoS Genet* 6(2): e1000857. doi: 10.1371/journal.pgen.1000857
- Guzmán, J. M. y M. T. Viana. 1998. Growth of *Haliotis fulgens* fed diets with and without fish meal compared to a commercial diet. *Aquaculture*. 165:321-331.

- Hamano, K., M. Mawaji y H. Usuki. 2005. cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *Journal of Endocrinology*. 187:55-67.
- Hansen C. J. 1970. Commensal activity as a Function of Age in two Species of California Abalones. *The veliger*. 13:90-94.
- Hara M. y M. Sekino. 2007. Genetic differences between hatchery stocks and natural populations in Pacific abalone (*Haliotis discus*) estimated using microsatellite DNA markers. *Mar. Biotechnol.* 9:74-81.
- Hatch W. I. 1980. The implication of carbonic anhydrase in the physiological mechanism of penetration of carbonate substrata by the marine burrowing sponge *Clione celata* (Demospongiae). *Biol. Bull.* 159:135-147.
- Hendrik H. N., J. A. Keogh y P. K. Probert. 2004. Haematological pathology of shell lesions in the New Zealand abalone, *Haliotis iris* (Mollusca: Gastropoda). *Com Clin Path.* 12:211-216
- Herrington J. y C. Carter-S. 2001. Signaling pathway activated by the growth hormone receptor. *Trends. Endocrinol. Metab.* 12:252-257.
- Inoue H., N. Hisamoto, J. H. An, R. P. Oliveira, E. Nishida, T. K. Blackwell y K Matsumoto. 2005. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & Development*. 18:(2278-2283).
- Jackson D. J., C. McDougall, K. Green, F. Simpson, G. Wörheide y B. M. Degnan. 2006. A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology*. 4:40.doi:10.1186/1741-7007.

- Jackson D.J., G. Wörheide y B. M. Degnan. 2007. Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evolutionary Biology*. 7:16. doi:10.1186/1471-2148-7-160.
- Jaekle W.B. y D.T. Manahan. 1989. Growth and energy imbalance during development of a lecithotrophic molluscan larva (*Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 177:237-246.
- Jia K., D. Chen y D. Riddle. 2004. The TOR pathway with the insulin signalling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development*. 131:3897-3906.
- Jonas E. A., R. J. Knox, L. K. Kaczmarek, J. H. Schwartz y D. H. Solomon. 1996. Insulin receptor in *Aplysia* Neurons: characterization, molecular cloning and modulation of ion currents. *The Journal of Neurosciences*. 16:1645-1658.
- Jyh-Yih C., C. Jian-Chyi, C. Chi-Yao. S. Shih-Chieh, C. Meng-Shu y W. Jen-Leigh. 2000. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides. *Aquaculture*. 181:347-360.
- Krauss G. 2003. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Third edition. Germany. Wyley-VCH Verlag. 544p.
- Lant B. y K. B. Storey. 2010. An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*. Conserved and contrasting signals with the mammalian system. *Int. J. Biol. Sci.* 9-50.

- Lauren M. S., J. McAtee y M. J. Shulman. 2005. The costs of being bored: Effects of a clonid sponge on the gastropod *Littorina littorea* (L). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 327:103– 114.
- Lee-Shing Fan y Pouyan Shen. 1988. A living mechanical file: the burrowing mechanism of the coral-boring bivalve *Lithophaga nigra*. Marine Biology. 97:349-354.
- Leet W. S., C. M. Dewees, R. Klingbeil y E. Larson. 2001. California's Living Marine Resources: A Status Report. Davis CA, University of California Sea Grant. 582 pp.
- Leevers S. J. 2001. Growth control: Invertebrate insulin surprises! Current Biology. 11:R209-R212.
- Mahajan K., D. Coppola, S. Challa, B. Fang, Y. A. Chen, W. Zhu, A. S. Lopez, J. Koomen, R. W. Engelman, C. Rivera, R. S. Muraoka-Cook, J. Q Cheng, E. Schönbrunn, S. M Sebti, H. S. Earp. N. P. Mahajan. 2010. Akt1 mediated AKT/PKB Tyrosin 176 phosphorylation regulates its activation. Plos One 5(3):e9646. doi:10.1371/journal.pone.009646.
- Montserrat N., J. C. Gabillard, E. Capilla, M. I. Navarro y J. Gutierrez. 2007. Role of insulin, insulina-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology. 150: 462-472.
- Moore P. 2003. Controlling how many cells make a fly. Journal of Biology. 2:16.

- Moriyama S., K. Tashiro, S. Furukawa y H. Kawauchi. 2008. Ability of salmon growth hormona to accelarte somatic growth of juvenile abalone *Haliotis discus hannai*. Fisheries Science. 74:860-866.
- Moriyama, S. y H. Kawauchi. 2004. Somatic growth acceleration of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, by immersion in and intramuscular injection of recombinant salmon growth hormone. Aquaculture. 229:469-478.
- Morley J. E. 1987. Neuropeptide regulation of appetite and weight. Endocr. Rev. 8:256-287.
- Moroz L. L., JR. Edwards, S. V. Puthaveetil, A. B. Kohn, T. Ha, A. Heyland, B. Knudsen, A. Sahni, F. Yu, L. Liu, S. Jezzini, P. Lovell, W. Iannucculli, M. Chen, T. Nguyen, H. Sheng, R. Shaw, S. Kalachikov, Y. V. Panchin, W. Farmerie, J. J. Russo J. Ju, y E. R. Kandel. 2006. Neuronal transcriptome of *Aplysia*: neuronal compartments and circuitry. Cell. 127: 1453-67.
- Morris P. A. (1966). A Field Guide to Pacific Coast Shells. Houghton Mifflin, Boston, 297 pp.
- Murai T y H. Ogata. 1990. Changes in free amino acid levels in various tissues of common carp in response to insulin injection followed by force-feeding an amino acid diet. The Journal of Nutrition. 120:711-718.
- Nasokin I. A. Alikasifogiu, T. Barrete, M. Cheng, P. Thomas y A. Nikitin. 2002. Cloning, characterization and embryonic expression analysis of

- Drosophila melanogaster* gene encoding insulin/relaxin-like peptide. Biochem. Biophys. Res. Com. 295:312-318.
- Navarro I. y J. Gutierrez. 1995. Fasting and starvation. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds). Biochemistry and Molecular of Fishes. Metabolic Biochemistry, vol. 4. Elsevier. Amsterdam, pp. 393-434.
- Neufeld T. 2003 Shrinkage control: regulation of insulin-mediated growth by FOXO transcription factors. Journal of Biology. 2:18. doi:10.1186/1475-4924-2-18
- Nollens H. H., J. A. Keogh, y P. K. Probert 2003. Shell lesions in the New Zealand blackfoot abalone, *Haliotis iris* (Mollusca: Gastropoda): pathogenic effects on survival, growth, condition and reproductive capacity. Dis Aquat Org 57:127–133
- Nussey S. S. y S. A. Whitehead. 2001. Chapter 2. The endocrine pancreas. En Andrea Bosher editor. Endocrinology an integrated approach. [En línea]. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=endocrin.
- Ortiz-Quintanilla, M. 1974. Los abulones churridos. Tècnica Pesquera. Año VII(79):17.
- Peterseva M. y O. Shpakov. 2002. Conservatism of the insulin signaling system in evolution of invertebrate and vertebrate animals. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 38: 547-561.
- Peyssonnaud C. y A. Eychène. 2001. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. Biology of the Cell 93:53-62.

- Ponce-Díaz G., A. Vega-Velázquez, M. Ramade-Villanueva, G. León-Carballo y R. Francisco-Santiago. 1998. Socioeconomic characteristics of the abalone fishery along the west coast of the Baja California Peninsula. *J. Shellfish Res.* 17:853-857.
- Pörtner H. O. 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser.* 373: 203-217.
- Renaville R., M. Hammadi y D. Portelle. 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology.* 23:351-360.
- Ribaux P., A. Gjnovci, H. Sadowski y P. Iynedjian. 2002. Discrimination between signalling pathways in regulation of specific gene expression by insulin and growth hormone in hepatocytes. *Endocrinology.* 143:3766-72.
- Rintelen F., H. Stocker, G. Thomas y E. Hafen. 2001. PDK regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*. *PNAS.* 98:15020-15025.
- Rosen G., C. J. Langdon y F. Evans. 2000. The nutritional value of *Palmaria mollis* cultured under different light intensities and water exchange rates for juvenile red abalone *Haliotis rufescens*. *J. Shellfish. Res.* 19:604.
- Rusakov Y., V. Bondareva, V. Kasarev, B. Leibush, R. Barkan y M. Pertseva. 1991. Some Biochemical characteristics of insulin-like substance in the bivalve mollusc *Anodonta cygnea*. *Biokhimiya.* 56:718-726.
- Salas-Garza A., G. Parés-Sierra, R. Gómez-Rigalt y E. Carpizo-Ituarte. 2009. The Larval development, metamorphosis and juvenil growth of the turban

- snail *Lithopoma (Astrea) undosa* (Wood, 1828) (Gastropoda: Turbinidae). J. W. Aq. Soc.. 40:460-471.
- Salas-Garza, A. E. y R. Searcy-Bernal. 1992. Desarrollo y estado actual del cultivo del abulon en México. In: S. A. Shepherd, M. J. Tegner & S. A. Guzman del Proo, editors. Abalone of the world, biology, fisheries and culture. Oxford: Fishing New Books. 538-546 pp.
- Shepherd S. A y M. Avalos Borja. 1997. The shell microstructure and chronology of the abalone *Haliotis corrugata*. Moll. Res. 18:197-207.
- Shepherd S. A., M. Avalos-Borja y M. Ortiz-Quintanilla. 1995. Toward a chronology of *Haliotis fulgens*, with a Review of Abalone Shell Microstructure. Mar. Freshwater Res. 46:607-15.
- Shingleton A. W., J. Das, L. Vinicius y D. L. Stern. 2005. The temporal requirements for insulin signalling during development in *Drosophila*. PLOS Biology. 3(9):e289. doi:10.1371/journal.pbio.0030289.
- Shöenberg C. H. 2008. A history of sponge erosion: from past myths and hypotheses to recent approaches. In: Currents Developments in Bioerosion. Springer Berlin Heidelberg. Pp. 165-202.
- Silhan J., P. Vacha, P. Strnadova, J. Vecer, P. Herman, M. Sulc, J. Teisinger, V. Obsilova y Tomas Obsil. 2009. 14-3-3 Protein Masks the Binding Interface of forkhead transcription factor FoXO4. J. of Biol. Chem.. 284:19349-19360.
- Smit A., R. Van Kesteren, K. Li, J. Van Minnen, S. Spijker, H. Van Heerikhuizen y P. Geraerts. 1998. Toward understanding the role of insulin in the brain:

Lessons from insulin-related signalling systems in the vertebrate brain.
 Prog. Neurobiol. 54:35-54.

Smit, A.B., Kesteren, R.E.V., Li, K.W., Minnen, J.V., Spijker, S., Heerikhuizen, H.V. y Geraerts, W.P.M. Towards understanding the role of insulin in the brain: lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. Progress in Neurobiology 1998. 54:35-54.

Takahashi A., T. Ogasawara, H. Kawauchi y T. Hirano. 1991. Effects of stress and fasting on plasma growth hormone levels in the immature rainbow trout. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 57:231-235.

Takeshi F., C. Schwarzingen, I Miksik, M. Smrz y A. Beran. 2009. Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. Comp. Biochem. and Physiol., Part B. 154:351-371.

Tartar M., A. Bartke y A. Antebi. 2003. The endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals. Science. 299: 1346-1351.

Toemel E. R., S. W. Chu, V. Reinke, S. S. Lee; F. M. Ausubel, D. H. Kim. 2006. p38 MAPK Regulates Expression of Immune Response Genes and Contributes to Longevity in *C. elegans*. PLoS Genetics. 2(11): e183. doi:10.1371/journal.pgen.0020183.

Vezina F. A., y O. Hoegh-Guldberg. 2008. Effects of ocean acidification on marine ecosystems. Mar Ecol Prog Ser. 373: 199-201

Viana M. T., L. R. D'Abramo, M. A. Gonzalez, J. V García-Suárez, A. Shimada y C. Vásquez-Peláez. 2007. Energy and nutrient utilization of juveniles

- green abalone (*Haliotis fulgens*) during starvation. *Aquaculture*. 264:323-329.
- Volaveric S. y G. Thomas. 2001. Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 65:101-127.
- Walkiewicz M. A., y M. Stern. 2009. Increased Insulin/Insulin Growth Factor Signaling Advances the Onset of metamorphosis in *Drosophila*. *PLoS ONE* 4(4):e5072. doi: 10.1371/journal.pone.0005072.
- Yan, Z., Chen, J., Wu, P. y Gao, X. The influence of light intensity on the growth and survival of the larvae and juvenile abalone of *Haliotis diversicolor aquatilis*. *J. Fish. China*; Shuichan Xuebao., 2001. 25:336-341.
- Ye X., J. L. Shobe, S. K. Sharma, A. Marina y T. J. Carey. 2008. Small G proteins exhibit pattern sensitivity in MAPK activation during the induction of memory and synaptic facilitation in *Aplysia*. *PNAS* 105: 20511-6.
- Zacharias M.A y D.J. Kushner. 2006. Sea Temperature and wave height as predictors of population size structure and density of *Megastrea (Lithopoma) undosa*: Implications for fishery management. *Bull. Mar. Sci.* 79:71-82.