

TESIS DEFENDIDA POR  
**Jennifer Marian Mancera Flores**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

*Co-Director del Comité*

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

*Co-Director del Comité*

---

Dra. Ana Denise Re Araujo

*Miembro del Comité*

---

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Saucedo

*Miembro del Comité*

---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

*Coordinador del programa de posgrado en  
Ciencias con orientación en Biotecnología  
Marina*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

10 de Diciembre de 2009

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CON  
CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LA NEUROHORMONA**

**Liv-CHH-SG1 de *Litopenaeus vannamei***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JENNIFER MARIAN MANCERA FLORES

Ensenada, Baja California, México, 10 de Diciembre de 2009.

# RESUMEN

**RESUMEN** de la tesis de **Jennifer Marian Mancera Flores**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en el posgrado en ciencias con orientación en **Biotecnología Marina**. Ensenada, Baja California. **Diciembre de 2009**.

## **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CON CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LA NEUROHORMONA**

**Liv-CHH-SG1 de *Litopenaeus vannamei***

Resumen aprobado por:

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
Co-Director de Tesis

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
Co-Director de Tesis

En crustáceos, el complejo órgano X-glándula del seno ubicado en el pedúnculo ocular y es uno de los sistemas neuroendocrinos en los cuales se han identificado una variedad de neuropéptidos. La familia de hormonas neuropeptídicas CHH/MIH/GIH comprende a la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH) y la hormona inhibidora de las gónadas (GIH). Estos neuropéptidos regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos incluyendo, muda, metabolismo de carbohidratos, reproducción y osmoregulación. La neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> ya ha sido clonada y expresada en *Pichia pastoris* y su actividad biológica determinada. Sin embargo, a la fecha no se han obtenido ni caracterizado anticuerpos policlonaes con capacidad de reconocimiento de la neurohormona Liv- Liv-CHH-SG1.

La expresión de la neurohormona recombinante Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> se llevó a cabo a partir de una cepa Mut<sup>s</sup> de *P. pastoris* utilizando medio BMMY con metanol al 4%. La proteína recombinante fue analizada en electroforesis Tricina-SDS-PAGE y corroborada por análisis de Western blot. La proteína fue cuantificada mediante el kit de análisis por BCA y RP-HPLC y utilizada para inmunizar un conejo. La sensibilidad y especificidad de los antisueros obtenidos fue analizada mediante ensayos de ELISA. Finalmente se establecieron las condiciones óptimas para el reconocimiento de la neurohormona recombinante y se realizaron los ensayos de reconocimiento en muestras de hemolinfa obtenidas de camarones sometidos a 28°C y 35%.

La neurohormona recombinante Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> expresada en *P. pastoris* tuvo un rendimiento de 71.43  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . El suero hiperinmune obtenido a partir de la inmunización del conejo con la neurohormona recombinante presentó valor de titulación de 1:500. Los anticuerpos policlonales (IgG) precipitados a partir del antisuero fueron utilizados para detectar a la neurohormona Liv-CHH-SG1 nativa en muestras de hemolinfa tomadas a lo largo de un ciclo de muda de juveniles de *L. vannamei*. La técnica estandarizada tuvo un límite mínimo de detección de 1.62  $\text{pmol ml}^{-1}$  de neurohormona recombinante.

**Palabras Clave:** *Litopenaeus vannamei*, Liv-CHH-SG1, ELISA, anticuerpos policlonales, *Pichia pastoris*.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Jennifer Marian Mancera Flores**, as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. **October 2009**.

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES WITH RECOGNIZING CAPACITY of *Litopenaeus vannamei* Liv-CHH-SG1 neurohormone**

In crustaceans, the X-organ-sinus gland complex in the eyestalk is one of the neuroendocrine systems in which a variety of neuropeptides have been identified. The CHH/MIH/GIH neuropeptide family comprise the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt inhibiting hormone (MIH) and vitellogenesis /gonad inhibiting hormone (VIH/GIH). These neuropeptides can regulate a variety of physiological processes, including molting, carbohydrate metabolism, reproduction, and osmoregulation. The Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> neurohormone has been cloned and expressed in *Pichia pastoris* and its biological activity determined. However, polyclonal antibodies with capacity of recognize Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> neurohormone have not been produced or characterized.

Recombinant Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> was expressed in a *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> strain, using BMMY medium with 4% methanol. The recombinant protein was analyzed by Tricine-SDS-PAGE and confirmed by Western blot analysis. The protein concentration was determined by a BCA Protein Analysis kit and RP-HPLC and it was used for the rabbit immunization. The sensitivity and specificity of the antiserum were determined by ELISA analysis. Finally, the optimal conditions for the recognition of the recombinant neurohormone were established and the recognition assays with haemolymph samples obtained from shrimps exposed to 28°C and 35‰ were realized.

The recombinant Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> neurohormone expressed in *P. pastoris* showed a yield of 71.43 µg ml<sup>-1</sup>. Rabbit antiserum raised against this recombinant neurohormone had a specific antibody titer of 1:500. Polyclonal antibodies (IgG) precipitated from antiserum, were utilized for detection of native Liv-CHH-SG1 in hemolymph samples during the molt cycle of *L. vannamei* juveniles. Standardized technique was sensitive to 1.62 pmol ml<sup>-1</sup> of recombinant neurohormone.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, Liv-CHH-SG1, ELISA, polyclonal antibodies, *Pichia pastoris*.

# DEDICATORIA

*A mis hijas,  
Ambar y Melina*

# AGRADECIMIENTOS

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

Al CICESE, su personal docente, administrativo y bibliotecario, por brindarme la oportunidad de superarme.

A mis co-directores, la Dra. Elizabeth Ponce Rivas y el Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, por permitirme ser su estudiante y formar parte de su equipo de trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Ana Denise Re Araujo y el Dr. Horacio Jesús de la Cueva Saucedo, por sus consejos y recomendaciones durante el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, por compartir conmigo su conocimiento y experiencia en este tema.

Al Dr. Ernesto García Mendoza, por su disponibilidad, asesoría y préstamo de instalaciones y equipo en la última fase de mi trabajo.

A mis padres, por todo su apoyo a lo largo de mi vida.

A toda la gente que creyó en mí.

# CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	1
I.1 Biología de <i>Litopenaeus vannamei</i>	1
I.2 Distribución geográfica de poblaciones silvestres	2
I.3 Importancia económica	4
I.4 Regulación endocrina	6
I.5 El proceso de muda	8
I.6 Familia MIH/CHH/GIH	13
I.7 Ablación de los pedúnculos oculares	17
I.8 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión	19
I.9 Vector de expresión pPICZαA	22
I.10 Anticuerpos	25
I.11 ELISA	26
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	28
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	32
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	33
IV.1 Objetivo general	33
IV.2 Objetivos específicos	33
<b>V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	34
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	35
VI. 1 Expresión de rLiv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> a partir de la clona obtenida en <i>Pichia pastoris</i> .	35
VI.1.1 PCR de colonia	35
VI.1.2 Crecimiento e inducción	36
VI.1.3 Cinética de expresión	36
VI.1.4 Escalamiento del cultivo	39



## CONTENIDO (Continuación)

	Página
VI.1.5 Concentración	39
VI.1.6 Cuantificación por BCA	40
VI.1.7 Cuantificación por RP-HPLC	41
VI. 2 Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales de conejo anti rLiv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub>	42
VI.2.1 Inmunización del conejo	42
VI.2.2 Obtención de sueros preinmune e inmunes	43
VI.2.3 Exanguinación	44
VI.2.4 Titulación del suero hiperinmune	45
VI.2.5 Precipitación y diálisis del suero hiperinmune	45
VI.2.6 Determinación del límite mínimo de detección	46
VI.2.7 Análisis de reacción cruzada	46
VI. 3 Obtención de muestras de hemolinfa de camarones juveniles a lo largo de su ciclo de muda	47
VI.3.1 Mantenimiento de organismos bajo condiciones controladas	47
VI.3.2 Toma y manejo de muestras	47
VI. 4 Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos policlonales hacia la hormona nativa en muestras de hemolinfa	48
VI.4.1 Análisis preliminar de muestras en <i>pool</i>	48
VI.4.2 Análisis preliminar de muestras en forma individualizada	48
VI.4.3 Reconocimiento diferencial del antígeno recombinante	48

# CONTENIDO (Continuación)

	Página
VI.4.4 Determinación de condiciones optimas para el reconocimiento de la hormona recombinante en SSA	49
VI.4.5 Análisis de muestras en condiciones predeterminadas	49
VI.4.6 Análisis de muestras pertenecientes a un ciclo de muda bajo condiciones predeterminadas	51
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
VII. 1 Expresión de rLiv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> a partir de la clona obtenida en <i>Pichia pastoris</i> .	52
VII.1.1 PCR de colonia	52
VII.1.2 Cinética de expresión	53
VII.1.3 Escalamiento del cultivo	54
VII.1.4 Cuantificación por BCA	55
VII.1.5 Cuantificación por RP-HPLC	58
VII. 2 Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales de conejo anti rLiv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub>	59
VII.2.1 Análisis inmunoenzimático de sueros pre-inmune e inmunes	59
VII.2.2 Titulación del suero hiperinmune	60
VII.2.3 Precipitación y diálisis del suero hiperinmune	61
VII.2.4 Determinación del límite mínimo de detección	62
VII.2.5 Análisis de reacción cruzada	64
VII. 3 Obtención de muestras de hemolinfa de camarones juveniles a lo largo de su ciclo de muda	65

# CONTENIDO (Continuación)

	Página
VII. 4 Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos policlonales hacia la hormona nativa en muestras de hemolinfa	65
VII.4.1 Análisis preliminar de muestras en <i>pool</i>	65
VII.4.2 Análisis preliminar de muestras en forma individualizada	66
VII.4.3 Reconocimiento diferencial del antígeno recombinante	67
VII.4.4 Determinación de condiciones optimas para el reconocimiento de la hormona recombinante en SSA	68
VII.4.5 Análisis de muestras en condiciones predeterminadas	69
VII.4.6 Análisis de muestras pertenecientes a un ciclo de muda bajo condiciones predeterminadas	74
<b>VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>81</b>
<b>X. ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Litopenaeus vannamei</i> Boone, 1931 (Dore y Frimodt, 1987).	1
2	Distribución de poblaciones silvestres (FAO Estadísticas pesqueras, 2006).	3
3	Ciclo de vida de un peneido típico con estadios en diferentes hábitats (Bailey-Brock y Moss, en: Marine Shrimp Culture: Principles and Practices, 1992).	3
4	Principales países productores de <i>L. vannamei</i> (FAO Estadísticas Pesqueras, 2006).	5
5	Producción global de <i>L. vannamei</i> por acuicultura (FAO Estadísticas Pesqueras, 2006).	6
6	Sistemas de control de primer, segundo y tercer orden, definidos de acuerdo al número de glándulas endocrinas ubicadas entre neurohormonas/neurotransmisores y tejidos blanco (Hsu <i>et al.</i> , 2006).	8
7	Diagrama que muestra la prolongación de los estadios de intermuda conforme se incrementa la edad del organismo (Waterman, 1960).	9
8	Diagrama del sistema endocrino de los crustáceos (Mazurová <i>et al.</i> , 2008).	12
9	A, Vista anterior del ganglio del pedúnculo ocular de <i>Gecarcinus lateralis</i> (Bliss y Welsh, 1952). B, Diagrama esquemático del órgano-x glándula del seno en <i>Cancer sp.</i> (Hsu <i>et al.</i> , 2006).	13
10	Esquema generalizado que ilustra los diferentes <i>loci</i> propuestos para la producción de CHH en decápodos (Fanjul-Moles, 2006).	14
11	Representación esquemática del gen, transcrito y estructura de los péptidos CHH/MIH (Böcking <i>et al.</i> , 2002).	17
12	Procesos fisiológicos que se encuentran bajo el control de las hormonas sintetizadas en los pedúnculos oculares (complejo órgano-x glándula del seno) de los crustáceos (LaFont, 2000).	18
13	Ruta metabólica para la utilización de metanol en <i>Pichia pastoris</i> (Gellisen <i>et al.</i> , 2005).	20
14	Vector de expresión pPICZαA.	22
15	Estructura de una Inmunoglobulina convencional (Abbas y Lichtman, 2005).	26

## LISTADO DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
16	Diagrama esquemático en el que se compara la estructura de la secuencia parcial del gen <i>mih</i> ( <i>chh-sg</i> ) y sus dos transcritos por corte y empalme alternativo, <i>mih-1</i> ( <i>chh-sg1</i> ) y <i>mih-2</i> ( <i>chh-sg2</i> ) de <i>L. vannamei</i> . Los cuatro exones se muestran con números romanos (EI – EIV). El exón e intrón I hipotéticos, se muestran con líneas punteadas (Lago-Lestón <i>et al.</i> , 2007).	29
17	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de Liv-CHH-1SG1 <sub>HIS</sub> (Sánchez-Castrejón, 2007).	30
18	PCR de colonia de la cepa KM71 MIH <sub>HIS</sub> .	52
19	Análisis de la síntesis y secreción de Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> , en electroforesis desnaturizante en poliacrilamida al 16% (tinción Azul Coomassie).	53
20	Análisis de la síntesis y secreción de Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> , mediante Western blot.	54
21	Análisis de la cosecha de Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> en electroforesis desnaturizante en poliacrilamida al 16% (tinción Azul Coomassie).	55
22	Análisis de la cosecha de Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> mediante Western blot.	55
23	Modelo de regresión lineal, a partir de los valores obtenidos de absorbancia y concentración conocida de BSA.	56
24	Análisis del concentrado en electroforesis desnaturizante en poliacrilamida al 16% (tinción Azul Coomassie).	57
25	Perfiles obtenidos a partir de diferentes diluciones de medio de inducción concentrado y separado por RP-HPLC.	58
26	Análisis inmunoenzimático de las fracciones de RP-HPLC mediante ELISA. PBS, blanco; (+), control positivo.	59
27	Incremento en valores de los títulos a lo largo del tiempo.	60
28	Valores de titulación obtenidos a partir de sueros pre-inmune e inmunes.	60
29	Visualización de IgG precipitadas y dializadas en electroforesis desnaturizante en poliacrilamida al 10%	61
30	Limite mínimo de detección de antígeno recombinante.	62

## LISTADO DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
31	Análisis de regresión lineal de las lecturas obtenidas en el ensayo para la determinación del límite mínimo de detección del antígeno recombinante.	63
32	Análisis de reacción cruzada.	64
33	Análisis de muestras de hemolinfa en <i>pool</i> .	66
34	Análisis preliminar de muestras de hemolinfa.	67
35	Reconocimiento diferencial de antígeno recombinante en PBS y SSA.	68
36	Determinación de condiciones para análisis de muestras con SSA.	69
37	Reconocimiento de hormona nativa en muestras de 50 µl de hemolinfa.	70
38	Análisis de 50 µl de muestras de hemolinfa correspondientes a un ciclo de muda.	71
39	Análisis de 40 µl de muestras de hemolinfa.	72
40	Análisis de 100 µl de muestras de hemolinfa.	73
41	Análisis de 100 µl de muestras de hemolinfa, correspondientes a un ciclo de muda.	74
42	Correlación de los títulos de Prc-MIH (TR-FIA) y ecdisteroides (RIA) en hemolinfa durante los estadios de intermuda y premuda temprana en <i>Procambarus clarkii</i> (Nakatsuji y Sonobe, 2003). TR-FIA, por sus siglas en inglés <i>Time Resolved Fluoroimmunoassay</i> ; RIA, Radio inmunoensayo.	76
43	Cambios en los niveles circulantes de MIH en hemolinfa y niveles de MIH en glándula del seno durante la intermuda y premuda tardía en <i>Carcinus maenas</i> (Chung y Webster, 2005).	77

## LISTADO DE TABLAS

Tabla		Página
I	Principales países acuicultores de <i>L. vannamei</i> (Estadísticas Pesqueras de la FAO, 2006).	6
II	Actividades biológicas de los péptidos de la familia CHH/MIH/GIH (Böcking <i>et al.</i> , 2002).	16
III	Componentes del vector pPICZ $\alpha$ A.	24
IV	Diluciones para la construcción de curva estándar.	40
V	Esquema de inmunización con el antígeno rLiv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> .	43
VI	Controles utilizados en el ensayo inmunoenzimático.	44
VII	Lecturas de absorbancia a 562nm.	56

# LISTADO DE ANEXOS

ANEXO		Página
A1	YPD, Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa	92
A2	BMGY, Medio complejo con amortiguador y glicerol	93
A3	BMMY, Medio complejo con amortiguador y metanol	94
A4	10X D, Dextrosa al 20%	95
A5	Amortiguador Fosfato de potasio pH 6.0	95
A6	10X YNB, Base nitrogenada de levadura	96
A7	10X B, Biotina al 0.02%	96
A8	10X GY, Glicerol al 10%	97
A9	10X M, Metanol al 5%	97
A10	Tricine-SDS-PAGE, Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida	98
A11	Tinción Azul Coomassie	101
A12	PBS, Amortiguador Fosfato Salino	102
A13	Western blot, Electrotransferencia semiseca	103
A14	Towbin 1X, Amortiguador de transferencia	104
A15	Solución bloqueadora	104
A16	Solución de incubación	105
A17	PBST, Solución de lavado	105
A18	SAS, Sulfato de Amonio Saturado	106
A19	ABTS, (por sus siglas en inglés, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	106



# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Biología de *Litopenaeus vannamei*

*Litopenaeus vannamei* (Figura 1), de nombre común camarón blanco o camarón de patas blancas, es un crustáceo decápodo que pertenece a una de las familias con mayor número de taxa, la familia Penneidae, la cual a su vez, pertenece a la Clase Malacostraca (Bailey-Brock y Moss, en: Marine Shrimp Culture: Principles and Practices, 1992)

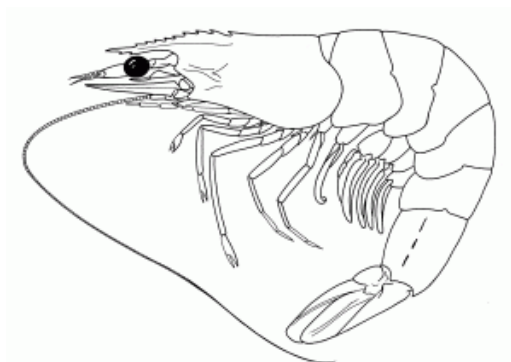


Figura 1. *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Dore y Frimodt, 1987)

Como en todos los decápodos, los apéndices asociados a la región de la cabeza de esta especie incluyen anténulas, antenas, mandíbulas y dos pares de maxilas. El tórax presenta tres pares de maxilípedos y cinco pares de pereópodos. El abdomen dividido en seis segmentos posee cinco pares de pleópodos y un par de urópodos, los cuales forman el abanico de la cola con el telson. Esta especie se distingue por la presencia de uno a tres dientes en el margen ventral del *rostrum* y de ocho a nueve en el margen dorsal. Su coloración es normalmente blanca translúcida, pero puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. Alcanza una talla máxima 23 cm y una longitud de caparazón máxima de 9 cm.

Son organismos dioicos y las estructuras de los genitales externos son las principales características de dimorfismo sexual. Los machos tienen el primer par de pleópodos modificados para la transferencia de esperma al receptáculo externo de la hembra (*thelycum*). Comúnmente las hembras crecen más rápidamente y adquieren mayor talla que los machos.

Entre los factores ambientales que influyen de mayor manera en las respuestas fisiológicas de esta especie se encuentran la temperatura, la salinidad y la interacción temperatura-salinidad (Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001). *Litopenaeus vannamei* se caracteriza por tolerar un amplio intervalo de salinidades que van desde 1-2 ‰ hasta 40 ‰ (Menz y Blake, 1980). El óptimo fisiológico de los juveniles de esta especie ocurre en su punto isosmótico, el cual corresponde a una salinidad de 26 ‰ (Valdez *et al.* 2008) y a una temperatura de 28 °C (Valdez, 2002).

## **I.2 Distribución geográfica de poblaciones silvestres**

Es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México, hacia Centro y Sudamérica, hasta Tumbes, Perú (Figura 2).

*L. vannamei* se encuentra en hábitats marinos tropicales. Presenta un ciclo de vida anfibiótico (Figura 3), que incluye distintos estadios larvarios que se distribuyen en diferentes hábitats.

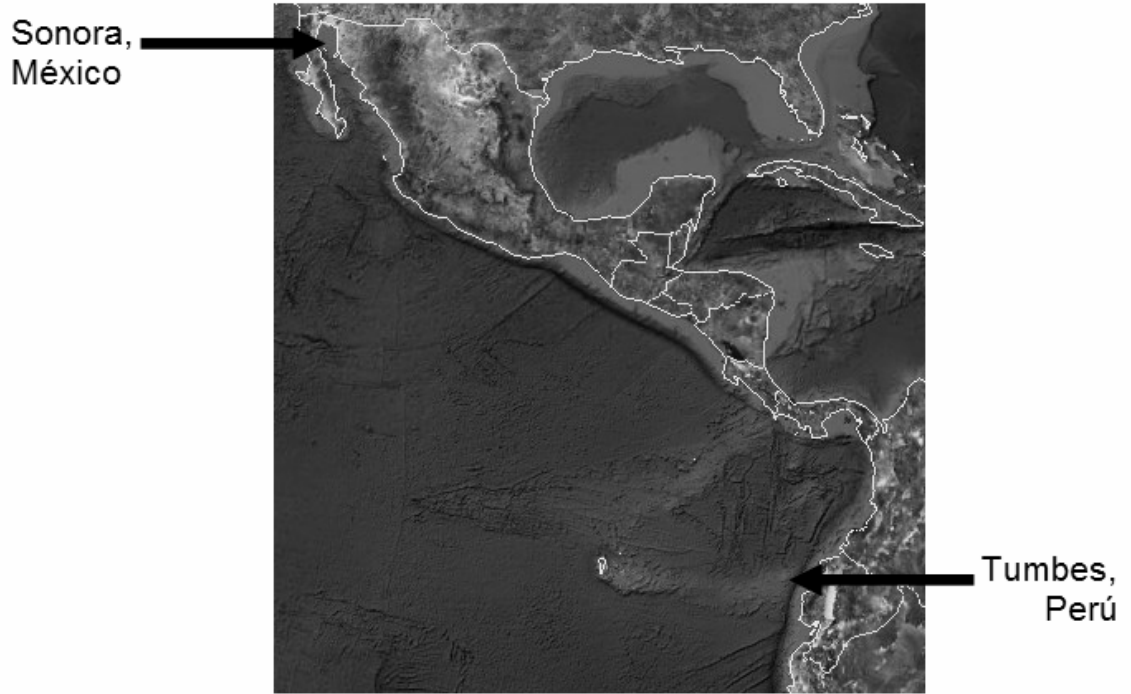


Figura 2. Distribución geográfica de poblaciones silvestres de *L. vannamei* (FAO Estadísticas Pesqueras, 2006)

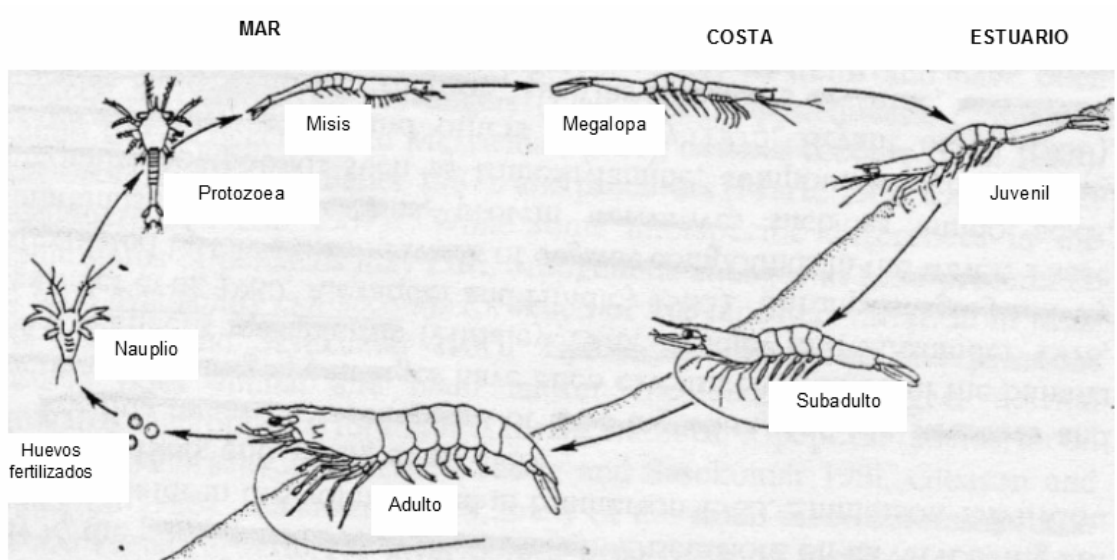


Figura 3. Ciclo de vida de un peneido típico, con estadios en diferentes hábitats (Bailey-Brock y Moss, en: Marine Shrimp Culture: Principles and Practices, 1992).

Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil y pre-adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares. Los machos maduran a partir de los 20 g y las hembras a partir de los 28 g, en una edad promedio entre 6 y 7 meses. El apareamiento y transferencia del espermátforo ocurren antes del desove. Durante el desove de 100,000 a 250,000 huevos y el esperma son liberados por la hembra simultáneamente, mientras ella nada. La eclosión ocurre en la columna de agua, aproximadamente 16 horas después. Posteriormente a la eclosión, la larva o nauplio, nada intermitentemente, es fototáctica positiva y se nutre exclusivamente de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvianas (protozoa, mysis y postlarva temprana) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan de fitoplancton y zooplancton, y son transportadas a la costa por las corrientes de marea. Cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su transformación al estado post larvario, se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y otros crustáceos (Bailey-Brock y Shaun, en: Marine Shrimp Culture: Principles and Practices, 1992).

### **I.3 Importancia económica**

De las especies de camarón que se reproducen en cautiverio, *Litopenaeus vannamei* es la especie dominante en el mercado. Ocupa el primer lugar de las especies cultivadas en los países occidentales y representa el 95% de la producción en América Latina (FAO Estadísticas Pesqueras, 2006)

Los principales países productores de *L. vannamei* se muestran en la Figura 4. La lista completa de países incluye: China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Belice, Vietnam, Malasia, Taiwán, Islas del Pacífico, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Estados Unidos de Norteamérica, India, Filipinas,

Camboya, Surinam, Saint Kitts, Jamaica, Cuba, República Dominicana y Bahamas.

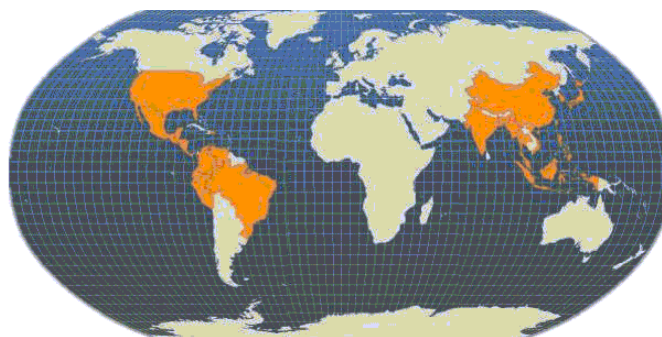


Figura 4. Principales países productores (color anaranjado) de *L. vannamei* (FAO Estadísticas Pesqueras, 2006).

Según las estadísticas de la FAO (2006), el total de la producción de granjas de *L. vannamei* se incrementó constantemente de 8,000 toneladas en 1980 (Figura 5), hasta 194,000 toneladas en 1998. Tras un pequeño declive en 1999 y otro más significativo en el año 2000 debido a la invasión del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en América Latina, la FAO registró un rápido crecimiento de la producción a más de 1,386,000 toneladas en 2004, debido a la rápida dispersión de esta especie en Asia. Los principales países productores en 2004 fueron: China (700,000 toneladas), Tailandia (400,000 toneladas), Indonesia (300,000 toneladas) y Vietnam (50,000 toneladas).

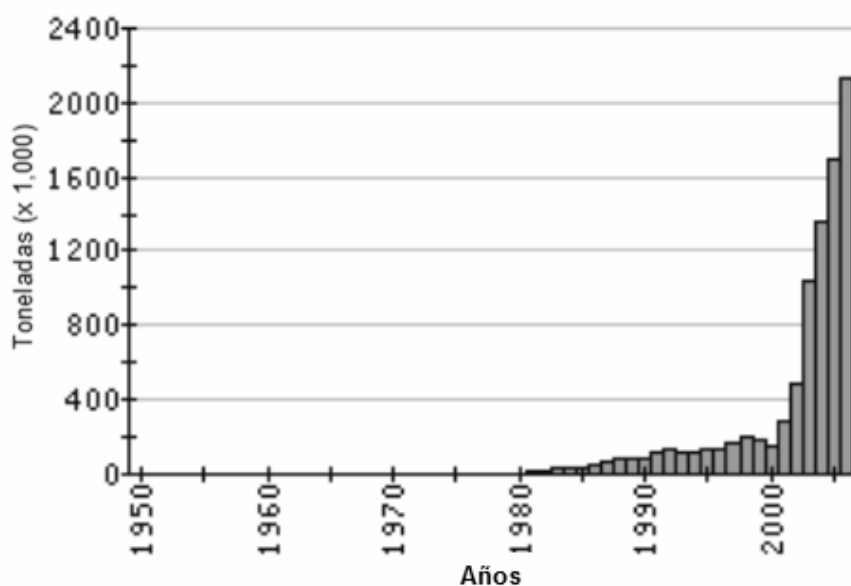


Figura 5. Producción acuícola global de *L. vannamei* (FAO Estadísticas Pesqueras, 2006).

A pesar de que en la producción global, América Latina aporta únicamente el 2.26% (Tabla I), el cultivo de *L. vannamei* para Latinoamérica representa el 95% de la producción total de camarones cultivados.

<b>País</b>	<b>Producción</b>	<b>Valor \$</b>
China	69.57%	51.20%
Asia*	21.92%	29.30%
Resto del mundo	8.51%	19.50%
América Latina	2.26%	7.47%

#### **I.4 Regulación endócrina**

Cualquier organismo multicelular requiere de mecanismos de coordinación que involucran varios mensajeros químicos capaces de ejercer control a grandes distancias. Actualmente, se cree que las neurohormonas precedieron a las hormonas verdaderas durante el desarrollo de la coordinación

nerviosa a través del proceso evolutivo. A diferencia de los neurotransmisores, las neurohormonas de los invertebrados y las hormonas se han diversificado de una manera importante. Entre otras, comprenden moléculas de naturaleza peptídica y lipídica, y pueden agruparse en familias con base en características estructurales comunes. Las hormonas peptídicas, son generalmente liberadas de los tejidos en respuesta a un estímulo y posteriormente transportadas por el sistema circulatorio hasta los tejidos blanco, en donde se unen a los receptores de la superficie celular y estimulan rutas intracelulares de transducción, que conllevan a una cascada de señalización, que regula directa o indirectamente algún proceso fisiológico (LeBlanc, 2007). De acuerdo al número de glándulas endocrinas ubicadas a lo largo de los ejes hormonales, los sistemas de control se clasifican en sistemas de primer, segundo y tercer orden (Figura 6), siendo este último el mas complejo y mas comúnmente encontrado en organismos evolutivamente superiores.

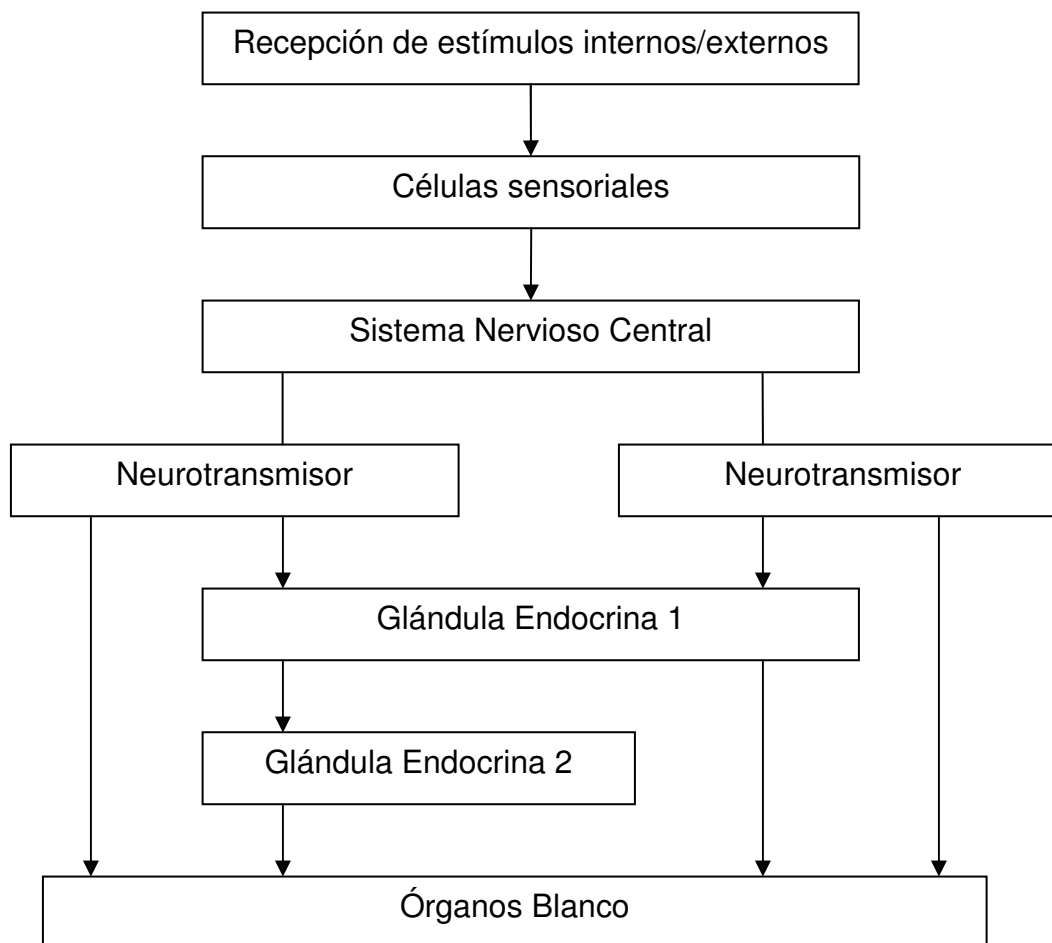


Figura 6. Sistemas de control de primer, segundo y tercer orden, definidos de acuerdo al número de glándulas endocrinas ubicadas entre neurohormonas/neurotransmisores y tejidos blanco (LaFont, 2000).

### I.5 El proceso de muda

La muda forma parte del crecimiento discontinuo propio de todos los artrópodos. Para su estudio, este proceso se ha dividido en cuatro fases: (1) **Metaecdisis o Postmuda** (estadios A y B), periodo inmediato a ecdisis; (2) **Anaecdisis o Intermuda** (estadio C), periodo de crecimiento de tejido y acumulación de reservas alimenticias; (3) **Proecdisis o Premuda** (estadio D),



periodo de cambios morfológicos y fisiológicos para la preparación de la siguiente muda y, (4) **Ecdisis o Muda** (estadio E), despojo de la cutícula vieja (Chan *et al.*, 1988). A medida que los animales envejecen, los periodos de intermuda se vuelven más prolongados (Figura 7).



Figura 7. Diagrama que muestra la prolongación de los estadios de intermuda conforme se incrementa la edad del organismo (Waterman, 1960).

A pesar de que el inicio de la Proecdisis (D0) no involucra cambios morfológicos drásticos, durante este estadio, ocurren una gran variedad de eventos bioquímicos, como la acumulación de glicógeno en epitelio y tejido conectivo subepitelial, elevación de niveles de Calcio en hemolinfa, decremento de fosfatos en hepatopancreas y el inicio de formación de gastrolitos (en aquellas especies en las que se presentan). A diferencia de otros estadios de la intermuda, la sucesión de los eventos fisiológicos que comprenden la fase D0, pueden ser detenidos cuando las condiciones externas son desfavorables. La fase D0 culmina, cuando comienza la formación del nuevo exoesqueleto. Durante la fase D1, las alteraciones del

exoesqueleto alteran la apariencia y el comportamiento del organismo. Generalmente, el decápodo entra en una etapa de inanición, y en este momento, las condiciones externas desfavorables son incapaces de frenar el desenlace del ciclo. La Ecdisis (E) se divide en una fase pasiva y una fase activa. Cuando este estadio comienza, el animal busca un refugio seguro, casi todos sus movimientos cesan y tiene lugar un incremento en los niveles de glucosa y presión osmótica de la hemolinfa. Durante la fase pasiva, el movimiento de agua hacia adentro se inicia cuando el recubrimiento gástrico viejo se rompe, exponiendo la nueva cutícula que es más permeable. El agua entra, incrementando la presión hidrostática en el lumen del tracto digestivo, y posteriormente pasa a la hemolinfa por filtración y osmosis. De esta manera, el organismo se hincha al duplicarse el volumen de su hemolinfa y el viejo exoesqueleto se fractura. Durante la fase activa de la Ecdisis, todos los apéndices, incluyendo patas, branquias, antenas, pedúnculos oculares y abdomen, son despojados. El recubrimiento del tracto digestivo también. Este permanece anclado al resto de la exuvia a través de la boca y el ano (se rompe o es enteramente absorbido en la región cardíaca). Por otra parte, la presión de los fluidos corporales en el cefalotórax decae, mientras que los apéndices se tornan con una apariencia ampulosa. El saco pericárdico auxilia en la expulsión de la hemolinfa fuera de la cavidad principal del cuerpo. La reabsorción de agua comienza nuevamente, de manera inmediata a la exuviación. Esta se acumula no solamente en la hemolinfa, sino también en los tejidos, especialmente en el hepatopancreas, el epitelio del integumento y en los músculos (Waterman, 1960).

Todo este proceso es estimulado y controlado por factores externos (p. ej. iluminación, temperatura, autotomía) e internos, como los ciclos circadianos (Fanjul-Moles, 2006), regidos por un grupo de neurohormonas: Hormona Inhibidora de la Muda (MIH), Hormona hiperglucémica (CHH) y su antagónico, la ecdisona.

El modelo actualmente aceptado del control negativo de la muda en crustáceos (Figura 8) se fundamenta en la hipótesis de que durante el periodo de intermuda (C4), la Hormona Hiperglucémica de Crustáceos (CHH) y la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH) son sintetizadas en las células neurosecretoras del órgano-X y secretadas a través de los axones terminales de la Glándula del Seno (Figura 9), un órgano neurohemal ubicado en los pedúnculos oculares. De manera que la inhibición de la muda ocurre por la acción supresora de MIH sobre la síntesis de ecdisteroides (ecdisona) (Chang, 2001; Chen *et al.*, 2005; Huberman, 2000; Lacombe *et al.*, 1999; LaFont, 2000; LeBlanc, 2007; Lee *et al.*, 1998) a través de receptores específicos de alta afinidad sobre las membranas celulares del órgano-Y (Webster, 1991) y una cascada de segundos mensajeros que involucran AMPc y GMPc (Lachaise *et al.*, 1993).

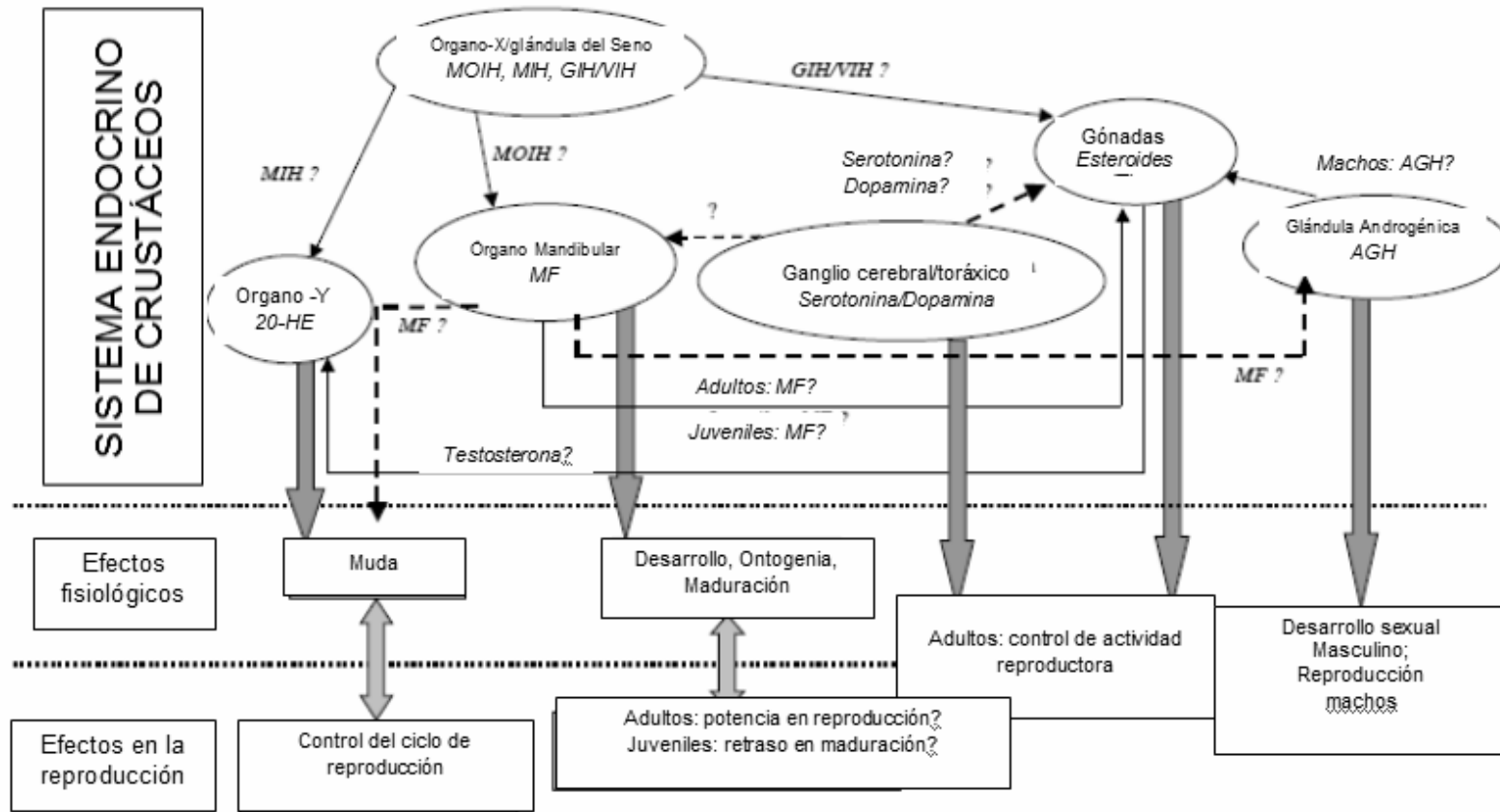


Figura 8. Diagrama del sistema endocrino de los crustáceos. El complejo órgano-x glándula del seno regula directamente a las gónadas a través de Hormona Inhibidora de las Gónadas/Hormona Inhibidora de la Vitelogénesis (GIH/VIH), y regula al órgano-Y a través de la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH) y al órgano mandibular por medio de la Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular (MOIH). Los mecanismos no conocidos están representados con líneas punteadas. MF, Metilfarnesoato; 20-HE, 20-Hidroxiciclidona ; AGH, Hormona de la Glándula Androgénica (Mazurová *et al.*, 2008)

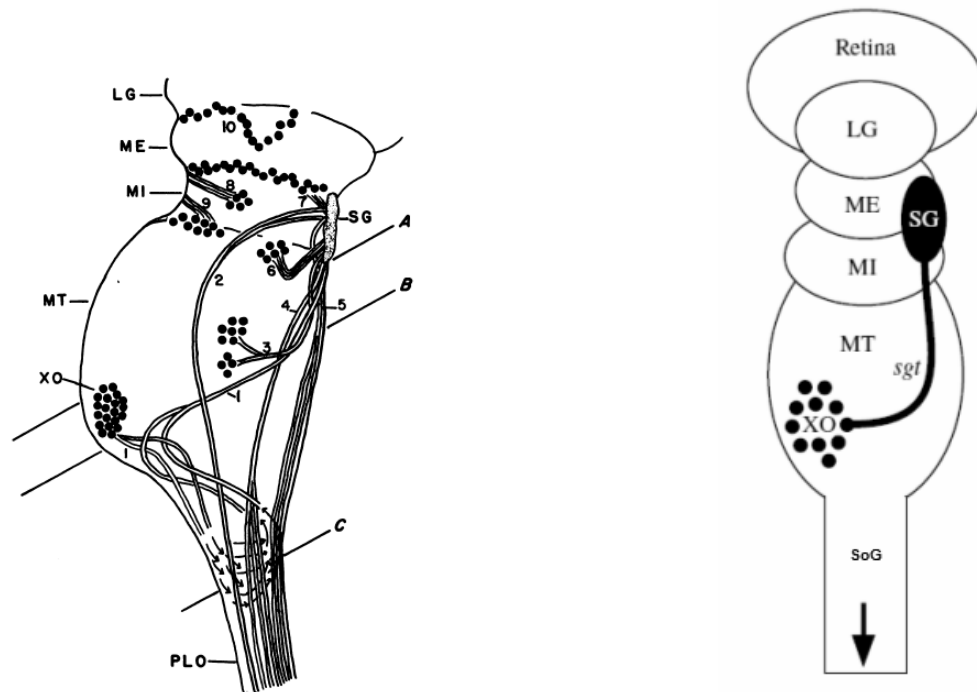


Figura 9. A, Vista anterior del ganglio del pedúnculo ocular de *Gecarcinus lateralis* (Bliss y Welsh, 1952). B, Diagrama esquemático del órgano-x glándula del seno en *Cancer* sp. (Hsu *et al.*, 2006). Los círculos representan grupos de células secretoras. Las líneas dobles indican fibras nerviosas. El complejo órgano-x glándula del seno se conecta al ganglio supraesofágico a través del nervio óptico. XO, órgano-x; SG, glándula del seno; LG, lámina ganglionaris; ME, MI, MT: Medula Externa, Interna y Terminal; PLO, pedúnculo del lóbulo óptico; LG, lamina ganglionaris; SoG, ganglio supraesofágico.

## I.6 Familia MIH/GIH/CHH

Las neurohormonas MIH, GIH, CHH (Hormona Inhibidora de la Gónada), pertenecen a la familia de neuropéptidos MIH/GIH/CHH, cuyos miembros controlan diversos procesos fisiológicos como muda, reproducción y el metabolismo de la glucosa, respectivamente. Esta familia es un grupo único de los artrópodos. Comparten un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos y conservación de seis residuos de cisteína, dos argininas, un aspartato y una fenilalanina, en las mismas posiciones relativas de los péptidos maduros. Generalmente tienen pesos moleculares de 7-9 kDa y su secuencia consiste de aproximadamente 70 aminoácidos y tres enlaces disulfuro (Böcking

*et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Chang, 2001; Chen *et al.*, 2005; Fingerman, 1987; García y Arechiga, 1998; Lacombe *et al.*, 1999)

En términos de su estructura primaria los péptidos se dividen en dos subfamilias. En la subfamilia CHH se agrupan alrededor de 38 péptidos descritos con base en sus características estructurales y no necesariamente a su función biológica. Están constituidos de 72 residuos, amidación en C-terminal y un piroglutamato como grupo bloqueador en N-terminal (Böcking *et al.*, 2002). En los camarones, los subtipos CHH pueden subdividirse en CHH-A y CHH-B (Chan *et al.*, 2003). Se ha reportado (Chang *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 1999; Chung y Zmora, 2008; Fanjul-Moles, 2006; Hsu *et al.*, 2006; Udomkit *et al.*, 2004) que en los decápodos, los péptidos CHH se sintetizan también en tejidos diferentes a los pedúnculos oculares (Figura 10).

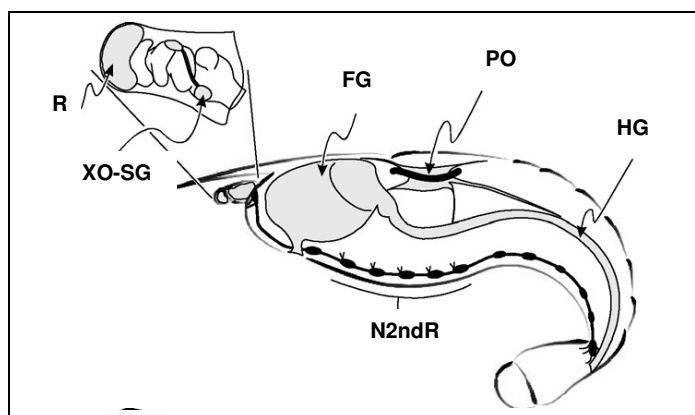


Figura 10. Esquema generalizado que ilustra los diferentes *loci* propuestos para la producción de CHH en decápodos. Retina (R), órgano-X-glándula del seno (XO-SG), intestino (FG, HG), neuronas de la segunda raíz torácica (N2ndR), y en el órgano pericárdico (PO) (Fanjul-Moles, 2006)

La segunda subfamilia llamada MIH/GIH o simplemente GIH, comprende aproximadamente 13 péptidos descritos de Hormonas Inhibidoras de la síntesis de Metil Farnesoato (MOIH) y Hormonas Inhibidoras de la Gónada (GIH) y de la Muda (MIH). Estos péptidos presentan mayor variación en longitud debido a la

presencia de residuos adicionales en extremo amino y carboxilo, los cuales raramente se encuentran bloqueados y de un residuo adicional de glicina localizado entre las primeras dos cisteínas (Böcking *et al.*, 2002). Se ha propuesto que el subtipo GIH evolucionó a partir de los subtipos CHH-A y CHH-B (Chan *et al.*, 2003).

La pleiotropía ha sido reportada en diferentes especies (Chang *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2005; De Kleijn y Herp, 1998; Euclides, 1997; Reddy y Reddy, 2006; Santos *et al.*, 1997; Sedlmeier, 1988; Tiu, 2007; Zarubin y Chang, 2008). Como puede observarse en la Tabla II, la actividad biológica de los péptidos CHH/MIH es multifuncional.

Los péptidos tipo CHH, además de su papel hiperglucémico clásico, también actúan como secretagogo, inhiben la síntesis de Metil Farnesoato en el Órgano Mandibular, pueden inhibir la síntesis de ecdisteroides en el Órgano-Y y la síntesis de proteínas y vitelogénesis en el ovario. Se piensa que pueden tener órganos blanco adicionales debido a su habilidad para elevar los niveles de nucleótidos cíclicos en gran variedad de tejidos. De manera general, el grupo CHH se caracteriza por la presencia de isoformas y especificidad de especie (Böcking *et al.*, 2002).

En algunas ocasiones, la actividad multifuncional es debida a isomerizaciones de tipo D- y L- (Serrano *et al.*, 2004), como lo es el caso de las isoformas Prc-CHH I (L-Phe13) y Prc-CHH II (D-Phe13) de *Procambarus clarkii*, entre las cuales, la única diferencia radica en la estereoinversión del residuo Fenilalanina en la posición 13: en Prc-CHH I es levógira y en Prc-CHH II es dextrógira. Durante los ensayos *in vitro*, ambas isoformas presentaron niveles similares de actividad hiperglucémica, sin embargo, Prc-CHH II superó por 10 veces la capacidad de Prc-CHH I para inhibir la muda (Yasuda *et al.*, 1994).

<b>Tabla II. Actividades biológicas de los péptidos de la familia CHH/MIH/GIH (Böcking et al., 2002)</b>			
Efectos	Especies	Tipo de péptido	Referencias
1. Hiperglucemia	Muchos decápodos, <i>Armadillidium vulgare</i>	CHH	Keller <i>et al.</i> (1985, revisión), Keller y Sedlmeier (1988, revisión)
2. Movilización de lípidos	<i>Chasmagnathus granulata</i> , <i>Carcinus maenas</i> , <i>Orconectes limosus</i>	CHH	Santos <i>et al.</i> (1997)
3. Actividad secretagogo en hepatopancreas	<i>Orconectes limosus</i>	CHH	Sedlmeier (1988)
4. Respuesta de nucleótidos cíclicos (cAMP, cGMP) e IP3 en varios tejidos	<i>Orconectes limosus</i> , <i>Homarus americanus</i> , <i>Carcinus maenas</i>	CHH y MIH	Sedlmeier y Keller (1981) Goy <i>et al.</i> (1987) Goy (1990) Saidi <i>et al.</i> (1994) Webster y Chung (1990)
5. Inhibición de la síntesis de ecdisteroides en órgano-Y	<i>Carcinus maenas</i> , <i>Cancer pagurus</i> , <i>Orconectes limosus</i> , <i>Procambarus clarkii</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i>	MIH (CHH-tipo con menor actividad)	Webster (1998, revisión) Sefiani <i>et al.</i> (1996) Webster y Chung (1999) Keller <i>et al.</i> (1999)
6. Inhibición de la síntesis de Metil Farnesoato en órgano mandibular (actividad MOIH)	<i>Libinia emarginata</i> , <i>Cancer pagurus</i> , <i>Carcinus maenas</i> , <i>Orconectes limosus</i>	MIH y CHH	Liu <i>et al.</i> (1997) Webster (1998, revisión) Keller <i>et al.</i> (1999)
7. Inhibición de la síntesis de proteínas (incluyendo vitelogénesis) en ovario (actividad GIH/VIH)	Varios decápodos y <i>Armadillidium vulgare</i>	MIH, CHH	De Kleijn y Van Herp (1998, revisión) Webster (1998, revisión) Khayat <i>et al.</i> (1998) Greve <i>et al.</i> (1999)

La mayoría de los genes que codifican para las preprohormonas de estos neuropéptidos consisten en un arreglo básico de tres exones y dos intrones (Figura 11). El exón 1 codifica para el extremo amino del péptido señal. El exón 2, codifica para la mayor parte del fragmento que corresponde al péptido señal, y en el caso de los genes tipo CHH, contiene la secuencia CPRP (*por sus siglas en ingles*, CHH-Precursor Related Peptide). El exón 3, codifica para el extremo carboxilo del péptido maduro. Recientemente, se han reportado variantes o isoformas en las dos subfamilias, resultantes de la transcripción por corte y empalme alternativo (Böcking *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Lago-Lestón *et al.*, 2007) o por polimorfismos debidos a modificaciones postraduccionales (De Kleijn *et al.*, 1994).



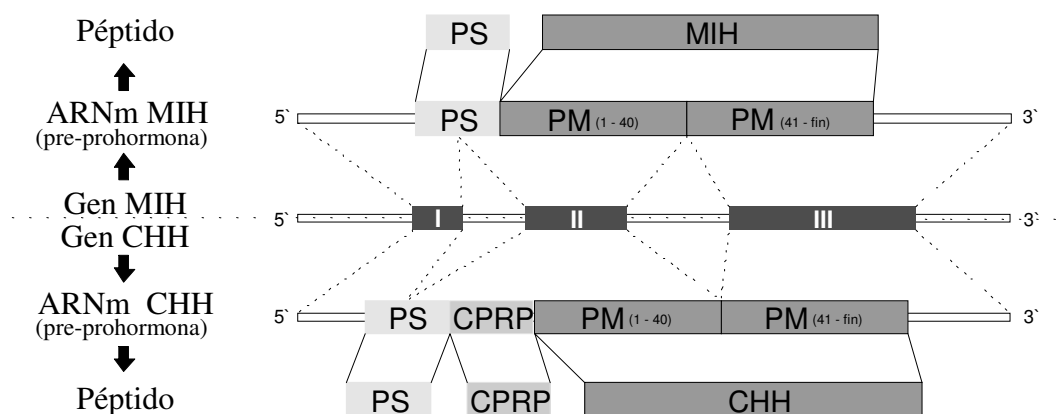


Figura 11. Representación esquemática del gen, transcrito y estructura de los péptidos CHH/MIH. Los transcritos y péptidos de las subfamilias CHH (abajo) y MIH (arriba) se derivan de genes con organización idéntica. PS, péptido señal; PM, péptido maduro; CPRP, péptido precursor relacionado a CHH (Böcking *et al.*, 2002)

## I.7 Ablación de los pedúnculos oculares

Una de las técnicas más utilizadas desde la década de 1970 para promover la maduración sexual de hembras juveniles y la producción de larvas para la acuicultura, ha sido la ablación de uno o ambos pedúnculos oculares. La ablación de pedúnculos oculares, además de estimular la hipertrofia gonadal, afecta el balance hormonal de numerosos procesos fisiológicos que están bajo la regulación total o parcial del complejo órgano-x glándula del seno (Figura 12). Entre estos se incluyen la síntesis de vitelo en ovarios (Quackenbush, 2001), transporte de glucosa, funciones respiratorias, metabolismo de carbohidratos, muda, osmoregulación, aclimatación termal, ritmo cardíaco, cambio de color y migración de pigmentos retinales (LaFont, 2000).

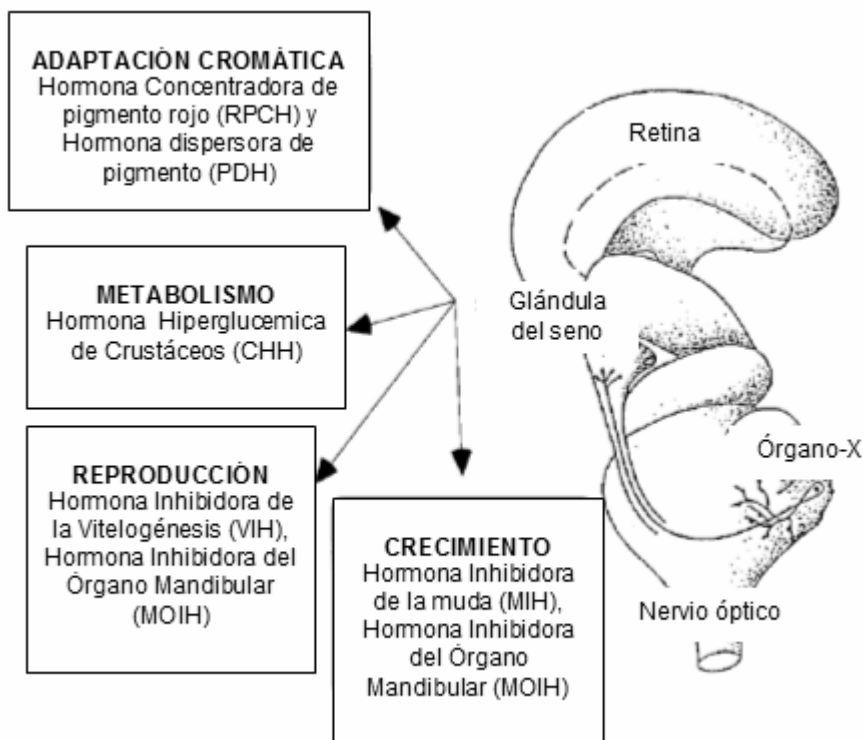


Figura 12. Procesos fisiológicos que se encuentran bajo el control de las hormonas sintetizadas en los pedúnculos oculares (complejo órgano-x glándula del seno) de los crustáceos (LaFont, 2000).

Como consecuencia de lo anterior, algunas de las condiciones observadas en poblaciones en cautiverio con ablación de pedúnculos oculares son: la disminución en número de huevos por desove, disminución en la duración del ciclo de muda, incremento en mortalidad, disminución en tasas de eclosión, disminución en tiempos de desarrollo larvario, anomalías físicas de nauplio, tallas menores en progenie y variabilidad en distribuciones de frecuencia por tallas. Se piensa que esto puede deberse al desarrollo de huevos anormales bajo las condiciones fisiológicas que determinan la ablación de los pedúnculos oculares (Bray y Lawrence, en: Marine and Shrimp Culture: Principles and Practices, 1992).

El desarrollo y utilización de las técnicas de Biología Molecular, han dado un fuerte impulso al estudio de las neurohormonas y su regulación en crustáceos.

### **I.8 *Pichia pastoris* como sistema de expresión**

*Pichia pastoris* se encuentra clasificada en la Familia Saccharomycetaceae. Su genoma es aproximadamente de  $1.5 \times 10^7$  pb y contiene solamente cuatro cromosomas (Ohi *et al.*, 1998). Actualmente, los avances en el conocimiento de su fisiología (Higgins y Cregg, 2008; Tuttle y Dunn, 1995) en combinación con su manipulación genética, la han convertido en una de las herramientas más utilizadas en biología molecular para la expresión de proteínas recombinantes intracelulares y extracelulares (Cereghino y Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 1993; Cregg *et al.*, 2000; Daly y Hearn, 2005; Escamilla-Treviño, *et al.*, 1999; Jahic *et al.*, 2006; Romanos, 1995) con fines terapéuticos (Vassileva *et al.*, 2001) y de investigación (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2001; Hellwig *et al.*, 2001; Ridder *et al.*, 1995). Su utilización específica como sistema de expresión de proteínas recombinantes de crustáceos, se ha llevado a cabo de manera exitosa (Gellisen *et al.*, 2005; Sun, 1997; Treerattrakool *et al.*, 2003; Yodmuang *et al.*, 2004; Zarubin y Chang, 2008).

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica, es decir, que utiliza metanol como única fuente de carbono para producir dióxido de carbono y energía. Para lograr esto, se requieren de grandes cambios metabólicos durante el cambio en la fuente de carbón. Estas alteraciones requieren de la síntesis de nuevas proteínas y la rápida degradación de aquellas enzimas que ya no son requeridas (Tuttle y Dunn, 1995). La primer ruta metabólica para la utilización de metanol (Figura 13) requiere de la enzima alcohol oxidasa (AOX) como catalizador de la primer reacción, la oxidación de metanol a formaldehído y

peróxido de hidrógeno. Para evitar la toxicidad, el peróxido de hidrógeno es posteriormente degradado por la enzima catalasa en el peroxisoma. Una porción del formaldehído generado por AOX sale del peroxisoma y es oxidado a formato y dióxido de carbono, por dos formaldehído deshidrogenasas citoplasmáticas (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2001). El proceso de oxidación genera una fuente de energía para la célula. La segunda enzima en la ruta de utilización de metanol, es la dihidroxiacetona sintetasa (DHAS, por sus siglas en inglés), la cual condensa el formaldehído restante. Los productos de esta reacción, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona, salen del peroxisoma y entran a la ruta citoplasmática para generar xilulosa-5-monofosfato y gliceraldehído-3-fosfato. Ambas enzimas (AOX y DHAS) están presentes en altos niveles en aquellas células que se encuentran creciendo en metanol, pero no son detectables en otras fuentes de carbono como glucosa, glicerol o etanol.

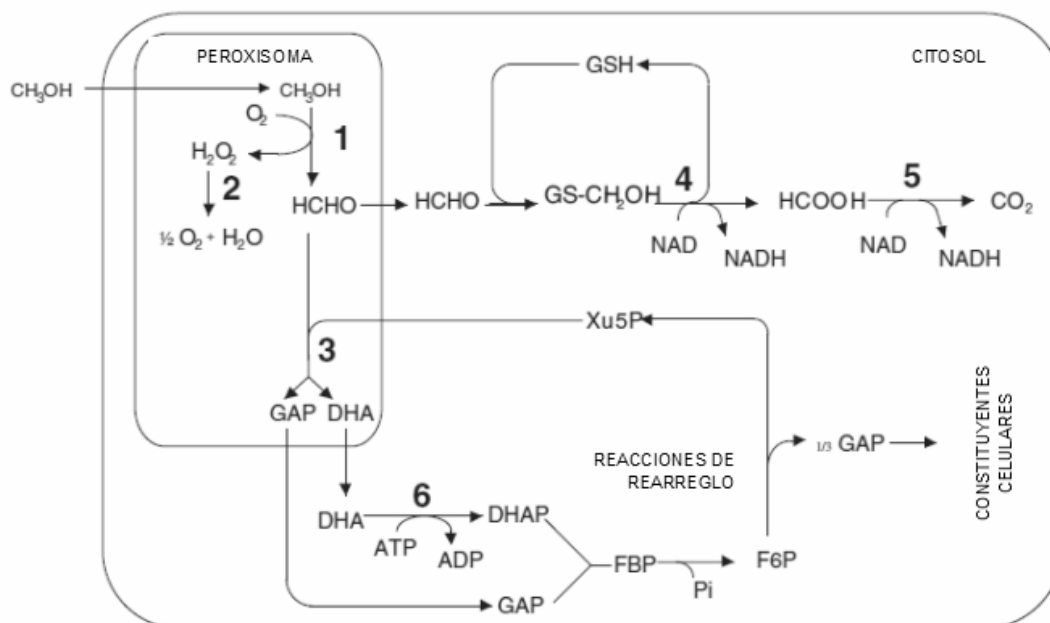


Figura 13. Ruta metabólica para la utilización de metanol en levaduras metilotróficas. 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, dihidroxiacetona sintetasa; 4, formaldehído deshidrogenasa; 5, formiato deshidrogenasa; 6, dihidroxiacetona cinasa; GSH, glutatión; Xu5P, xilulosa-5-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato (Gellisen *et al.*, 2005)

La enzima alcohol oxidasa es la enzima clave para la utilización de metanol. Esta enzima está codificada por dos genes: *AOX1* y *AOX2*. El gen *AOX1* es el gen responsable de la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa en la célula (Cregg *et al.*, 1989). Este gen puede ser regulado e inducido por metanol, a pesar de que el gen *AOX2* tiene una homología del 97% con el gen *AOX1*, el producto de *AOX2* se expresa en un nivel mucho menor que *AOX1*.

La expresión de *AOX1* es regulada a nivel transcripcional (Tschopp *et al.*, 1987; Ellis *et al.*, 1985) a través de mecanismos de represión/desrepresión e inducción. El crecimiento en glucosa reprime la transcripción, aun en presencia de metanol. Por esta razón, se recomienda el crecimiento en glicerol para una inducción óptima con metanol. El crecimiento en glicerol (desrepresión) no es suficiente para generar niveles mínimos de expresión del gen *AOX1*. La presencia del inductor metanol (inducción), es necesaria para que la presencia de *AOX1* se encuentre en niveles de expresión detectables (Tschopp *et al.*, 1987).

De acuerdo a la utilización de metanol, existen diferentes cepas de *P. pastoris*. Las cepas de tipo silvestre contienen ambos genes *AOX1* y *AOX2*, y crecen en metanol a velocidad similar de las cepas silvestres (fenotipo Mut<sup>+</sup>, por sus siglas en inglés, *Metanol utilization plus*). Sin embargo, existen otras cepas en las cuales uno o ambos genes *AOX* han sido eliminados, por lo que no se requieren grandes cantidades de metanol, que rutinariamente se utilizan en fermentaciones a gran escala de las cepas Mut<sup>+</sup>. KM71, es una cepa en la cual el gen *AOX1* ha sido parcialmente eliminado y reemplazado por el gen *ARG4* de *S. cerevisiae* (Cregg y Madden, 1987). Debido a esto, la cepa depende de un metabolismo de metanol más débil, basado en la actividad enzimática del producto del gen *AOX2*, y por lo tanto, crece lentamente en esta fuente de carbono (fenotipo Mut<sup>S</sup>, por sus siglas en inglés, *Methanol utilization slow*).

*P. pastoris* tiene el potencial para realizar muchas de las modificaciones postraduccionales típicamente asociadas a los eucariotas superiores. Estas incluyen el procesamiento de secuencias señal, plegamiento, formación de enlaces disulfuro y glicosilaciones tipo N y O (Higgins y Cregg, 2008).

### I.9 Vector de expresión pPICZ $\alpha$ A

Este vector de expresión fue diseñado como vector de integración para *E. coli*/*P. pastoris*. Contiene un origen de replicación para mantenimiento del plásmido en *E. coli* y marcadores que son funcionales en ambos organismos (Figura 14).

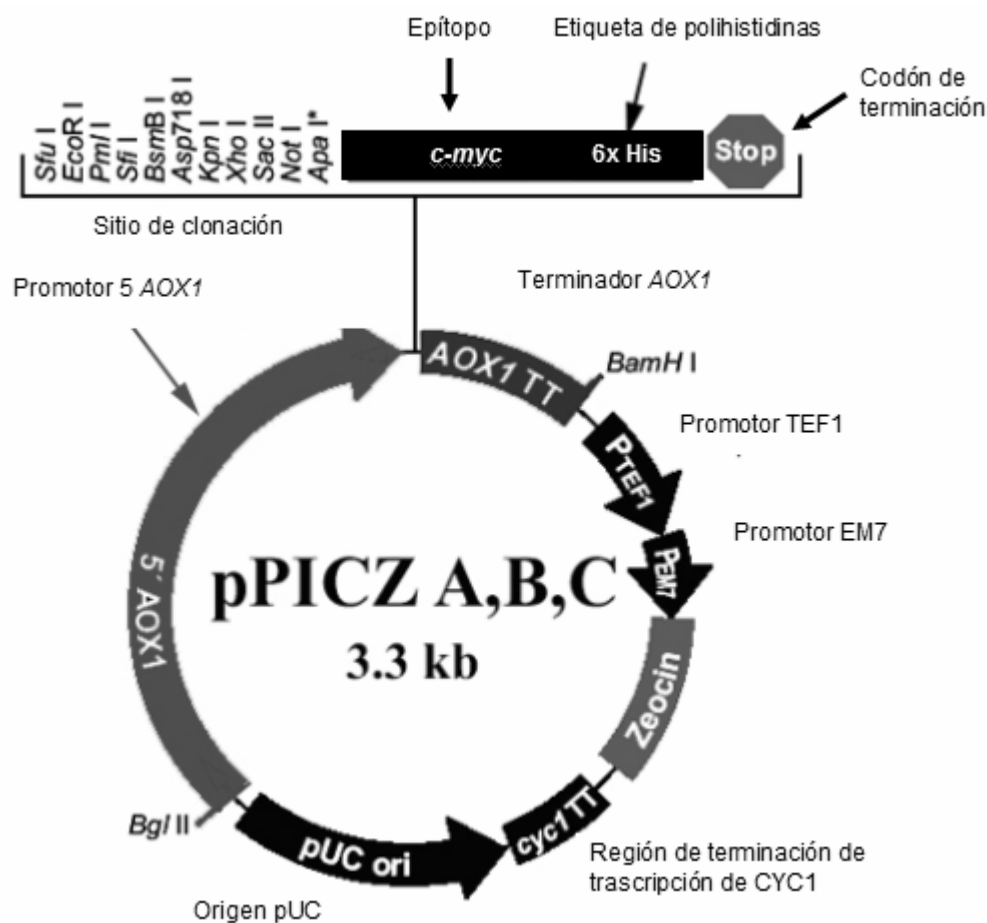


Figura 14. Vector de expresión pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen Cat. no. V190-20)

El casete de expresión está compuesto de un fragmento de 0.9 kb a partir del gen *AOX1*. Contiene una secuencia promotor 5' y un segundo fragmento corto derivado de *AOX1*, con las secuencias requeridas para la terminación de la transcripción (Koutz *et al.*, 1989). Contiene sitios de clonación múltiple localizados entre el promotor 5' y las secuencias de terminación. La señal de secreción  $\alpha$ -MF (por sus siglas en inglés,  *$\alpha$ -Mating Factor*) de *S. cerevisiae* se encuentra fusionada en marco de lectura río arriba de la secuencia que codifica para la expresión de proteínas heterólogas. Una vez que se ha transferido el vector de expresión recombinante a las levaduras, éste se integra al genoma de *P. pastoris*. Esto es posible debido a que el plásmido posee un fragmento 5' del gen *AOX1*, con un sitio único de restricción, en donde el vector es digerido previamente a la transfección, de manera que el extremo libre de DNA es utilizado para dirigir la recombinación homóloga que resulta en la integración del casete de expresión en el genoma de *P. Pastoris*, específicamente en el locus *AOX1* (Cereghino y Cregg, 2000).

Además de las características anteriores, este vector de expresión contiene el gen *Sh ble* de *Streptoalloetichus himudustanus*, cuyo producto le confiere a las bacterias transformantes o levaduras transfectantes, la resistencia a Zeocina, un antibiótico de amplio espectro, tóxico para bacterias, hongos, levaduras, células vegetales y animales. La Tabla III describe de manera general cada uno de los componentes de este vector de expresión.

<b>Tabla III. Componentes del vector de expresión pPICZαA (Invitrogen Cat. no. V190-20)</b>	
5' AOX1	Fragmento de 942 pb que contiene el promotor <i>AOX1</i> . Región de integración del plásmido al locus <i>AOX1</i> .
α-Factor	Señal de secreción nativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Permite la secreción de la proteína heteróloga al medio de cultivo.
Sitio de clonación múltiple	Permite la inserción de la secuencia que codifica para la proteína heteróloga en el vector de expresión.
AOX1(TT)	Señal de terminación de transcripción y poliadenilación del gen <i>AOX1</i> . Incrementa la estabilidad y eficiencia del procesamiento del extremo 3' RNAm.
Promotor TEF1	Controla la expresión del gen <i>Sh ble</i> , el cual confiere resistencia a zeocina en levaduras transfectadas.
EM7	Promotor para síntesis constitutiva. Controla la expresión del gen <i>Sh ble</i> , el cual confiere resistencia a zeocina en <i>E. coli</i> transformadas.
Zeocina	Gen <i>Sh ble</i> (gen de bleomicina de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> ). Confiere resistencia a zeocina.
CYC1	Extremo 3' del gen <i>CYC1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Incrementa la estabilidad y eficiencia del procesamiento del extremo 3' RNAm del gen <i>Sh ble</i> .
ColE1	Permite la replicación y mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i> .

Por otra parte, el desarrollo de la inmunología en combinación con los adelantos tecnológicos, han permitido en los últimos años de la disposición de técnicas en las que se precisa la detección y cuantificación de productos mediante anticuerpos, cuyas aplicaciones son muy diversas en los campos de la investigación biológica, como la detección de hormonas potencialmente CHH (Chang *et al.*, 2005a; Chang *et al.*, 2005b; Giulianini *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 1994; Shih *et al.*, 1998; Sun, 1997), con actividad potencial MIH (Gu *et al.*, 2001, Gu *et al.*, 2002; Reddy y Reddy, 2006; Sonobe *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2006), su cuantificación (Chang *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999a; Chang *et al.*, 1999b; Chang 2005a; Chang, 2005b;



Lorenzon *et al.*, 2004; Nakatsuji *et al.*, 2000), la determinación de su actividad biológica por inmunosupresión (Treerattrakool, 2006) o la ubicación física de los sistemas neurosecretores de estas neurohormonas (Dircksen *et al.*, 1988; Jaros y Keller, 1979; Montagne *et al.*, 2008).

### **I.10 Anticuerpos**

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas transmembranales de linfocitos B (Figura 15) y que también pueden producirse en forma secretada por linfocitos B antígeno-estimulados. Su estructura convencional consiste de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), unidas por enlaces disulfuro. Ambos tipos comprenden de una región o dominio variable (V) en el extremo amino, que participa en el reconocimiento y unión al antígeno y una región o dominio constante (C) en el extremo carboxilo, que media las funciones efectoras características de cada clase de Ig (Abbas *et al.*, 2004).

Las inmunoglobulinas, pueden presentarse en distintas clases conocidas como isotipos, dependiendo de las diferencias en la estructura de las regiones constantes (C) de sus cadenas pesadas (H). En anticuerpos del mismo isotipo, estas regiones presentan esencialmente la misma secuencia de aminoácidos, en anticuerpos del distinto isotipo ocurre el caso contrario. Las cadenas pesadas son nombradas por la letra del alfabeto griego correspondiente al isotipo del anticuerpo ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ). En mamíferos placentados existen cinco isotipos conocidos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, los cuales difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos.

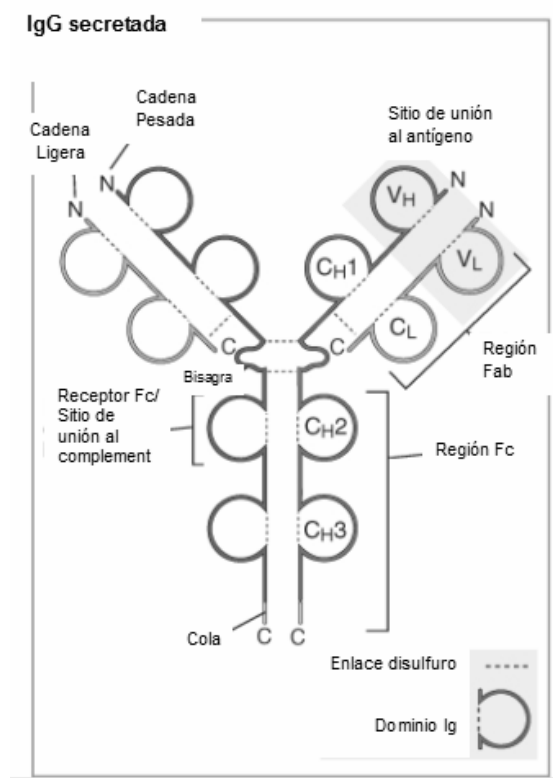


Figura 15. Estructura de una Inmunoglobulina convencional (Abbas *et al.*, 2004).

Las inmunoglobulinas se encuentran distribuidas en los fluidos biológicos, como el suero, o en la superficie de linfocitos B. El antisuero, se refiere al suero que contiene un número detectable de moléculas de anticuerpos que se unen a un antígeno particular. El título de un anticuerpo se refiere a la última dilución serial del antisuero, en la cual puede detectarse la unión anticuerpo-antígeno.

## I.9 ELISA

El ELISA (por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) es una de las técnicas inmunoenzimáticas que combinan la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de ensayos enzimáticos. La técnica se basa en el uso de antígenos o anticuerpos conjugados con una

enzima, de forma que los complejos resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista y cuantificable espectrofotométricamente.

Una de las variantes de esta técnica es conocida como ELISA indirecto. A grandes rasgos, este tipo de ensayo consta primeramente de la fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio; la adición del antisuero, de tal forma que sus anticuerpos reaccionen específicamente con los antígenos fijados al soporte; la adición de anti-anticuerpos marcados con una enzima, como  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa; y finalmente, de la adición del sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima en cuestión. En este sistema, pueden utilizarse combinaciones de anticuerpos policlonal-policlonal, monoclonal-monoclonal o policlonal-monoclonal.

Los anticuerpos policlonales son aquellos que provienen de diferentes clonas de linfocitos, y que por lo mismo difieren en las secuencias de las estructuras receptoras al antígeno y por lo tanto en su especificidad. Los anticuerpos monoclonales son idénticos, porque son producidos por clones procedentes de una sola célula madre, o clona de sistema de expresión utilizado (p. ej. Despliegue en Fago) y poseen una especificidad inherente por un epítipo del antígeno.

## II. ANTECEDENTES

La presencia de MIH en los pedúnculos oculares de los crustáceos es conocida desde hace más de 100 años (Zeleny, 1905), sin embargo, la Hormona Inhibidora de la Muda y sus isoformas han sido caracterizadas y cuantificadas solamente en algunas especies.

Para *L. vannamei*, los niveles de glucosa, ecdisteroides y proteínas totales han sido determinados y correlacionados con el proceso de setogénesis (Chan *et al.*, 1988). Asimismo, se han clonado y expresado isoformas distintas a Liv-CHH-SG1 (Chen *et al.*, 2007; Sefiani *et al.*, 1996; Sun, 1994; Sun, 1995; Sun, 1997; Wang *et al.*, 2000).

La expresión del gen *chh-sg*, que codifica para la neurohormona Liv-CHH-SG1 (anteriormente nombrada Liv-MIH-1), fue analizada (Lago-Lestón, 2001; Lago-Lestón *et al.*, 2007) a partir de los pedúnculos oculares de *L. vannamei* en diferentes condiciones de salinidad y temperatura. A partir de este estudio, se determinó que la temperatura ejerce un mayor efecto sobre la expresión de estos genes, en comparación con el efecto de la salinidad sobre los mismos. Se propuso que el gen previamente publicado como *mih* (Hormona Inhibidora de la Muda) podría ser *chh* (Hormona Hiperglucémica de Crustáceos), de acuerdo a su estructura génica y al alto grado de homología resultante del análisis filogenético entre Liv-CHH-SG1 y otras secuencias depositadas en el banco de genes pertenecientes al grupo CHH. Asimismo, se determinó que bajo ciertas condiciones de estrés, por corte y empalme alternativo (Figura 16), se expresa la isoforma Liv-CHH-SG2 (anteriormente denominada Liv-MIH-2). Se sugirió actividad pleiotrópica para ambos péptidos. En la actualidad, este gen se denomina *chh-sg*

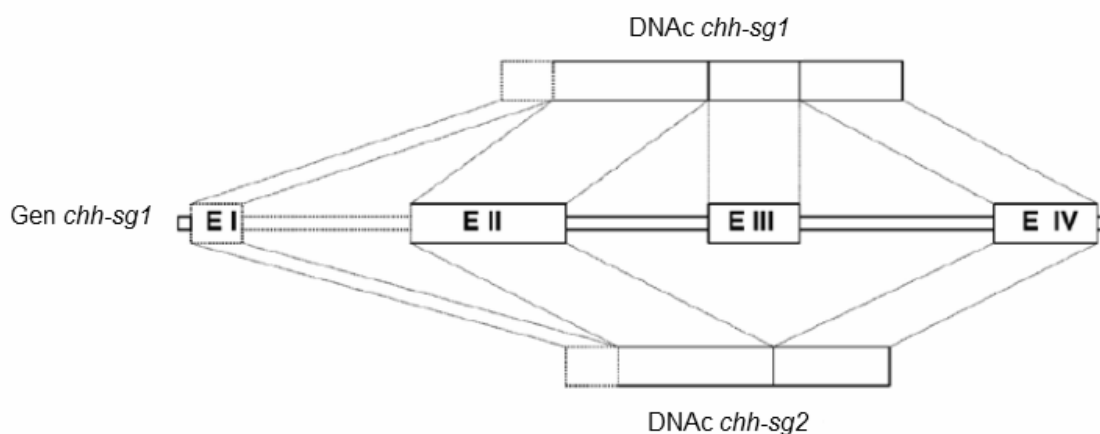


Figura 16. Diagrama esquemático en el que se compara la estructura de la secuencia parcial del gen *chh-sg* y sus dos transcritos por corte y empalme alternativo, *chh-sg1* y *chh-sg2* de *L. vannamei*. Los cuatro exones se muestran con números romanos (E I – E IV). El exón e intrón I hipotéticos, se muestran con líneas punteadas (Lago-Leston et al., 2007).

Posteriormente, se realizó la clonación y expresión del gen *chh-sg* (Organes-De Los Santos, 2004) para la producción de la neurohormona recombinante potencialmente inhibidora de la muda de *L. vannamei* (Liv-CHH-SG1), utilizando como sistema de expresión procariota a *E. coli*. Sin embargo, no se logró producir cantidades suficientes para llevar a cabo estudios de actividad biológica.

Consecutivamente, se efectuó la clonación y expresión del gen *chh-sg* de *L. vannamei* para la producción de la hormona recombinante con actividad potencial inhibidora de la muda (Liv-CHH-SG1) (Sánchez-Castrejón, 2007; Sánchez-Castrejón, 2008), utilizando como sistema de expresión eucariota a la levadura *Pichia pastoris*, transfectada con un vector de expresión (pPICZ $\alpha$ A) inducible por metanol y con una señal de secreción ( $\alpha$ -factor). Adicionalmente, la secuencia del inserto clonado en el vector (Figura 17) incluyó un sitio de reconocimiento para enteroquinasa, de manera que posteriormente a la etapa de purificación por afinidad a metales pudieran eliminarse las regiones adicionales en C-Terminal, es decir, la región de poli-Histidinas (6xHis) y la



muda, utilizando la hormona recombinante que incluía regiones adicionales en C-Terminal (*c-myc* y 6xHis). Los resultados mostraron que la neurohormona recombinante tiene la habilidad de elevar los niveles de glucosa en hemolinfa, sin afectar la muda. Los resultados funcionales obtenidos coincidieron con la similitud estructural y filogenética observada entre Liv-CHH-SG1 y el grupo CHH. Sin embargo, no se descartó la posibilidad de interferencia de la región C-Terminal adicional (*c-myc* y 6xHis) en la actividad inhibidora de la muda.

Por otra parte, la detección y cuantificación de neurohormonas en hemolinfa, pertenecientes a la familia MIH/CHH/GIH, utilizando como técnica de detección de proteínas recombinantes el ELISA indirecto, ha sido posible en otras especies como *Eriocheir japonica sinensis* (Yao *et al.*, 2006) y *Palaemon elegans* (Lorenzón *et al.*, 2004). En este último estudio, se reportó la presencia de la hormona CHH en el orden de  $\text{pmol ml}^{-1}$ , como respuesta a diferentes condiciones de estrés por metales pesados y polisacáridos. La neurohormona fue detectada en hemolinfa, en un lapso de 0.5 a 3 horas posteriores a las condiciones anteriormente mencionadas, utilizando un anticuerpo policlonal anti 6xHis-NenCHHwt (*N. norvegicus*) y un anticuerpo biotinilado como anticuerpo de detección.

### III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la importancia creciente de la camaronicultura en un contexto mundial, el estudio específico de la endocrinología del camarón está retrasado con respecto a los avances en el estudio endocrinológico de otros crustáceos. En el caso particular de *Litopenaeus vannamei*, la especie dominante en el mercado mundial, se han clonado y secuenciado algunos neuropéptidos que potencialmente están relacionados con el proceso de muda y regulación de glucosa, sin embargo, se ha reportado muy poco acerca de como y bajo qué condiciones estas neurohormonas e isoformas son sintetizadas y liberadas diferencialmente a la hemolinfa a lo largo del ciclo de muda, en parte, debido a la confusión que provoca el traslape en su actividad biológica y a las similitudes estructurales de los péptidos de la familia CHH/MIH/GIH.

La importancia de este trabajo exploratorio, radica en la capacidad de detección de la neurohormona nativa mediante un ELISA indirecto con anticuerpos policlonales. Lo anterior, representa una plataforma para estudios posteriores enfocados en establecer la variación de los niveles de Liv-CHH-SG1 en la hemolinfa a lo largo del ciclo de muda de organismos sometidos a diferentes condiciones nutricionales y ambientales que afectan su fisiología. De esta manera, se plantea la posibilidad de utilizar a Liv-CHH-SG1 como una molécula indicadora del estado de salud de *L. vannamei*.



## IV. OBJETIVOS

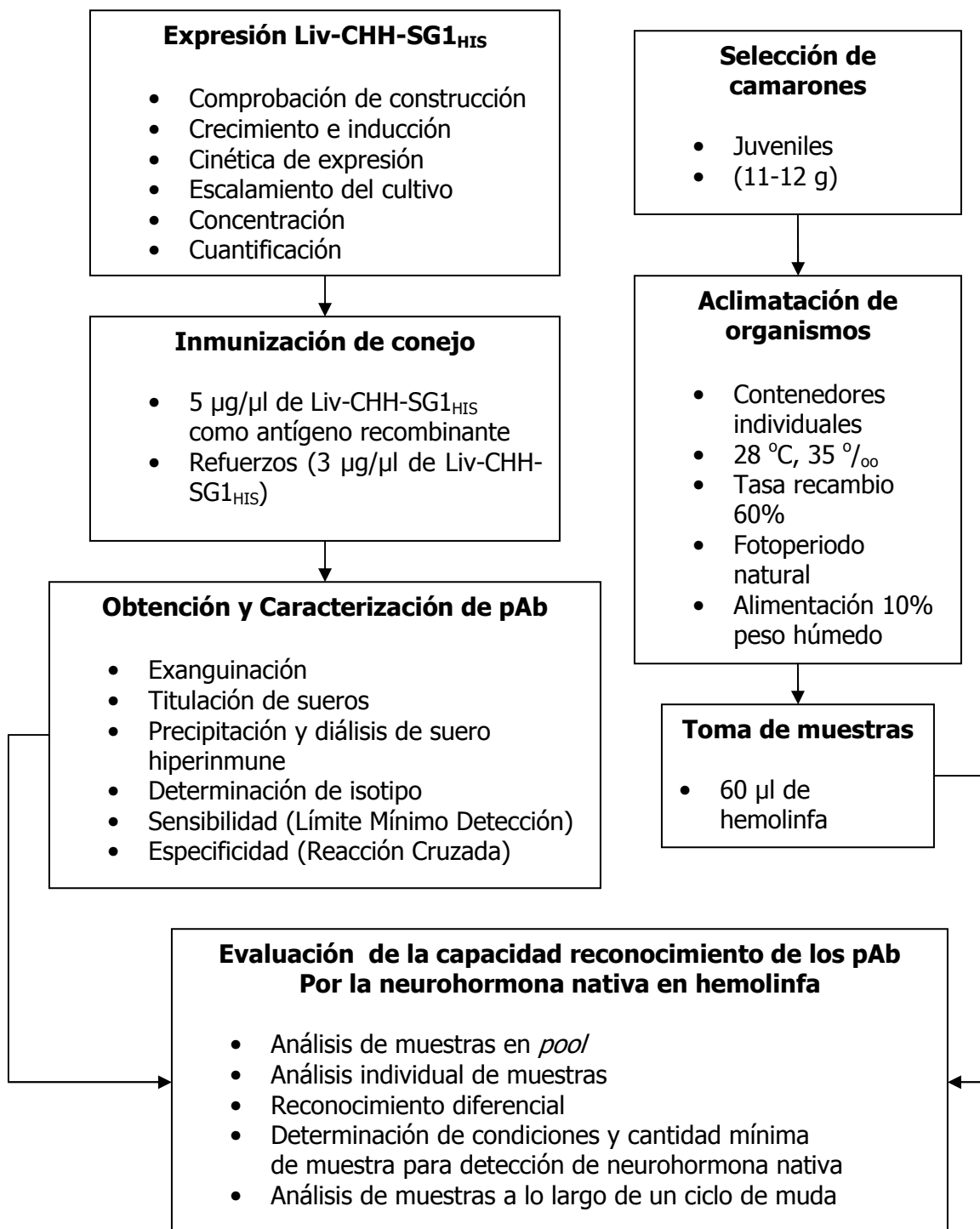
### 4.1 Objetivo General

- Producir y caracterizar anticuerpos policlonales con capacidad de reconocimiento de la neurohormona Liv-CHH-SG1 de *Litopenaeus vannamei*.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Expresar la neurohormona rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> a partir de la clona obtenida en *Pichia pastoris*.
- Obtener y caracterizar pAb de conejo anti rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>.
- Obtener muestras de hemolinfa de camarones juveniles a lo largo de su ciclo de muda.
- Evaluar la capacidad de reconocimiento de pAb hacia la hormona nativa en muestras de hemolinfa.

## V. DISEÑO EXPERIMENTAL



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 EXPRESIÓN DE LA NEUROHORMONA rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> A PARTIR DE LA CLONA OBTENIDA EN *Pichia pastoris*

Para la expresión de la versión molecular con etiqueta de polihistidinas (6xHis) de la neurohormona recombinante rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, se utilizó la cepa KM71<sub>HisTag</sub> de *Pichia pastoris*, misma que contiene integrada a su genoma una secuencia que codifica para un neuropéptido maduro, cuya región C-terminal presenta un sitio de hidrólisis para enteroquinasa y los sitios *c-myc* (para identificación con anticuerpos anti *c-myc*) y 6xHis (para purificación por una columna de afinidad).

#### VI.1.1 PCR de colonia

Para comprobar la presencia de la construcción *chh-sg1* en el genoma de la cepa KM71<sub>HisTag</sub> criopreservada, esta fue resembrada en placas con medio YPD y zeocina (100 µg/ml). Con un palillo estéril, se tomó una porción de una colonia y se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril. Se añadieron 5 µl de solución de 5 U µl<sup>-1</sup> de Liticasa (Sigma) y se incubó a 30 °C por 10 minutos, y posteriormente a -80 °C por 10 minutos. Se prepararon 3 reacciones de PCR Hot Star (Tris-HCl [20 mM] pH 8.4, KCl [50 mM], cebador 5'AOX1 [0.4 µM], cebador 3'AOX1 [0.4 µM], MgCl<sub>2</sub> [3 mM], dNTPs [0.2 mM]), utilizando la enzima DNA Taq polimerasa recombinante *Invitrogen* ([0.625 U]) y 2.5 µl del lisado celular, en un volumen total de 25 µl cada una. Como control negativo se utilizó la cepa silvestre KM71. Como control de PCR se incluyeron todos los componentes de la reacción, con excepción del lisado celular. El termociclador (GeneAmp PCR System 2400 PERKIN ELMER) se programó con un ciclo de 5 minutos a 95 °C y posteriormente se añadió la enzima DNA Taq polimerasa recombinante. Se continuó con una programación de 30 ciclos para las fases de desnaturalización (1 minuto a 95 °C), alineamiento (1 minuto a 54 °C) y

extensión (1 min a 72 °C); y 1 ciclo para extensión final (7 minutos a 72 °C). Los productos de PCR fueron analizados en electroforesis de agarosa al 1% (Invitrogen Life Technologies Corporation, EasySelect™ *Pichia* Expression Kit Cat no. K1740-01).

### **VI.1.2 Crecimiento e inducción**

Se utilizaron células criopreservadas a -80 °C de la cepa KM71<sub>HIS</sub>Tag, para inocular placas YPD (ANEXO A1) con zeocina (100 µg/ml), las cuales fueron incubadas a 30 °C (Barnstead Lab-Line). Las colonias frescas fueron utilizadas para inocular 3 ml de medio YPD líquido con zeocina (100 µg/ml), mismos que se incubaron por 24 horas a 30 °C y 250 rpm. Posteriormente, se transfirió 1 ml del cultivo anterior a 500 ml de medio BMGY (ANEXO A2), los cuales fueron incubados bajo las mismas condiciones. La densidad óptica fue leída en espectrofotómetro (BIORAD SmartSpec™ 3000) a 260 nm. Una vez alcanzada una  $DO_{260}=4$ , se cosechó la mitad del cultivo, distribuido en volúmenes de 50 ml en 5 tubos cónicos estériles. Los tubos se centrifugaron (Heraeus MULTIFUGE 1 S-R) por 10 minutos a 4 °C a 2,000 x g y se descartó el sobrenadante. Se vertieron nuevamente 50 ml de medio en cada tubo cónico, y se repitió el procedimiento anterior. Los restos de medio de cultivo fueron eliminados lavando el pellet con agua destilada estéril. Para inducir la expresión, el pellet obtenido en cada tubo cónico fue resuspendido en 25 ml de medio BMMY (ANEXO A3) con metanol al 4%, incubado a 30 °C y 250 rpm, hasta el día de cosecha. Para mantener la concentración inicial de metanol fue necesario adicionar diariamente 1 ml de metanol a cada matraz.

### **VI.1.3 Cinética de expresión**

Con la finalidad de determinar la producción diaria de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, se tomaron muestras de 1 ml de cada matraz con cultivo de inducción, previamente a la adición de metanol, cada 24 horas, por 8 días. Las alícuotas se centrifugaron (Heraeus Biofuge) a 13,000 rpm por 20 minutos, a 4

°C. El sobrenadante se almacenó a -20 °C para su análisis en electroforesis desnaturizante en poliacrilamida al 16% (ANEXO A10).

Previamente al inicio de la electroforesis, las muestras fueron descongeladas y las proteínas fueron precipitadas con 150 µl de ácido tricloroacético por 12 horas a 4 °C. Posteriormente fueron centrifugadas (Heraeus Biofuge) a 13,000 rpm, por 20 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de acetona fría mezclando por inversión. Se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente cada pellet fue resuspendido en 23 µl de amortiguador de carga A4 (ANEXO A10).

El gel y los amortiguadores para la electroforesis en condiciones desnaturizantes (Tricine-SDS-PAGE), fueron preparados de acuerdo a los estándares utilizados para proteínas con pesos moleculares por debajo de los 30 kDa (Schagger, 2006). En cada pozo se cargo la mitad del volumen del pellet resuspendido en amortiguador de carga A4, equivalente a 10 µl, mismos que corresponden a 500 µl del sobrenadante del cultivo de inducción de los días 0-7. El tiempo de corrida fue de 4.5 horas a 150 V, con un amperaje constante de 50 mA. Una vez finalizada la electroforesis, las bandas fueron visualizadas utilizando la técnica de tinción Azul Coomassie (ANEXO A11). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen).

Asimismo, la porción restante de las proteínas precipitadas con TCA y resuspendidas en amortiguador de carga A4 para los días de inducción 0-8, fue analizada en Western blot (ANEXO A13) de transferencia semiseca con amortiguador Towbin 1X (ANEXO A14), utilizando una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 µm (BIO-RAD), un sistema de

transferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP) y el anticuerpo Anti-*myc*-HRP, el cual permite la detección de proteínas recombinantes que contienen el epítipo *c-myc*, cuya secuencia es -Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu- (Invitrogen Life Technologies Cat. no. R951-25)

Para llevar a cabo el Wester blot, primero se hizo una electroforesis, en la cual se utilizaron los 10 µl restantes de cada alícuota previamente precipitada con ácido tricloroacético y resuspendida en amortiguador de carga A4, equivalentes a 500 µl del sobrenadante del cultivo de inducción muestreados en los días 0-8. Después de separar las muestras en un gel de poliacrilamida, las proteínas fueron electrotransferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa adyacente, aplicando un campo eléctrico con un voltaje menor a 20 V y un amperaje constante de 200 mA por 1 hora. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular MultiMarkR Multi-Colored Standard (Invitrogen).

Para la inmunodetección, inmediatamente después de finalizar la electroforesis, la membrana fue desmontada y bloqueada por 12 horas en agitación moderada a 4 °C, con solución bloqueadora (ANEXO A15). Posteriormente, se descartó la solución anterior, y se agregaron 30 ml de solución de incubación (ANEXO A16), en la cual la membrana permaneció sumergida por 2 horas, en agitación moderada, a temperatura ambiente. Seguido a esto, se reemplazó la solución de incubación con 30 ml de solución de lavado (ANEXO A17) y se mantuvo en agitación moderada a temperatura ambiente por 15 minutos. El procedimiento anterior se repitió tres veces más.

Por último, la detección colorimétrica se realizó con el equipo Opti-4CN™ Substrate Kit, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (BIO-RAD). Durante el último lavado, se prepararon 13 ml de diluyente mezclando 1 ml de diluyente concentrado, 9 ml agua destilada y 260 µl de sustrato. La solución del último lavado fue reemplazada por la solución anterior, en la cual se mantuvo

completamente sumergida la membrana por 1 hora en agitación moderada a temperatura ambiente. Se hicieron cuatro lavados con agua destilada a temperatura ambiente con agitación moderada, cada uno con una duración de 15 minutos. Finalmente se procedió a la documentación y almacenamiento de la membrana.

#### **VI.1.4 Escalamiento del cultivo**

Una vez establecido el tiempo del mayor rendimiento, se procedió al crecimiento e inducción de un mayor volumen de cultivo, siguiendo los protocolos y día de cosecha previamente determinados. Se tomaron alícuotas de 1 ml en el día 0 y 1 de inducción, para su análisis en electroforesis desnaturante de poliacrilamida con tinción Azul Coomassie y Western blot. Al llegar al día de mayor expresión, los cultivos se centrifugaron a 2,000 x g por 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -20 °C en alícuotas de 35 ml.

#### **VI.1.5 Concentración**

El sobrenadante de los cultivos de inducción fue concentrado utilizando concentradores (Orbital Biosciences) con capacidad de retención para proteínas mayores a 9 kDa. Previamente a su concentración, el sobrenadante se descongeló, se centrifugó a 4,500 rcf por 10 minutos a 4 °C y se descartó el sedimento. Posteriormente se colocaron 5 ml de sobrenadante en el tubo concentrador y se centrifugó a 4,500 rcf a 4 °C por 35 minutos o hasta que la mayor parte del sobrenadante atravesara la membrana. Lo anterior se repitió hasta terminar con el volumen total de 35 ml de sobrenadante de inducción. Finalmente, se hicieron cinco lavados con 5 ml de PBS (ANEXO A12), se resuspendió con una micropipeta y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Para recuperar el microsolutos capturados en la membrana concentradora, se aforó a 1 ml con PBS, se resuspendió por vórtex, y se retiró el contenido por la parte superior del tubo utilizando una micropipeta.

### VI.1.6 Cuantificación por BCA (Ácido Bicinconínico)

La concentración de rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> se determinó utilizando el método del ácido bicinconínico, con el kit Pierce<sup>R</sup> BCA Protein Assay (Thermo SCIENTIFIC, Cat no. 23225) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor, y utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés, *Bovine Serum Albumin*) como estándar.

Este análisis consiste en la reducción del ión  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en un medio alcalino por parte de las proteínas presentes en la muestra, y la detección colorimétrica posterior del ión cuproso por el ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés, *Bicinconinic Acid*). El producto de la reacción se visualiza de color morado, y es el resultado de la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. El complejo soluble en agua tiene una absorbancia fuerte a 562 nm, la cual se mantiene casi de manera lineal al incrementar las concentraciones de proteína en un rango de 20-2,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Para la construcción de la curva estándar, se hicieron diluciones por duplicado que se muestran en la Tabla IV.

<b>Tabla IV. Diluciones para la construcción de curva estándar</b>			
Dilución	PBS ( $\mu\text{l}$ )	BSA ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )
A	0	300	2,000
B	125	375	1,500
C	35	325	1,000
D	175	175 de B	750
E	325	325 de C	500
F	325	325 de E	250
G	325	325 de F	125
H	400	100 de G	25
I	400	0	0



Se prepararon 40 ml del reactivo de trabajo WR (por sus siglas en inglés, *Working Reagent*) en proporción 50:1 (A:B). A cada tubo de ensaye con las diluciones A-I, se les agregaron 2 ml de reactivo WR, en donde la dilución I fue considerada como blanco estándar. Asimismo, se hizo una dilución 1:20 por duplicado de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> concentrada, tomando 5 µl de la hormona recombinante los cuales se mezclaron con 95 µl de PBS. A las diluciones anteriores también se les agregaron 2 ml de reactivo WR y los 20 tubos se incubaron en baño de agua a 37 °C por 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se hicieron lecturas en espectrofotómetro a 562nm, con un tiempo menor a 10 minutos de diferencia entre todas las lecturas. Como blanco se utilizó PBS. De cada lectura se sustrajo el valor promedio de la lectura a 562 nm del blanco estándar, equivalente a 0.115. Los valores de densidad óptica a 562 nm obtenidos para BSA y de la dilución de la muestra, se graficaron en Excel (Microsoft Office) contra los valores de concentración conocida de BSA.

#### **VI.1.7 Cuantificación por RP-HPLC**

En un Sistema SHIMADZU (SCL-10AVP), se analizaron 200 µl de medio de inducción (BMMY) concentrado (1:1; 1:3 y sin dilución), utilizando una columna de fase reversa TSKgel<sup>TM</sup> (Octadecyl-4PW 15 cm x 4.6 mm 7µ TOSOH BIOSEP), con un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> y una longitud de onda de 254 nm. Las corridas se hicieron con el siguiente gradiente: B = 0% (0 min); B = 60% (65 min); B = 100% (67 min); B = 100% (80 min); B = 0% (82 min); STOP (82.5 min). Como amortiguador A, se utilizó TFA 0.1% en agua desionizada. Como amortiguador B, se utilizó TFA 0.1% en Acetonitrilo.

La corrida de muestra sin dilución, fue colectada de acuerdo a los siguientes tiempos de retención (min): 0-12, 12-25, 25-35, 35-45, 45-55, 55-65, 65-75, 75-85. Las fracciones se almacenaron a -20 °C, previamente a su análisis en ELISA de detección.

El ensayo inmunoenzimático para la detección de la presencia de la neurohormona Liv-CHH-SG<sub>HIS</sub> recombinante en cada una de las fracciones se hizo por triplicado, siguiendo el protocolo que se detalla en la sección VI.2.2 (Tabla VI), utilizando como blanco y control negativo PBS (Control 1), y 5 µg/ml de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> como control positivo.

Las fracciones producto del RP-HPLC con respuesta positiva en el análisis anterior, fueron liofilizadas (LABCONCO FreeZone 2.5) al vacío, con una presión de 0.200 mBar y una temperatura de -53 °C, por 8 h. Posteriormente el producto liofilizado fue resuspendido en 5 ml de PBS y cuantificado en el espectrofotómetro (NanoVue GE) a 280nm.

## **VI.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO ANTI rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>**

### **VI.2.1 Inmunización de conejo con antígeno rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>**

En la primera inmunización, se utilizaron 5 µg del antígeno rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> resuspendido en amortiguador salino de fosfatos o PBS (ANEXO A12), mezclado con 500 µl de PBS y 500 µl de Adyuvante Completo de Freud (DIFCO Bacto). En los siguientes refuerzos, se disminuyó la dosis de antígeno a 3 µg, mezclados con 500 µl de PBS y 500 µl de Adyuvante Incompleto de Freud (DIFCO Bacto).

Las mezclas anteriores fueron emulsificadas completamente mediante vórtex por 15 minutos. Se administró por vía subcutánea en varios puntos de la parte dorsal posterior. Los intervalos entre los primeros tres refuerzos fueron de 11 días, como se presenta en la Tabla V.

<b>Tabla V. Esquema de inmunización con el antígeno rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub></b>		
<b>Día</b>	<b>Actividad</b>	
1	*Sangrado/inmunización	5 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl ACF
11	*Sangrado/primer refuerzo	3 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl AIF
22	*Sangrado/segundo refuerzo	3 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl AIF
33	*Sangrado/tercer refuerzo	3 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl AIF
50	*Sangrado/cuarto refuerzo	3 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl AIF
67	*Sangrado/quinto refuerzo	3 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl AIF
91	*Sangrado/sexta refuerzo	3 ug Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> + 500 µl PBS + 500 µl AIF
98	**Sangrado hiperinmune	
*500 µl extraídos de la vena marginal de la oreja; **punción cardíaca; PBS = amortiguador salino de fosfatos; ACF = Adyuvante Completo de Freud; AIF = Adyuvante Incompleto de Freud		

### VI.2.2 Obtención de sueros pre-inmunes e inmunes de conejo

Antes de iniciar la primera inmunización y los siguientes refuerzos, se extrajeron 500 µl de sangre a partir de la vena central de la oreja, para comprobar la ausencia de reactividad al antígeno en el suero pre-inmune y el cambio en los títulos de los sueros inmunes tomados en intervalos de 11 días. La sangre se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se almacenó a -20 °C.

Los antisueros obtenidos hasta el día 40 fueron analizados por triplicado para evaluar la capacidad inmunogénica del antígeno rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando una placa de 96 pozos, siguiendo el protocolo que se detalla en la sección VI.2.2 (Tabla VI), utilizando como blanco y control negativo PBS (Control 1), y 5 µg/ml de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> como control positivo. Los pozos se incubaron con 50 µl de la dilución anterior del antígeno recombinante (rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>) por 12 horas a 4 °C. Posteriormente, cada pozo se bloqueó con 150 µl de BSA 3% (Albúmina de Suero Bovino) a 37 °C por una hora. Se descartó la solución bloqueadora y se hicieron tres lavados con 150 µl de Amortiguador de Fosfatos, Tween-20 5% o PBST (ANEXO A15). Posteriormente se incubaron por triplicado 50 µl de los

sueros con diluciones 1:50, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 y 1:20,000 a 37 °C por una hora. Se descartaron las diluciones de los sueros y se hicieron tres lavados con 150 µl de PBST. Se agregaron 50 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa HRP (por sus siglas en inglés, *Horseradish Peroxidase*) (Sigma) en una dilución 1:3,000 y se incubó a 37 °C por una hora. Se hicieron tres lavados con 150 µl de PBST. Se agregaron 50 µl a cada pozo de sustrato para peroxidasa (ANEXO A19) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. La placa se leyó en un espectrofotómetro (Labsystems Uniskan II) a 405 nm.

**Tabla VI. Controles utilizados en el ensayo inmunoenzimático.**

BCO	CTRL1	CTRL5	CTRL 8	Control Positivo	Procedimiento ordinario
PBS	PBS	SSA	SAS	Liv-CHH-SG1 <sub>HIS</sub> (5 µg/ml) PBS	Antígeno
BSA 3%	BSA 3%	BSA 3%	BSA 3%	BSA 3%	Bloqueo con BSA 3%
PBST	PBST	PBST	PBST	PBST	Lavados con PBST
PBS	Antisuero (1:100)	Antisuero (1:100)	Antisuero (1:100)	Antisuero (1:100)	Diluciones de antisuero en PBS
PBST	PBST	PBST	PBST	PBST	Lavados con PBST
PBS	α-conejo	α-conejo	α-conejo	α-conejo	α-conejo
PBST	PBST	PBST	PBST	PBST	Lavados con PBST
Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato HRP

BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL 5, Control 5; CTRL 8, Control 8; PBS, Amortiguador de Fosfatos BSA, Albúmina de Suero Bovino; SSA, Solución Salina Anticoagulante (Vargas-Albores, 1993); SAS, Sulfato de Amonio Saturado; PBST, Amortiguador de Fosfatos Tween-20 5%; α-conejo, anticuerpo policlonal de cabra anticonejo; Sustrato HRP, sustrato para enzima peroxidasa.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron contra las diluciones utilizadas y el tiempo de toma de muestras.

### VI.2.3 Exanguinación

A los 98 días de la primera inmunización y aplicación de refuerzos, se llevó a cabo la exanguinación del conejo. El manejo del animal se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999. Como sedante y relajante muscular se aplicaron 6 mg de Xilazina IM. Después de 8 minutos se administraron 65 mg de Pentobarbital monosódico IV como anestésico general.

Una vez que se verificó la ausencia de reflejos, se procedió a rasurar el cuello del animal. Se expuso la vena yugular y se inserto un catéter para iniciar con la captura de sangre en un recipiente estéril. Cuando la expulsión de sangre ceso, se administraron 189 mg de Pentobarbital monosodico IV como eutanásico.

Para facilitar la formación del coagulo, la sangre se mantuvo a 37 °C por 2 h y posteriormente a 4 °C por 12 h. Para la obtención del suero, la sangre se centrifugó a 3,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. El antisuero se almacenó a -20 °C.

La disposición del cuerpo del conejo y demás desechos biológicos se realizó de acuerdo a las disposiciones establecidas en la NOM-087-ECOL-1995.

#### **VI.2.4 Titulación del suero hiperinmune**

En este ensayo se probó por triplicado, la reactividad de las diluciones 1:50, 1:100, 1:500, 1:1,000 y 1:5,000 del antisuero hiperinmune en BSA 1% contra la neurohormona recombinante Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, siguiendo el protocolo que se detalla en la sección VI.2.2 (Tabla VI), utilizando como blanco y control negativo PBS (Control 1), y 5 µg/ml de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> como antígeno recombinante para cada una de las diluciones de antisuero.

#### **VI.2.5 Precipitación y diálisis del suero hiperinmune**

Se tomó un volumen de antisuero hiperinmune obtenido en la sección VI.2.3 y se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se traspasó a un tubo estéril y se agrego gota a gota, medio volumen de Sulfato de Amonio Saturado (ANEXO A18), manteniendo en agitación a 4 °C por 12 horas. Se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregó medio volumen de Sulfato de Amonio Saturado al 33%. Se completamente resuspendió completamente por vórtex, y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Por último, el pellet fue resuspendido en PBS (10-15% del

volumen de antisuero) (Cooper, 1977, en: Short Protocols in Molecular Biology) y se colocó dentro de una bolsa de diálisis de 2 kDa (Spectra/Por<sup>R</sup> Dialysis MWCO: 2,000), la cual se mantuvo sumergida en 1 L de PBS a 4°C y en agitación. Se hicieron 3 recambios de solución de PBS cada 2 horas y un último recambio a las 12 horas. El contenido de la bolsa se transfirió a un tubo estéril y se mantuvo a -20 °C (Page y Thorpe, en: The Protein Protocols Handbook) hasta su análisis en electroforesis desnaturizante de poliacrilamida (10%).

### **VI.2.6 Determinación del Límite Mínimo de Detección**

Se probó la reactividad de las IgG obtenidas en la sección VI.2.5, en una dilución 1:100 en BSA 1%, contra 11 diluciones seriales en PBS de la neurohormona recombinante Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, en un rango de 250 a 0.244 ng de antígeno recombinante. Cada dilución de antígeno se ensayó por triplicado, siguiendo el protocolo que se detalla en la sección VI.2.2 (Tabla VI), utilizando como blanco y control negativo PBS (Control 1).

### **VI.2.7 Análisis de reacción cruzada**

Para evaluar la capacidad de reconocimiento del anticuerpo hacia otras proteínas que también presentan la secuencia *cmyc* y 6xHis en C-Terminal, se analizó por triplicado un ELISA de detección, utilizando 5 µg/ml PBS de la proteína TNF-43 (donada por el Dr. Alexei Licea, del Lab. de Toxicología Molecular del CICESE), siguiendo el protocolo que se detalla en la sección VI.2.2 (Tabla VI), utilizando como blanco y control negativo PBS (Control 1), y 5 µg/ml de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> como control positivo.

## **VI.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE HEMOLINFA DE CAMARONES JUVENILES A LO LARGO DE SU CICLO DE MUDA**

### **VI.3.1 Mantenimiento de organismos bajo condiciones controladas**

Se seleccionaron 25 individuos juveniles, con un rango de peso de 11-12 g y se mantuvieron en contenedores individuales, marcados con un número identificador, sumergidos en un estanque con 700 L de agua de mar natural, con una tasa de recambio diaria de 60%, temperatura óptima de 28 °C (Valdez, 2002), salinidad 35 ‰, fotoperiodo natural, y alimentación con Purina™ equivalente al 10% de su peso húmedo administrado en dos raciones diarias. Las exubias, alimento no ingerido y heces fueron retirados diariamente con un sifón.

### **VI.3.2 Toma y manejo de muestras de hemolinfa**

La toma de muestras de hemolinfa se realizó como un seguimiento individualizado del ciclo de muda de cada organismo, iniciando en cada caso, el primer día de muda (estadio E), y cerrando el ciclo de muestras para el organismo en cuestión, con la toma de una última muestra el primer día del siguiente ciclo de muda.

Este procedimiento consistió en tomar diariamente a la misma hora, 60 µl de hemolinfa con una jeringa marca BD Ultra-Fine™, previamente cargada con 120 µl de solución salina anticoagulante a 14 °C (Vargas-Albores *et al.* 1993). Las muestras fueron mantenidas en hielo y posteriormente centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5415 C) por 5 minutos a 12,000 rpm y temperatura ambiente. El sobrenadante se almacenó a -20 °C.

## **VI.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES HACIA LA HORMONA NATIVA EN MUESTRAS DE HEMOLINFA**

### **VI.4.1 Análisis preliminar de muestras en *pool***

Se combinaron tres muestras de hemolinfa de un mismo organismo, tomadas en días consecutivos. El volumen total (510  $\mu$ l) fue precipitado con Sulfato de Amonio Saturado, resuspendido en PBS y dializado como se detalla en la sección VI.2.5. El producto final se analizó por triplicado con ELISA de detección, siguiendo el protocolo que se detalla en la sección VI.2.2 (Tabla VI), utilizando tres controles negativos: Amortiguador Salino de Fosfatos o PBS (control 1), Solución Salina Anticoagulante o SSA (control 5) y Sulfato de Amonio Saturado o SAS (control 8). Como blanco, se utilizó PBS y como control positivo, 5  $\mu$ g/ml de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en PBS.

### **VI.4.2 Análisis preliminar de muestras en forma individualizada**

Se analizaron por triplicado seis muestras de un mismo organismo, tomadas en dos series de días consecutivos. Estas comprendieron los días 7, 6 y 5 anteriores a la muda, así como el día de la muda y un día anterior y posterior a esta. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5  $\mu$ g/ml PBS de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante, y como blanco se utilizó PBS.

### **VI.4.3 Reconocimiento diferencial del antígeno recombinante**

Se evaluó la capacidad de reconocimiento de las IgG (1:100, BSA 1%) hacia la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante resuspendida en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, pH 7.4) y SSA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/Kg) mediante un ELISA de detección. El ensayo se hizo por triplicado, utilizando una concentración de 5  $\mu$ g/ml de antígeno recombinante disuelto en



las soluciones anteriores. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5 µg/ml PBS de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante, y como blanco se utilizó PBS.

#### **VI.4.4 Determinación de condiciones óptimas para el reconocimiento de la neurohormona recombinante en SSA**

Se evaluó por triplicado, la capacidad de reconocimiento de dos diluciones de IgG (1:100 y 1:500; BSA 1%) hacia el antígeno recombinante (5 µg/ml SSA) en tres concentraciones de BSA (1%, 2.5% y 5%) mediante un ELISA de detección. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5 µg/ml PBS de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante, y como blanco se utilizó PBS.

#### **VI.4.5 Análisis de muestras bajo condiciones predeterminadas**

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el reconocimiento de la neurohormona recombinante en SSA, se iniciaron los ensayos para el reconocimiento de la neurohormona nativa en muestras de hemolinfa mezcladas con SSA.

El primer ensayo consistió en el análisis por duplicado de 13 muestras de hemolinfa de días consecutivos, utilizando un volumen de 50 µl por muestra. Estas comprendieron 6 días previos y posteriores a la muda, y el día de ecdisis. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5 µg/ml SSA de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante en BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS.

A continuación, se analizaron las muestras de hemolinfa correspondientes a un ciclo de muda, con duración promedio de 10 días, y utilizando el mismo volumen de muestra. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5 µg/ml SSA de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante en BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS.

Con el objetivo de establecer la cantidad mínima de muestra en la cual la neurohormona nativa puede ser detectada de forma reproducible en muestras de hemolinfa mezcladas con SSA, se realizó otro ensayo en el cual se analizaron por triplicado 40 µl de nueve muestras de un mismo organismo, en dos series de días consecutivos (2 al 7 y 8 al 11) de un ciclo de muda promedio de 12 días. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5 µg/ml SSA de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante en BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS.

Subsecuentemente, se analizaron sin duplicado 100 µl de nueve muestras de un mismo organismo, correspondientes a siete días previos a la muda, el día de ecdisis y un día posterior a la muda. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5 µg/ml SSA de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante en BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS.

#### **VI.4.6 Análisis de muestras pertenecientes a un ciclo de muda bajo condiciones predeterminadas**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección VI.4.5, se analizaron sin duplicado, 100  $\mu$ l de muestras de hemolinfa de un mismo organismo, correspondientes a un ciclo de muda completo con duración de 12 días. El protocolo utilizado fue el mismo que el detallado en la sección VI.2.2 (Tabla VI). Como controles negativos se utilizaron PBS (control 1) y SSA (control 5). Como control positivo se utilizaron 5  $\mu$ g/ml SSA de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante en BSA al 1%, y como blanco se utilizo PBS.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 EXPRESIÓN DE LA NEUROHORMONA rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> A PARTIR DE LA CLONA OBTENIDA EN *Pichia pastoris*

#### VII.1.1 PCR de colonia

Para corroborar la construcción de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, se realizó un PCR de colonia de la cepa KM71<sub>HisTag</sub>. En la Figura 18, se muestra el análisis en agarosa al 1% del producto de PCR de colonia. La banda que se observa en el carril 4, corresponde al fragmento esperado (747 pb). De esta manera, se confirmó la presencia del gen de interés en el genoma de la cepa criopreservada, por lo que se llevó a cabo su crecimiento para determinar el día de mayor producción.

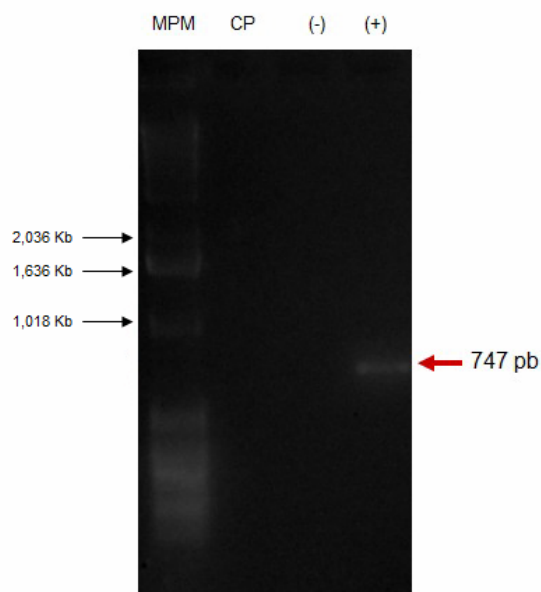


Figura 18. PCR de colonia de cepa criopreservada KM71 MIH<sub>HIS</sub>. MPM, marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); CP, Control de PCR; (-), control negativo cepa KM71 silvestre; (+) cepa KM71<sub>HisTag</sub>.

### VII.1.2 Cinética de expresión

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la electroforesis desnaturalizante en poliacrilamida al 12% (tinción Azul Coomassie), el neuropéptido rLiv-CHH-SG1<sub>His</sub>, con un peso esperado de 12.1 kDa, se expresó mayoritariamente en el día 1 (Figura 19).

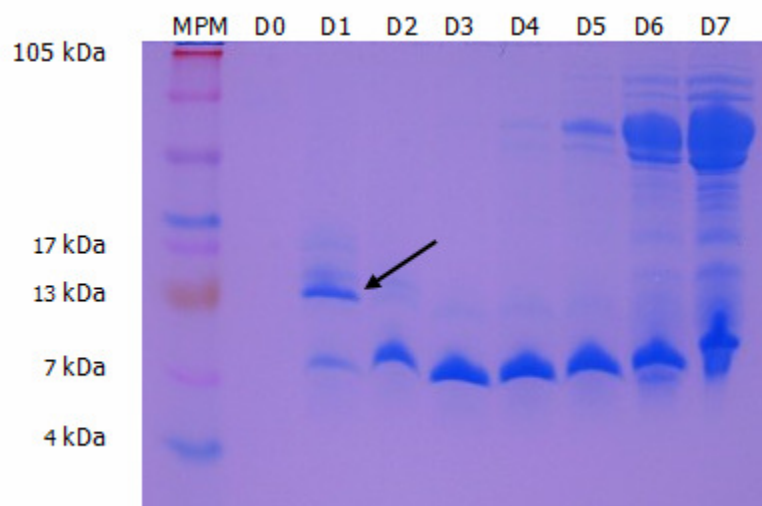


Figura 19. Análisis de la síntesis y secreción de Liv-CHH-SG1<sub>His</sub>, en electroforesis desnaturalizante en poliacrilamida al 16% (tinción Azul Coomassie). La flecha indica la banda correspondiente al péptido bajo estudio. MPM, marcador de peso molecular MultiMarkR Multi-Colored Standard (Invitrogen); carriles D0-D7, 500  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo correspondientes a los días 0-7 de inducción, respectivamente.

Asimismo, el resultado anterior se confirmó mediante inmunodetección por Western Blot (Figura 20). La flecha indica la banda correspondiente al péptido reconocido por el anticuerpo. Por encima de la banda principal se distinguieron dos bandas de menor intensidad, también inmunodetectadas. La presencia de estas bandas de mayor tamaño fue observada en un estudio previo (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008), y su secuenciación reveló que corresponden a la porción NH<sub>2</sub> terminal de Liv-CHH-SG1, por lo que se sugiere que se trata probablemente de formas que no fueron desnaturalizadas completamente.

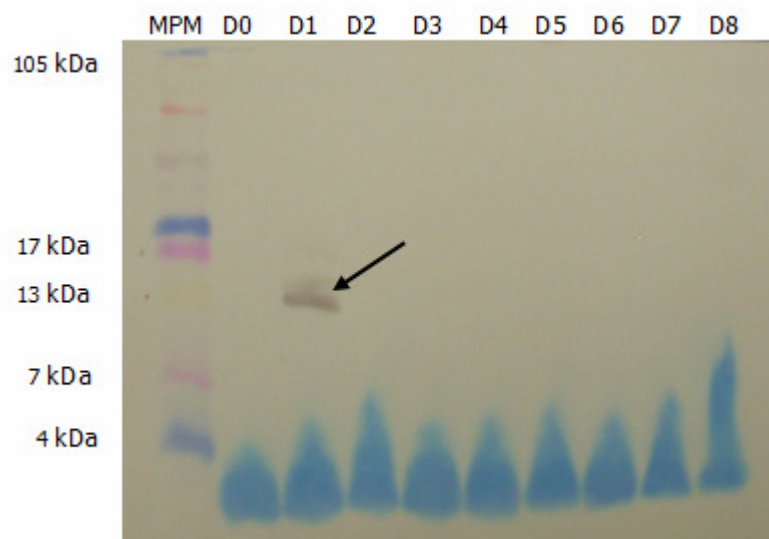


Figura 20. Análisis de la síntesis y secreción de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>, mediante Western blot. MPM, marcador de peso molecular MultiMark<sup>R</sup> Multi-Colored Standard (Invitrogen); carriles D0-D8, 500  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo correspondientes a los días 0-8 de inducción, respectivamente.

### VII.1.3 Escalamiento del cultivo

Una vez determinado el tiempo del mayor rendimiento, Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> se expresó por un proceso de fermentación de 24 horas a partir de su inducción con metanol al 4%, en un volumen mayor de cultivo. De esta manera se obtuvieron 200 ml de sobrenadante de cultivo de inducción (BMMY), a partir de la duplicación del volumen de cultivo de crecimiento (BMGY) utilizado inicialmente.

La presencia del péptido de interés en el sobrenadante de cosecha en el día uno de inducción, fue analizada por duplicado en electroforesis desnaturizante de poliacrilamida al 16% (Figura 21) y confirmada por Western blot (Figura 22).

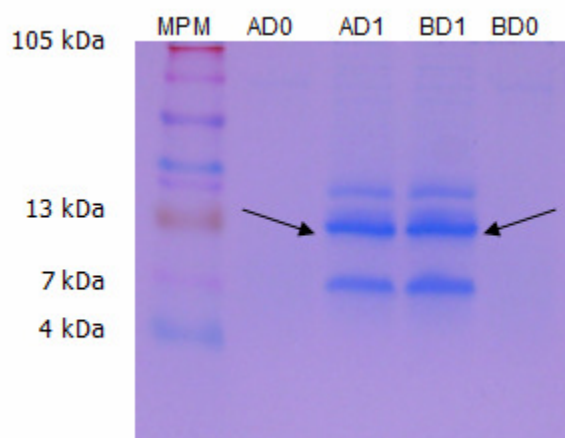


Figura 21. Análisis de la cosecha de Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> en electroforesis desnaturalizante en poliacrilamida al 16% (tinción Azul Coomassie). MPM, marcador de peso molecular MultiMarkR Multi-Colored Standard (Invitrogen); AD0, Cultivo A día 0 de inducción; AD1, Cultivo A día 1 de inducción; BD1, Cultivo B día 1 de inducción; BD0, Cultivo B día 0 de inducción.

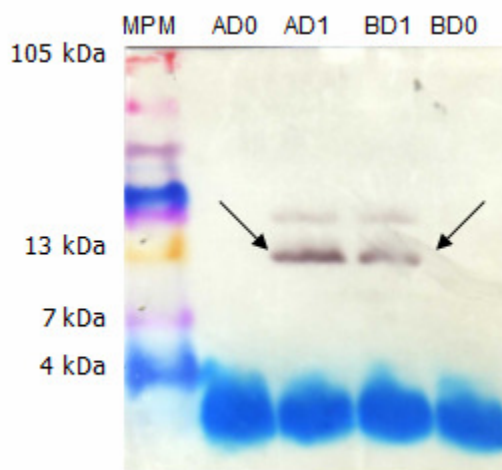


Figura 22. Análisis de la cosecha de Liv-CHH-SG1<sub>His</sub> mediante Western blot. MPM, marcador de peso molecular MultiMark<sup>R</sup> Multi-Colored Standard (Invitrogen); AD0, Cultivo A día 0 de inducción; AD1, Cultivo A día 1 de inducción; BD1, Cultivo B día 1 de inducción; BD0, Cultivo B día 0 de inducción.

#### VII.1.4 Cuantificación por BCA (Ácido Bicinonínico)

Las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo de inducción, fueron concentradas utilizando una membrana con capacidad de retención para proteínas con peso molecular mayor a los 9 kDa. El concentrado fue

cuantificado por BCA. De acuerdo a la ecuación de la recta  $Y=0.0016x + 0.6515$  (Figura 23), a la cual se ajustaron las lecturas de absorbancia a 562 nm (Tabla VII) en un 87%, se determinó la presencia de 80.89 mg/L de proteínas totales en el concentrado.

<b>Tabla VII. Lecturas de absorbancia a 562nm</b>			
	Concentración (mg/ml)	Lectura 1	Lectura 2
BSA	25	0.303	0.309
	125	0.698	0.780
	250	0.911	0.969
	500	1.645	1.738
	750	2.136	2.437
	1,000	2.659	2.659
	1,500	3.136	3.136
	2,000	3.136	3.136
Muestra (1:20)	Desconocida	0.878	0.876

Por otra parte, para eliminar algunos patógenos, el producto concentrado fue filtrado utilizando un poro de 0.2  $\mu\text{m}$  y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ .

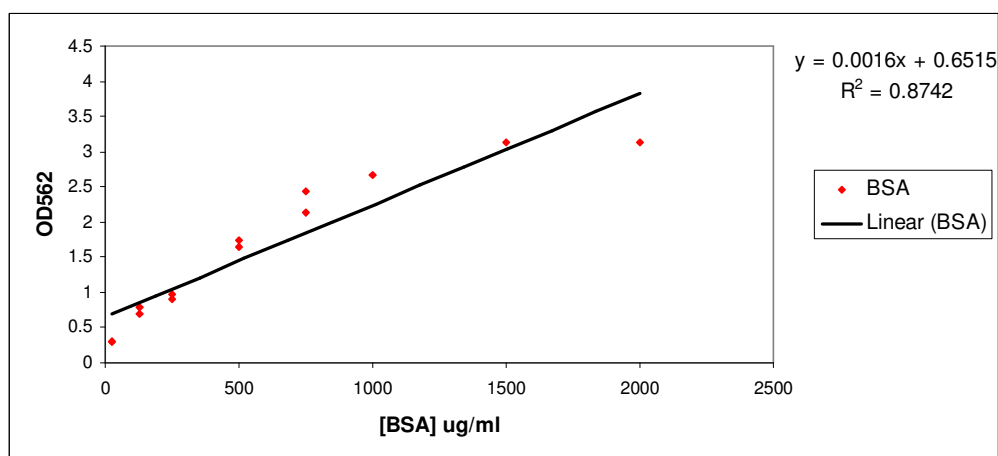


Figura 23. Modelo de regresión lineal, a partir de los valores obtenidos de absorbancia y concentración conocida de BSA. Eje Y, valores de densidad óptica leídos a una longitud de onda de 562 nanómetros; eje X, concentración de BSA en microgramos por mililitro; puntos, lecturas de densidad óptica de BSA a 562 nanómetros; línea, representa el ajuste de las lecturas a un modelo lineal.



La Figura 24 muestra el análisis en electroforesis de poliacrilamida al 16% del producto concentrado y filtrado, en la cual se observó la presencia de proteínas adicionales por debajo del peso molecular de la proteína de interés. Para corregir esta situación fue necesaria una recuantificación mediante RP-HPLC.

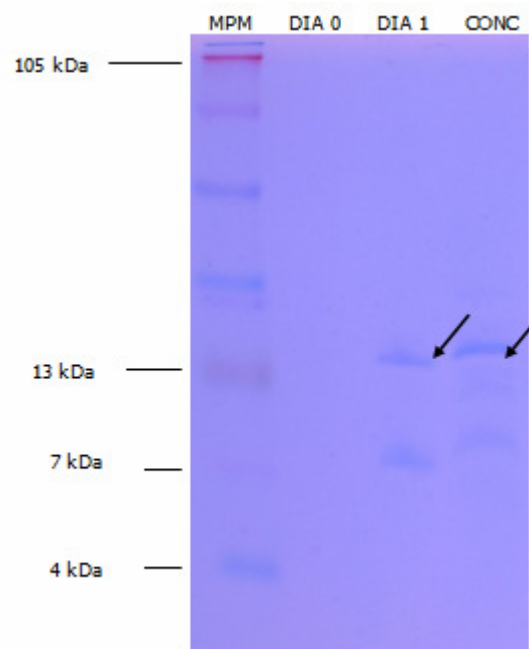


Figura 24. Análisis del concentrado en poliacrilamida al 16% (tinción Azul Coomassie). Las flechas indican la banda correspondiente a Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>. MPM, marcador de peso molecular MultiMark<sup>®</sup> Multi-Colored Standard (Invitrogen); D0, 500  $\mu$ l de sobrenadante del día 0 de expresión; D1, 500  $\mu$ l de sobrenadante del día 1 de expresión; CONC, 15  $\mu$ l de concentrado equivalente a 525  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo de expresión al día 1.

### VII.1.5 Cuantificación por RP-HPLC

La Figura 25, muestra los perfiles obtenidos a partir del análisis del sobrenadante de inducción.

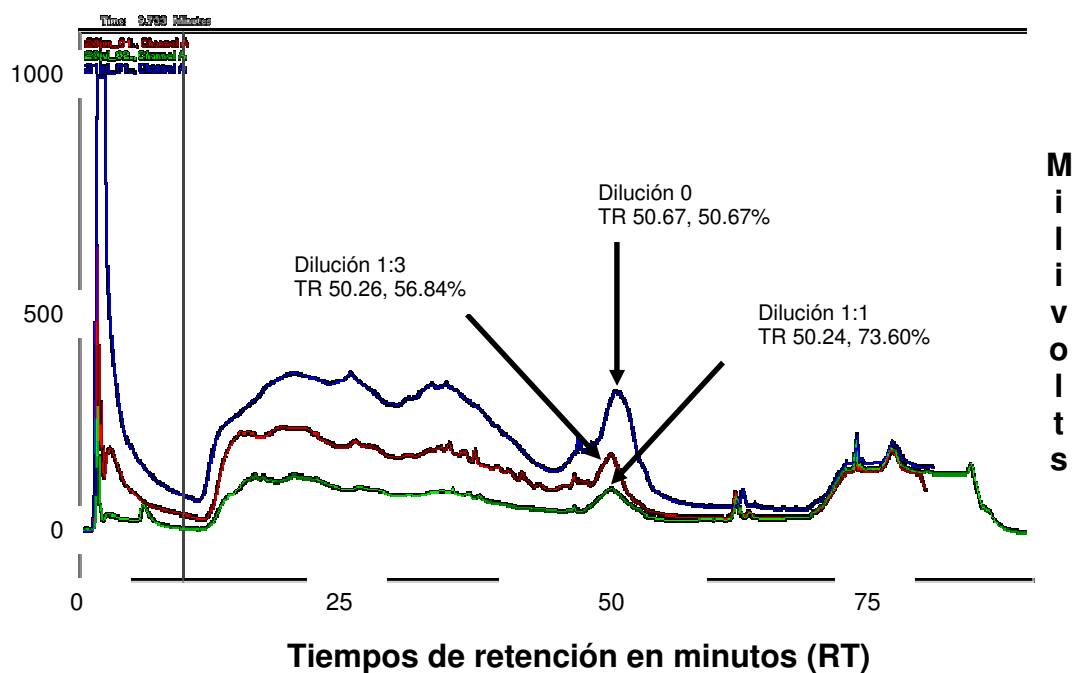


Figura 25. Perfiles obtenidos a partir de diferentes diluciones de medio de inducción analizadas por RP-HPLC. TR, tiempos de retención en minutos; %, porcentajes en proporción al volumen total de muestra analizada.

Las fracciones correspondientes a los tiempos de retención 45-55 y 55-65, de la corrida de sobrenadante de inducción sin dilución, presentaron un resultado positivo en el ELISA de detección (Figura 26). Por esta razón, se incorporaron en un solo volumen y fueron liofilizadas y resuspendidas en 5 ml de PBS.

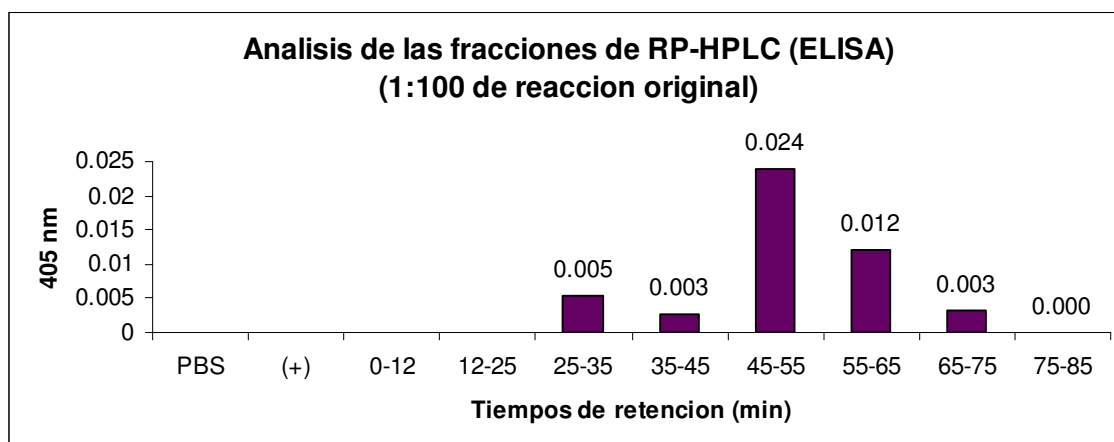


Figura 26. Análisis inmunoenzimático de las fracciones de RP-HPLC mediante ELISA. PBS, blanco; (+), control positivo. En la reacción del ensayo sin dilución, el valor del control positivo fue de 2.514.

La cuantificación a 280nm del liofilizado resuspendido (NanoVue) fue de 71.43 mg L<sup>-1</sup>, lo cual representa el 50.5 % de las proteínas totales en el medio de inducción concentrado con la membrana de 9 kDa.

## VII.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO ANTI rLiv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>

### VII.2.1 Análisis inmunoenzimático de sueros pre-inmune e inmunes

La proteína recombinante fue utilizada para inmunizar al conejo de acuerdo al protocolo mencionado en la Tabla V de la sección VI.2.1. Los antisueros obtenidos se analizaron para evaluar la capacidad inmunogénica del antígeno recombinante. Los resultados obtenidos (Figura 27), indican que para el suero preinmune (día 0), el conejo presentó una respuesta inmunológica al antígeno prácticamente nula, y que de acuerdo al transcurso del tiempo, tuvo lugar un incremento gradual en el valor de los títulos de los anticuerpos generados contra el antígeno recombinante.

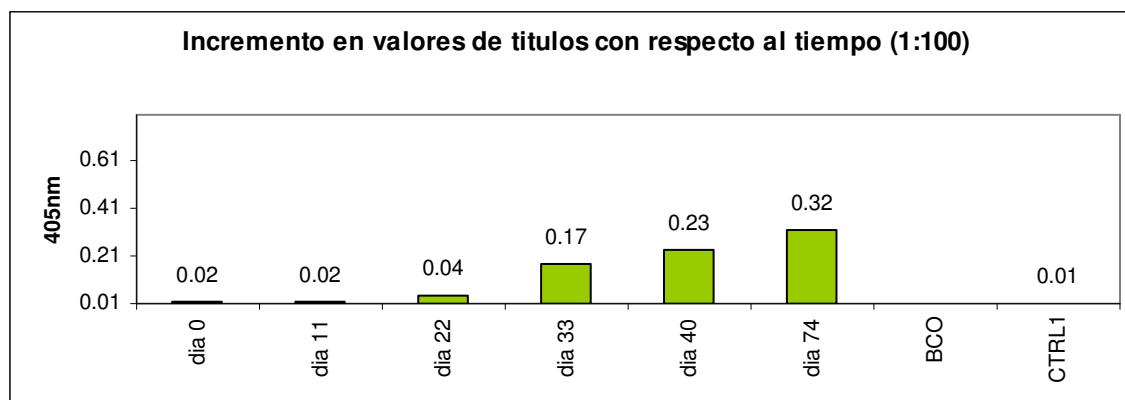


Figura 27. Incremento en valores de los títulos a lo largo del tiempo. BCO, Blanco; CTRL1, control 1.

### VII.2.2 Titulación de suero hiperinmune

De acuerdo a la linealidad que se observa en la gráfica que se presenta en la Figura 28, el valor de titulación del antisuero hiperinmune obtenido a partir de la exanguinación del conejo fue de 1:500.

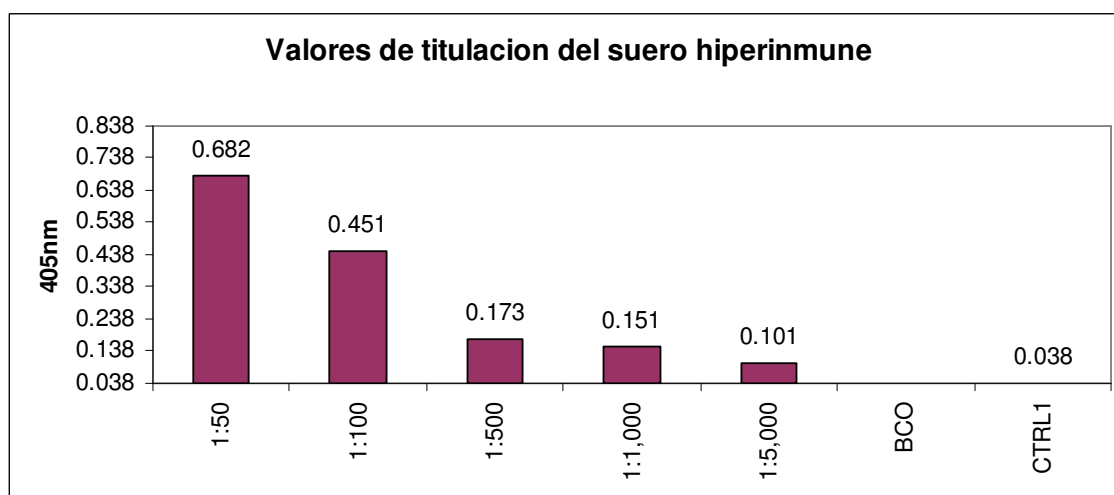


Figura 28. Valores de titulación del antisuero hiperinmune. BCO, blanco; CTRL1, control 1.

### VII.2.3 Precipitación y diálisis del suero hiperinmune

Con el propósito de verificar el isotipo de las inmunoglobulinas, precipitadas con Sulfato de Amonio Saturado y dializadas contra PBS, obtenidas a partir del antisuero hiperinmune, se analizaron 5  $\mu$ l en electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (10%) (Figura 29). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular MultiMarkR Multi-Colored Standard (Invitrogen).

De acuerdo a la presencia de las bandas con pesos moleculares de 25 y 50 kDa (Figura 29), se verificó el isotipo  $\gamma$  de las Inmunoglobulinas obtenidas. Por otra parte, la intensidad de las bandas anteriormente mencionadas, en relación con el resto de los componentes separados durante la electroforesis, revelan la pureza relativa de los anticuerpos precipitados y dializados.

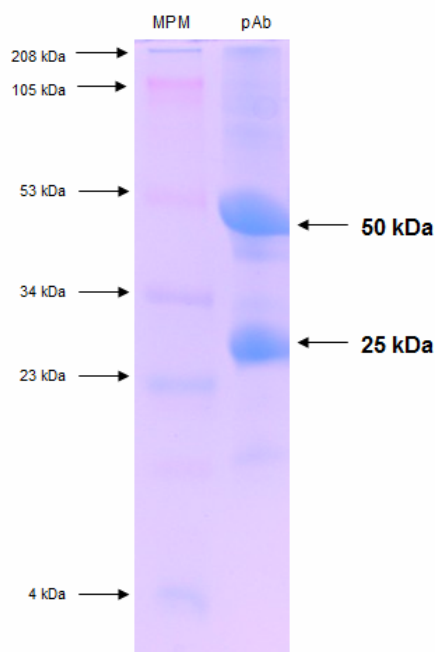


Figura 29. Visualización de la electroforesis de poliacrilamida (Tricine-SDS-PAGE) al 10% (Tinción Azul Coomassie), de Inmunoglobulinas precipitadas y dializadas. Las flechas indican una banda de 50 kDa que corresponde a las cadenas pesadas y una banda de 25 kDa que corresponde a las cadenas ligeras. MPM, MultiMarkR Multi-Colored Standard (Invitrogen); pAb, anticuerpos policlonales precipitados con Sulfato de Amonio Saturado y dializados contra PBS.

### VII.2.4 Determinación del Límite Mínimo de Detección

Para probar la reactividad de las IgGs obtenidas, se realizó un ensayo ELISA con diluciones seriales de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>. En la Figura 30, se presentan las densidades ópticas de las diferentes diluciones de antígeno recombinante, reconocidas por el *pool* de IgG (1:100; BSA 1%) y leídas a 405 nm.

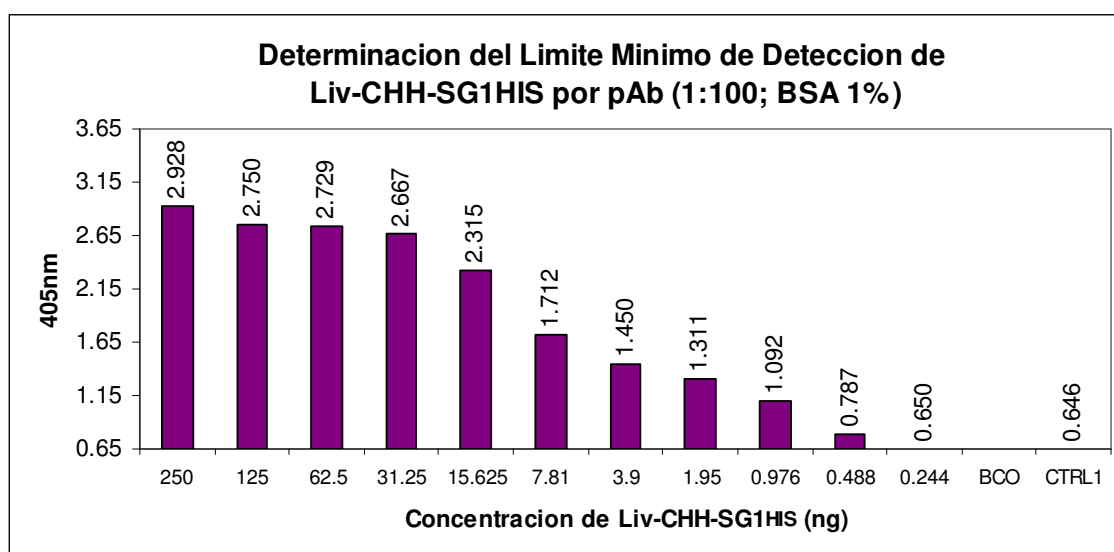


Figura 30. Limite mínimo de detección de antígeno recombinante. BCO, blanco; CTRL1, control 1.

De acuerdo al análisis de regresión lineal de las lecturas anteriores (Figura 31), los datos se ajustaron en un 96% a la ecuación de la recta  $y=0.2521x + 0.3411$ . La concentración menor de antígeno detectado por el anticuerpo policlonal que presentó diferencia significativa ( $P=0.03^*$ ) con el control 5 (Tabla VI), en el cual la presencia del antígeno se encuentra sustituida por Solución Salina Anticoagulante, fue de 0.976 ng, equivalente a  $1.62 \text{ pmol ml}^{-1}$ .

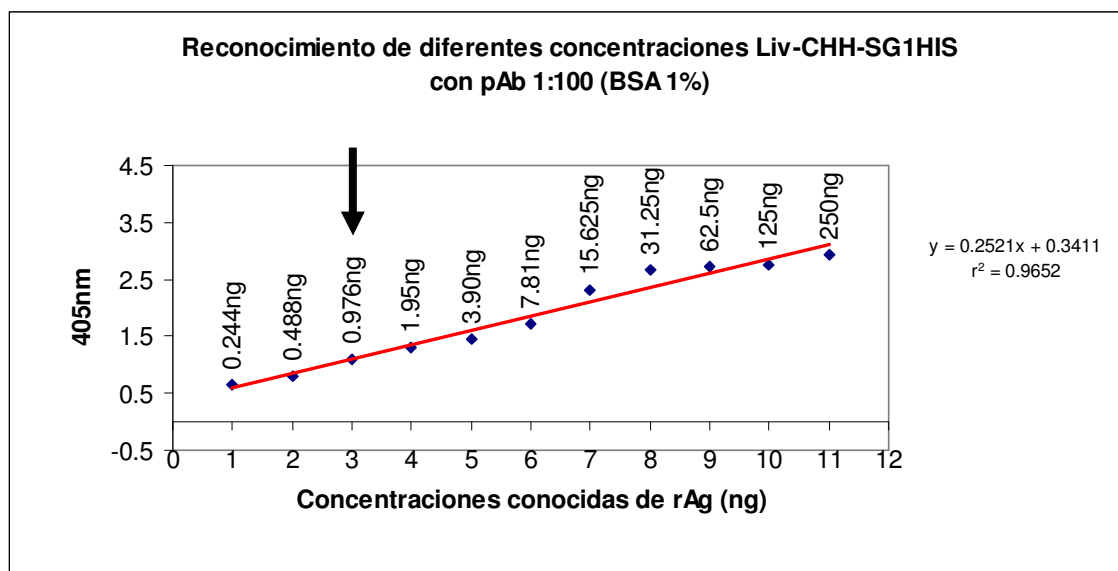


Figura 31. Análisis de regresión lineal de las lecturas obtenidas en el ensayo para la determinación del límite mínimo de detección de antígeno recombinante.

La sensibilidad lograda con este ensayo fue relativamente buena, comparada con otros trabajos en los cuales se ha logrado la detección y cuantificación de neurohormonas de crustáceos utilizando anticuerpos policlonales y la misma variante de ELISA. Tal es el caso de una isoforma hiperglucémica de *Palaemon elegans* (Lorenzon *et al.*, 2004), la cual fue detectada en hemolinfa en el orden de  $\text{pmol ml}^{-1}$ , mediante un ELISA indirecto, después de someter a un grupo de organismos a estrés por metales pesados y lipopolisacáridos. Por otra parte los anticuerpos policlonales obtenidos en conejos por Sánchez-Castrejón *et al.* (2008), a partir de porciones del péptido sintético Liv-CHH-SG1 de *L. vannamei*, tuvieron un límite mínimo de detección de 6.3 ng de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub>. Sin embargo, la detección de la neurohormona nativa en hemolinfa no fue posible.

### VII.2.5 Análisis de reacción cruzada

Las proteínas recombinantes Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> y TNF-43 contienen las regiones *cmyc* (para reconocimiento con anticuerpos) y 6xHis (para purificación por afinidad a metales) en su porción C-Terminal. La similitud entre las secuencias de ambas proteínas recombinantes fue analizada mediante el software ClustalW (v1.4) *multiple sequence alignment*. Ambas proteínas presentaron 11% de identidad/similitud. Los aminoácidos compartidos fueron G9 Y11 R17 Y33 V34 K39 F48 D54 D59 Y64 G73.

Las lecturas de densidad óptica (Figura 32) tomadas a 405 nm fueron muy similares en ambas proteínas. Sin embargo, los anticuerpos reconocieron en mayor medida a la proteína recombinante TNF-43, pues hubo una diferencia significativa ( $P=0.028^*$ ) entre la lecturas de densidad óptica del reconocimiento de ambas proteínas.

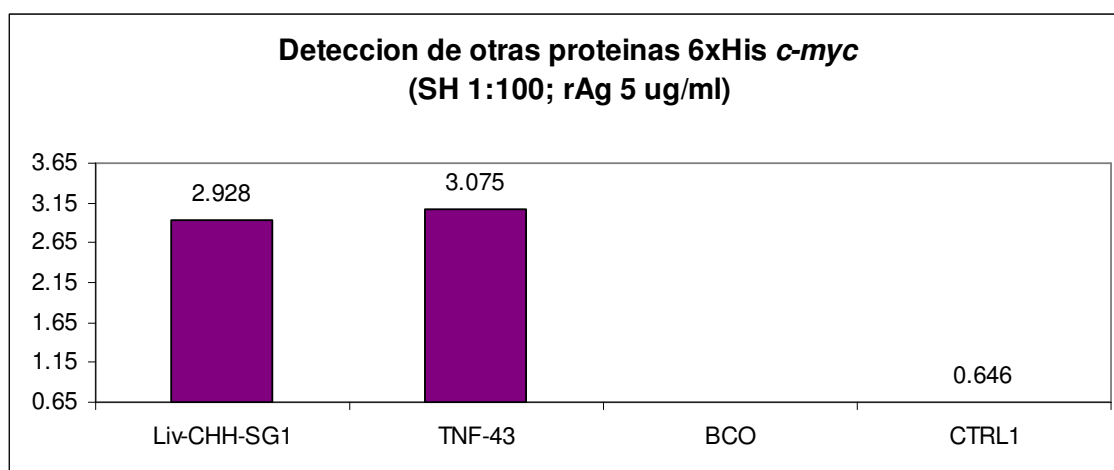


Figura 32. Análisis de reacción cruzada. BCO, blanco; CTRL1, control 1.

Lo anterior puede deberse a que los epítomos *cmyc* y 6xHis son altamente inmunogénicos. Por esa misma razón, una gran cantidad de anticuerpos policlonales generados a partir del antígeno recombinante, estuvieron dirigidos



hacia esas regiones durante la respuesta inmune propiciada en el conejo durante la inmunización y refuerzos.

### **VII.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE HEMOLINFA DE CAMARONES JUVENILES A LO LARGO DE SU CICLO DE MUDA**

Con el propósito de evaluar la capacidad de los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo, para reconocer a la hormona Liv-CHH-SG1 nativa en hemolinfa de camarones juveniles, se logró la colección de 99 muestras de sobrenadante de hemolinfa, que corresponden al ciclo de muda de 8 organismos, cuya duración oscila en un rango de 10 a 16 días.

### **VII.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES HACIA LA HORMONA NATIVA EN MUESTRAS DE HEMOLINFA**

#### **VII.4.1 Análisis preliminar de muestras en *pool***

El análisis en *pool* mediante un ELISA indirecto (Figura 33), reveló la detección de la hormona nativa en hemolinfa por parte de los anticuerpos policlonales tipo IgG, con una lectura de densidad óptica de 0.522 leída a 405 nm.

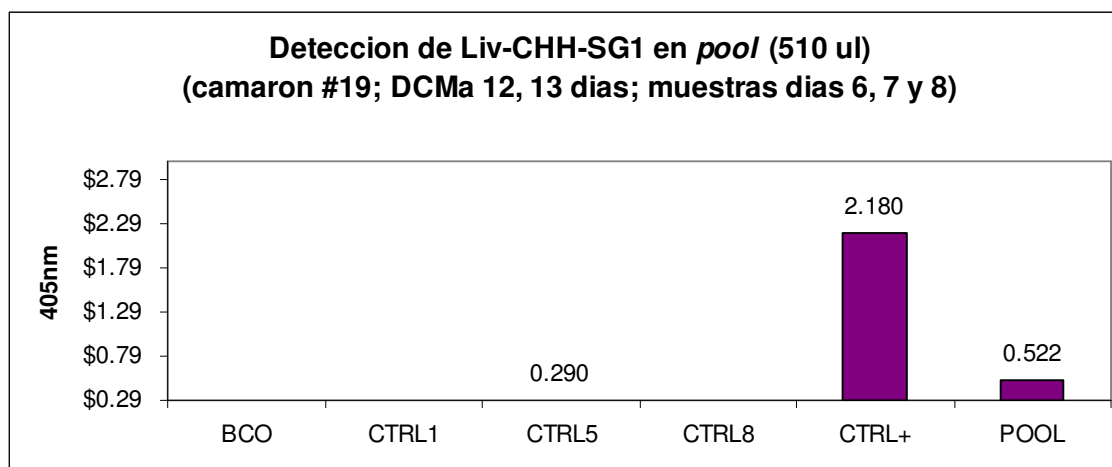


Figura 33. Análisis de muestras de hemolinfa en *pool*. BCO, blanco; CTRL1, control 1; CTRL5, control 5; CTRL8, control 8.

#### VII.4.2 Análisis preliminar de muestras en forma individualizada

Después de verificar la capacidad de los anticuerpos para reconocer a la hormona nativa en muestras de hemolinfa en *pool*, se procedió a analizar las muestras de forma individual mediante el mismo procedimiento. Al ajustar los valores de las lecturas de las muestras de hemolinfa al valor de densidad óptica del control 5 (Tabla VI), en el cual la cantidad de antígeno equivale a 0, en la Figura 34 puede observarse que en la muestra del día 7 antes de la muda no hubo reconocimiento de la hormona nativa por parte de los anticuerpos. En el resto de las muestras analizadas hubo un reconocimiento que proporcionalmente equivale al 25 -38 % de la lectura del control positivo (0.693).

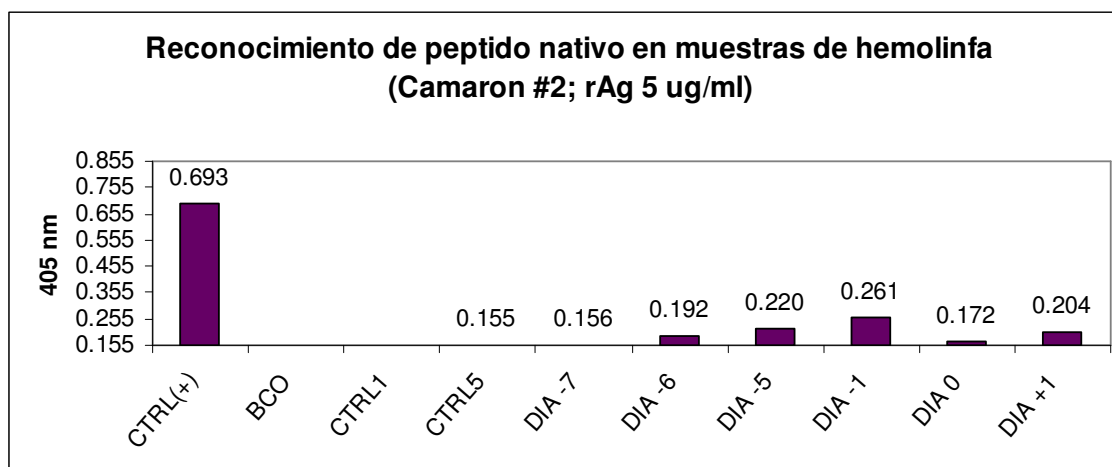


Figura 34. Análisis preliminar de muestras de hemolinfa. CTRL (+),  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en PBS; BCO, blanco; CTRL 1, Control 1; CTRL 5, Control 5; DIA (-), días previos al día de muda; DIA 0, día de muda; DIA (+), días posteriores al día de muda.

Proporcionalmente, los valores de densidad óptica obtenidos a partir de las muestras en el ensayo individualizado fueron menores que el valor de la lectura del análisis de muestras en *pool*. Lo anterior puede deberse a algún tipo de interferencia por parte de los componentes de las muestras o a que durante los días en los que las muestras fueron tomadas, la cantidad de hormona en la hemolinfa era menor.

#### VII.4.3 Reconocimiento diferencial del antígeno recombinante

Con el propósito de determinar si la presencia de SSA en las muestras de hemolinfa interfiere de alguna manera durante el procedimiento de inmunodetección de la hormona nativa, se realizó un ELISA de detección de la neurohormona recombinante resuspendida en PBS y SSA. El resultado reveló que existe un reconocimiento diferencial de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante cuando esta se encuentra resuspendida en ambas soluciones. Como puede observarse en la Figura 35, el valor de la lectura obtenida a partir del reconocimiento de la neurohormona recombinante resuspendida en SSA (0.189) es igual al valor obtenido en la lectura del control 5, en el cual la cantidad de antígeno es igual a 0 (Tabla VI). Es decir, el reconocimiento bajo

estas condiciones es nulo. Lo anterior puede deberse a que la composición de la SSA, interfiere de alguna manera en la adherencia del antígeno recombinante a la placa, y por esta misma razón, la neurohormona se pierde durante los lavados y cambios de las soluciones utilizadas en el procedimiento.

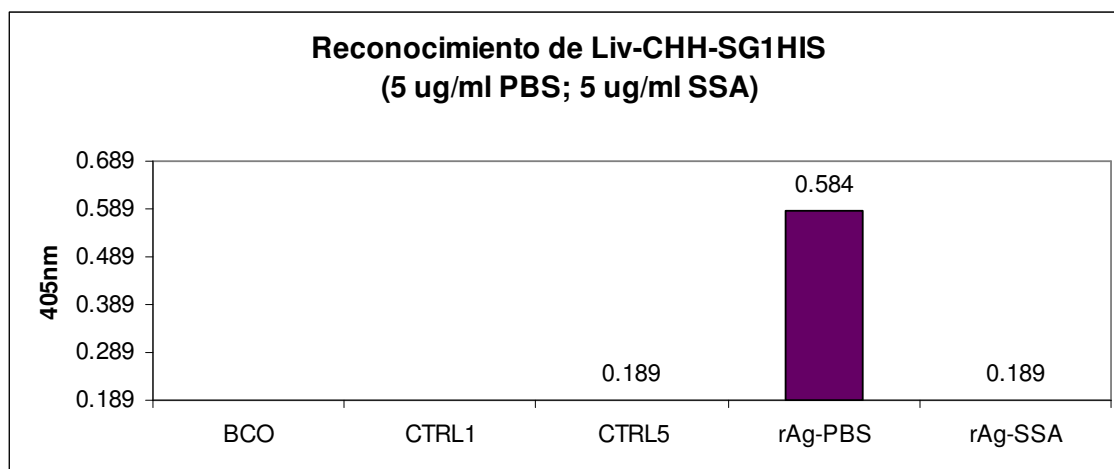


Figura 35. Reconocimiento diferencial de antígeno recombinante en PBS y SSA. BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL5, Control 5; rAg-PBS,  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> resuspendida en PBS; rAg-SSA,  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> resuspendida en SSA.

Por otra parte, la lectura de la misma concentración de hormona recombinante resuspendida en PBS fue de 0.584.

#### **VII.4.4 Determinación de condiciones óptimas para el reconocimiento de la hormona recombinante en SSA.**

Una vez establecido que la presencia de SSA en las muestras de hemolinfa interfiere en la detección del antígeno mediante el inmunoensayo en placa, se procedió a determinar las condiciones en las cuales la hormona recombinante puede ser inmunodetectada cuando esta se encuentra resuspendida en SSA.

De acuerdo a los valores de densidad óptica que se muestran en la Figura 36, la concentración de BSA 1% en SSA y la dilución 1:100 de los anticuerpos

policlonaes, tuvieron un valor de densidad óptica de 0.429 y fueron en combinación, las condiciones en las cuales la neurohormona recombinante fue reconocida en mejor medida.

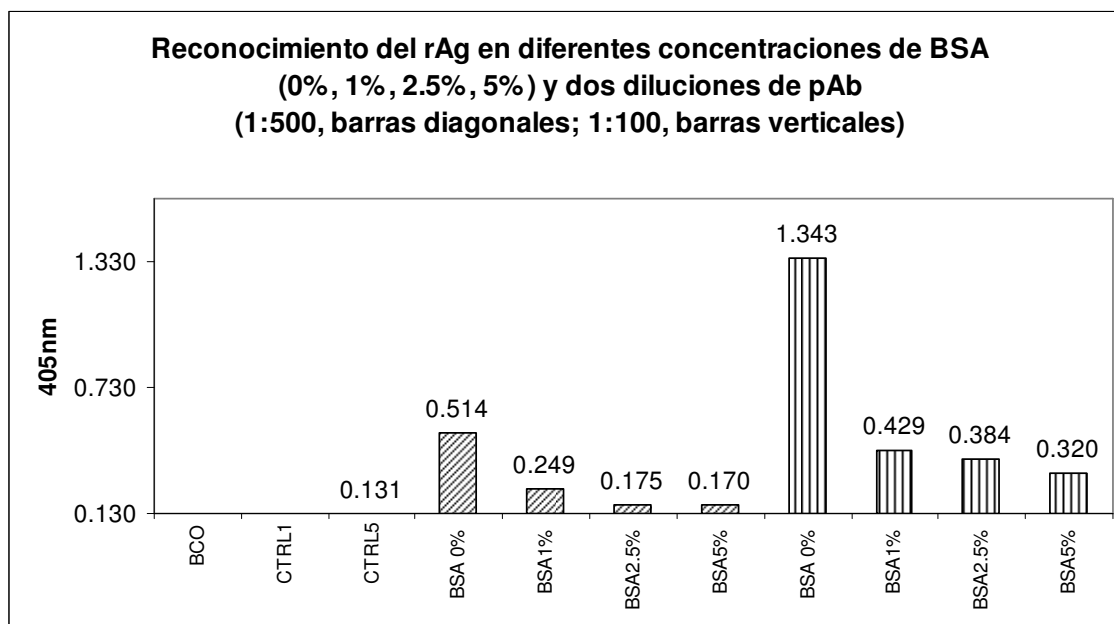


Figura 36. Determinación de condiciones para análisis de muestras de hemolinfa con SSA. Reconocimiento de neurohormona recombinante con pAb en una dilución de 1:500 (verde) y 1:100 (morado). BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL5, Control 5; rAg-PBS,  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> resuspendida en PBS; rAg-BSA 1, 2.5 y 5%,  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> resuspendida en BSA al 1, 2.5 y 5%.

#### VII.4.5 Análisis de muestras en condiciones predeterminadas

Después de determinar la concentración de BSA y la dilución de anticuerpos policlonaes, con las cuales la neurohormona recombinante puede ser reconocida en SSA mediante un ELISA indirecto, se procedió a evaluar la capacidad de los anticuerpos para detectar a la neurohormona nativa en muestras de hemolinfa bajo estas mismas condiciones.

En el primer ensayo, se analizaron por duplicado  $50 \mu\text{l}$  de hemolinfa para evaluar la presencia de la neurohormona nativa en muestras correspondientes

a seis días anteriores y posteriores al día de muda (Figura 37). Como controles negativos se utilizaron PBS (Control 1) y SSA (Control 5). Como control positivo se utilizaron  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en SSA con BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS. La presencia de la neurohormona fue detectada en las muestras de los días 5 y 3 anteriores a la muda, el día de ecdisis y el día 3 posterior a la liberación de la exuvia, debido a que durante el inmunoensayo estas muestras presentaron lecturas de densidad óptica superiores al valor del control 5 (0.314), en el cual la cantidad de antígeno equivale a 0 (Tabla VI).

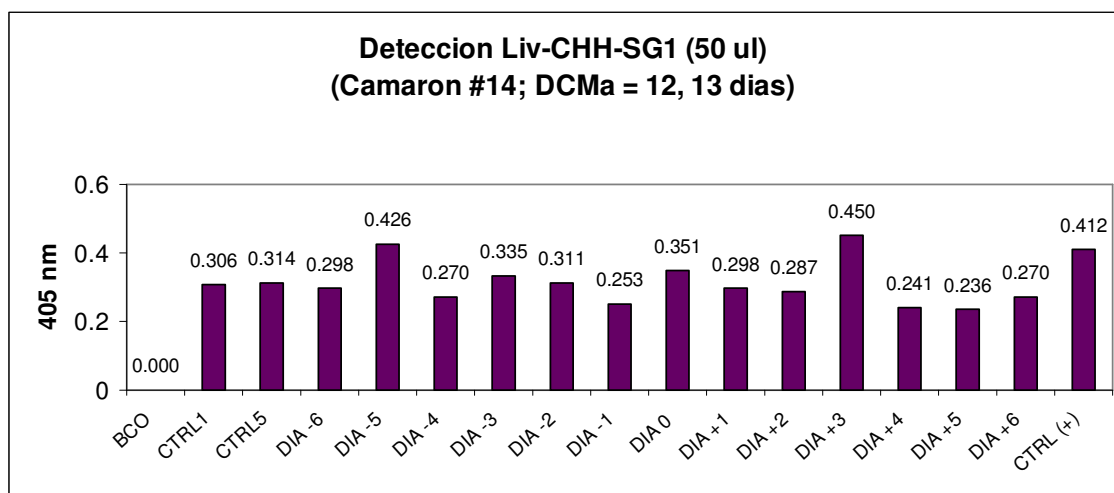


Figura 37. Reconocimiento de hormona nativa en muestras de  $50 \mu\text{l}$  de hemolinfa. BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL5, Control 5; DIA (-), días anteriores al día de muda; DIA 0, día de muda; DIA (+), días posteriores al día de muda. CTRL (+),  $5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en SSA.

Después de verificar el reconocimiento efectivo de los anticuerpos policlonales por la neurohormona nativa en muestras aleatorias de hemolinfa con SSA, se procedió a analizar las muestras de hemolinfa correspondientes a un ciclo de muda. En este ensayo, se analizaron por duplicado de  $50 \mu\text{l}$  hemolinfa, correspondientes al ciclo de muda de un organismo con duración de 10 días (Figura 38). Como controles negativos se utilizaron PBS (Control 1) y SSA (Control 5). Como blanco se utilizó PBS. La presencia de la neurohormona se detectó en las lecturas que estuvieron por encima del valor del control 5

(0.179), en el cual la cantidad de antígeno equivale a 0 (Tabla VI). Como resultado, la neurohormona fue detectada en todas las muestras con excepción de los días 5 y 7 posteriores a la muda. Por otra parte, la lectura de la muestra del día con el cual inicia el ciclo de muda, fue proporcionalmente casi el doble de la lectura correspondiente al día con el cual finaliza el ciclo.

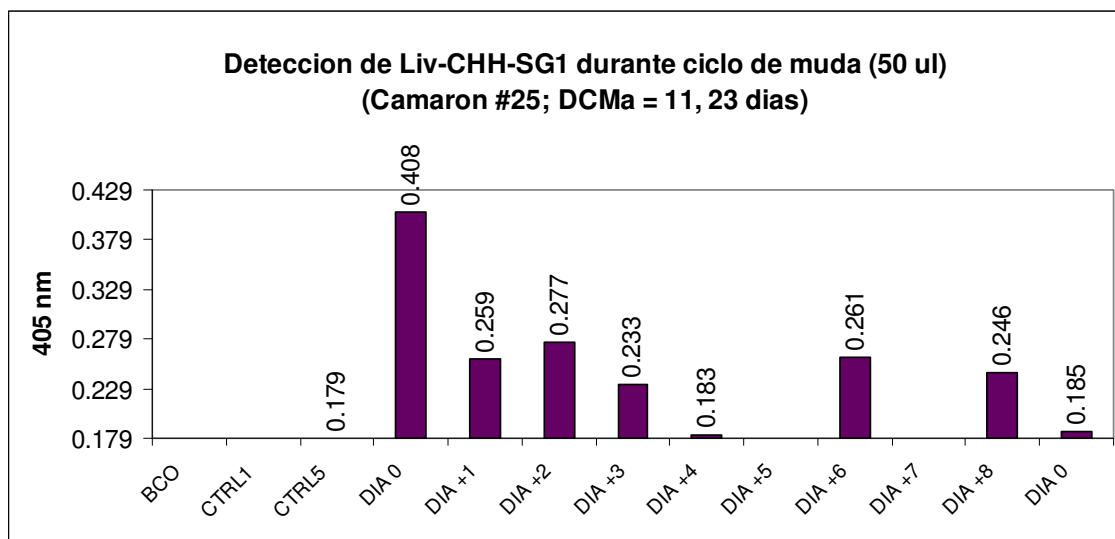


Figura 38. Análisis por duplicado de 50  $\mu$ l de muestras de hemolinfa correspondientes a un ciclo de muda. BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL5, Control 5; DIA 0, día de muda; DIA (+), días posteriores al día de muda.

Con el propósito de obtener lecturas por triplicado para poder realizar un análisis estadístico y evaluar el grado de reproducibilidad del ELISA, se analizaron 40  $\mu$ l de muestras de hemolinfa de los días 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11 posteriores al día de muda de un mismo organismo, con duración promedio de ciclo de muda de 12 días (Figura 39). Como controles negativos se utilizaron PBS (Control 1) y SSA (Control 5). Como blanco se utilizó PBS. Los resultados mostraron que todas las lecturas de densidad óptica estuvieron por debajo del valor del control 5 (0.357), en el cual la cantidad de antígeno equivale a 0.

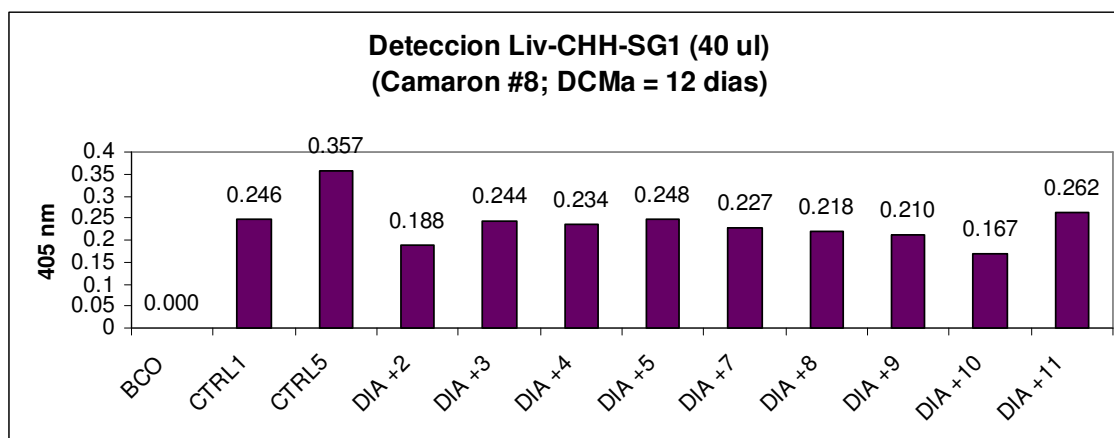


Figura 39. Promedio del análisis por triplicado de 40  $\mu$ l de muestras de hemolinfa. BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL5, Control 5; DIA (+), días posteriores al día de muda.

Esto indica que el volumen de muestra no fue suficiente para detectar a la neurohormona mediante este tipo de ensayo. En otros estudios, la concentración tan baja de la isoforma bajo estudio ha sido una limitante para su detección y cuantificación, inclusive utilizando otras variantes de inmunoensayo con mayor sensibilidad como lo es el ELISA sándwich. Tal es el caso de la isoforma Prc-MIH de *Procambarus clarkii*, la cual no fue posible detectar en hemolinfa (Nakatsuji *et al.*, 2000). En los casos en los que se ha logrado la cuantificación, se han reportado niveles tan bajos como menores a 5 fmol 100  $\mu$ l<sup>-1</sup> (Chung *et al.*, 1999; Chung y Webster, 2003; Chung y Webster, 2005). Además de esto, las concentraciones reportadas para isoformas tipo MIH (fmol 100  $\mu$ l<sup>-1</sup>) son menores que las de isoformas tipo CHH (fmol ml<sup>-1</sup>).

Con base en lo anterior, se decidió realizar un ensayo utilizando 100  $\mu$ l de muestras de hemolinfa, correspondientes a siete días anteriores y uno posterior al día de muda, de un camarón que tuvo un ciclo de muda de 23 días. Como control negativo se utilizó SSA (Control 5). Como control positivo se utilizaron 5  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en SSA con BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS. La presencia de la neurohormona se detectó en las lecturas que estuvieron por encima del valor del control 5 (0.37), en el cual la cantidad de



antígeno equivale a 0 (Tabla VI). Como puede observarse en la Figura 40, fue posible detectar cambios en las lecturas a lo largo los días consecutivos analizados. Los resultados sugieren un descenso gradual en los niveles de la neurohormona reconocida a partir de los días 7 y 4 anteriores a la muda, hasta llegar a un valor de 0 (imperceptible mediante esta técnica) en los días 2 y 1 precedentes a la muda, así como en el día de la ecdisis (día 0). A partir del día 1 posterior al día de muda, se observó un pequeño incremento en la cantidad de neurohormona reconocida.

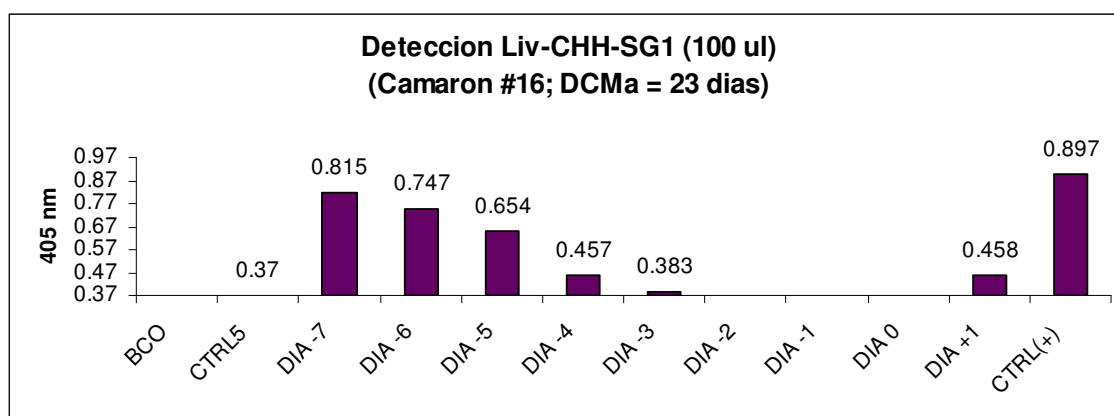


Figura 40. Análisis de 100  $\mu$ l de muestras de hemolinfa. BCO, Blanco; CTRL5, Control 5; DIA (-), días anteriores al día de muda; DIA 0, día de muda; DIA (+), días posteriores al día de muda; CTRL (+), control positivo 5  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en SSA.

#### VII.4.6 Análisis de muestras correspondientes a un ciclo de muda bajo condiciones predeterminadas

Con el propósito de establecer los cambios de Liv-CHH-SG1 en hemolinfa a lo largo de un ciclo de muda completo, se analizaron 100  $\mu$ l de muestras correspondientes a un ciclo de muda de 12 días (Figura 41). Como controles negativos se utilizaron PBS (Control 1) y SSA (Control 5). Como control positivo se utilizaron 5  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en SSA con BSA al 1%, y como blanco se utilizó PBS. La presencia de la neurohormona se detectó en las lecturas que estuvieron por encima del valor del control 5 (0.268), en el cual la

cantidad de antígeno equivale a 0 (Tabla VI), en los días 3, 4, 5, 8, 9 y 10. El valor mas bajo se presentó en los días 0 o días de muda (0.23). Los valores más altos, se presentaron en los días 8 y 9, con valores de densidad óptica de 0.449 y 0.479, respectivamente.

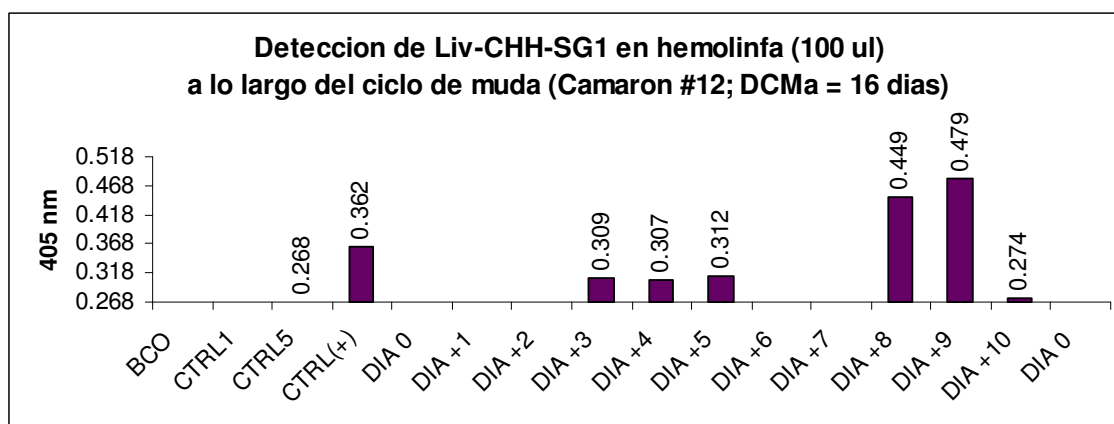


Figura 41. Análisis de 100  $\mu$ l de muestras de hemolinfa correspondientes a un ciclo de muda. BCO, Blanco; CTRL1, Control 1; CTRL5, Control 5; CTRL (+), control positivo 5  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> en SSA.

La capacidad de esta neurohormona para elevar los niveles de glucosa en hemolinfa ya ha sido comprobada anteriormente (Sánchez-Castrejón, 2007; Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008), de manera que la variación de la neurohormona a lo largo del ciclo de muda de la hemolinfa de los camarones analizados, posiblemente fue debida al estrés causado por la manipulación para la toma de muestras de hemolinfa. Los estudios enfocados en evaluar la actividad CHH, plantean evaluaciones cortas en la escala de tiempo acerca de la respuesta hiperglucémica a estresores ambientales como son la emersión, hipoxia, shock térmico, cambios en salinidad, exposición a metales pesados o lipopolisacáridos. Estos estudios, evalúan la respuesta hiperglucémica desde algunos minutos hasta cinco horas después de exponer a los organismos a los diferentes tipos de estresores mencionados. El único estudio en el cual se establece la variación de una CHH en hemolinfa, fue el publicado por Chung y Webster (2005), en el cual paralelamente las neurohormonas Cam-CHH y Cam-

MIH de *Carcinus maenas* mantuvieron sus niveles sin cambios significativos en hemolinfa durante la intermuda (C4) y premuda temprana (D0-D1), en un rango de 21.5 a 24.8 fmol ml<sup>-1</sup>. Sin embargo, no se establece la variación de esta CHH durante el resto de las fases del ciclo de muda.

Por otra parte, los títulos de MIH en hemolinfa han sido determinados únicamente en dos especies: *Procambarus clarkii* y *Carcinus maenas* (Nakatsuji *et al.*, 2009).

En el caso de los títulos hemolinfáticos de la isoforma Prc-MIH (Figura 42) de *P. clarkii* (Nakatsuji y Sonobe, 2003), los niveles mas altos de la neurohormona se presentaron durante la intermuda (6.53 fmol/ml) y los niveles mas bajos en la premuda temprana (1.25 fmol/ml).

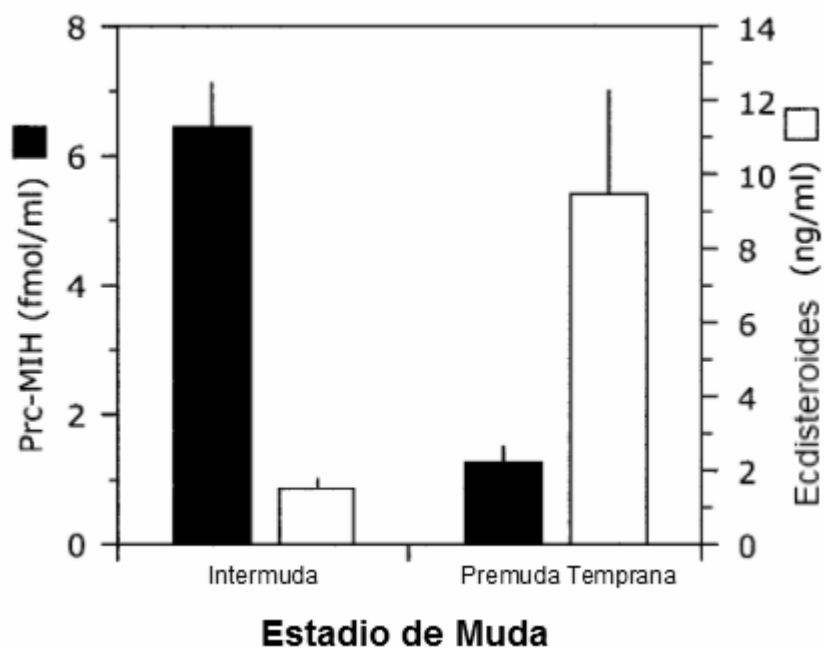


Figura 42. Correlación de los títulos de Prc-MIH (TR-FIA) y ecdisteroides (RIA) en hemolinfa durante los estadios de intermuda y premuda temprana en *Procambarus clarkii* (Nakatsuji y Sonobe, 2003). TR-FIA, por sus siglas en ingles *Time Resolved Fluoroimmunoassay*; RIA, Radio inmunoensayo.

Esto coincide con la hipótesis del ciclo de muda, la cual establece que los niveles más altos de MIH se presentan durante la intermuda, cuando los niveles de ecdisteroides se encuentran en su nivel más bajo, y que los niveles de MIH decrecen hasta una concentración basal hacia la premuda temprana, cuando los niveles de ecdisteroides comienzan a incrementarse poco a poco.

Sin embargo, en un estudio realizado por Nakatsuji y Sonobe (2004), se encontró que durante la premuda media esta misma isoforma reestablece su concentración en hemolinfa a un nivel semejante al que se presenta durante la intermuda, paralelamente al incremento en los títulos de ecdisteroides, lo cual contradice a la hipótesis. Esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que la isoforma Prc-MIH adicionalmente ha mostrado actividad hiperglucémica *in vitro* (Sonobe *et al.*, 2001). La información acerca de la respuesta del órgano-Y a MIH durante esta fase es escasa *in vitro* e *in vivo*, por lo que se sugiere que la secreción de ecdisteroides a partir del órgano-Y, para dar inicio al proceso de muda se encuentra regulado por cambios en la capacidad de respuesta del órgano-Y a MIH, y no solamente por el cambio en los títulos de esta neurohormona en la hemolinfa. Estos cambios en la capacidad de respuesta durante la premuda media y tardía, resultan al menos en parte por los cambios en la actividad glandular de la enzima fosfodiesterasa (PDE, por sus siglas en inglés) (Nakatsuji *et al.*, 2009). El isotipo PDE1 en *Callinectes sapidus* es Calcio/Calmodulina dependiente, por lo que el Calcio puede regular la ecdisteroidogénesis a través de la activación de PDE glandular. Por otro lado, el segundo mensajero que media la supresión de síntesis de ecdisteroides en el órgano-Y inducida por MIH es GMPc (Nakatsuji *et al.*, 2006).

A diferencia de lo anterior, no se han observado cambios significativos en los niveles de la neurohormona Cam-MIH de *C. maenas* en hemolinfa durante la intermuda (C4) y premuda temprana (D0-D1). Sin embargo, durante la premuda tardía (D3-D4) los niveles de Cam-MIH se elevaron enormemente, al

grado de disminuir significativamente los niveles de Cam-MIH almacenados en la glándula del seno durante la fase de ecdisis (E1-E2) (Figura 43) (Chung y Webster, 2005).

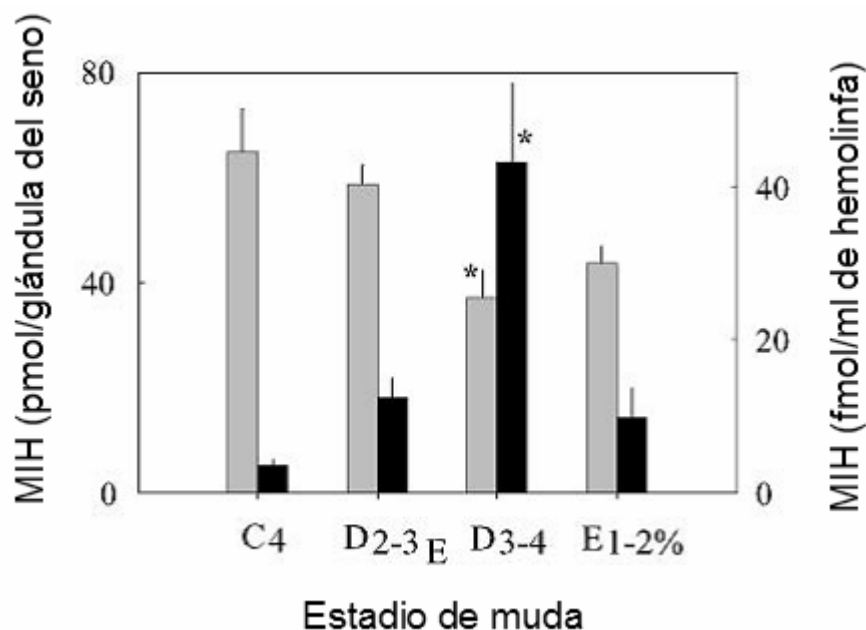


Figura 43. Cambios en los niveles circulantes de MIH en hemolinfa (barras negras) y niveles de MIH en glándula del seno (barras grises) durante la intermuda y premuda tardía en *Carcinus maenas* (Chung y Webster, 2005).

Los resultados obtenidos al analizar 100  $\mu$ l de hemolinfa de días consecutivos (Figura 40) y de un ciclo de muda completo (Figura 41), podrían ser semejantes al perfil hemolinfático publicado de Cam-MIH (Figura 43), en el cual los niveles mas altos de la hormona se presentan durante la premuda tardía. Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado que Liv-CHH-SG1 tenga actividad MIH adicional a la actividad CHH demostrada por Sánchez-Castrejón (2007), como es el caso de una isoforma de *Homarus americanus* (Chang *et al.*, 1990) y las neurohormonas de *Procambarus clarkii* Prc-MIH (Sonobe *et al.*, 2001), Prc-CHHI y Prc-CHHII (Yasuda *et al.*, 1994).

Por otra parte, hasta la fecha únicamente se ha publicado la variación en la concentración de dos MIH a lo largo del ciclo de muda (Cam-MIH y Prc-MIH), y debido a la falta de concordancia en el comportamiento de estas dos isoformas a lo largo del ciclo, Liv-CHH-SG1 no necesariamente tendría que seguir específicamente ese mismo patrón.

El análisis de los resultados indica la importancia de identificar las diferentes etapas del ciclo de muda mediante setogénesis (Chan *et al.*, 1988), evaluación de gastrolitos (Nakatsuji *et al.*, 2000) o alguna otra metodología publicada hasta ahora, con el propósito de poder correlacionar los datos de ensayos individuales, independientemente de las variaciones en la duración del ciclo de muda.

Asimismo, se advierte la importancia de poder contar con una mayor cantidad de hemolinfa por muestra para poder realizar ensayos por triplicado. Esto puede ser posible utilizando organismos de mayor talla. Por otro lado, la utilización de técnicas más sensibles como el ELISA sándwich podría permitir resultados reproducibles, utilizando cantidades pequeñas de hemolinfa.

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- La expresión de Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante en *Pichia pastoris* mostró un rendimiento de 71.43  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .
- El suero hiperinmune obtenido a partir de la inmunización del conejo con Liv-CHH-SG1<sub>HIS</sub> recombinante, presentó un valor de titulación de 1:500.
- La electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida del antisuero hiperinmune, confirmó que el isotipo del *pool* de anticuerpos policlonales obtenidos fue IgG.
- El Límite Mínimo de Detección de la neurohormona recombinante por los anticuerpos policlonales obtenidos, fue de 1.62 pmol ml<sup>-1</sup>, un límite mínimo relativamente bueno para la modalidad de ELISA utilizada, comparado con los resultados obtenidos en otros estudios del mismo tipo.
- Una gran proporción de las IgG obtenidas, reconocieron a los epítomos 6xHis y c-myc de la neurohormona recombinante, por lo que se sugiere que esta región utilizada para la purificación y reconocimiento de proteínas recombinantes es altamente inmunogénica.
- Se establecieron las condiciones (BSA1%, pAb 1:100) que permitieron la detección de la neurohormona Liv-CHH-SG1 nativa en muestras de hemolinfa mezclada con Solución Salina Anticoagulante, correspondientes a varios días del ciclo de muda de camarones juveniles (11-12 g) mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura (28 °C) y salinidad (35 ‰).

Como continuación de este trabajo, se contempla la selección de anticuerpos policlonales que reconozcan regiones diferentes a *cmyc* y 6xHis, y su utilización para la cuantificación de la neurohormona a lo largo del ciclo de muda, así como la realización de ensayos *in vivo* para determinar la actividad biológica de la neurohormona, mediante la administración de la versión recombinante nativa de la neurohormona Liv-CHH-SG1<sub>NAT</sub> y anticuerpos policlonales por separado.



## IX LITERATURA CITADA

Abbas, A.K., Lichtman, A. y Pober, J. 2004. Inmunología Celular y Molecular. McGraw-Hill Interamericana. Quinta Edición. España. 592 pp.

Bailey-Brock, J.H. y Moss, S.M. 1992. Penaeid taxonomy, biology, and zoogeography. En: Fast, A.W. y Lester, L.J. (Eds). Marine shrimp culture: principles and practices. Developments in aquaculture and fisheries science, volume 23. Elsevier Science Publisher B.V., The Netherlands, 9-27 p.

Bliss, D.E. y Welsh, J.H. 1952. The neurosecretory system of brachyuran crustacea. Biol. Bull., 103: 157-169 p.

Böcking, D., Dirksen, H. y Keller, R. 2001. The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. En: Korand, W. (ed). The Crustacean Nervous System. Springer Berlin, Germany, 84-97 p.

Bray, W.A. y Lawrence, A.L. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En: Fast, A.W. y Lester, L.J. (Eds). Marine shrimp culture: principles and practices. Developments in aquaculture and fisheries science, volume 23. Elsevier Science Publisher B.V., The Netherlands, 93-170 p.

Cereghino, J.L. y Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24: 45-66 p.

Chan, S.M., Rankin, S.M. y Keeley L.L. 1988. Characterization of the Molt Stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and Hemolymph Levels of Total Protein, Ecdysteroids, and Glucose. Biol. Bull. 175: 185-192 p.

Chan, S.M., Gu, P.L., Chu, K.H. y Tobe, S.S. 2003. Crustacean neuropeptide genes of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies. Gen. Comp. Endocrinol. 134: 214-219 p.

Chang, E.S., Prestwich, G.D. y Bruce, M.J. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster *Homarus americanus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171 (2): 818-826 p.

Chang, E.S., Keller, R. y Chang, S.A. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. Gen. Comp. Endocrinol. 111 (3): 359-366 p.

Chang, E.S., Chang, S.A., Beltz, B.S. y Kravitz, E.A. 1999a. Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Lobster Nervous System: Localization and Release From Cells in the Subesophageal Ganglion and Thoracic Second Roots. *J. Comp. Neurol.* 414: 50-56 p.

Chang, E.S., Chang, S.A., Keller, R., Reddy, P.S., Snyder, M.J., y Spees, J.L. 1999b. Quantification of Stress in Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone, Stress Proteins, and Gene Expression. *Amer. Zool.* 39: 487-495 p.

Chang, E.S. Crustacean Hyperglycemic Hormone Family: Old Paradigms and New Perspectives. 2001. *Amer. Zool.* 41: 380-388 p.

Chang, E.S., Neil, D.M., Stentiford, G.D. y Chang, S.A. 2005a. Crustacean Hyperglycemic Hormone and Hemolymph Metabolites: Stress Responses in Two Lobster Species. En: Sakai, Y., McVey, J.P., Jang, D, McVey, E. y Caesar, M. (Eds.). *Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species. Proceedings of the 32<sup>nd</sup> US-Japan Meeting on Aquaculture.* Davis, California, Nov. 2003. NOAA Tech. Rep. NMFS. 77-85 p.

Chang, E.S. 2005b. Stressed-Out Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins. *Integr. Comp. Biol.* 45: 43–50 p.

Chen, S.H., Lin, C.Y. y Kuo, C.M. 2005. In Silico Analysis of Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. *Mar. Biotechnol.* 7: 193-206 p.

Chen, H.Y., Watson, R.D., Chen, J.C., Liu, H.F y Lee, C.Y. 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151: 72-81 p.

Chung, J.S., Dirksen, H. y Webster, S.G. 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *PNAS.* 96 (23): 13103-13107 p.

Chung, J.S. y Webster, S.G. 2003. Molt cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Eur. J. Biochem.* 270: 3280-3288 p.

Chung, J.S. y Webster, S.G. 2005. Dynamics of in Vivo Release of Molt-Inhibiting Hormone and Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Shore Crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology* 146 (12): 5545-5551 p.

Chung, J.S. y Zmora, N. 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* –the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. FEBS J. 275 (4): 693-704 p.

Cooper, 1992. Purification of IgG Antibodies from Atiserum, Ascites Fluid, or Hybridoma Supernatant. Precipitation of IgG with Ammonium Sulfate, En: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (Eds.) Short Protocols in Molecular Biology. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons. New York. 40-41 p.

Cregg, J. y Madden, K. 1987. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. En: Stewart, G.G., Russell, I., Klein, R.D. y Hierbsch, R.R. (Eds.) Biological Research on Industrial yeasts Vol.2. CRC Press, Boca Raton, FL., 1-18 p.

Cregg, J., Madden, K., Barringer, K., Thill, G., Stillman, C. 1989. Function characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 9: 1316-1323 p.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S. y Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology (NY). 11 (8): 905-910 p.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. y Higgins, D.R. 2000. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 16: 23-52 p.

Daly, R. y Hearn, M.T. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 18 (2): 119-38 p.

De Kleijn, D.P.V., Janssen, K.P.C., Martens, G.J.M. y Herp, F.V. 1994. Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. FEBS Eur. J. Biochem. 224: 623-629 p.

De Kleijn, D.P.V. y Herp, F.V. 1998. Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. Invertebr. Reprod. Dev. 33: 263-272 p.

Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E. y Re, A.D., 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. Mar. Freshwat. Behav. Physiol. 34: 93-104 p.

Dirksen, H., Webster, S.G. y Keller, R. 1988. Immunocytochemical demonstration of the neurosecretory systems containing putative moult-inhibiting hormone and hyperglycemic hormone in the eyestalk of brachyuran crustaceans. *Cell Tissue Res.* 251: 1432-0878 p.

Dore, I. y Frimodt, C. 1987. *An Illustrated Guide to Shrimp of the world.* Osprey Books. Huntington, N.Y. 229 pp.

Ellis, S. Brust, P., Koutz, P., Waters, A., Harpold, M. y Gingeras, T. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1111-1112 p.

Escamilla-Treviño, L.L., Viader-Salvado, J.M., Guerrero-Olazarán, M. 1999. Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL.* 2 (2): 27-33 p.

Fanjul-Moles, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Elsevier. Comp. Biochem. Phys. Part C.* 142: 390-400 p.

Fingerman, M. 1987. The Endocrine Mechanisms of Crustaceans. *J. Crustacean Biol.* 7 (1): 1-24 p.

FAO, Estadísticas Pesqueras. 2006.  
[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es)

García, U. y Arechiga, H. 1998. Regulation of Crustacean Neurosecretory Cell Activity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18 (1): 81-99 p.

Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M. y Van der Klei, I. 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Res.* 5: 1079-1096 p.

Giulianini, P.G., Pandolfelli, N., Lorenzon, S., Ferrero, E.A. y Edomi, P. 2002. An antibody to recombinant crustacean hyperglycaemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. *Cell Tissue Res.* 307: 243-254 p.

Gu, P.L., Chu, K.H. y Chan, S.M. 2001. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Res.* 303: 129-136 p.

Gu, P.L., Tobe, S.S., Chow, B.K.C., Chu, K.H., He, J.G. y Chan, S.M. 2002. Characterization of an additional molt inhibiting hormone-like neuropéptido from the shrimp *Metapenaeus ensis*. Peptides. 23: 1875-1883 p.

Guerrero-Olazarán, M., Escamilla-Treviño, L.L., Wormhoudt, A.V., Sepúlveda-Saavedra J., Viader-Salvado, J.M. 2001. Efecto de la expresión en *Pichia pastoris* de una serinproteasa sobre enzimas peroxisomales. CIENCIA UANL. 4 (4) 448-453 p.

Hellwig, S., Emde, F., Raven, N.P., Henke, M., Van Der Logt, P. y Fischer, R. 2001. Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. Biotechnol. Bioeng. 74 (4): 344-352 p.

Higgins, D.R. y Cregg, J.M. 2008. Introduction to *Pichia pastoris*. En: Higgins, D.R., y Cregg, J.M. (Eds.) Methods in Molecular Biology Vol. 103. *Pichia* protocols. Humana Press. Totowa, NJ. 1-15 p.

Hsu, Y.W.A., Messinger, D.I., Cheng, J.S., Webster, S.G., De-la-Iglesia, H.O., y Christie, A.E. 2006. Members of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) peptide family are differentially distributed both between and within the neuroendocrine organs of *Cancer* crabs: implications for differential release and pleiotropic function. J. Exp. Biol. 209: 3241-3256 p.

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture. 191: 191-208 p.

Invitrogen life technologies Corporation. Anti-myc-HRP Antibody. Catalog no. R951-25.

Invitrogen life technologies Corporation. EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1740-01.

Invitrogen life technologies Corporation. pPICZ A, B, and C. *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of recombinant proteins. Catalog no. V190-20.

Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T., Enfors, S.O. 2006. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnol. Prog. 22 (6): 1465-1473 p.

Jaros, P.P. y Keller, R. 1979. Immunocytochemical identification of hyperglycemic hormone-producing cells in the eyestalks of *Carcinus maenas*. Cell Tissue Res. Vol. 204, Number 3: 379-385 p.

Keller, R., Haylett, B. y Cooke, I. 1994. Neurosecretion of Crustacean Hyperglycemic Hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline  $K^+$  concentration quantified by a sensitive immunoassay method. *J. exp. Biol.* 188: 293-316 p.

Koutz, P., Davis, G., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J. y Thill, G. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast.* 5: 167-177 p.

Lachaise, F., LeRoux, A., Hubert, M., y LaFont, R. 1993. The Molting gland in Crustaceans: Localization, activity and endocrine control. *J. Crustacean Biol.* 13: 198-234 p.

Lacombe, C., Greve, P. y Martin, G. 1999. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides.* 33 (1): 71-80 p.

LaFont, R. 2000. The Endocrinology of Invertebrates. *Ecotoxicology.* 9: 41-57 p.

Lago-Lestón, M.A. 2001. Estudio de la expresión de los genes de la familia peptídico MIH/GIH/CHH de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en diferentes condiciones de estrés. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 85 p.

Lago-Lestón, A., Ponce, E. y Muñoz, M.E. 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture.* 270: 343-357 p.

LeBlanc, G.A. 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology.* 16: 61-81 p.

Lee, K.J., Watson, R.D. y Roer, R.D. 1998. Molt-Inhibiting Hormone mRNA Levels and Ecdysteroid Titer during a Molt Cycle of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (3): 624-627 p.

Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettulio, R. y Ferrero, E.A. 2004. Variation of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *J. Exp. Biol.* 207: 4205-5213 p.

Mazurova, E., Hilscherova, K., Triebkorn, R., Kohler, H.R., Marsalek, B. y Blaha, L. 2008. Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans:

Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants. Springer *Biologia*. 63 (2): 139-150 p.

Menz, A. y Blake, B. F. 1980. Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 48: 99-111 p.

Montagne, N., Soyez, D., Gallois, D., Ollivaux, C. y Toullec, J.Y. 2008. New Insights into evolution of crustacean hyperglycaemic hormone in decapods –first characterization in Anomura. *FEBS Journal*. 275: 1039-1052 p.

Nakatsuji, T., Keino, H., Tamura, K., Yoshimura, S., Kawakami, T., Aimoto, S. y Sonobe, H. 2000. Changes in the Amounts of the Molt-Inhibiting Hormone in Sinus Glands during the Molt Cycle of the American Crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci.* 17: 1129-1136 p.

Nakatsuji, T y Sonobe, H. 2003. Measurement of Molt-inhibiting Hormone Titer in Hemolymph of the American Crayfish, *Procambarus clarkii*, by Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Zool. Sci.* 20: 999-1001 p.

Nakatsuji, T. y Sonobe, H. 2004. Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135 (3): 358-364 p.

Nakatsuji, T., Sonobe, H. y Watson, R.D. 2006. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): Involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 253 (1-2): 76-82 p.

Nakatsuji, T., Lee, C.Y. y Watson, R.D. 2009. Crustacean molt-inhibiting hormone: Structure, function, and cellular mode of action. *Comp Biochem. Physiol.* 152 (2): 139-148 p.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995. Requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que prestan atención médica.

Ohii, H., Okazaki, N., Uno, S., Miura, M. 1998. Chromosomal DNA pattern and gene stability of *Pichia pastoris*. *Yeast*. 14 (10): 895-903 p.

Organes-De los Santos, H.C. 2004. Clonación y expresión de los genes *chh* y *mih* para la producción de las neurohormonas hiperglucémica e inhibidora

de la muda recombinantes de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 90 p.

Page, M. y Thorpe, R. 2002. Purification of IgG by precipitation with Sodium Sulfate or Ammonium Sulfate. En: Walker, J.M. (Ed.) The Protein Protocols Handbook Part IV, 2nd Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 983-984 p.

Passano, L.M. 1960. Molting and It's Control. En: Waterman, T. (Ed.) The Physiology of Crustacea Vol. I. Metabolism and Growth. Academic Press, London. USA. 473-536 p.

Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone 1931. *Aquaculture*. 157: 107-115 p.

Quackenbush, L.S. 2001. Yolk Synthesis in the Marine Shrimp, *Penaeus vannamei*. *Amer. Zool.* 41: 458-464 p.

Reddy, P.S. y Reddy, P.R. 2006. Purification of molt-inhibiting hormone-like peptides with hyperglycemic activity from the eyestalks of the crab *Scylla serrata*. *Fisheries Sci.* 72: 415-420 p.

Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F. y Gram, H. 1995. Generation of Rabbit Monoclonal Antibody Fragments from a Combinatorial Phage Display Library and Their Production in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. 13: 225-260 p.

Romanos, M.A. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expresión. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 527-533 p.

Sánchez-Castrejón, E. 2007. Producción de la hormona recombinante hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 138 p.

Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, M.B. y Díaz-Herrera, F. 2008. Molecular cloning and expression of a putative crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11(4): 1-8 p.

Santos, E.A., Luiz, E., Nery, M. y Goncalvez, A. 1997. Evidence for the Involvement of the Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Regulation of Lipid Metabolism. *Physiol. Biochem. Zool.* 70 (4): 415-420 p.

Schägger, 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. 1: 16-22 p.



Sedlmeier, D. 1988. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regul. Peptides*. 20 (2): 91-98 p.

Sefiani, M., Le Caer, J.P. y Soyez, D. 1996. Characterization of Hyperglycemic and Molt-Inhibiting Activity from Sinus Glands of the Penaeid Shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103: 41-53 p.

Serrano, L., Grousset, E., Charmantier, G. y Spanings-Pierrot, C. 2004. Occurrence of L- and D-Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms in the Eyestalk X-Organ/Sinus Gland Complex During the Ontogeny of the Crayfish *Astacus leptodactylus*. *J. Histochem. Cytochem.* 52 (9): 1129-1140 p.

Shih, T.W., Suzuki, Y., Nagasawa, H. y Aida, K. 1998. Immunohistochemical Identification of Hyperglycemic Hormone- and Molt-Inhibiting Hormone- Producing Cells in the Eyestalk of the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 15: 389-397 p.

Sonobe, H., Nishimura, T., Sonobe, M., Nakatsuji, T., Yanagihara, R., Kawakami, T. y Aimoto, S. 2001. The Molt-Inhibiting Hormone in the American Crayfish *Procambarus clarkii*: Its Chemical Synthesis and Biological Activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121 (2): 196-204 p.

Sun, P.S. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3 (1): 1-6 p.

Sun, P.S. 1995. Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4 (3): 262-268 p.

Sun, P.S. 1997. Recombinant Molt-Inhibiting Hormone-Like neuropeptide produced in the yeast *Pichia pastoris*. En: Pacon 97 Proceedings. Symposium on Resource Development. 6-8 Agosto de 1997, Hong Kong, China. 509-518 p.

Tiu, S.H., He, J.G. y Chan, S.M. 2007. The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed putative ion transport peptide (LvITP) for osmo-regulation. *Gene*. 396: 226-235 p.

Treerattrakool, S., Udomkit, A., Eurwilaichitr, L., Sonthayanon, B. y Panyim, S. 2003. Expression of Biologically Active Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. *Mar. Biotechnol.* 5: 373-379 p.

Treerattrakool, S., Udomkit, A. y Panyim, S. 2006. Anti-CHH Antibody Causes Impaired Hyperglycemia in *Penaeus monodon*. J. Biochem. Mol. Biol. 39 (4): 371-376 p.

Tschopp, J.F. y Brust, P., Cregg, J., Stillman, C. y Gingeras, T. 1987. Expression of the *LacZ* gene from two methanol –regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Res. 15: 3859-3876 p.

Tuttle, D.L. y Dunn, W.A. 1995. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J. Cell Sci. 108: 25-35 p.

Udomkit, A., Treerattrakool, S. y Panyim, S. 2004. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 298: 79-91 p.

Valdez, S.G. 2002. Determinación de la preferencia térmica y fisiológica energética de juveniles de *Litopenaeus vannamei* aclimatados a diferentes salinidades. Tesis de Maestría en Ciencias con Orientación en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 68 p.

Valdez, G., Díaz, F., Re, A.D. y Sierra, E. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). Hidrobiológica. 18 (2): 105-115 p.

Vargas-Albores, F., Guzman, M.A. y Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph Collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol.106A (2): 299-303 p.

Vassileva, A., Chugh, D.A., Swaminathan, S. y Khanna, N. 2001. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using GAP promoter. J. Biotechnol. 88 (1): 21-35 p.

Wang, Y.J., Hayes, T.K., Holman, G.M., Chavez A.R., y Keeley, L.L. 2000. Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei*. Peptides. 21: 477-484 p.

Watson, R.D., Lee, K.J., Qiu, S., Luo, M., Umphrey, H.R., Roer, R.D. y Spaziani, E. 2001. Molecular Cloning, Expression, and Tissue Distribution of Crustacean Molt-Inhibiting Hormone. Amer. Zool. 41: 407-417 p.

Webster, S. 1991. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. 244: 247-252 p.

Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T. y Naya, Y. 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 387–398 p.

Yao, Y., Zhou, K.Y. y Song, D.X. 2006. Expression and polyclonal antibody preparation of molt-inhibiting hormone 1 (MIH1) from the mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*. *Acta Zoologica Sinica.* 52: 209-214 p.

Yodmuang, S., Udomkit, A., Treerattrakool, S. y Panyim, S. 2004. Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 312: 101-114 p.

Zarubin, T.P., Chang, E.S. y Mykles, D.L. 2009. Expression of recombinant eyestalk crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*, that inhibits Y-organ ecdysteroidogenesis *in vitro*. *Mol. Biol. Rep.* 36 (6): 1231-1237 p.

Zeleny, C. 1905. Compensatory Regulation. *J. Exp. Zool.* 2: 1-102 p.

## X. ANEXOS

### **ANEXO A1**

#### **YPD – Medio con Extracto de Levadura, Peptona y Dextrosa (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*)**

Para 1 L, mezclar:

Agua destilada 700 ml

Peptona 20 g

Extracto de Levadura 10 g

Aforar a 1 L

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup>, por 20 min

Adicionar 10X D (ANEXO A4) 100 ml

Enfriar a temperatura ambiente

Adicionar antibiótico:

Zeocina (100 mg/ml) 1 ml

**ANEXO A2****BMGY – Medio Complejo con Amortiguador y Glicerol**  
**(*Buffered Glycerol Complex Medium*)**

Para 1 L, mezclar:

Agua destilada 700 ml

Peptona 20 g

Extracto de Levadura 10 g

Aforar a 1 L

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup>, por 20 min

Enfriar a temperatura ambiente

Adicionar:

Amortiguador Fosfato de Potasio (ANEXO A5) 100 ml

10X YNB (ANEXO A6) 100 ml

500X B (ANEXO A7) 2 ml

10X GY (ANEXO A8) 100 ml

**ANEXO A3****BMMY – Medio complejo con Amortiguador y Metanol**  
**(*Buffered Methanol Complex Medium*)**

Para 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 ml
Peptona	20 g
Extracto de Levadura	10 g

Aforar a 1 L

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup>, por 20 min

Enfriar a temperatura ambiente

Adicionar:

Amortiguador Fosfato de Potasio (ANEXO A5)	100 ml
10X YNB (ANEXO A6)	100 ml
500X B (ANEXO A7)	2 ml
10X M (ANEXO A9)	100 ml

**ANEXO A4****10X D – Dextrosa al 20%**

Para 1 L, mezclar:

d-glucosa 200 g

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup>, por 15 min o por filtración

Almacenar a 4 °C

**ANEXO A5****Amortiguador Fosfato de Potasio, pH 6.0**

Para 1 L, mezclar:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M 132 ml

KHPO<sub>4</sub> 1 M 868 ml

Ajustar pH con KOH 5 M

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup>, por 15 min. Almacenar a 4 °C.

**ANEXO A6****10X YNB – Base Nitrogenada de Levadura  
(*Yeast Nitrogen Base*)**

Para 1 L, mezclar:

Agua destilada 700 ml

YNB sin sulfato de amonio,  
y aminoácidos 34 g

Sulfato de amonio 100 g

Aforar a 1 L

Esterilizar por filtración

Almacenar a 4 °C

**ANEXO A7****10X B – Biotina al 0.02%**

Para 100 ml, mezclar:

Agua destilada 100 ml

Biotina 20 mg

Esterilizar por filtración

Almacenar a 4 °C



**ANEXO A8****10X GY – Glicerol al 10%**

Para 1 L, mezclar:

Agua destilada 900 ml

Glicerol 100 ml

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup>, por 20 min o por filtración

Almacenar a 4 °C

**ANEXO A9****10X M – Metanol al 5%**

Para 100 ml, mezclar:

Agua destilada 95 ml

Metanol 5 ml

Esterilizar por filtración

Almacenar a 4 °C

**ANEXO A10****Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (Tricine-SDS-PAGE)**

A. Preparación de amortiguador del Cátodo (10X) (Tris Base 1M, pH 8.25, 1% SDS)

Para 250 ml, mezclar:

150 ml agua destilada

30.28 g Tris Base

44.79 g Tricina

ajustar pH a 8.25 (HCl absoluto)

aforar a volumen requerido con agua destilada

2.5 g SDS

almacenar a 4 °C

B. Preparación de amortiguador del Ánodo (10X) (Tris Base 2M, pH 8.9)

Para 250 ml, mezclar:

150 ml agua destilada

60.57 g Tris Base

ajustar pH a 8.9 (HCl absoluto)

aforar a volumen requerido con agua destilada

almacenar a 4°C

C. Preparación de 1 gel (1.5 mm grosor), mezclar:

Gel separador:

1,540 µl agua destilada

4,600 µl acrilamida:bisacrilamida, 29:1 (40%)

1,200 µl glicerol

3,600  $\mu$ l amortiguador de gel  
110  $\mu$ l Persulfato de amonio (10%)  
11  $\mu$ l TEMED

Gel concentrador:

3,160  $\mu$ l agua destilada  
640  $\mu$ l acrilamida:bisacrilamida, 29:1 (40%)  
1,200  $\mu$ l amortiguador de gel  
50  $\mu$ l Persulfato de amonio (10%)  
5  $\mu$ l TEMED

D. Preparación de solución acrilamida:bisacrilamida, 29:1 (40%)

Para 100 ml, mezclar:

50 ml agua destilada

38.67 g acrilamida

1.33 g bisacrilamida

aforar a 100 ml con agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.

E. Preparación de amortiguador de gel (Tris 3 M, 0.3% SDS, pH 8.45)

Para 100 ml, mezclar:

40 ml agua destilada

36.34 g Tris base

Ajustar pH a 8.45 (HCl absoluto)

Aforar a volumen requerido con agua destilada

0.3 g SDS

Almacenar a 4°C

#### F. Preparación de solución persulfato de amonio al 10%

Mezclar:

0.02 g persulfato de amonio

200  $\mu$ l agua destilada

NOTA: la gelificación correcta requiere de la utilización de solución de persulfato recién preparada.

#### G. Preparación de amortiguador de Carga A4:

Amortiguador A

Para 100  $\mu$ l, mezclar:

94  $\mu$ l de solución stock (12% SDS, 30% Glicerol, Tris HCl 150 mM, pH 7.0)

6  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol

Amortiguador A4

Para 250  $\mu$ l, mezclar:

62.5  $\mu$ l amortiguador A

187.5  $\mu$ l agua destilada

*Para resuspensión de pellets en buffer A4, incubar a 50 °C hasta disolver. Almacenar a -20 °C o cargar en gel inmediatamente.*

**ANEXO A11****Tinción Azul Coomassie**

A. Preparación de solución fijadora (50% metanol, 10 % ácido acético, 100 mM acetato de amonio)

Para 1 L, mezclar:

500 ml agua destilada

7.7 g acetato amonio

100 ml ácido acético

500 ml metanol

Aforar a volumen requerido con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente. La solución tiene una vigencia de 3 meses.

- Sumergir el gel por 1-2 horas, a temperatura ambiente con agitación moderada.

B. Preparación de solución tención (50% metanol, 20% ácido acético, 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250)

Para 200 ml, mezclar:

100 ml metanol

0.1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (Spectrum)

20 ml ácido acético

80 ml agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente. La solución tiene una vigencia de 6 meses.

- Sumergir el gel por 4-12 horas, a temperatura ambiente con agitación moderada.

C. Preparación de solución desteñido (40% metanol, 10% ácido acético)

Para 1 L, mezclar:

400 ml metanol

100 ml ácido acético

Aforar a 1 L con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

- *Sumergir el gel a temperatura ambiente con agitación moderada, hasta obtener el contraste deseado.*

#### D. Preparación de solución fijación (25% etanol, 10% glicerol)

Para 1 L, mezclar:

250 ml etanol

100 ml glicerol

Aforar a 1 L con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

- *Sumergir el gel por 1-2 horas. Envolver en papel celofán, documentar y dejar secar.*

## **ANEXO A12**

### **PBS - Amortiguador Fosfato Salino**

Para 1 L, mezclar:

600 ml agua destilada

8 g Cloruro de Sodio (NaCl 137 mM)

2.0 g Cloruro de Potasio (KCl 2.7 mM)

1.42 g Fosfato de Sodio bibásico anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM)

0.244 g Fosfato de Potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 Mm)

Aforar a 1 L con agua destilada

**ANEXO A13****Western blot – electrotransferencia semiseca**

1. al concluir la electroforesis, colocar el gel de poliacrilamida en un recipiente con buffer de transferencia o Towbin 1X (ANEXO A14) e incubar en agitación moderada a temperatura ambiente por 15 minutos.
2. Saturar 3 piezas de papel filtro Whatman 3MM con buffer de transferencia y poner sobre el ánodo del aparato de electrotransferencia.
3. Sumergir 1 pieza de membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  en buffer de transferencia y colocar sobre las piezas de papel filtro anteriormente mencionadas, y en seguida el gel incubado en buffer de transferencia.
4. Saturar 3 piezas de papel filtro Whatman 3MM con buffer de transferencia y colocar una por una sobre el gel. *Para evitar la formación de burbujas entre cada pieza colocada, hacer rodar cuidadosamente una pipeta.*
5. Colocar el electrodo superior (cátodo) y un peso correspondiente a 500 ml de agua.
6. Electrotransferir por 1 hora a 200 mA constantes y un voltaje menor a 20 V.
7. Proceder a inmunodetección.
  - a. Bloquear la membrana con solución bloqueadora (ANEXO A15) por 3 horas en agitación moderada a temperatura ambiente o por 12 horas a 4 °C.
  - b. Eliminar solución bloqueadora
  - c. Incubar la membrana con solución de incubación (ANEXO A16) por 2 horas a temperatura ambiente en agitación moderada o por 12 horas a 4 °C.

- d. Lavar la membrana con solución de lavado (ANEXO A17) 4 veces por 15 minutos.
- e. Revelar de acuerdo al método seleccionado.

## **ANEXO A14**

### **Towbin 1X, Amortiguador de transferencia (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM, 20% metanol (v/v), pH 8.3)**

Para 1 L, mezclar:

3.02 g Tris Base

14.4 g Glicina

200 ml metanol

Aforar a 1 L con agua destilada. Almacenar a 4 °C.

## **ANEXO A15**

### **solución bloqueadora – Amortiguador Fosfato Salino, 0.05% Tween-20 (v/v), 5% leche descremada en polvo**

Para 30 ml, mezclar:

28.5 ml PBST

1.5 g leche descremada en polvo (Svelty)

Almacenar a 4°C.

*Descartar después de utilizar una vez*



**ANEXO A16**

**Solución de incubación – Amortiguador Fosfato Salino, 0.05% Tween-20 (v/v), 1% leche descremada en polvo, anti-*myc*-HRP (Invitrogen) 1:3,500)**

Para 30 ml, mezclar:

29.7 ml PBST

0.3 g leche descremada en polvo (Svelty)

8.56  $\mu$ l anti-*myc*-HRP (Invitrogen)

Almacenar a 4°C

- La solución puede ser reutilizada 2 o 3 veces en un periodo de 12 días.

**ANEXO A17**

**solución de lavado (PBST) – Amortiguador Fosfato Salino, 0.05% Tween-20 (v/v)**

Para 100 ml, mezclar:

99.95 ml PBS

50  $\mu$ l Tween-20

- *Preparar solamente la cantidad necesaria a utilizar en una ocasión.*

**ANEXO A18****Sulfato de Amonio Saturado (SAS)**

Esta solución debe prepararse al menos 24 horas antes de la precipitación:

Añadir un exceso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (950 g) en 1 L de agua destilada

Agitar toda la noche a temperatura ambiente

Almacenar a 4 °C

**ANEXO A19****ABTS, (*por sus siglas en inglés*, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))**

Para 1 ml de sustrato, mezclar:

100  $\mu\text{l}$  de Amortiguador de Citratos 10X

20  $\mu\text{l}$  de ABTS

1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30%

879  $\mu\text{l}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$

Amortiguador de Citratos 10X (1L):

9.802 g ácido Cítrico

14.2 g Citrato de Sodio

ajustar pH a 4.1

1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%

*Nota: El agua oxigenada puede agregarse al momento de preparar la mezcla del sustrato para la enzima, o durante la preparación del amortiguador de citratos 10X.*