

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con
Orientación en Biotecnología Marina**

**Efecto de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos
recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 de *Litopenaeus vannamei*
en los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y
osmorregulación**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Laura Camacho Jiménez

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Laura Camacho Jiménez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora del comité

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Dra. Ivone Giffard Mena

Dr. Fernando Díaz Herrera



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Laura Camacho Jiménez © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis que presenta **Laura Camacho Jiménez** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina.

Efecto de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 de *Litopenaeus vannamei* en los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y osmorregulación

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de Tesis

Las hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHHs) son neurohormonas que regulan diversos procesos fisiológicos en crustáceos. Los péptidos CHH-B1 y CHH-B2 del camarón *Litopenaeus vannamei* son isoformas originadas por corte y empalme alternativo del gen *chhB*, las cuales difieren en secuencia sobretodo en el extremo C-terminal, donde CHH-B1 tiene un aminoácido libre (péptido CHH-L) y CHH-B2 tiene un grupo amida (péptido CHH). Para estudiar las funciones de estos péptidos en la modulación de algunas respuestas metabólicas y de osmorregulación en *L. vannamei*, CHH-B1 y CHH-B2 se expresaron de manera recombinante (rCHH-B1 y rCHH-B2) con una secuencia idéntica a los péptidos maduros nativos en la levadura *Pichia pastoris*. Ambas hormonas fueron purificadas por RP-HPLC e identificadas mediante secuenciación N-terminal e inmunodetección utilizando un anticuerpo con capacidad de reconocimiento dentro de la región conservada. El péptido rCHH-B2 además fue amidado *in vitro* para estudiar el efecto de la amidación sobre su actividad biológica. Para evaluar las propiedades, secuencias y estructuras de los péptidos se hicieron análisis predictivos con herramientas bioinformáticas y experimentales por espectroscopia. Los análisis de secuencias sugieren que ambas hormonas difieren en sus propiedades fisicoquímicas y que la región C-terminal es altamente variable no solo entre las isoformas de *L. vannamei* sino con respecto a otros péptidos CHH/CHH-L de otras especies, por lo cual podrían presentar diferencias funcionales entre sí y con las isoformas de otros crustáceos. La estructura secundaria de las rCHHs se analizó experimentalmente por espectroscopía FTIR, determinándose que rCHH-B2 tiene un mayor contenido de hélices alfa que rCHH-B1 lo que coincidió con la predicción *in silico* de estructura secundaria y modelado tridimensional por homología. La actividad de ambas hormonas recombinantes sobre los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y osmorregulación se evaluó *in vivo*. En experimentos con camarones ablacionados bilateralmente, ambas isoformas presentaron actividad hiperglucémica alta dependiente de la dosis de hormona. rCHH-B1 confirmó ser un péptido CHH-L con actividad hiperglucémica significativa contrario a lo observado en otras especies. Por otro lado, ambas isoformas fueron capaces de elevar la concentración de triglicéridos en la hemolinfa, observándose un efecto dosis-dependiente con rCHH-B2. Esta respuesta podría relacionarse al uso de los triglicéridos para obtener energía o glucosa. Así mismo, ambas hormonas modificaron la capacidad osmorreguladora (CO) en organismos aclimatados en agua de mar (35 ‰), lo que sugirió una función en la osmorregulación. Al comparar la actividad hiperglucémica, los niveles de triglicéridos y la CO entre la isoforma rCHH-B2 amidada y sin amidar a una dosis de 100 pmol, se observó un incremento en los efectos con la forma amidada. Estos resultados sugieren que el grupo amida C-terminal es relevante para la actividad de las isoformas que naturalmente

lo presentan como CHH-B2. Dado el efecto osmótico de ambas rCHHs se evaluó su capacidad de modificar las concentraciones de osmolitos orgánicos (glucosa, proteínas, hemocianina), la CO y la capacidad ionorreguladora (CI) en organismos juveniles aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera aguda a condiciones hipo- (8 ‰) e hiper-osmóticas (45 ‰). Los camarones en condiciones hipo-osmóticas presentaron mortalidad a partir de 3 h y una rápida disminución de la concentración de proteínas, lo que podría asociarse a un mayor costo energético debido al estrés. En condiciones hiper-osmóticas las hormonas promovieron el catabolismo de proteínas posiblemente para usarlas como fuente de energía o generar osmolitos para regular el volumen celular. Además, modificaron la CI del Na^+ , K^+ y Cl^- lo que sugiere un papel en la modulación de los mecanismos de transporte de estos iones. Por otro lado, rCHH-B2 presentó un efecto sobre la CI del Ca^{2+} bajo condiciones iso-osmóticas lo cual plantea la posibilidad de una nueva función para las CHHs. Además, rCHH-B1 incrementó la hipo-CO, lo cual podría relacionarse con la absorción como se ha sugerido en otras especies. Los resultados de este trabajo, en conjunto sugieren que CHH-B1 y CHH-B2 tienen un papel pleitrópico en la fisiología de *L. vannamei*. Las diferencias entre las secuencias y estructuras podrían ser claves para explicar las diferencias entre sus niveles de actividad y especificidad funcional.

Palabras clave: CHH, camarón, proteína recombinante, neurohormona, metabolismo, osmorregulación

Abstract of the thesis presented by **Laura Camacho Jiménez** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with Orientation Marine Biotechnology

Effect of recombinant crustacean hyperglycemic hormones CHH-B1 and CHH-B2 of *Litopenaeus vannamei* on levels of glucose, triglycerides, proteins and osmoregulation

Abstract approved by:

Dr. Elizabeth Ponce Rivas
Director of Thesis

The crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) are neurohormones that regulate diverse physiological processes in crustaceans. The CHH-B1 and CHH-B2 peptides of white shrimp *Litopenaeus vannamei* are isoforms originated by alternative splicing of *chhB* gene, which differ in sequence especially at C-terminal region, where CHH-B1 has a free amino acid (CHH-L peptide) and CHH-B2 an amide group (CHH peptide). To study the function of these peptides in modulation of some metabolic and osmoregulation responses in *L. vannamei*, CHH-B1 and CHH-B2 were recombinant expressed (rCHH-B1 and rCHH-B2) with a sequence identical to native mature hormones in the yeast *Pichia pastoris*. Both hormones were purified by RP-HPLC and identified by N-terminal sequencing and immunodetection by using an antibody with recognition capacity inside the conserved region. The peptide rCHH-B2 was also α -amidated *in vitro* to study the effect of amidation on its biological activity. To evaluate properties, sequences and structures of peptides, predictive analyses were performed with bioinformatics tools and by spectroscopy. Sequence analyses revealed that both hormones differ in their physicochemical properties and the C-terminus region is highly variable not only among the *L. vannamei* isoforms, but with respect to other CHH/CHH-L peptides of other species. This suggests that both peptides may differ each other in terms of structure and activity, and also with respect to CHH/CHH-L peptides from other species, which may result in functional differences between these peptides and with other crustacean isoforms. The secondary structure of rCHHs was experimentally analyzed by FTIR spectroscopy, which determined that rCHH-B2 has a higher contain of alpha helix than rCHH-B1 matching with *in silico* prediction of secondary structure and three-dimensional homology modelling. The activity of both recombinant hormones on levels of glucose, triglycerides, proteins and osmoregulation was evaluated *in vivo*. In experiments with bilaterally eyestalk ablated shrimp, both isoforms showed high dose-dependant hyperglycemic activity. rCHH-B1 confirmed to be a CHH-L peptide with significant hyperglycemic activity in contrast to experiments in other species. On the other hand, both isoforms were able to rise the triglyceride concentration in hemolymph, finding a dose-dependant effect with rCHH-B2. This response could be related to triglyceride usage to obtain energy or glucose. In addition, both hormones modified the osmoregulatory capacity (OC) in organisms acclimated to seawater (35 ‰), suggesting a role on osmoregulation. By comparing hyperglycemic activity, the triglyceride levels and the OC between the amidated and non amidated rCHH-B2 at a 100 pmol dose, an increase of the effects was observed with the amidated form. These results suggest that C-terminal amide group is relevant for activity in naturally amidated isoforms like CHH-B2. Given the osmotic effect of both rCHHs, we evaluate their ability to modify organic osmolytes (glucose, proteins, hemocyanin), OC and ionoregulatory capacity (IC) in juvenile organisms acclimated to iso-osmotic (26 ‰)

and acute exposed to hypo-(8 ‰) and hyper-osmotic (45 ‰) conditions. The shrimp under hypo-osmotic conditions presented mortality at 3 h and a rapid decrease in protein concentration, which could be associated to a higher energetic cost caused by stress. On hyper-osmotic conditions the hormones promoted protein catabolism possibly for their usage as energy source or to generate osmolytes to regulate cell volume. Moreover, the rCHHs modified the IC of Na^+ , K^+ y Cl^- , suggesting a role on modulation of ion transport mechanisms. On the other hand, rCHH-B2 showed an effect on IC of Ca^{2+} under iso-osmotic conditions, opening the possibility of a novel function for CHHs. Moreover, rCHH-B1 increased the hypo-OC, which could be associated to water absorption as have been suggested in other species. The results of this work altogether suggest that CHH-B1 and CHH-B2 have a pleiotropic role on *L. vannamei* physiology. The differences between sequences and structures may be a key to explain the contrasts between their activity levels and functional specificity.

Keywords: CHH, shrimp, recombinant protein, neurohormone, metabolism, osmoregulation

Dedicatoria

A mis padres Tere y Juan Carlos por nunca poner límites a mis metas, nunca permitir que me rinda cuando las cosas se ponen difíciles, y por apoyarme siempre en todas mis decisiones profesionales aunque estas pongan distancias físicas entre nosotros. Pero sobre todo por ser junto con mi hermano Juan Carlos un motivo para seguir adelante.

Gracias por su apoyo, ¡Los amo!

A mi abuela Queta, mi segunda madre

A mi Tía Clara (Q. P. D.) en quien tuve una amiga y consejera

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de doctorado y por los recursos para desarrollar mi trabajo experimental a través del proyecto de ciencia básica CB2009-133958-Z a cargo de la Dra. Elizabeth Ponce Rivas.

Al CICESE por financiar parte de mis estudios, asistencias a congresos, la beca terminal y por permitirme el uso de sus instalaciones y recursos.

A mis profesores, del posgrado en ciencias de la vida por los conocimientos compartidos durante sus clases.

A mi directora la Dra. Elizabeth Ponce Rivas por recibirme como estudiante durante estos 6 años, por compartir sus conocimientos, su confianza, su apoyo, su gran paciencia y por tranquilizarme cuando algo no salía como esperábamos. Muchas gracias por todos sus consejos y enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal.

A la Dra. Ma. Enriqueta Muñoz Márquez (Q.P.D.) por sus consejos, aportaciones y siempre haber estado al pendiente de los avances de mi trabajo.

A la Dra. Edna Sánchez Castejón, por su asesoría en la parte de expresión recombinante, su ayuda en los muestreos y por su colaboración en la escritura de la publicación.

Al Dr. Fernando Díaz Herrera por compartirme su experiencia en la fisiología de crustáceos, lo cual fue importante para el diseño experimental y entender parte de los resultados.

A la Dra. Ivone Giffard Mena por sus comentarios, sugerencias y aportaciones durante la etapa de ensayos y de escritura de la tesis.

A la Dra. Denise Re Araujo por apoyarme con la elaboración de una dieta para uno de mis experimentos.

Al Dr. Manuel Aguilar del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por los análisis de las secuencias de los péptidos y por su colaboración en la escritura de la publicación.

Al Ing. Ernesto Lerma y el Sr. Martín Hernández, por auxiliarme con la instalación de los sistemas de cultivo de camarón.

Al M. en C. Eduardo Morales, por su apoyo con el manejo del equipo de HPLC.

A los investigadores, personal administrativo, técnicos y estudiantes del departamento de Biotecnología Marina, por el buen ambiente de trabajo y todos los gratos momentos de convivencia dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Celular y Molecular, pasados y presentes: los M. en C. Roberto Arredondo, M. en C. Yesenia Balderas, el Dr. Alejandro Sánchez y a las futuras Bioingenieras Ariana Montiel y Gloria Salinas. Gracias por ayudarme con mis experimentos, el apoyo moral y los momentos de diversión.

A mi familia de La Paz: mis padres Tere y Juan Carlos, mi hermano Juan Carlos, mi sobrino Leo, mi abuela Enriqueta, y a los Dibene-Jiménez y Jiménez-Acosta. ¡Los amo!

A mis viejos y muy queridos amigos que siempre están al pendiente aunque sea de lejos: Jonathan, Edwin, Polo, Liliana, Mariela, Melissa y Ana. Muchas gracias por todos estos años llenos de buenos recuerdos.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iv
Dedicatorias	vi
Agradecimientos	vii
Lista de figuras	xii
Lista de tablas	xv
Capítulo 1. Presentación	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	4
1.2.1 Neuropeptidos con acción hormonal.....	4
1.2.2 Neuropeptidos en crustáceos.....	6
1.2.3 CHHs.....	8
1.2.4 CHHs de <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
1.3 Justificación.....	15
1.4 Hipótesis.....	15
1.5 Objetivos.....	16
1.5.1 Objetivo general.....	16
1.5.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Producción de las neurohormonas recombinantes rCHH-B1 y rCHH-B2	17
2.1 Introducción.....	17
2.2 Objetivos.....	19
2.3 Materiales y métodos.....	20
2.3.1 Expresión de rCHH-B1 y rCHH-B2 en <i>Pichia pastoris</i>	20
2.3.1.1 Condiciones de expresión.....	20
2.3.1.2 Análisis de la expresión.....	21
2.3.1.2.1 Precipitación de proteínas.....	21
2.3.1.2.2 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida con tricina (Tricina-SDS-PAGE).....	21
2.3.1.2.3 Inmunodetección por Western blot.....	22
2.3.2 Purificación de los péptidos recombinantes.....	22
2.3.2.1 Precipitación con sulfato de amonio.....	22
2.3.2.2 RP-HPLC.....	23
2.3.3 Amidación del C-terminal de rCHH-B2.....	24
2.3.4 Análisis bioinformático de los neuropeptidos.....	24
2.3.4.1 Alineamiento y dendograma de secuencias.....	24
2.3.4.2 Propiedades físicas y químicas.....	25
2.3.4.3 Estructura secundaria y tridimensional.....	25
2.3.5 Análisis de la estructura secundaria por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.4 Resultados.....	27
2.4.1 Expresión de rCHH-B1 y rCHH-B2 en <i>Pichia pastoris</i>	27
2.4.2 Purificación de los péptidos recombinantes.....	30

2.4.3 Amidación del C-terminal de rCHH-B2.....	34
2.4.4 Análisis bioinformático de los neuropéptidos.....	35
2.4.4.1 Alineamiento y dendrograma de secuencias.....	35
2.4.4.2 Propiedades físicas y químicas.....	38
2.4.4.3 Estructura secundaria y tridimensional.....	39
2.4.5 Análisis de la estructura secundaria por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	42
2.5 Discusión.....	44
2.6 Conclusiones.....	49
Capítulo 3. Efecto de los péptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 en algunos procesos metabólicos	51
3.1 Introducción.....	51
3.2 Objetivos.....	53
3.3 Materiales y métodos.....	53
3.3.1 Crecimiento y mantenimiento de camarones.....	53
3.3.2 Efecto de los neuropéptidos recombinantes sobre algunas respuestas metabólicas en la hemolinfa.....	54
3.3.2.1 Evaluación de la actividad de los péptidos recombinantes.....	54
3.3.2.1.1 Condiciones experimentales.....	54
3.3.2.1.2 Seguimiento del ciclo de la muda y ablación.....	55
3.3.2.1.3 Tratamientos y controles experimentales.....	55
3.3.2.2 Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa.....	56
3.3.2.2.1 Condiciones experimentales.....	56
3.3.2.2.2 Seguimiento del ciclo de la muda y ablación.....	56
3.3.2.2.3 Extractos de glándulas del seno.....	56
3.3.2.2.4 Tratamientos y controles experimentales.....	56
3.3.2.3 Efecto de la dosis y la amidación C-terminal de rCHH-B2 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa.....	57
3.3.2.3.1 Condiciones experimentales.....	57
3.3.2.3.2 Seguimiento del ciclo de la muda y ablación bilateral	57
3.3.2.3.3 Tratamientos y controles experimentales.....	57
3.3.2.4 Toma de muestras de hemolinfa, procesado y cuantificación de las variables metabólicas.....	57
3.3.2.5 Análisis estadísticos.....	58
3.4 Resultados.....	58
3.4.1 Efecto de los neuropéptidos recombinantes sobre algunas respuestas metabólicas en la hemolinfa.....	58
3.4.1.1 Evaluación de la actividad de los péptidos recombinantes purificados.....	58
3.4.1.2 Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa.....	59
3.4.1.3 Efecto de la dosis y la amidación C-terminal de rCHH-B2 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa.....	61

3.5	Discusión.....	63
3.6	Conclusiones.....	68
Capítulo 4. Efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 en los procesos de osmorregulación		70
4.1	Introducción.....	70
4.2	Objetivos.....	74
4.3	Materiales y métodos.....	74
4.3.1	Efecto de la dosis de los péptidos recombinantes sobre la capacidad osmorreguladora.....	74
4.3.2	Efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 sobre la osmorregulación de <i>L. vannamei</i> aclimatado a condiciones iso-osmóticas y expuestos de manera aguda a salinidades extremas.....	75
4.3.2.1	Condiciones experimentales.....	75
4.3.2.2	Tratamientos y controles experimentales.....	75
4.3.2.3	Toma y procesado de muestras de hemolinfa.....	76
4.3.2.4	Capacidad osmorreguladora (CO).....	76
4.3.2.5	Osmolitos.....	77
4.3.2.5.1	Osmolitos orgánicos.....	77
4.3.2.5.1.1	Hemocianina.....	77
4.3.2.5.1.2	Glucosa y proteínas totales.....	77
4.3.2.5.1.3	Relación hemocianina a proteínas totales.....	77
4.3.2.5.2	Iones.....	78
4.3.3	Análisis estadísticos.....	78
4.4	Resultados.....	78
4.4.1	Efecto de la dosis de los péptidos recombinantes sobre la capacidad osmorreguladora.....	78
4.4.2	Efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 sobre la osmorregulación de <i>L. vannamei</i> aclimatado a condiciones iso-osmóticas y expuestos de manera aguda a salinidades extremas.....	81
4.4.2.1	Capacidad osmorreguladora (CO).....	81
4.4.2.3	Osmolitos.....	82
4.4.2.3.1	Osmolitos orgánicos.....	82
4.4.2.3.2	Iones.....	85
4.5	Discusión.....	89
4.6	Conclusiones.....	97
Capítulo 5. Integración		99
5.1	Discusión general.....	99
5.2	Conclusiones generales.....	108
5.3	Perspectivas y recomendaciones.....	110
Lista de referencias bibliográficas		112
Anexos		130

Lista de figuras

Figura		Página
1	Biosíntesis, procesamiento, transporte y secreción de neuropéptidos .	5
2	Localización del centro neuroendócrino OX-GS.....	7
3	Estructura de los genes <i>chh</i>	10
4	Ciclo de vida típico de un peneido	11
5	Estructura del gen <i>chhB</i> de <i>L. vannamei</i>	13
6	Reacción de amidación catalizada por la enzima bifuncional PAM.....	19
7	Análisis por Tricina-SDS-PAGE de la expresión de rCHH-B1 en <i>P. pastoris</i>	27
8	Análisis por Tricina-SDS-PAGE de la expresión de rCHH-B2 en <i>P. pastoris</i>	28
9	Análisis por Tricina-SDS-PAGE de la expresión de proteínas en las cepas de <i>P. pastoris</i> sin transformar	29
10	Análisis por Western-blot de las muestras en medio BMMY con el anticuerpo anti-CHH-B	30
11	Cromatograma de la separación de los concentrados por SA.....	31
12	Análisis por Western blot de las fracciones separadas por RP-HPLC...	32
13	Análisis del péptido purificado rCHH-B1.....	33
14	Análisis del péptido purificado rCHH-B2.....	33
15	Cromatograma de los productos de la reacción de amidación de rCHH-B2.....	35
16	Alineamiento múltiple de secuencias CHH/CHH-L.....	37
17	Dendograma de las secuencias de isoformas CHH/CHH-L.....	38
18	Estructuras tridimensionales de las neurohormonas recombinantes y de Mar-MIH.....	40
19	Alineamiento de las estructuras tridimensionales.....	41

20	Gráficos de Ramachandran de las estructuras tridimensionales modeladas.....	42
21	Espectro IR del péptido rCHH-B1.....	43
22	Espectro IR del péptido rCHH-B2.....	43
23	Modelo de la regulación de las secreción de la CHH.....	52
24	Estanques experimentales de 200 L.....	54
25	Procedimiento de ablación de pedúnculo ocular.....	55
26	Niveles de glucosa obtenidos en el ensayo de actividad con los péptidos purificados.....	59
27	Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa.....	60
28	Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de triglicéridos en la hemolinfa.....	61
29	Efecto de la dosis de rCHH-B2 sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa.....	62
30	Efecto de la dosis de rCHH-B2 sobre los niveles de triglicéridos en la hemolinfa.....	63
31	Modelo hipotético para el movimiento de NaCl a través del epitelio branquial en organismos hiper-osmorreguladores	71
32	Diseño experimental del ensayo de exposición a diferentes condiciones osmóticas.....	76
33	Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre la capacidad osmorreguladora (CO) de organismos ablacionados bilateralmente.....	79
34	Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre la capacidad osmorreguladora (CO) de organismos ablacionados bilateralmente.....	80
35	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad osmorreguladora (CO) de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	81
36	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en los niveles de glucosa de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	83

37	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en los niveles de proteínas totales de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	84
38	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en los niveles de hemocianina de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	85
39	Relación hemocianina a proteínas totales de los organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	85
40	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion Na^+ de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	86
42	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion Cl^- de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	87
43	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion K^+ de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	88
44	Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion Ca^{+2} de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas.....	89

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Propiedades físicas y químicas teóricas de las isoformas recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 estimadas con ProtParam ..	39
2	Análisis predictivo del contenido de estructuras secundarias de los péptidos recombinantes.....	40
3	Estadísticas de los gráficos de Ramachandran de los modelos tridimensionales	41
4	Asignaciones teóricas de las bandas que componen la región amida I (Kong y Yu <i>et al.</i> , 2007) de los péptidos recombinantes	44
5	Porcentajes de estructuras secundarias de cada péptido recombinante con relación al área total de la banda amida I.....	44
6	Resumen de los efectos de la inyección de las rCHHs sobre las respuestas metabólicas y osmorregulación bajo diferentes condiciones de salinidad.....	102

Capítulo 1. Presentación

1.1 Introducción

Los crustáceos son un grupo de organismos de hábitat principalmente acuático, los cuales han tenido una gran radiación, logrando colonizar una gran variedad de nichos ecológicos. Gran parte de su éxito evolutivo se debe a adaptaciones fisiológicas, las cuales les permiten tolerar cambios en su ambiente (Husain y Alikhan, 1979). La fisiología de los crustáceos está regulada por neurohormonas peptídicas, principalmente aquellas sintetizadas y secretadas por el complejo del órgano X-glándula del seno (OX-GS) localizado en los pedúnculos oculares. Estos neuropéptidos, al ser similares en secuencia y estructura conforman la familia peptídica de la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), nombrada así porque sus miembros más abundantes son los péptidos CHH (Hopkins, 2012; Webster *et al.*, 2012).

Las CHHs coordinan respuestas fisiológicas importantes en crustáceos, relacionadas con la movilización de las reservas metabólicas y la homeostasis iónica, las cuales son vitales para los organismos acuáticos. Sin embargo, también se han propuesto funciones en los procesos reproductivos y de crecimiento (muda) (Webster, 2015). Los mecanismos de secreción, transporte, y acción de las CHHs no están totalmente descritos, por lo que cualquier información generada al respecto es relevante, tanto para el estudio de la neuroendocrinología de crustáceos como para el estudio comparativo con otros taxa dentro del reino Animalia.

Particularmente hablando de los crustáceos decápodos, muchas especies son explotadas como recursos pesqueros o acuícolas, por lo que el estudio de la endocrinología con un enfoque ecofisiológico podría contribuir al entendimiento de cómo son procesadas las señales ambientales (fotoperiodo, oxígeno disuelto, temperatura, salinidad, entre otras) por los centros neuroendocrinos que secretan neurohormonas con diferentes efectos fisiológicos de manera regulada. Esa información puede favorecer por ejemplo, a la mejora de las condiciones de cultivo de estos organismos, a la generación de biotecnologías que permitan estimular o inhibir procesos fisiológicos, como la muda, crecimiento, reproducción, y al desarrollo de métodos para el monitoreo del estado de salud de los organismos (Reddy y Ramamurthi, 1999; Shrivastava y Princy, 2014).

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, es la especie marina que domina el mercado mundial de la acuicultura (FAO, 2012), lo que destaca su importancia comercial como recurso alimenticio. Una de las razones de su éxito comercial es su capacidad de tolerar cambios en las condiciones ambientales, principalmente de temperatura y salinidad (Re *et al.*, 2012). Sin embargo, la información acerca de las bases endocrinológicas de las respuestas que permiten a esta especie adaptarse a su medio ambiente es escasa. Particularmente resulta importante estudiar el efecto fisiológico del estrés, el cual puede ocurrir tanto en el medio natural como bajo condiciones de cultivo. Actualmente, se sabe que las CHHs podrían estar involucradas en el mecanismo de respuesta al estrés en esta especie provocado por ejemplo, por cambios en la temperatura, salinidad y exposición aérea (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Shinji *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

En *L. vannamei*, se han identificado tres isoformas de la CHH, CHH-A codificada por el gen *chhA* y CHH-B1 y CHH-B2, las cuales resultan de gran interés ya que son generadas a partir del corte y empalme alternativo del gen *chhB*. Las neurohormonas CHH-B1 y CHH-B2 son idénticas en los primeros 40 aminoácidos de la región N-terminal, mientras que hacia la región C-terminal difieren considerablemente (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Las secuencias de aminoácidos traducidas sugieren que CHH-B1 posee un extremo C-terminal libre típico de las isoformas tipo CHH (CHH-like o CHH-L), mientras que CHH-B2 y CHH-A poseen una señal de amidación (aminoácidos GK) en el extremo C-terminal, la cual es una modificación postraducciona característica de las hormonas CHH (Chen *et al.*, 2005; Lago-Lestón *et al.*, 2007).

Por otro lado, los transcritos de las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 muestran diferencias en sus niveles de expresión según las condiciones de temperatura y salinidad de aclimatación (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Tiu *et al.*, 2007), el estadio del ciclo de muda, y también difieren en su distribución en los tejidos (Tiu *et al.*, 2007). Todo esto sugiere que ambas isoformas son importantes para la adaptación del organismo a su medio ambiente a lo largo del ciclo de vida, puesto que durante este experimenta grandes cambios en las condiciones de hábitat (Valles-Jiménez *et al.*, 2005).

Las diferencias en los patrones de expresión de ambas isoformas, y en la secuencia de aminoácidos de los péptidos sugieren que podrían diferir en actividad

biológica, como se ha observado que ocurre con otras isoformas CHH/CHH-L de otras especies (Dircksen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Ohira *et al.*, 2006; Zarubin *et al.*, 2009).

Para llevar a cabo la caracterización estructural y funcional de los péptidos de la familia CHH uno de los enfoques utilizados es la producción de versiones recombinantes, lo que facilita su producción en cantidades suficientes para realizar ensayos *in vivo* e *in vitro* sin la necesidad de tener que cultivar organismos para realizar la disección del tejido neuroendocrino y purificar la hormona de interés (Gu *et al.*, 2000; Udomkit *et al.*, 2004; Ohira *et al.*, 2006). Esta estrategia ha sido adoptada por nuestro grupo de trabajo.

A la fecha, se han expresado las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 heterólogas como proteínas de fusión con etiquetas en la región C-terminal (6xHis, *c-myc*) en la levadura *Pichia pastoris* para facilitar su identificación por anticuerpos comerciales y su purificación por cromatografía de afinidad (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; López-Rodríguez, 2009). La CHH-B1 recombinante con etiquetas adicionales elevó los niveles de glucosa en organismos ablacionados unilateralmente (Sánchez *et al.*, 2008). Algunos estudios en otros organismos sugieren que la secuencia y estructura de la región C-terminal es importante para la actividad biológica de las CHHs (Marco *et al.*, 2000), por lo cual la presencia de regiones adicionales a la secuencia madura nativa podría afectar la estructura y actividad del péptido recombinante (Zarubin *et al.*, 2009). En este sentido, resulta también importante estudiar el efecto de la amidación del extremo C-terminal sobre la estructura y actividad del péptido CHH-B2.

Trabajos en otros crustáceos donde se han amidado *in vitro* a CHHs recombinantes sugieren que el grupo amida del C-terminal es importante para la estructura y actividad hiperglucémica de las CHHs (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). Sin embargo, a la fecha el efecto de la amidación no ha sido entendido completamente. Para estudiar el efecto de la amidación en la actividad hiperglucémica de péptidos maduros que presentan la señal de amidación en el C-terminal, como es el caso de CHH-B2, se requiere expresar versiones recombinantes que tengan la secuencia lo más parecida al péptido original con una glicina libre en el extremo C-terminal que sirva como sustrato para la amidación *in vitro* del aminoácido contiguo (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009).

En nuestro grupo de trabajo, se cuenta con diferentes cepas de la levadura *P. pastoris* que expresan los péptidos con una secuencia idéntica a la de los péptidos maduros CHH-B1 y CHH-B2 expresados en la GS de *L. vannamei*. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo la expresión y purificación de ambas isoformas recombinantes con estructuras lo más similares a las de los péptidos nativos, para ser utilizados como una herramienta que permita evaluar el efecto de las hormonas sobre los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y osmorregulación en *L. vannamei*, permitiendo estudiar posibles funciones de estas isoformas de la CHH en la fisiología de la especie.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Neuropéptidos con acción hormonal

Las células de los organismos multicelulares se comunican entre sí a través de mensajeros químicos secretados a los fluidos extracelulares. Muchos de estos son hormonas que actúan de manera endócrina, viajando a través del sistema circulatorio hasta sus células diana donde se unen a proteínas receptoras, lo cual desencadena cascadas de señalización intracelular que ocasionan cambios en la fisiología celular. Estas respuestas, de manera ideal y a nivel sistémico, permiten que los organismos mantengan un estado de equilibrio dinámico conocido como “homeostasis” (Zeugswetter y Jensen-Jarolim, 2014).

En invertebrados, muchas hormonas son neuropéptidos, ya que son sintetizados y secretados por neuronas. Estas neurohormonas neuropéptidos, típicamente tienen un amplio espectro de funciones y su secreción no ocurre de manera continua sino pulsátil, cíclica o rítmica (Nässel y Larhammar, 2013).

Por otro lado, están codificados en el genoma como precursores largos conocidos como prepropéptidos. La síntesis de estos prepropéptidos inicia en los ribosomas ubicados en el citosol (Fig. 1). Los prepropéptidos una vez sintetizados son dirigidos por la secuencia señal a la membrana del retículo endoplásmico (RE), en la cual el péptido señal es removido por una endopeptidasa y da lugar a los propéptidos. Los propéptidos son plegados también en el RE, y entonces enviados al aparato de Golgi donde pueden ser modificados post-traduccionalmente (por ejemplo fosforilados, glucosilados). Los

propéptidos antes de dejar la red de Golgi son empaquetados en vesículas secretoras, las cuales son transportadas a las terminales nerviosas (Strand, 1999; Nässel y Larhammar, 2013).

En las vesículas secretoras, los propéptidos son digeridos por proteasas que dan lugar a los péptidos activos, algunos de los cuales pueden requerir un proceso de amidación previo a su secreción a los fluidos extracelulares. La secreción de neurohormonas maduras, ocurre mediante exocitosis estimulada por el incremento de Ca^{2+} intracelular (Strand, 1999; Nässel y Larhammar, 2013).

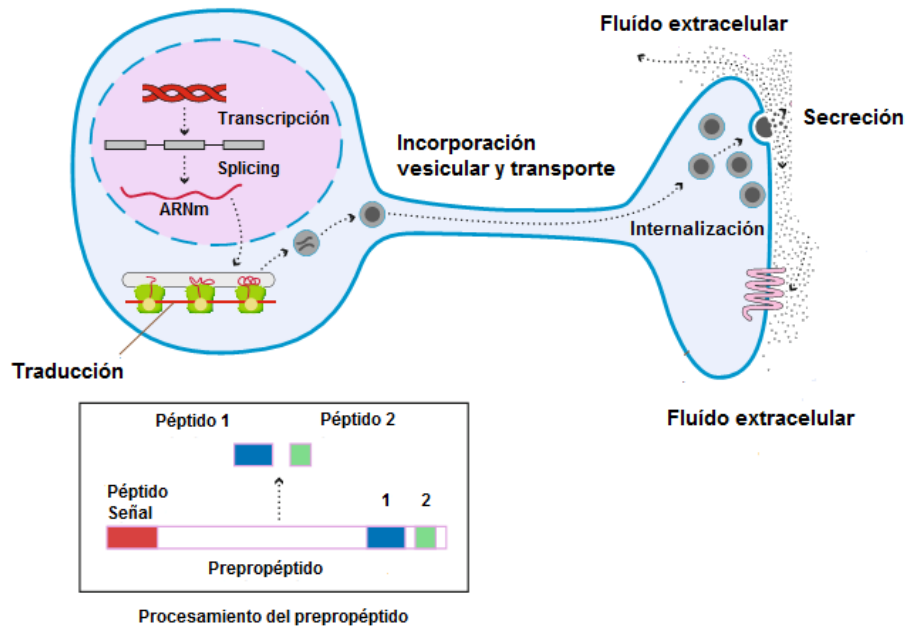


Figura 1. Biosíntesis, procesamiento, transporte y secreción de neuropéptidos (Modificado de Nässel y Larhammar, 2013).

La morfología de las células peptidogénicas y neurosecretoras está conservada desde artrópodos hasta mamíferos. Tienen cuerpos celulares largos (soma) (donde se lleva a cabo la biosíntesis de los neuropéptidos), y terminales axónicas (con sitios de almacenamiento y liberación a la circulación) generalmente organizadas en estructuras que están en contacto con los fluidos circulatorios llamados órganos neurohemales. Potencialmente, todas las células de los organismos responden a neurohormonas, sin

embargo, la especificidad de la respuesta de una célula a un neuropéptido depende de la presencia de receptores de superficie celular capaces de reconocerlo (Nässel y Larhammar, 2013).

1.2.2 Neuropéptidos de crustáceos

En crustáceos decápodos existen dos ejes neuroendocrinos importantes; el complejo del órgano X-glándula del seno (OX-GS) localizado en los pedúnculos oculares, y el órgano pericárdico que rodea al corazón. Además, existen estructuras secundarias como el plexo cardíaco y los órganos post-comisural y comisural anterior localizados de manera lateral al esófago (Christie *et al.*, 2010).

Los crustáceos, al igual que los demás artrópodos, poseen un sistema circulatorio abierto, en el cual el corazón bombea la hemolinfa (fluido circulatorio compuesto de sales, biomoléculas y desechos metabólicos) al hemocele que baña todos los órganos internos. El regreso de la hemolinfa al corazón se da mediante un gradiente de presión ocasionado por la contracción del corazón, la cual arrastra la hemolinfa al seno pericárdico y por consiguiente hacia dentro del corazón (Brusca y Brusca, 2003). Debido este tipo de organización del sistema circulatorio, los órganos neuroendocrinos se definen como aquellas estructuras del sistema nervioso cuyas terminales están en contacto directo con la hemolinfa (órganos neurohemales) (Christie, 2011).

El centro neuroendócrino dominante es el OX-GS (Fig. 2) Las neuronas secretoras del OX están localizadas en la *medulla terminalis* del pedúnculo ocular y sus axones desembocan en la GS adyacente a la arteria oftálmica, lo cual permite que sus secreciones entren en circulación. Neuronas especializadas producen diferentes tipos de neuropéptidos pertenecientes a dos grandes familias peptídicas; la familia de los efectores pigmentarios y la de las CHHs (Nässel y Larhammar, 2013).

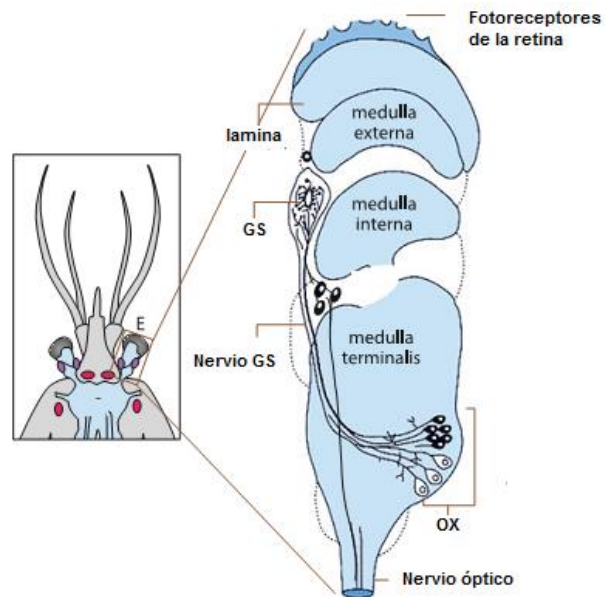


Figura 2. Localización del centro neuroendócrino OX-GS. E, pedúnculo ocular; GS, glándula del seno; OX, órgano X (Modificado de Nässel y Larhammar, 2013).

La familia CHH además de incluir a los neuropéptidos CHH, engloba a las hormonas inhibitoras de la muda (MIHs), las hormonas inhibitoras de las gónadas o de la vitelogénesis (GIHs, VIHs), y a las hormonas inhibitoras del órgano mandibular (MIOHs). Todos éstos péptidos tienen un peso molecular de 7 a 9 kDa y presentan características estructurales conservadas; aproximadamente 70 residuos de aminoácidos, seis cisteínas en posiciones conservadas que forman tres enlaces disulfuro que estabilizan su estructura globular, dos argininas, un ácido aspártico y un residuo de fenilalanina también en posiciones conservadas. Estas neurohormonas a nivel funcional, coordinan principalmente procesos relacionados con el metabolismo, crecimiento y reproducción (De Kleijn y Van Herp, 1998; Böcking *et al.*, 2002; Hopkins, 2012; Webster *et al.*, 2012).

Los péptidos de la familia CHH se dividen en dos sub-familias o tipos, la subfamilia (tipo) I o CHH y la subfamilia (tipo) II o MIH (Webster *et al.*, 2012). Los péptidos de la subfamilia I contienen exclusivamente a las CHHs, las cuales presentan 72-74 aminoácidos, un extremo C-terminal generalmente amidado y un grupo bloqueador piro glutamato (piro-Glu) en el extremo N-terminal. Por otro lado, los propéptidos, cuentan con un péptido relacionado al precursor de CHH (CPRP), ausente en los péptidos de la

subfamilia II, el cual es escindido a través de un sitio de procesamiento dibásico (KR o RR). Los péptidos de la subfamilia II comprenden a las MIHs, GIHs (VIHs) y MOIHs. Estos péptidos pueden presentar residuos adicionales en las regiones N y C-terminal, los cuales raramente presentan bloqueos o amidación, respectivamente y al parecer invariablemente cuentan con un residuo adicional de glicina entre las primeras dos cisteínas (Böcking *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2012).

Recientemente, algunos autores como Mongtagné *et al.* (2010) y Lee *et al.* (2014) reconocen un tercer tipo de péptidos (tipo III) dentro de la familia CHH, en el cual se incluye a los péptidos transportadores de iones (ITP) de insectos (considerados ortólogos a las CHHs) y a los neuropéptidos de braquiópodos, los cuales filogenéticamente están localizados en la base de los clados de las subfamilias I y II.

Dentro de los miembros de la familia CHH, las CHHs son los neuropéptidos más abundantes en decápodos; se caracterizan por expresarse en múltiples tejidos y por ser en muchos casos multifuncionales, por lo cual estas neurohormonas tienen un gran significado biológico (Fanjul-Moles, 2006; Hopkins, 2012).

1.2.3 CHHs

Las hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHH) tienen como principal función conocida la movilización de la glucosa a la hemolinfa desde sus reservas, ocasionando un efecto hiperglucémico (Webster, 1996). Sin embargo, otras funciones han sido sugeridas para las CHHs, como en el control del metabolismo de lípidos (Santos *et al.*, 1997), del proceso de muda (Chung *et al.*, 1999; Chung y Webster, 2005), osmorregulación (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003), reproducción (De Kleijn *et al.*, 1998; Tsuisui *et al.*, 2005), y la respuesta al estrés (Chang, 2005).

Se ha observado que tanto la liberación de la hormona CHH como la respuesta hiperglucémica ocurren bajo condiciones de estrés, tales como, hipoxia (Webster, 1996), exposición aérea (Shinji *et al.*, 2012), estrés osmótico (Chang *et al.*, 1998; Shinji *et al.*, 2012), estrés térmico (Chang *et al.*, 1998), contaminación por metales pesados (Lorenzon *et al.*, 2004; Lorenzon *et al.*, 2005), y la presencia de patógenos (Lorenzon *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2013), entre otras, lo que destaca su importancia adaptativa frente a cambios ambientales.

Por otro lado, la secreción de las CHHs varía de manera cíclica, ya que se ha observado que los niveles circulantes fluctúan con los ciclos circadianos dependientes del fotoperiodo (Kallen *et al.*, 1990), estacionales y con el ciclo de la muda (Chung y Webster, 2005). Todo lo anterior, sugiere que la hormona es importante para la supervivencia de los organismos en su ambiente.

Las CHHs no solamente se sintetizan en OX-GS, ya que mediante el aislamiento de los transcritos o por detección de los péptidos con radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés) se ha demostrado su expresión en otros tejidos como el órgano pericárdico, ganglio torácico, abdominal, cordón nervioso ventral, glándula antenal, corazón, intestino, branquias y hemocitos (Chang *et al.*, 1999; Dirksen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Tiu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012a; Wu *et al.*, 2012b).

Estudios en varios organismos demuestran que las CHHs se distribuyen en isoformas, las cuales pueden ser generadas de manera post-traducciona por la isomerización D o L del residuo Phe³ (Yasuda *et al.*, 1994; Aguilar *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 2004), o mediante el bloqueo del extremo N-terminal con un grupo piro-Glu (Chung y Webster, 1996; Hsu *et al.*, 2006). Sin embargo, a la fecha no se ha encontrado ninguna de estas modificaciones en isoformas CHH de camarones peneidos y tampoco en camarones y langostinos de agua dulce (Webster *et al.*, 2012).

Existen también isoformas codificadas a nivel genómico. Los genes *chh* pueden presentar dos tipos de estructuras (Fig. 3). Los genes tipo I están compuestos por 4 exones y 2 intrones, y dan origen a dos isoformas mediante un proceso de corte y empalme alternativo. El exón I contiene una región no traducida 5' (5'UTR) y un segmento del péptido señal; el exón II codifica casi todo el péptido señal, el CPRP, y los primeros 40 aminoácidos del N-terminal. Uno de los transcritos contiene exón III y el exón IV es una región no traducida, mientras que para originar el otro transcrito, el exón III es escindido, por lo tanto ambos péptidos son idénticos en los primeros 40 y difieren en la región C-terminal, donde una de las isoformas presenta un grupo amida C-terminal característico de las CHHs y el otro un C-terminal libre, por lo cual se nombran péptidos tipo CHH o CHH-L (del inglés "CHH-like"), respectivamente (Chen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2014).

El otro tipo de genes (tipo II), tienen una estructura de 3 exones y 2 intrones codificando los mismos elementos que los genes tipo I. Ésta estructura es también la típica de la subfamilia MIH, con excepción de que el exón II no codifica un CPRP (Chen *et al.*, 2005). Por consenso, todas las CHHs producto de estos genes se expresan en OX-GS y tienen un extremo C-terminal amidado, como lo sugiere la señal de amidación en los aminoácidos GK o GKR en el extremo C-terminal que presentan de manera invariable (Webster *et al.*, 2012, Chen *et al.*, 2005).

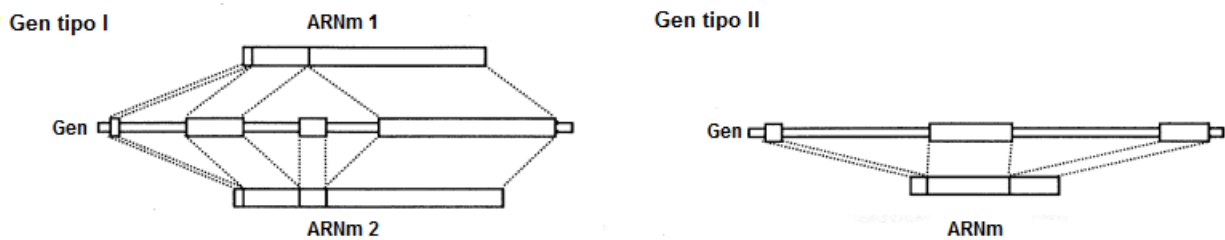


Figura 3. Estructura de los genes *chh* (Modificado de Chen *et al.*, 2005).

La existencia de isoformas podría ser una de las razones para la pleiotropía de funciones de las CHHs, cuyas actividades a menudo se traslapan con las asignadas a los otros péptidos de la familia CHH, por ejemplo, en la movilización de lípidos a la hemolinfa (hiperlipidemia) (Santos *et al.*, 1997), osmorregulación (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003), inhibición de la síntesis de ecdiesteroides en el órgano Y (OY) (actividad MIH) (Zarubin *et al.*, 2009), estimulación de la vitelogénesis (De Kleijn y Van Herp, 1998), inhibición de la vitelogénesis (actividad VIH) (Tsuitsui *et al.*, 2013), inhibición de la producción del metil farnesoato en el órgano mandibular (actividad MOIH), lo cual estimula a su vez la producción de ecdiesteroides en el OY (Webster, 1998).

Sin embargo, según lo observado en *Callinectes sapidus*, las CHHs tienen sitios de unión en las membranas de numerosos tejidos y son capaces elevar en ellos los niveles de GMPc (guanosín monofosfato cíclico), por lo cual se piensa que podrían presentar aún más funciones (Katayama y Chung, 2009).

1.2.4 CHHs de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (Decápoda: Penaeidae) es una especie nativa del Pacífico Oriental, que se distribuye desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú (Holthuis, 1980). El ciclo de vida típico de los camarones peneidos (Fig. 4) involucra cambios en las condiciones de hábitat durante sus diferentes estadios; el desarrollo larval ocurre en mar abierto, posteriormente las post-larvas migran a estuarios y lagunas costeras, donde se desarrollan hasta la etapa juvenil. Finalmente, en la etapa sub-adulta migran al mar abierto donde se lleva a cabo la reproducción y el desove de los nauplios (Valles-Jiménez *et al.*, 2005). Es por esto, que se ha sugerido que *L. vannamei*, al habitar en los sistemas lagunares-estuarinos durante su etapa juvenil, presenta una alta capacidad de respuesta fisiológica a las variaciones de las condiciones ambientales (Ponce-Palafox *et al.*, 1997).

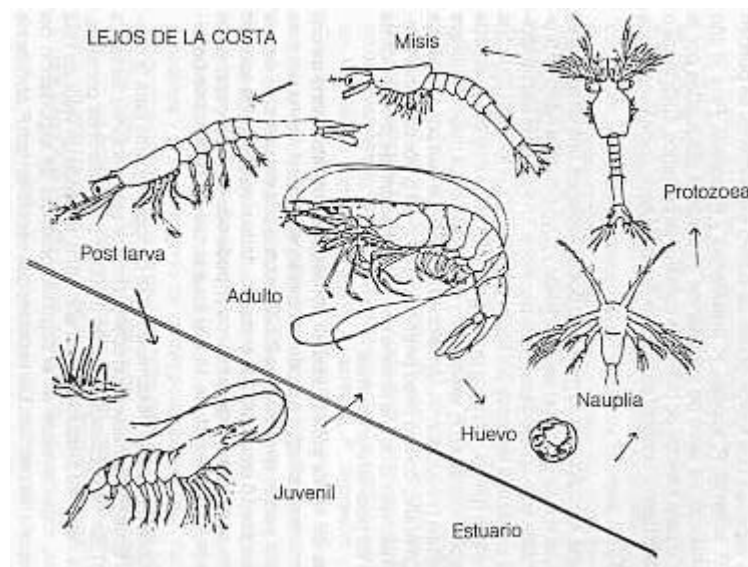


Figura 4. Ciclo de vida típico de un peneido (Álvarez, 1988).

Entre los factores que se ha observado que tienen mayor efecto sobre el crecimiento, desarrollo y maduración del camarón blanco están la temperatura y la salinidad. Particularmente, hablando de la salinidad, se ha observado que este organismo es capaz de adaptarse a variaciones diarias y estacionales, y que presenta un patrón de osmorregulación hiper- o hipo-osmótico en función de la salinidad ambiental. En

condiciones hiper-osmóticas la osmolaridad de la hemolinfa del camarón es menor a la del medio externo, mientras que en condiciones hipo-osmóticas la osmolaridad de la hemolinfa del camarón es mayor a la del medio externo (Díaz *et al.*, 2001). Esta capacidad de hiper-regulación se adquiere a través del desarrollo ontogénico y el desarrollo de las estructuras especializadas en la osmorregulación (Chong-Robles *et al.*, 2014). En crustáceos, las respuestas fisiológicas están reguladas a un nivel neuroendocrino. A la fecha, la información sobre endocrinología de crustáceos aún es limitada, especialmente en camarones peneidos; por lo que la generación de conocimiento básico en esta área resulta de gran relevancia para la generación de tecnologías aplicadas a la acuicultura de la especie, como por ejemplo estimular o inhibir procesos relacionados con el crecimiento o la reproducción, monitorear el estado de salud de los organismos, así como detectar y contrarrestar el estrés en los mismos.

Un primer esfuerzo por aislar los neuropéptidos de la GS de *L. vannamei* fue realizado por Sefiani *et al.* (1996), quienes fraccionaron por cromatografía líquida extractos de las glándulas. Las fracciones reactivas a un anticuerpo anti-CHH_A de *H. americanus* fueron analizadas *in vivo* para determinar si presentaban actividad hiperglucémica e inhibidora de la síntesis de ecdiesteroides en el OY. La fracción con mayor señal, contenía un solo péptido bifuncional, cuya secuencia (Uniprot: Q26181.1) tiene un 100% de identidad con la isoforma CHH-A de *L. vannamei* (GenBank: AAR11295.1), posteriormente aislada en nuestro laboratorio (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Las otras fracciones presentaron ambas actividades y no se logró la separación total de sus componentes, por lo cual en ellas podría haber una mezcla de hormonas MIH y CHH, péptidos bifuncionales o una mezcla de isoformas con funciones diferentes.

Mediante la aplicación de las técnicas de biología molecular, Sun (1995) clonó el gen codificante de una hormona tipo MIH (MIH-like) de la GS de *L. vannamei* utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de una región conservada del gen *mih* de *Homarus americanus*. Posteriormente, Lago-Lestón *et al.* (2007) utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos de *mih-like* (GenBank: S73824) aisló el ADNc de los transcritos codificantes de las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 de la glándula del seno (antes MIH1 y MIH2). Adicionalmente, a partir de una secuencia *chh* de *L. vannamei* (GenBank: X99731) se diseñaron oligonucleótidos con los cuales se amplificó

el ADNc de la isoforma CHH-A. Los ADNc fueron clonados y secuenciados, y el análisis de los transcritos reveló que su expresión varía con la temperatura y salinidad de aclimatación de los organismos.

El análisis de las secuencias de los transcritos *chh-A*, *chh-B1* y *chh-B2* así como del ADN genómico reveló que CHH-A se encuentra codificada en el gen *chhA*, mientras que CHH-B1 y CHH-B2 son isoformas originadas por corte y empalme alternativo del gen *chhB* (Fig. 5), el cual es un gen *chh* del tipo I. Por lo tanto ambas isoformas, comparten los aminoácidos de las posiciones 1-40 y difieren notablemente desde la posición 41 hacia el C-terminal. La secuencia traducida de la isoforma CHH-B2 presenta la señal de procesamiento GK en el C-terminal que sugiere que presenta el grupo amida C-terminal (péptido CHH), mientras que CHH-B1 parece tener un C-terminal libre (péptido CHH-L) (Lago-Lestón *et al.*, 2007).

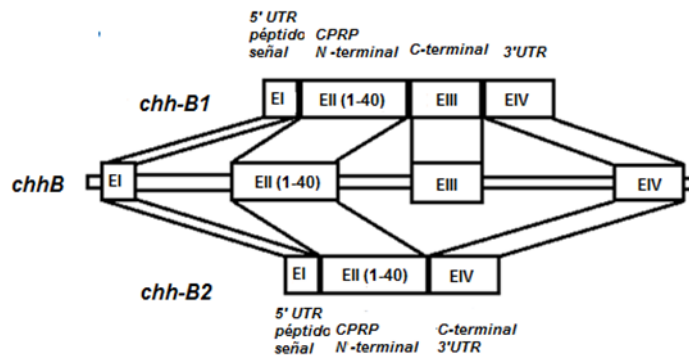


Figura 5. Estructura del gen *chhB* de *L. vannamei*. E, exón; UTR región no traducida (Modificado de Lago-Lestón *et al.*, 2007).

En otros estudios se ha reportado que los tres transcritos se expresan en diferentes tejidos tanto de origen nervioso como no nervioso (Tiu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014), y en el caso particular de CHH-B1 y CHH-B2, éstos varían en abundancia durante las diferentes etapas del ciclo de muda y de vida (Tiu *et al.*, 2007).

Recientemente se aisló un transcrito que codifica para otro péptido CHH-L proveniente de un gen con estructura tipo II en *L. vannamei*. Su expresión al igual que

CHH-B1 ocurre en OX-GS y en otros tejidos y también varía con el ciclo de muda (Ventura-López *et al.*, 2016).

Las isoformas CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 se han expresado de manera recombinante. La isoforma A ha sido expresada en *E. coli* y *P. pastoris* tanto como proteína de fusión (Wanlem *et al.*, 2011; Arredondo-Espinoza, 2014; Liu *et al.*, 2014;) como conteniendo exclusivamente la secuencia del péptido nativo (Balderas-González, 2014). El péptido recombinante CHH-A ha demostrado que al ser inyectado a organismos en intermuda eleva los niveles de glucosa de la hemolinfa (hiperglucemia) (Wanlem *et al.*, 2011; Arredondo-Espinoza, 2014), estimula respuestas inmunológicas como el incremento en el conteo total de hemocitos, actividad fenoloxidasa y proteínas séricas en organismos infectados con *Vibrio harveyi* (Wanlem *et al.*, 2011) y modifica la capacidad osmorreguladora de los organismos (Balderas-González, 2014) y la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa bajo diferentes condiciones de salinidad (Liu *et al.*, 2014).

Por otra parte, CHH-B1 y CHH-B2 se han expresado en *P. pastoris* como proteínas de fusión con etiquetas (6xHis, *c-myc*) en el extremo C-terminal (rCHH-B1_{His} y rCHH-B2_{His}) (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; López-Rodríguez, 2009). El péptido rCHH-B1_{His} ha presentado actividad hiperglucémica al inyectarse en organismos ablacionados unilateralmente (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008), y por otro lado se ha sugerido que tiene además otros efectos metabólicos como promover la movilización de triglicéridos a la hemolinfa y la disminución de las proteínas séricas, así como incremento de la capacidad hipo-osmorreguladora al ser suministrada en sub-adultos aclimatados en agua de mar (Camacho-Jiménez, 2011).

Por otro lado, debido a que Sun (1995) aisló la secuencia *mih-like* (*chhB*) utilizando unos oligonucleótidos diseñados contra una MIH de *H. americanus* que presentó actividad hiperglucémica e inhibidora de la muda (Chang *et al.*, 1990), se evaluó la capacidad de rCHH-B1_{His} de inhibir la muda *in vivo*, no encontrándose efecto alguno (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no se ha descartado que las etiquetas C-terminales interfirieran con dicha función, ya que se ha sugerido que esa región es crítica tanto para la actividad de las MIHs (Gu *et al.*, 2001) como de las CHHs (Zarubin *et al.*, 2009), las cuales pueden tener también actividad MIH como se ha sugerido para CHH-A (Sefiani *et al.*, 1995).

Además, se ha sugerido que las etiquetas en la región C-terminal (6xHis, c-myc) son altamente inmunogénicas (Mancera-Flores, 2009), lo cual dificulta generar anticuerpos con suficiente sensibilidad para detectar las hormonas a muy baja concentración, así como el desarrollo de inmunoensayos para identificarlas y cuantificarlas en muestras biológicas.

Por lo tanto, la producción de péptidos recombinantes sin regiones adicionales ofrece una fuerte posibilidad de que estos tengan una estructura y actividad similar a los péptidos nativos de la GS, permitiendo un estudio más adecuado de sus propiedades, estructura y actividad biológica.

1.3 Justificación

El camarón blanco *L. vannamei* es un recurso acuícola de importancia mundial, por lo cual la comprensión de su fisiología es fundamental para optimizar su cultivo. Las CHHs son un grupo de neuropéptidos multifuncionales que coordinan parte importante de la fisiología de crustáceos decápodos, sin embargo a la fecha muchas funciones propuestas aún no han sido confirmadas, o bien los mecanismos de acción no están totalmente descritos. Estudios previos sugieren que las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 de *L. vannamei* podrían ser pleiotrópicas y estar involucradas en la regulación de procesos relacionados con el metabolismo y la osmorregulación, sin embargo la evidencia experimental aun es escasa. La expresión heteróloga de péptidos recombinantes activos (rCHH-B1 y rCHH-B2), con la secuencia de aminoácidos idéntica a la de los péptidos maduros de las hormonas producidas en la glándula del seno, permitirá el estudio del papel de estas hormonas en el metabolismo y osmorregulación de la especie bajo condiciones de estrés como el salino. Por otro lado, la producción de una versión amidada *in vitro* del péptido rCHH-B2 permitirá estudiar el efecto de esta modificación post-traducciona sobre la actividad biológica de esta isoforma CHH.

1.4 Hipótesis

Los neuropéptidos CHH-B1 y CHH-B2 en sus versiones recombinantes al ser inyectados en *L. vannamei* tendrán un efecto modulador de algunas respuestas fisiológicas relacionadas con el metabolismo, provocando incrementos en los niveles de glucosa, triglicéridos y proteínas en la hemolinfa, así como la modificación de la capacidad

ionorreguladora y osmorreguladora en organismos expuestos a diferentes condiciones de salinidad.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de las neurohormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-B1 y CHH-B2 recombinantes de *Litopenaeus vannamei* sobre los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y osmorregulación.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Llevar a cabo la expresión y purificación de las neurohormonas recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 con una secuencia idéntica a la de los neuropéptidos maduros producidos en la glándula del seno de *L. vannamei*.
2. Analizar mediante herramientas bioinformáticas las secuencias, propiedades y estructuras (secundarias y terciarias) a partir de la secuencia de aminoácidos traducida de los péptidos maduros CHH-B1 y CHH-B2.
3. Analizar la estructura secundaria de los péptidos recombinantes mediante espectroscopia.
4. Evaluar el efecto de los neuropéptidos recombinantes en los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa de *L. vannamei*.
5. Analizar *in vivo* el efecto de la amidación del C-terminal sobre la actividad biológica del péptido recombinante CHH-B2.
6. Estudiar el efecto de las neurohormonas recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 sobre las respuestas fisiológicas relacionadas a procesos de osmorregulación en organismos expuestos a diferentes condiciones de salinidad.

Capítulo 2. Producción de las neurohormonas recombinantes rCHH-B1 y rCHH-B2

2.1 Introducción

Comúnmente, el estudio de la actividad de las CHHs requiere la purificación de los péptidos a partir del tejido secretor elaborando extractos u homogenados a partir de los cuales se realiza la separación cromatográfica de sus componentes (Kallen *et al.*, 1986; Kegel *et al.*, 1989; Kegel *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2012b).

Los trabajos acerca de la purificación de péptidos de la familia CHH de peneidos son escasos (Sefiani *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997; Wang, 2000; Shinji *et al.*, 2012). En crustáceos, la purificación de los péptidos de la familia CHH se puede ver dificultada por la similitud estructural entre los mismos (Chen *et al.*, 2005), la baja cantidad que se obtiene por glándula (Yasuda *et al.*, 1994), y el pequeño tamaño de las mismas, especialmente en camarones. Debido a esto, una alternativa usada es la producción de versiones recombinantes (Huberman, 2000), lo cual además permite la generación de proteínas con etiquetas para facilitar su identificación y purificación (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; Morera *et al.*, 2012), así como proteínas con delecciones o mutaciones puntuales para realizar estudios de relación estructura-función (Mettulio *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015). Por lo tanto, la producción heteróloga de neuropéptidos es una biotecnología útil para elucidar su función biológica.

Los sistemas de expresión más utilizados para producir neuropéptidos de crustáceos se basan en la bacteria *Escherichia coli* (Gu *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2009; Wanlem *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de esto, presentan desventajas importantes, ya que a menudo las proteínas recombinantes requieren tratamientos adicionales para su solubilización y plegado, y además la bacteria es incapaz de realizar modificaciones post-traduccionales críticas para la actividad biológica de péptidos de origen eucariota (Choi y Lee, 2004). Por lo tanto, algunos autores han optado por utilizar sistemas de expresión eucarióticos, como por ejemplo los basados en levaduras.

Los sistemas de expresión basados en la levadura metilotrófica *P. pastoris* son muy utilizados, ya que al igual que *E. coli* existen protocolos bien estandarizados para su

cultivo y manipulación genética pero con la ventaja de utilizar vectores de integración cromosómica, llevar a cabo muchas modificaciones postraduccionales y secretar la proteína al medio de cultivo (Romanos, 1995; Cereghino y Cregg, 2000). En *P. pastoris* se han producido algunas neurohormonas de peneidos como *Marsupenaeus japonicus* (Ohira *et al.*, 2003) y *Penaeus monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2003; Yodmuang *et al.*, 2004; Treerattrakool *et al.*, 2014).

Con respecto a las CHHs de *L. vannamei* previamente se han expresado las isoformas recombinantes CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 (rCHH-B1, rCHH-B2 y rCHH-A) en *P. pastoris*. Las tres han sido producidas como proteínas de fusión con un epítipo para su reconocimiento por anticuerpos comerciales y seis histidinas que permiten su purificación por cromatografía de afinidad a metales, ambos en el C-terminal (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; López-Rodríguez, 2009; Arredondo-Espinoza, 2014). Sin embargo, se ha sugerido que esas regiones afectan en alguna medida su estructura y actividad. Para solucionar lo anterior, la isoforma rCHH-A se ha expresado con una secuencia primaria idéntica a la nativa y se ha purificado por cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC) (Balderas-González, 2014).

Con respecto a rCHH-B1 y rCHH-B2, actualmente se cuenta con cepas de *P. pastoris* con las secuencias codificantes de los péptidos nativos maduros integradas en su genoma. Particularmente hablando de CHH-B2, al contrario de CHH-B1 que tiene un extremo C-terminal libre, presenta la señal de amidación GK, en la construcción se ha eliminado la lisina para dejar la glicina expuesta en el C-terminal para su amidación *in vitro* (Anexo 1). Se ha sugerido que la α -amidación del C-terminal es importante para la actividad hiperglucémica de las CHHs que presentan la señal de amidación de manera nativa (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010).

La reacción de amidación en células nerviosas y endócrinas de animales es catalizada por la enzima monooxigenasa α -amidante de peptidil-glicina (PAM) (Kato *et al.*, 1990). La PAM es un polipéptido con dos dominios enzimáticamente activos que catalizan dos reacciones distintas. En la primera, el dominio monooxigenasa α -hidroxilante de peptidil-glicina (PHM) produce un intermediario a partir del péptido con la glicina C-terminal en presencia de cobre, ascorbato y oxígeno (Fig. 6). En la segunda, el dominio liasa α -amidante de peptidil- α -hidroxiglicina (PAL) convierte el intermediario en

un péptido α -amidado liberando glioxilato. La PAM de manera comercial es producida de manera heteróloga para ser utilizada en la amidación *in vitro* de péptidos recombinantes y sintéticos de interés comercial o biotecnológico (Kim y Seong, 2001).

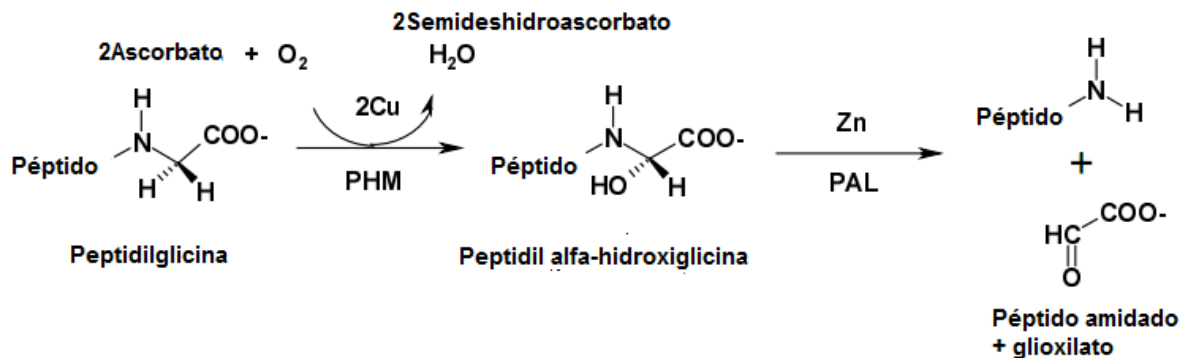


Figura 6. Reacción de amidación catalizada por la enzima bifuncional PAM (Modificado de Kim y Seong, 2001).

Este método se ha empleado para amidar *in vitro* CHHs recombinantes (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010), por lo cual podría aplicarse en la producción de una versión amidada del péptido rCHH-B2, la cual se esperaría que tuviera una actividad biológica semejante a la del péptido nativo del OX-GS.

Considerando todo lo anterior, en el presente capítulo se enfoca en la producción y análisis de los péptidos recombinantes: rCHH-B1, rCHH-B2 sin amidar y rCHH-B2 amidado para su uso en estudios de estructura y actividad biológica.

2.2 Objetivos

1. Expresar a rCHH-B1 y CHH-B2 en *P. pastoris* con una secuencia idéntica a la de los péptidos maduros nativos de OX-GS de *L. vannamei*.
2. Purificar los péptidos recombinantes mediante cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC).
3. Llevar a cabo la amidación *in vitro* del extremo C-terminal de rCHH-B2.
4. Realizar un análisis bioinformático de las secuencias y estructuras de las proteínas CHH-B1 y CHH-B2, así como de sus propiedades fisicoquímicas.

5. Analizar la estructura secundaria de rCHH-B1 y rCHH-B2 por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Expresión de rCHH-B1 y rCHH-B2 en *Pichia pastoris*

La expresión de las rCHH-B1 se llevó a cabo en las cepas SMD1168H-CHH-B1a y X-33-CHH-B1a de *P. pastoris* y la expresión de CHH-B2 en SMD1168H-CHH-B2b y X-33-CHH-B2b. La cepa X-33 no presenta mutaciones en su genoma, mientras que la cepa SMD1168H (*pep4*) es deficiente en la expresión de proteasas (Daly y Hearn, 2005). Ambas cepas asimilan el metanol a la tasa del fenotipo silvestre (Mut⁺). Las cepas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas previamente por nuestro grupo de trabajo integrando en el genoma de *Pichia* las secuencias codificantes de los péptidos maduros nativos entre la región 5' del promotor del gen de la enzima alcohol oxidasa isoforma 1 (5'AOX1) y el terminador en la región 3' (3'AOX1), como se describe en Camacho-Jiménez *et al.* (2015). El promotor 5'AOX1 es un promotor fuerte que está regulado por la presencia de metanol en el medio de cultivo, por lo que éste funciona como inductor de la expresión del péptido recombinante (Cereghino y Cregg, 2000).

2.3.1.1 Condiciones de expresión

Las cepas criopreservadas SMD1168H y X-33 transformadas se sembraron en placas con medio YPD-agar 1.5% (extracto de levadura 1%, peptona 2%, D-glucosa 10%, agar 1.5%) con zeocina (100 µg/mL) y se incubaron hasta observar colonias aisladas (30°C). Cultivos de 3 mL de medio de YPD con zeocina fueron inoculados con una asada de colonia e incubados durante 18 h (30°C, 250 rpm).

Posteriormente, 500 mL de medio BMGY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 µM, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4x10⁻⁵%, glicerol 1%) y 500 mL de medio BMGH (fosfato de potasio 100 µM, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4x10⁻⁵%), glicerol 1%, histidina al 1x10⁻³%) fueron inoculados con 0.5 mL del cultivo anterior. Los cultivos se incubaron (30°C, 250 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ ~ 4.0. La biomasa se cosechó por centrifugación (2,500 xg, 5 min) en tubos cónicos (100 mL por tubo). El pellet recuperado en cada tubo a partir de medio BMGY fueron resuspendidos en 20 mL de

medio BMMY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 μ M, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina al 4×10^{-5} %) (medio enriquecido), y los de BMGH fueron resuspendidos en 20 mL de medio BMMH (fosfato de potasio 100 μ M, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, histidina al 1×10^{-3} %) (medio mínimo). Estos cultivos se llevaron a cabo en matraces bafleados con una capacidad de 250 mL, a los cuales se le agregó una concentración diferente de metanol (0, 1, 2 y 4%, v/v).

Los cultivos de inducción se incubaron por 2 días a 30°C y 250 rpm. Cada 12 h se adicionó metanol para mantener la inducción, y cada 24 h se tomó 1 mL de muestra para analizar la producción de péptidos recombinantes. Las muestras colectadas se centrifugaron (13, 000 xg, 5 min) y el sobrenadante fue recuperado y almacenado (-20°C). Estos procedimientos fueron realizados también con las cepas sin transformar como un control negativo de las condiciones de expresión.

2.3.1.2 Análisis de la expresión

2.3.1.2.1 Precipitación de proteínas

Las proteínas presentes en los sobrenadantes obtenidos de las diferentes condiciones de inducción fueron precipitadas adicionando ácido tricloroacético (TCA) al 100% para obtener una concentración final del 15% (v/v) y se incubaron ~12 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 13, 000 xg y 4 °C durante 20 min. El pellet se lavó con 1 mL de acetona fría al 100% y se centrifugó bajo las condiciones anteriores. Los pellets se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en amortiguador de carga 2X (Laemmli, 1970).

2.3.1.2.2 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida con tricina (Tricina-SDS-PAGE)

A partir de 1 ml de cada cultivo se analizó la expresión de los péptidos recombinantes por medio de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12.5% con tricina (Tricina-SDS-PAGE) (Schägger, 2006). Las bandas en los geles fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (Sasse y Gallagher, 2003). Finalmente, se eligieron algunas de las muestras que presentaron las bandas de peso molecular cercano a lo esperado para ser evaluadas por inmunodetección.

2.3.1.2.3 Inmunodetección por Western blot

La inmunodetección de las neurohormonas se realizó mediante la técnica de Western blot. Posterior a la separación de las proteínas por Tricina SDS-PAGE se procedió a transferirlas a una membrana de nitrocelulosa Trans-blot transfer medium de 0.45 μm (Bio-Rad) por el método de transferencia semi-seca (Gallagher *et al.*, 2003).

Una vez transferidas, la membrana se bloqueó en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 0.05%, pH 7.4) con 0.05% de Tween-20 (PBST) y 5% de leche descremada en polvo, durante 2 h en agitación a temperatura ambiente, seguido de una incubación de ~12 h a 4 °C. Posteriormente, se lavó 3 veces por 5 min con PBST, y se procedió a incubar a temperatura ambiente por 4 h en una solución con el anticuerpo primario (1:500 en PBST con 1% de leche descremada). El anticuerpo primario consistió de un anticuerpo policlonal de conejo (GenScript) que reconoce a los 7 primeros aminoácidos de la región N-terminal de las neurohormonas CHH-B1 y CHH-B2 (anti-CHH-B) (DTFDHSC). Posteriormente la membrana fue lavada e incubada en una solución de anticuerpo secundario (1:5000) bajo las condiciones anteriores. Como anticuerpo secundario se utilizó el anti-IgG monoclonal de conejo conjugado a la enzima peroxidasa (Sigma-Aldrich).

Finalmente la membrana fue lavada nuevamente y revelada mediante quimioluminiscencia con el kit Enhanced chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences) en una placa fotográfica (Kodak) según las instrucciones del fabricante. A partir de estos resultados, se seleccionaron las condiciones de expresión para llevar a cabo la producción de los péptidos recombinantes en un mayor volumen de cultivo.

2.3.2 Purificación de los péptidos recombinantes

2.3.2.1 Precipitación con sulfato de amonio

Los péptidos recombinantes fueron purificados a partir de 200 mL de sobrenadante de cultivo bajo las condiciones de inducción seleccionadas. Las proteínas contenidas en los extractos crudos se concentraron por precipitación con sulfato de amonio (SA) a un porcentaje de saturación del 50%. Las proteínas precipitadas fueron recuperadas por centrifugación (10000 xg, 4 °C, 20 min) y resuspendidas en PBS. Para remover el SA

residual, cada muestra se dializó con PBS utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) con una capacidad de retención de 3500 MWCO, según las especificaciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su separación por RP-HPLC.

2.3.2.2 RP-HPLC

Los péptidos recombinantes se purificaron de los extractos crudos concentrados por RP-HPLC utilizando un sistema Agilent Technologies 10100 equipado con un degasificador, bomba cuaternaria, inyector manual y detector de longitud de onda múltiple. La separación se llevó a cabo en una columna C18 TSK-Gel Octadecyl-4 PW (15 cm X 4.6 mm, 7 µm), (Tosoh Biosep, Supelco) con un guarda columna C18 Eclipse XDB (12.5 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Zorbax, Agilent). Los solventes de elución utilizados fueron ácido trifluoroacético (TFA) al 0.12% (solvente A) y TFA al 0.1% en acetonitrilo (solvente B). La columna se equilibró 5 min con 0% de B en 100% de A, seguido de un gradiente de 60 min de 0% a 60% de B en A con un flujo de 1 mL/min y un incremento de B de 1%/min. La elución se monitoreó midiendo la absorbancia a 280 nm. En cada corrida se colectaron fracciones de 5 min, las cuales fueron liofilizadas y resuspendidas en PBS.

Las fracciones fueron analizadas primero por Dot-blot, con el anticuerpo anti-CHH-B, para lo cual una muestra de cada una se aplicó sobre una membrana de nitrocelulosa y se procedió al bloqueo e inmunodetección como se describe en el apartado 2.3.1.2.3. Las que dieron una señal positiva fueron reevaluadas por Western blot para identificar las bandas. Aquellas que presentaron las bandas de interés en cada caso, se mezclaron en una sola muestra, y se cuantificaron por el método del ácido bicinconínico (BCA) con el kit BCA protein assay (PIERCE) según el procedimiento para microplaca descrito por el fabricante. Los péptidos fueron evaluados por RP-HPLC y Tricina-SDS-PAGE.

Adicionalmente, se realizó un análisis por secuenciación N-terminal de las proteínas en cada banda. Las proteínas purificadas se analizaron por Tricina-SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF Sequit-Blot de 0.2 µm (Bio-Rad). La membrana fue teñida 5 min con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250, 0.025%, metanol 40%) y desteñida con metanol al 50%. Las bandas fueron escindidas y enviadas

a secuenciar al Laboratorio de Neurofarmacología Marina en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

La secuencia de los primeros residuos de aminoácidos de la región N-terminal se obtuvo mediante el método de degradación de Edman en un secuenciador Procise 491 Protein Sequence System (Applied Biosystems). Las secuencias se compararon con la secuencia primaria de cada péptido recombinante. Las secuencias adicionales encontradas, estas se alinearon contra la base de datos de proteínas depositada en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con la herramienta blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3.3 Amidación del C-terminal de rCHH-B2

Se realizó la amidación *in vitro* de 157 µg del péptido rCHH-B2 purificado utilizando la enzima PAM recombinante humana (rhPAM) (R&D systems) según las especificaciones del fabricante. Las condiciones finales de reacción fueron: 0.1 µg PAM, CuCl₂ 1 µM, catalasa 2000 U/mL, rCHH-B2 50 µM y ácido ascórbico 50 mM. Como controles se hizo una reacción sin enzima ni sustrato (rCHH-B2) y otra solamente sin enzima. La separación cromatográfica de la reacción de amidación se realizó acorde con el apartado 2.3.2.2 pero con un gradiente de 40 min de 0-40% de B en A, un flujo de 0.8 mL/min y un incremento de B de 1%/ min. Los dos productos de la reacción purificados se liofilizaron y se resuspendieron en PBS. Ambas muestras se cuantificaron mediante el método del ácido bicinconínico con el kit BCA proteín assay (PIERCE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.3.4 Análisis bioinformático de los neuropéptidos

2.3.4.1 Alineamiento y dendograma de secuencias

Las secuencias de aminoácidos teóricas de los péptidos maduros nativos CHH-B1 y CHH-B2 se alinearon contra las secuencias de otras isoformas CHH y CHH-L de otras especies producidas por corte y empalme alternativo. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). El alineamiento múltiple fue realizado con el método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) usando el software BioEdit 7.25. Los parámetros para el alineamiento fueron: una matriz de sustitución de mutaciones

puntuales aceptadas PAM250, y una penalidad de gaps de 10. A partir de las mismas secuencias se construyó un dendograma con el software Mega 6.06 mediante el método Neighbor-Joining con 1000 repeticiones bootstrap y el método de corrección de distancias de Poisson. Como grupos externos se incorporaron las secuencias ITP e ITP-L de *Schistocerca gregaria*.

2.3.4.2 Propiedades físicas y químicas

A partir de las secuencias de aminoácidos de cada neurohormona se hizo un análisis predictivo de sus propiedades fisicoquímicas utilizando la herramienta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005). Los parámetros teóricos estimados fueron: peso molecular, punto isoeléctrico (PI), número de residuos con carga positiva y negativa, coeficiente de extinción, vida media, índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropaticidad (GRAVY).

2.3.4.3 Estructura secundaria y tridimensional

A partir de las secuencias teóricas de los péptidos recombinantes, se realizó una estimación del contenido de estructuras secundarias (hélices α , láminas β y giros). El análisis se realizó con el algoritmo de Chou y Fasman (1974) en el servidor CFSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>). Además, se hizo una predicción de la conectividad entre las 6 cisteínas mediante enlaces disulfuro con el servidor DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) (Ferre y Clote, 2005).

Por otro lado, se realizó un modelado por homología de las estructuras tridimensionales utilizando el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) (<http://swissmodel.expasy.org/org/>) (Arnold *et al.*, 2006) utilizando como templado la estructura soluble del péptido Marja-MIH de *M. japonicus* obtenida por resonancia magnética nuclear (NMR) (Katayama *et al.*, 2003) (Protein Data Bank ID: 1J0T) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Las estructuras fueron visualizadas y editadas con el software Deep View/Swiss-PdbViewer 4.1.0. La similitud de los modelos con respecto a Marja-MIH se estimó con base en a los carbonos α , calculando la distancia promedio entre los esqueletos superpuestos de ambas estructuras como la desviación de la raíz cuadrada de las medias (RMSD).

La validación de los modelos se realizó mediante las gráficas de Ramachandran elaboradas con el programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) disponible en el servidor SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Los datos estadísticos arrojados por las gráficas que se consideraron son el factor G y la localización de los residuos en las gráficas.

2.3.5 Análisis de la estructura secundaria por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar de manera experimental las diferencias entre las estructuras secundarias de rCHH-B1 y rCHH-B2, se hizo un análisis de los péptidos purificados por espectroscopia FTIR, para lo cual se liofilizaron 50 µg de cada péptido recombinante y se resuspendieron en óxido de deuterio (agua deuterada) a una concentración final de ~5 mg/mL.

Los espectros IR de los neuropéptidos así como del agua deuterada fueron obtenidos utilizando un espectrómetro FTIR Cary 630 (Agilent Technologies) equipado con una prensa de muestra y un accesorio ATR de cristal de diamante. Las condiciones de barrido fueron programadas con el software MicroLab FTIR (Agilent Technologies) de la siguiente manera:

- Intervalo espectral: 2000-1300 cm^{-1}
- Barridos de señal: 32
- Barridos de muestra: 32
- Resolución: 2 cm^{-1}
- Apodización: HappGendel

Los análisis de los espectros IR se realizaron con el software Resolutions Pro FTIR Spectroscopy, versión 5.2.0 (Agilent Technologies), en los cuales primeramente se realizó la substracción del espectro del hidróxido de deuterio al espectro de cada neuropéptido con un factor de 1. Posteriormente se suavizaron los espectros con una función boxcar de 11 puntos. Después, se definió la región espectral correspondiente a la banda amida I, y el espectro en dicha región se deconvolucionó con un factor $K= 2.5$ y $HW= 13$, y finalmente se definieron las bandas en esa región (picos) con una sensibilidad de 8.

2.4 Resultados

2.4.1 Expresión de rCHH-B1 y rCHH-B2 en *Pichia pastoris*

Los análisis de los sobrenadantes de los cultivos de inducción por Tricina-SDS-PAGE presentaron bandas de ~10 kDa cercanas al tamaño esperado para rCHH-B1 (8.8221 kDa) (Fig. 7) y rCHH-B2 (8.6177 kDa) (Fig. 8) en aquellos con medio BMMY y metanol. Las bandas presentaron una mayor intensidad en los cultivos de la cepa X-33-CHH-B1a con 1% de metanol en el día 2 y 2% de metanol en los días 1 y 2. Estas bandas no se observaron en los sobrenadantes de cultivo con medio BMMH y metanol. Por otra parte, no se observaron bandas en los cultivos de las cepas sin transformar (Fig. 9). Además, en los cultivos de inducción en medio rico con metanol se observó una baja secreción de proteínas adicionales a la de interés.

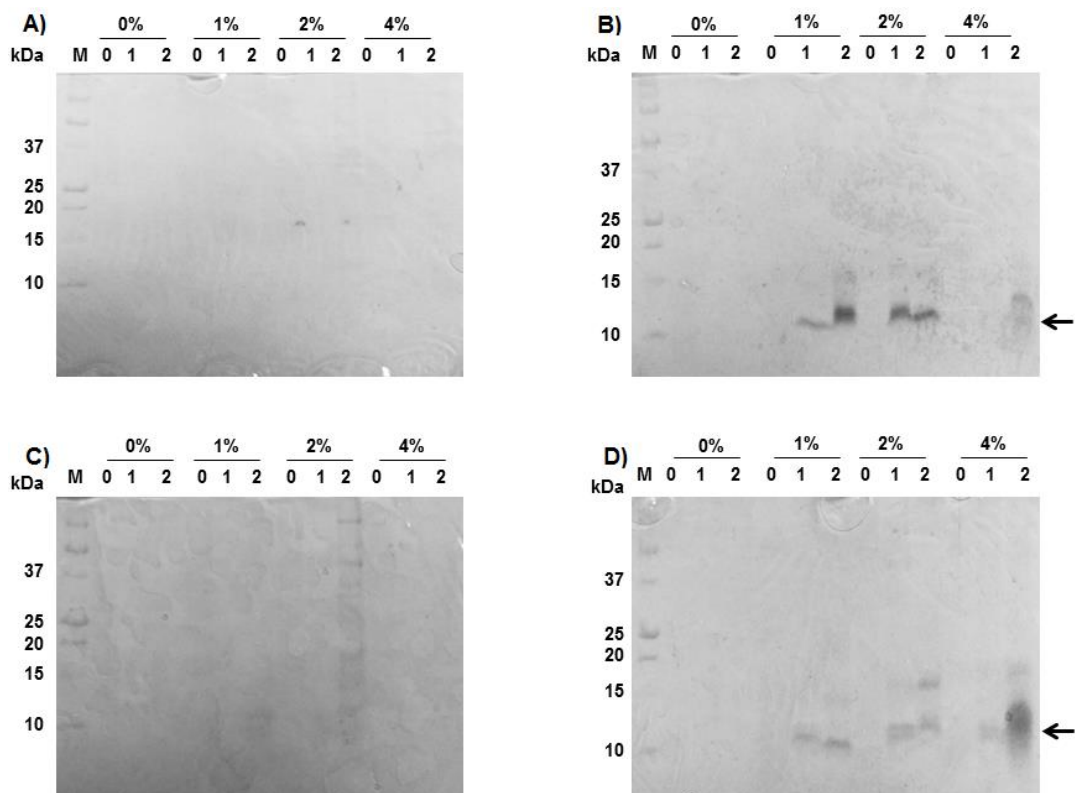


Figura 7. Análisis por Tricina-SDS-PAGE de la expresión de rCHH-B1 en *P. pastoris*. En todos: M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards; 0-4%, porcentaje de metanol; 0-2, días de inducción. A), X-33-CHH-B1a en medio BMMH; B), X-33-CHH-B1a en medio BMMY; C), SMD1168H-CHH-B1a en medio BMMH. D), SMD1168H-CHH-B1a en medio BMMY. Las flechas indican las bandas de interés.

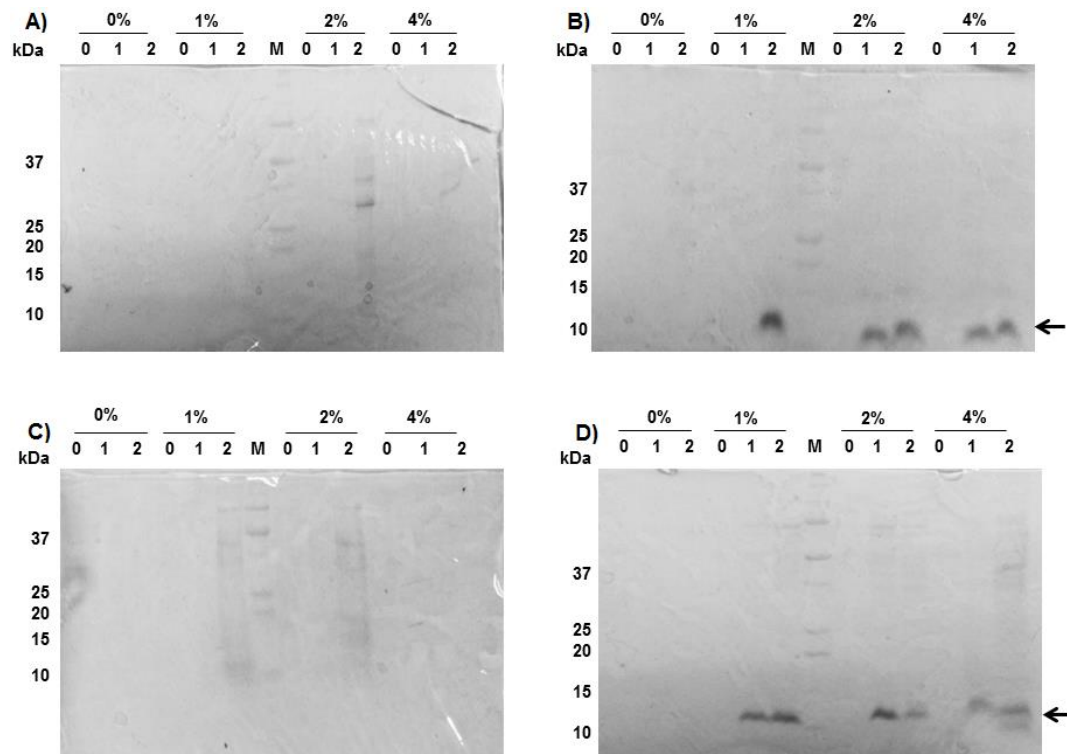


Figura 8. Análisis por Tricina-SDS-PAGE de la expresión de rCHH-B2 en *P. pastoris*. En todos: M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards; 0-4%, porcentaje de metanol; 0-2, días de inducción. A), X-33-CHH-B2b en medio BMMH; B): X-33-CHH-B2b en medio BMMY; C), SMD1168H-CHH-B2b en medio BMMH. D), SMD1168H-CHH-B2b en medio BMMY. Las flechas indican las bandas de interés.

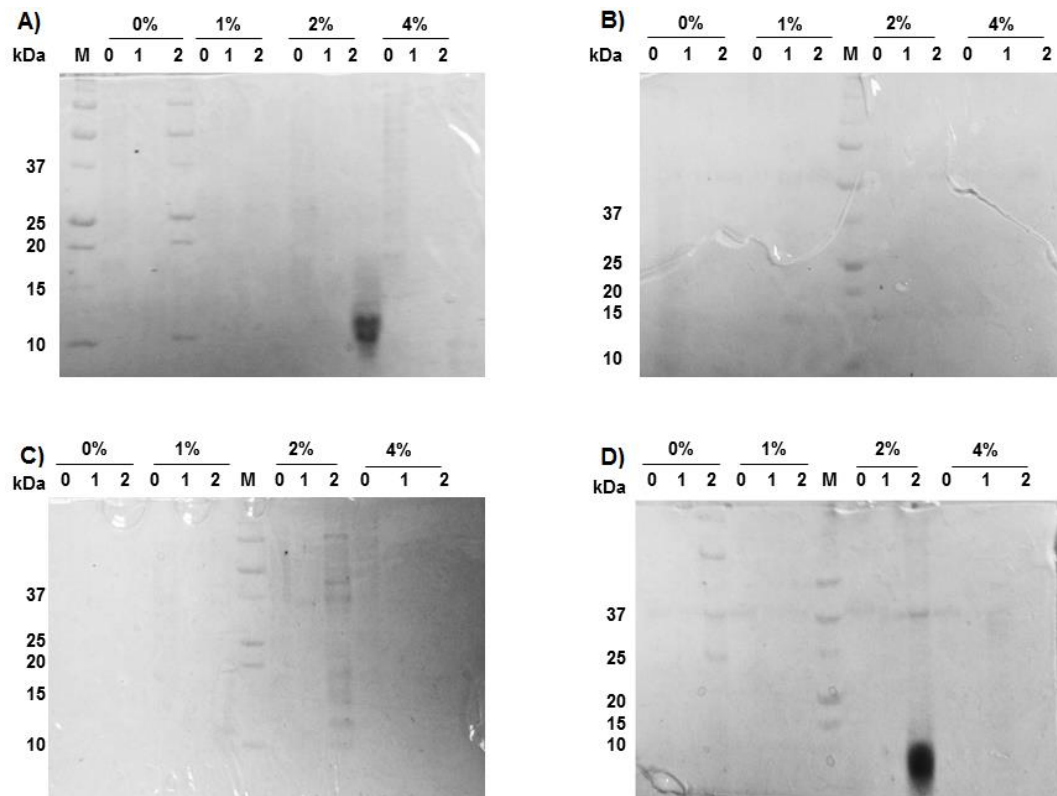


Figura 9. Análisis por Tricina-SDS-PAGE de la expresión de proteínas en las cepas de *P. pastoris* sin transformar. En todos: M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards; 0-4%, porcentaje de metanol; 0-2, días de inducción. A), X-33 en medio BMMH; B): X-33 en medio BMMY; C), SMD1168H en medio BMMH. D), SMD1168H en medio BMMY. Las flechas indican las bandas de interés.

El análisis con el anticuerpo anti-CHH-B permitió identificar ambas neurohormonas en los sobrenadantes de los cultivos en medio BMMY con metanol, confirmando una mayor expresión en la cepa X-33-CHH-B1a con 2% de metanol. Para rCHH-B1 (Fig. 10A), la expresión fue muy similar entre los días 1 y 2 de inducción, por lo cual se decidió seleccionar como condiciones de expresión de rCHH-B1 la cepa X-33-CHH-B2b en medio BMMY con 2% de metanol por 24 h con base en el tiempo más corto para producir una cantidad significativa de péptido recombinante.

Para rCHH-B2 (Fig. 10B), el Western blot reveló una mayor expresión del péptido después de 48 h de inducción, por lo cual se eligió esta condición para la producción de rCHH-B2.

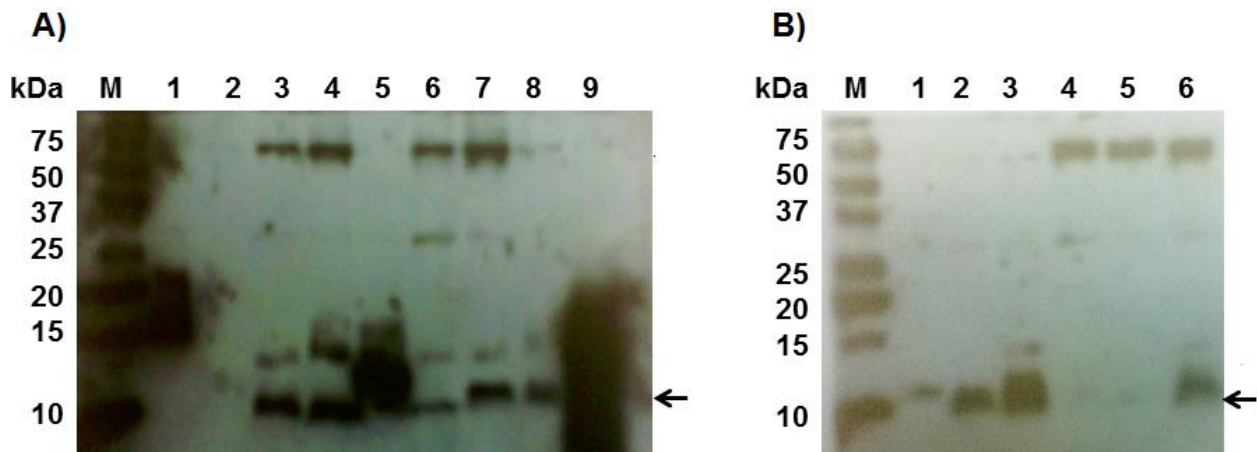


Figura 10. Análisis por Western-blot de las muestras en medio BMMY con el anticuerpo anti-CHH-B. A): 1, rCHH-B1_{His} purificada (control +); 2, X-33 sin vector (2% de metanol, día 2); 3-4, X-33-CHH-B1a (2% metanol, días 1-2); 5, SMD1168H sin vector (2% de metanol, día 2); 6, SMD1168H/CHH-B1 (1% de metanol, día 2); 7-8, SMD1168H-CHH-B1a (2% de metanol, días 1-2); 9, péptido sintético (control +). B): 1, X-33-CHH-B2b (1% de metanol, día 1); 2-3, X-33-CHH-B2b (2% de metanol, día 1-2); 4, SMD1168H-CHH-B2b (1% de metanol, día 1); 5-6, X-33-CHH-B2b (2% de metanol, día 1-2). En ambas: M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad). Las flechas indican las bandas de interés.

2.4.2 Purificación de los péptidos recombinantes

Los péptidos recombinantes fueron concentrados y purificados parcialmente mediante precipitación con SA, seguido por una separación selectiva por RP-HPLC.

De acuerdo con el cromatograma (Fig. 11A) en la muestra X-33-CHH-B1a las fracciones F3 (25-30% de B) y F4 (30-35% de B) presentaron los picos más prominentes y presentaron la señal más intensa en el análisis por Dot blot. El análisis de Western blot (Fig. 12A) confirmó que F3 y F4 contenían una mayor cantidad del péptido rCHH-B1 como una mezcla de 2 bandas: la del tamaño esperado y una banda adicional de ~15 kDa observada en análisis anteriores. Por otro lado, a pesar de que las fracciones 5 y 6 indicaron un resultado positivo en el análisis por Dot blot, en el análisis por Western blot se obtuvo un resultado negativo para las bandas de interés.

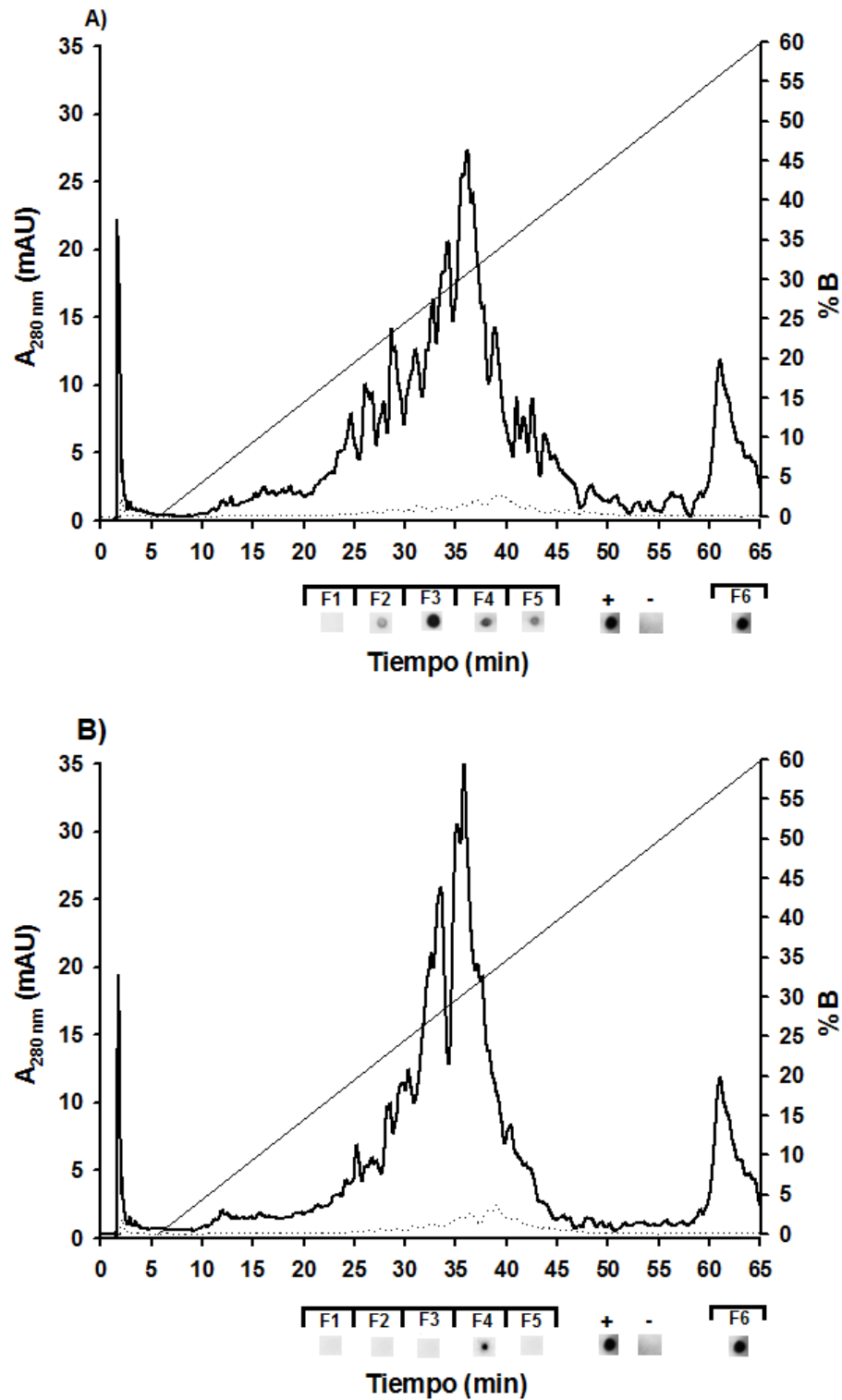


Figura 11. Cromatograma de la separación de los concentrados por SA. A), X-33-CHH-B1a; B), X-33-CHH-B2b. En ambos: F1-F6, Dot blot de las fracciones 1-5; +, péptido sintético como control +; -, PBS 1X como control negativo. La línea transversal indica el gradiente lineal de elución.

Por otro lado, el cromatograma de la muestra X-33-CHH-B2b (Fig. 11B) indicó que las fracciones F3 y F4 presentaron los picos más definidos. Sin embargo, por Dot blot la proteína sólo se detectó en la F4, la cual de acuerdo con el Western blot (Fig. 12B) contenía la mayor parte de rCHH-B2, a pesar de que en F5 también se observó la banda de interés, aunque más tenue. En este caso también, aunque la F6 dio una señal positiva en el Dot blot, en el Western blot no se observó ninguna banda de interés.

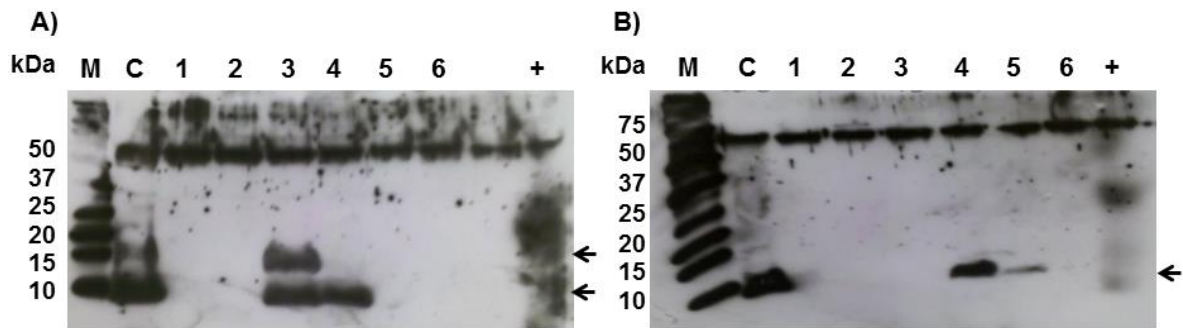


Figura 12. Análisis por Western blot de las fracciones separadas por RP-HPLC. A), X-33-CHH-B1; B), X-33-CHH-B2. En ambas: M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad); C, concentrado por SA; F1-F6, fracciones 1-6; +, péptido sintético (control +). Las flechas indican la proteína de interés.

El análisis por Tricina SDS-PAGE del péptido purificado rCHH-B1 (Fig. 13A) reveló que la mezcla de fracciones con rCHH-B1 sólo contenía las dos bandas que previamente fueron detectadas por el anticuerpo. El cromatograma del péptido purificado (Fig. 13B) indicó la presencia de dos picos definidos que podrían corresponder a ambas bandas, sin embargo, también señaló la presencia de al menos un pico minoritario adicional.

Por otro lado, en el análisis por Tricina SDS-PAGE del péptido rCHH-B2 (Fig. 14A) se observó únicamente la banda de tamaño esperado, lo cual correspondió con el único pico observado en el cromatograma (Fig. 14B).

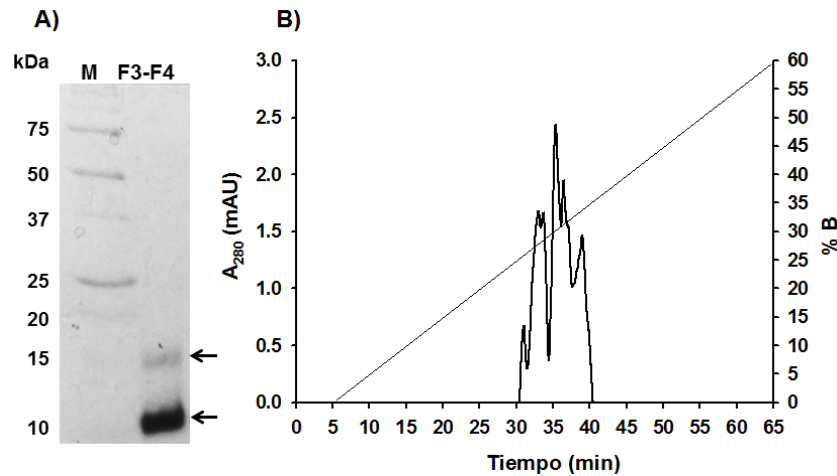


Figura 13. Análisis del péptido purificado rCHH-B1. A) Análisis por Tricina-SDS-PAGE. B) Perfil Cromatográfico de las fracciones que contienen las neurohormonas. En A): M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); F3-F4, pool de fracciones que contienen el neuropéptido recombinante. Las flechas indican las bandas de interés. En B): La línea transversal indica el gradiente de elución.

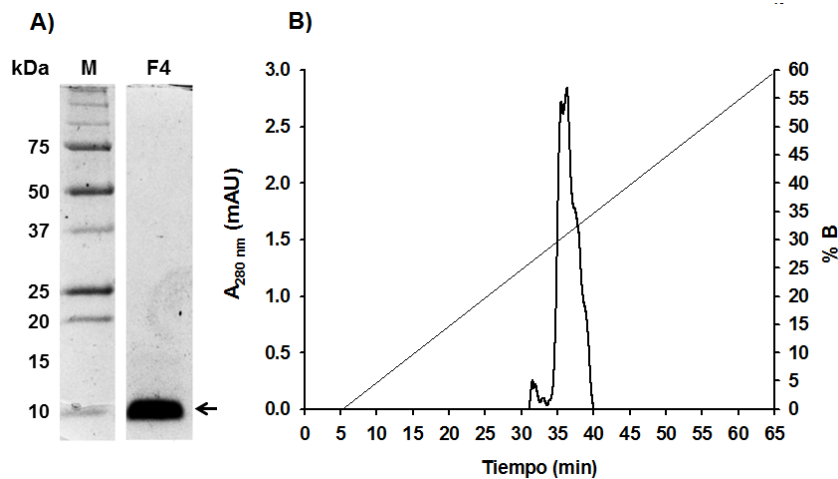


Figura 14. Análisis del péptido purificado rCHH-B2. A) Análisis por Tricina-SDS-PAGE. B) Perfil Cromatográfico de las fracciones que contienen las neurohormonas. En A): M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); F4, fracción que contiene el neuropéptido recombinante. La flecha indica la banda de interés. En B): La línea transversal indica el gradiente de elución.

Los resultados de la secuenciación N-terminal de las bandas de ~10 y ~15 kDa de rCHH-B1 y la banda ~10 kDa de rCHH-B2 revelaron la presencia de la secuencia DTFDHS que correspondió a los primeros 6 residuos de la secuencia de los péptidos recombinantes. Sin embargo, en la muestra rCHH-B1, se encontró la secuencia adicional

GLOGTA donde O es (4-hidroxi-prolina), la cual correspondió al 2.8% de la proteína de la banda de ~10 kDa y el 14.9% de la banda de ~15 kDa.

El alineamiento de la secuencia adicional con secuencias de proteínas depositadas en GenBank demostró un 100% de identidad con las posiciones 3-8 de una secuencia parcial identificada como alfa-2 pro-colágeno humano (GenBank: AAA51857.1). Sin embargo al ser alineada solamente con las secuencias de proteínas de *P. pastoris*, también presentó un 100% de identidad con diversas proteínas, por ejemplo una proteína hipotética en las posiciones 112-116 (XP_002493343.1) y fosfatidilserina sintasa (XP_002490079.1) en las posiciones 235-239.

Finalmente, el rendimiento de la purificación de rCHH-B1 fue de 7 mg/L, mientras que para rCHH-B2 fue de 2.3 mg/L.

2.4.3 Amidación del C-terminal de rCHH-B2

De acuerdo con el cromatograma de los productos de la reacción de amidación (Fig. 15), se observaron dos picos entre los 30-40 min de corrida del producto. En análisis previos, anteriormente se comprobó que el péptido rCHH-B2 eluye alrededor de los 35 minutos de corrida, por lo tanto el primer pico podría corresponder a la forma del péptido sin amidar y el segundo producto, que eluyó antes de los 40 min, a la forma amidada (rCHH-B2-NH₂). Del total de material inyectado, sólo se recuperaron 16 µg del pico que correspondería a rCHH-B2-NH₂ lo cual equivale a 8% del total, mientras que de la forma no amidada se recuperaron 27 µg lo que representó el 14% de lo incluido en la reacción. Por lo tanto, el rendimiento de la reacción de amidación fue de alrededor de 0.1 mg de rCHH-B2-NH₂ por cada mg de sustrato (rCHH-B2).

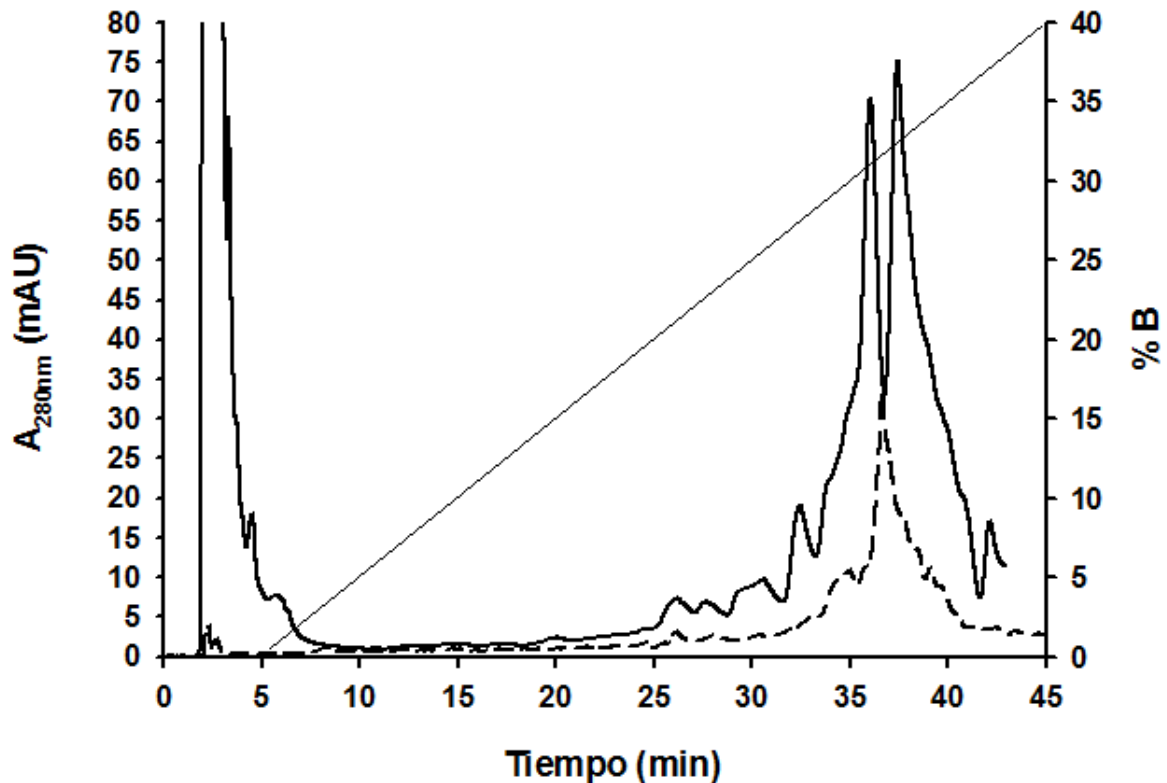


Figura 15. Cromatograma de los productos de la reacción de amidación de rCHH-B2. Línea sólida, reacción de amidación; Línea punteada, rCHH-B2 sin amidar. La línea transversal señala el gradiente de elución.

2.4.4 Análisis bioinformático de los neuropéptidos

2.4.4.1 Alineamiento y dendograma de secuencias

El alineamiento múltiple entre secuencias CHH/CHH-L de diferentes crustáceos (Fig. 16) reveló que la mayoría de los residuos conservados en la secuencia consenso estuvieron ubicados entre las posiciones 1-40 en la región N-terminal y que la mayor parte de las diferencias estaban localizadas hacia la región C-terminal. Por otro lado, la región C-terminal presentó mayor variabilidad entre los péptidos CHH-L que entre los péptidos CHH. Ambas isoformas presentaron mayor similitud con otros péptidos CHH/CHH-L de carídeos y astácidos. El péptido CHH-B1, presentó un mayor porcentaje de identidad con los péptidos CHH-L de *Pandalopsis japonica* (54.6%), *Macrobrachium rosenbergii* (52%), y con los péptidos CHH-1-L (54%) y CHH-2-L (50%) de *Procambarus clarkii*.

Por otro lado CHH-B2 presentó mayor similitud con las isoformas CHH de *P. japonica* y *M. rosenbergii* (72.9%). Además, es importante señalar que esta isoforma presentó en general valores de identidad igual o superiores del 50% con las demás isoformas CHH y con dos isoformas CHH-L: PjCHH1PO de *P. japonica* (52%) y Prc-CHH2-L (50%) de *P. clarkii*.

El dendograma elaborado con las secuencias CHH/CHH-L (Fig. 18) reveló una separación de los péptidos en dos subgrupos: uno conformado por los péptidos CHH/CHH-L de cangrejos (Infraorden: Brachyura) y el otro compuesto por las hormonas de astácidos, peneidos y carídeos.

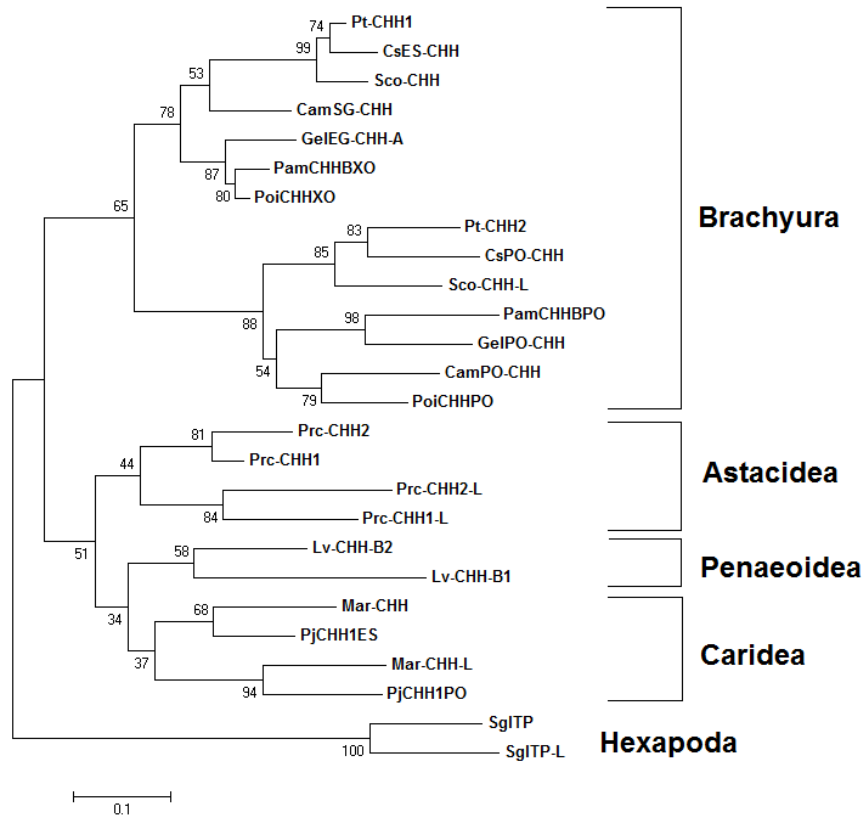


Figura 17. Dendrograma de las secuencias de isoformas CHH/CHH-L. Pam, *P. marmoratus*; Pt, *P. trituberculatus*; Cs, *C. sapidus*; Gel, *G. lateralis*; Cam, *C. maenas*; Sco, *S. olivacea*; Mar, *M. rosenbergii*; Prc, *P. clarkii*; Pj, *P. japonica*; Lv, *L. vannamei*; Sg, *S. gregaria*. Los números representan los valores bootstrap de las ramas.

Por otra parte, el dendrograma sugirió que las isoformas de *L. vannamei* guardan una mayor cercanía filogenética con los péptidos CHH/CHH-L de carídeos, aun cuando este resultado se debe interpretar con cautela pues el valor de bootstrap de la rama interna de dicho subgrupo es menor a 50. Sin embargo, éstos resultados parecen indicar que los péptidos de *L. vannamei* tienen un alto grado de diferenciación a nivel de secuencia con respecto a los péptidos CHH/CHH-L de braquiuros.

2.4.4.2 Propiedades físicas y químicas

A pesar de que ambos péptidos contaron con un 100% de identidad en los primeros 40 aminoácidos de su secuencia, éstos difieren teóricamente en sus propiedades físicas y químicas (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas teóricas de las isoformas recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 estimadas con ProtParam.

Propiedad	rCHH-B1	rCHH-B2
Aminoácidos	73	74
Peso molecular (kDa)	8.8822	8.6177
Punto isoeléctrico (PI)	8.99	4.72
Residuos con carga positiva (Asp +Glu)	10	13
Residuos con carga negativa (Arg + Gly)	15	9
Coeficiente de extinción a 280 nm (Cys formando cistinas) ($M^{-1} C^{-1}$)	7825	9315
Índice alifático	63.97	80.00
Gran promedio de hidropaticidad (GRAVY)	-0.596	-0.310
Tiempo de vida media (en levaduras) (min)	3	3
Índice de inestabilidad	40.52	20.48

Entre las diferencias importantes entre ambas isoformas están en los PI. El PI de CHH-B2 está muy por debajo del PI de CHH-B1. Por otra parte el índice alifático, representa el volumen ocupado por cadenas laterales alifáticas en el polipéptido (Ala, Val, Ile, Leu) y en términos de termoestabilidad debe interpretarse como un valor positivo, por lo que resultó más alto para CHH-B2 que para CHH-B1.

Por otro lado el índice GRAVY es un indicador de la hidrofobicidad de una cadena polipeptídica, el cual se interpreta de manera positiva, por lo cual teóricamente CHH-B2 es más hidrofóbica que CHH-B1.

Finalmente, el índice de estabilidad debe interpretarse de manera negativa, lo cual sugiere que CHH-B2 es más estable *in vitro* que CHH-B1.

2.4.4.3 Estructura secundaria y tridimensional

La predicción de estructura secundaria (Tabla 2) sugirió que rCHH-B2 posiblemente contiene una mayor cantidad de aminoácidos en estructura de α -hélice y lámina β con respecto a rCHH-B1.

Tabla 2. Análisis predictivo del contenido de estructuras secundarias de los péptidos recombinantes.

Péptido	Residuos en α -hélice (aminoácidos, %)	Residuos en lámina β (aminoácidos, %)	Residuos en giros (aminoácidos, %)
rCHH-B1	38, 51.2	62, 84.9	7, 9.6
rCHH-B2	39, 53.4	66, 90.4	6, 8.2

Por otro lado, la conectividad predicha entre Cys fue la misma entre rCHH-B1 y rCHH-B2: (Cys 1-5), (Cys 2-4), (Cys 3-6). Las posiciones moleculares de los enlaces en ambos casos fueron: Cys⁷-Cys⁴³, Cys²³-Cys³⁹, Cys²⁶-Cys⁵².

Finalmente las estructuras tridimensionales modeladas por homología utilizando como molde la MIH de *M. japonicus* (Fig. 18), sugieren que ambos péptidos tienen una estructura tridimensional conformada por 4 hélices.

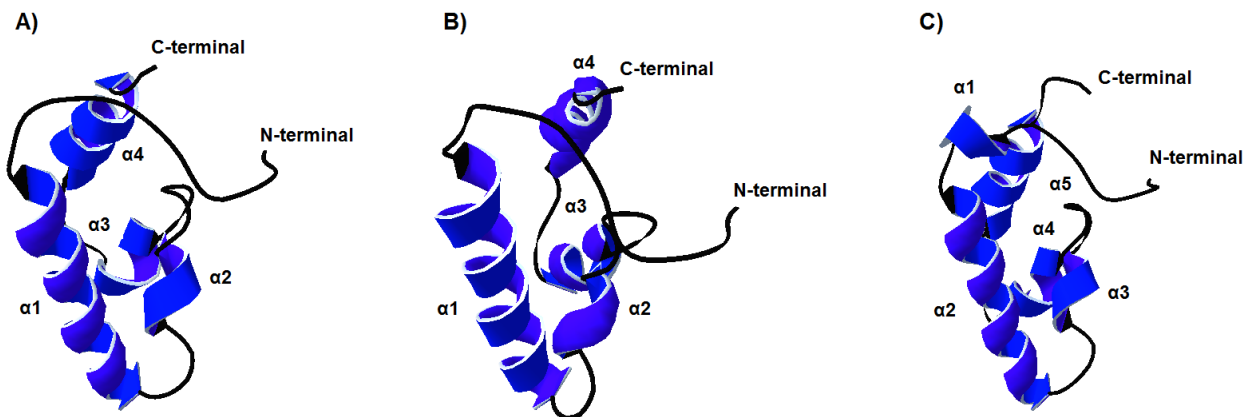


Figura 18. Estructuras tridimensionales de las neurohormonas recombinantes y de Mar-MIH. A), rCHH-B1; B), rCHH-B2; C), Mar-MIH.

El alineamiento de las estructuras (Fig. 19) sugirió que las posiciones y longitudes de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de ambas isoformas son las mismas, ya que están localizadas en el segmento conservado de la región N-terminal. Sin embargo, la hélice $\alpha 3$ en rCHH-B1 aparentemente es más corta (5 residuos) en comparación con rCHH-B2 (7 residuos). Por otro lado, aunque la herramienta de modelado por convencionalidad no consideró la prolina C-terminal de rCHH-B1, la posición de la $\alpha 4$ varía entre ambas hormonas, sin

causadas por su orientación, por lo tanto la conformación de la cadena peptídica es posible (Murray *et al.*, 2003).

Los factores G promedio estuvieron por encima de -0.5 lo que significa que las propiedades estereoquímicas de los modelos pueden considerarse “normales” y que la conformación modelada tiene una alta probabilidad.

Los gráficos de Ramachandran (Fig. 20) revelaron que para ambas isoformas y la estructura templado, todas las hélices predichas por Swiss-Model son dextrógiras. Sin embargo, aunque los gráficos generados con PROCHECK concuerdan con lo anterior, contradictoriamente demostró que la Cys⁴³ está ubicada en una hélice levógira.

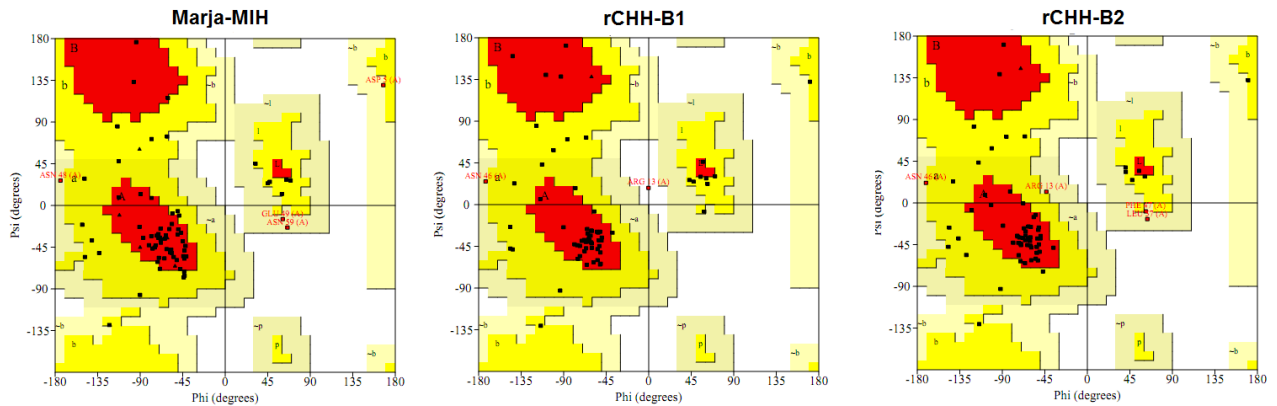


Figura 20. Gráficos de Ramachandran de las estructuras tridimensionales modeladas. Rojo, regiones favorables; amarillo, regiones adicionales permitidas; amarillo pálido, regiones generosamente permitidas; blanco, regiones denegadas. Los residuos de aminoácidos están en puntos negros

2.4.5 Análisis de la estructura secundaria por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los resultados del análisis los espectros IR de las neurohormonas rCHH-B1 (Fig. 21) y rCHH-B2 (Fig. 22), indicaron la presencia de las bandas amida I y amida II características de las proteínas, cuyas asignaciones teóricas estuvieron en las frecuencias de 1600-1690 cm^{-1} y 1480-1575 cm^{-1} , respectivamente (Kong y Yu, 2007).

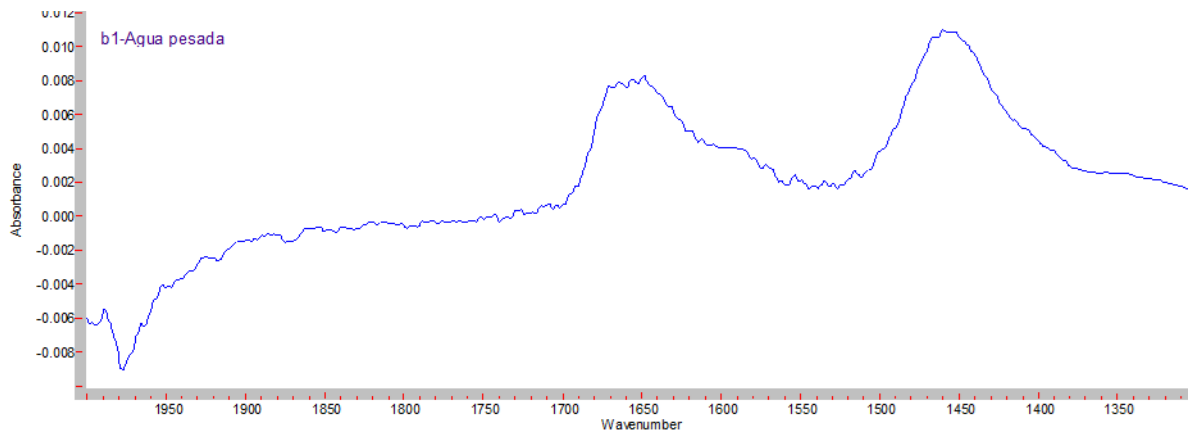


Figura 21. Espectro IR del péptido rCHH-B1.

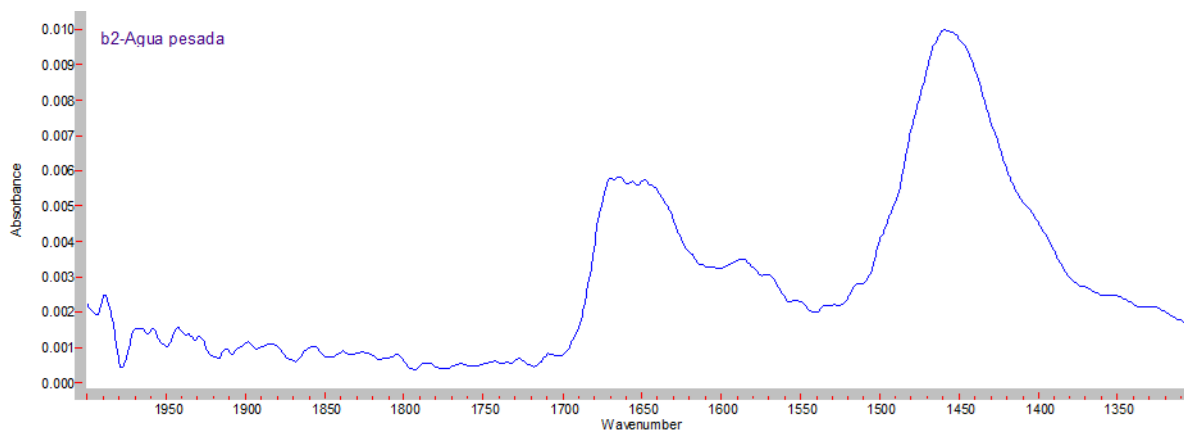


Figura 22. Espectro IR del péptido rCHH-B2.

El espectro de la banda amida I de rCHH-B1 y rCHH-B2 se deconvolucionó y se detectaron un total de 14 bandas (picos) para rCHH-B1 y 13 para rCHH-B2. Las frecuencias, áreas y asignaciones teóricas se encuentran detalladas en la Tabla 4.

Del total de bandas presentes en la banda amida I, sólo 10 correspondieron teóricamente a estructuras secundarias. A partir de las sumatorias de las áreas correspondientes a un mismo tipo de estructura, se estimó la composición en porcentajes de estructuras secundarias en relación al área total, la cual se estimó como la sumatoria de las áreas de cada banda sin importar si tienen una asignación o no (Tabla 5). La rCHH-B2 presentó un mayor porcentaje de alfa hélices en comparación con rCHH-B1.

Tabla 4. Asignaciones teóricas de las bandas que componen la región amida I (Kong y Yu *et al.*, 2007) de los péptidos recombinantes.

rCHH-B1		rCHH-B2		Asignación teórica
Frecuencia (cm ⁻¹)	Área	Frecuencia (cm ⁻¹)	Área	
1604.77	.131	1603.770	.020	-
1611.973	.207	1611.365	.030	-
1619.129	.267	1618.954	.048	-
1626.159	.217	1626.481	.055	Lámina β (1624 ± 4)
1633.099	.210	1633.872	.073	Lámina β (1631 ± 3, 1637 ± 3)
1640.534	.221	1641.409	.098	Hélice α (1641 ± 2)
1649.307	.318	1648.958	.135	Al azar (1645 ± 4) o hélice α (1653 ± 4)
1657.109	.513	1656.516	.165	Hélice α (1653 ± 4)
1664.509	.685	1663.958	.193	Giro β (1663 ± 4)
1671.729	.660	1671.314	.195	Giro β (1671 ± 3)
1678.825	.693	1678.563	.180	Lámina β (1675 ± 5)
1685.911	.482	1685.812	.116	Giro β (1683 ± 2)
1692.860	.350	1693.073	.088	Giro β (1694 ± 2.0)
1699.257	.039	-		-

Tabla 5. Porcentajes de estructuras secundarias de cada péptido recombinante con relación al área total de la banda amida I.

rCHH-B1		rCHH-B2	
Estructura	%	Estructura	%
Hélice α	21.07	Hélice α	28.51
Lámina β	22.43	Lámina β	22.06
Giro β	43.6	Giro β	42.41

2.5 Discusión

Las CHHs son hormonas involucradas principalmente en el metabolismo y aunque cada vez existe mayor evidencia de su implicación en otros procesos fisiológicos, la mayoría de las funciones alternativas asignadas no han sido confirmadas por la falta de evidencia experimental (Lee *et al.*, 2014; Webster, 2015). El desarrollo de péptidos recombinantes favorece el estudio de sus funciones, al permitir obtenerlos en cantidades suficientes para llevar a cabo los ensayos, sin tener que extirpar el tejido endócrino de una gran cantidad de organismos.

En este trabajo, los péptidos recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 con una secuencia idéntica a la de los péptidos maduros nativos, se expresaron en la levadura *P. pastoris* como proteínas secretadas al medio de cultivo. Los análisis corroboraron la expresión de

la banda de tamaño esperado (~10 kDa), que en ambos casos fue mayor en los cultivos de la cepa X-33 en medio enriquecido con metanol. En estos experimentos, se esperaba una mayor expresión en la cepa deficiente en la producción de proteasas, las cuales se liberan al medio de cultivo producto de la muerte celular, y potencialmente pueden degradar el péptido recombinante (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Sin embargo, este tipo de cepas suelen tener tasas crecimiento más bajas que las de genotipo silvestre, lo cual también afecta la producción de la proteína heteróloga (Inan *et al.*, 2004).

La concentración de metanol seleccionada para inducir la expresión fue de 2% por 24 y 48 h para rCHH-B1 y rCHH-B2, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por Sánchez-Castrejón (2007) para el péptido CHH-B1, y por Balderas-González (2014) para el péptido CHH-A, expresados con 2% de metanol durante 48 h.

La purificación de los péptidos recombinantes se realizó en dos pasos: una precipitación con sulfato de amonio seguido de una separación por RP-HPLC. Esta estrategia ha sido utilizada para purificar exitosamente otros péptidos recombinantes de la familia CHH por ejemplo, Pem-CHH-1-3, Pem-MIH1 y Pem-GIH de *P. monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2003; Udomkit *et al.*, 2004; Yodmuang *et al.*, 2004; Treerattrakool *et al.*, 2014). El hecho de que se corroborara la secuencia de los primeros 6 residuos del N-terminal tanto en la banda de 10 como de 15 kDa de las proteínas rCHH-B1 y rCHH-B2, que además de fueron reconocidas por el anticuerpo anti-CHH-B, demostró el procesamiento correcto de la señal de secreción α -factor de los pro-péptidos por la proteasa *KEX2* de *P. pastoris*.

La muestra de proteína rCHH-B1 utilizada para los bioensayos contiene tanto el fragmento de tamaño esperado (~10 kDa) como el de mayor peso molecular (~15 kDa), las cuales contienen la secuencia específica de rCHH-B1. La banda de mayor peso pudo corresponder a agregados no covalentes formados durante la electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Sin embargo, se encontró una secuencia adicional en muy baja proporción en ambas bandas. Los alineamientos con las secuencias depositadas en GenBank, revelaron una coincidencia con colágeno, uno de los componentes de la peptona del medio enriquecido, así como con proteínas de *P. pastoris* que pudieron provenir de la muerte celular durante la fase de inducción. En la muestra de rCHH-B2 no se encontró ninguna secuencia adicional, por lo que probablemente la

proteína adicional eluyó en la fracción F3 como ocurrió en la purificación del péptido rCHH-B1. En la purificación de rCHH-B1 la secuencia adicional estuvo prácticamente ausente en la banda de 10 kDa y se encontró en mayor proporción en la banda de 15 kDa de la fracción F3. La banda de mayor peso molecular a la esperada estuvo ausente en un nivel detectable en la muestra purificada de rCHH-B2.

Para optimizar la purificación del péptido rCHH-B1 podría reexaminarse la expresión en medio mínimo bajo otras condiciones, ya que en trabajos de nuestro grupo se ha logrado expresar en medio mínimo al péptido rCHH-A (Arredondo-Espinoza, 2014; Balderas-González, 2014). Por otro lado, podría modificarse el método de RP-HPLC o utilizar otras técnicas de purificación, como la cromatografía de intercambio iónico o de exclusión molecular, utilizadas también en la purificación de CHHs (Udomkit *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2010).

El rendimiento de la purificación de rCHH-B1 fue 67% mayor que el estimado para rCHH-B2, lo que sugiere que este último péptido presentó una menor expresión bajo las condiciones empleadas. A pesar de esto, los rendimientos de este trabajo son mayores que los reportados para otras CHHs heterólogas expresadas en *P. pastoris*, por ejemplo, Pem-CHH2 y PemCHH3 de *P. monodon* (Udomkit *et al.*, 2004), Pej-SGP-III de *M. japonicus* (Ohira *et al.*, 2003), y rCHH-A_{His} de *L. vannamei* (Arredondo-Espinoza, 2014). Sin embargo, el rendimiento en este trabajo fue menor al obtenido por nuestro grupo de trabajo con la isoforma rCHH-A (Balderas-González, 2014) pero comparable con lo reportado para rCHH-B1_{His} (Sánchez *et al.*, 2008), ambas de *L. vannamei*.

El péptido rCHH-B2 fue amidado *in vitro*. Los productos de la reacción de amidación difirieron en hidrofobicidad como reflejan sus tiempos de retención en el HPLC. Algunos autores señalan que esta modificación incrementa la hidrofobicidad de los péptidos al prevenir la ionización del C-terminal (Prigge *et al.*, 2000; Zhong y Wright, 2013), por lo tanto el pico de mayor tiempo de retención podría corresponder al péptido amidado. Sin embargo, es necesario confirmar este resultado empleando técnicas como la espectrometría de masas (An *et al.*, 2012).

El análisis de las secuencias de isoformas CHH/CHH-L provenientes de genes *chh* tipo I, reveló que la mayor parte de las diferencias entre los péptidos CHH/CHH-L se

encuentran después de los primeros 40 residuos hacia la región C-terminal. Invariablemente, en todas las especies donde se ha encontrado este tipo de estructura de genes, estos aminoácidos están compartidos entre los pares de isoformas (Dircksen *et al.*, 2001; Toullec *et al.*, 2006; Lestón *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que las isoformas CHH, que principalmente se expresan en el OX, presentan un C-terminal amidado y cuentan con actividad hiperglucémica e/o inhibidora de la muda; mientras que por otro lado, los péptidos CHH-L se expresan predominantemente en el sistema nervioso periférico, tienen un C-terminal libre y carecen de actividad hiperglucémica, por lo cual podrían presentar otras funciones (Montagné *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014). Controversialmente, se ha determinado que CHH-B1 de *L. vannamei* presenta una alta expresión de sus ARNm en el pedúnculo ocular (Lago-Lestón *et al.*, 2007), y una versión recombinante (rCHH-B1_{HIS}) presentó actividad hiperglucémica *in vivo* (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008). Por lo tanto, las CHH/CHH-L de peneidos podrían tener características estructurales y funcionales diferentes con respecto a las CHHs de otros crustáceos estudiados a la fecha.

Esta hipótesis coincide con los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos realizados por otros autores utilizando datos morfológicos, embriológicos y moleculares ya que señalan que el suborden Dendrobranchiata, al cual pertenecen los peneidos, es un taxón monofilético, y distinto a los demás decápodos integrados en el suborden Pleocyemata (Martin y Davis, 2001). Estas relaciones, se ven reflejadas en el árbol filogenético elaborado con las secuencias, donde las isoformas de *L. vannamei* forman un solo subgrupo y son más cercanos a las CHHs de Caridea (Pleocyemata). Sin embargo, estos resultados deben manejarse con reserva, ya que los valores de bootstrap son sólo altamente probables (>70%) para el grupo de los braquiuros, quizás porque contó con el mayor número de secuencias.

No obstante, se ha sugerido que las secuencias CHH/CHH-L de peneidos tienden a ser más variables, y por lo tanto en términos de actividad podrían ser diferentes a las de otros crustáceos (Webster, 2015). Con el auge de las técnicas de secuenciación masiva y de la espectrometría de masas se espera que en los próximos años se describan los transcriptomas y proteomas de los tejidos neuroendócrinos de diferentes

especies y que las anotaciones de secuencias de péptidos CHH/CHH-L de peneidos y crustáceos en general incrementen en las bases de datos.

Los péptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 difirieron teóricamente en sus propiedades. Por ejemplo, según el análisis rCHH-B1 presentó un PI ligeramente más básico que el pH de la hemolinfa (pH 7.3) (Vargas-Albores *et al.*, 1993), mientras que rCHH-B2 tiene un PI mucho más ácido. Al respecto, el PI determina la carga neta de las proteínas en un ambiente fisiológico determinado, lo cual permite predecir su estabilidad (Xia *et al.*, 2007), tiempo de vida media e interacciones proteína-proteína (Dice y Goldberg, 1975), como por ejemplo hormona-receptor. Por otro lado, los análisis demostraron que ambas isoformas tienen diferentes índices de hidropaticidad, lo cual significa que difirieron en la cantidad y posiciones de residuos hidrofóbicos en la cadena peptídica; estos factores se ha sugerido tiene un efecto en su estructura secundaria e interacción con receptores (Krystek *et al.*, 1985). Por lo tanto, en conjunto, los PI y los índices de hidropaticidad sugieren que la manera en la cual los neuropéptidos interaccionan con sus receptores pudiera ser distinta.

Finalmente, los resultados de los índices alifáticos sugirieron diferencias en cuanto la termoestabilidad de los péptidos. Un mayor índice alifático significa que un péptido es más termostable (Ikai, 1980), lo cual fue el caso de CHH-B2 comparando con CHH-B1.

De manera predictiva y experimental ambas isoformas presentaron diferencias en su estructura. Los modelos por homología, revelaron que las dos presentaron las 4 hélices α características de las CHHs (Katayama *et al.*, 2003), sin embargo, difirieron en su extensión, contenido de residuos en esta estructura y localización de las mismas. El péptido rCHH-B2 tuvo un mayor contenido de residuos en estructura de hélice α que rCHH-B1, lo que concuerda con lo obtenido en los análisis predictivos y por FTIR. Las hélices α_1 y α_2 , que corresponden a la región N-terminal, estuvieron en las mismas posiciones, mientras que la hélice α_3 es más corta en rCHH-B1 y la α_4 varió en posición en ambas hormonas. Sin embargo, el modelado *in silico* sólo consideró la secuencia traducida de aminoácidos sin tomar en cuenta modificaciones post-traduccionales como la amidación C-terminal, la cual se ha demostrado incrementa el contenido de hélices α en las rCHHs (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009).

Las proporciones determinadas por FTIR para ambos neuropéptidos se parecen mucho a las obtenidas por dicroísmo circular para algunas CHHs recombinantes, que naturalmente están amidadas pero que fueron expresadas en sus versiones recombinantes sin amidar, por ejemplo, rPej-SGP-I-Gly (29.6 %) (Katayama *et al.*, 2002), rPej-SGP-VII-Gly (23.2%) (Nagai *et al.*, 2009) de *Marsopenaeus japonicus* y AsIrcHH-Gly (21 %) de *Astacus leptodactylus* (Mosco *et al.*, 2008). Sin embargo, en todos estos casos, la amidación *in vitro* elevó el contenido de esa estructura secundaria en los péptidos recombinantes a valores cercanos a los de los péptidos nativos purificados de la GS, lo cual habrá que validar para la rCHH-B2 amidada.

Es notorio que existieron diferencias entre las estructuras de las isoformas de *L. vannamei* y con otros péptidos CHH/CHH-L de otros crustáceos, sin embargo, estas podrían ser o no relevantes para su actividad biológica. La obtención de estos péptidos recombinantes permitirá la realización de bioensayos para la obtención de datos fisiológicos, que favorezca a la integración de la información estructural con la funcional.

2.6 Conclusiones

Se expresaron las neurohormonas recombinantes con una secuencia de aminoácidos idéntica a la nativa en la levadura *P. pastoris*, seleccionándose como condiciones de expresión 2% de metanol por 24 h para rCHH-B1 y 2% de metanol por 48 h para rCHH-B2, utilizando en ambos casos la cepa X-33 y medio enriquecido.

Los neuropeptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 fueron purificados mediante precipitación por sulfato de amonio y RP-HPLC obteniéndose rendimientos de 7 mg/L y 2.3 mg/L respectivamente. Su identidad, fue corroborada por inmunoensayos utilizando un anticuerpo policlonal con capacidad de reconocimiento del N-terminal y por secuenciación del N-terminal por degradación de Edman.

Los resultados preliminares sugieren que el péptido rCHH-B2 fue amidado *in vitro*. Este resultado se espera sea confirmado en un futuro por espectrometría de masas.

Los análisis de las secuencias de los neuropéptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 sugirieron que estos difieren entre sí y con otros péptidos CHH/CHH-L de otras especies principalmente en la región C-terminal, de las cuales el dendograma sugirió que los péptidos de *L.*

vannamei se encuentran filogenéticamente separados de los de otros crustáceos, sobre todo con respecto a las secuencias de braquiuros.

Los análisis bioinformáticos realizados a partir de la secuencia de aminoácidos y los resultados experimentales obtenidos por FTIR sugieren que los péptidos difieren en sus propiedades y estructuras. Los análisis predictivos y experimentales determinaron que rCHH-B2 tuvo una mayor cantidad de residuos en estructura de hélice α con respecto a rCHH-B1, las cuales variaron en extensión y posición. Lo anterior podría verse reflejado en diferencias funcionales entre ambas isoformas. Habrá que confirmar dichas diferencias con el péptido recombinante amidado y la hormona nativa.

Capítulo 3. Efecto de los péptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 en algunos procesos metabólicos

3.1 Introducción

El primer indicio de que el metabolismo de los crustáceos está bajo control hormonal fue encontrado por Abramowitz *et al.* (1944), quienes observaron que los extractos acuosos de los pedúnculos oculares de *Uca pugilator* provocaban una respuesta hiperglucémica en la hemolinfa de *C. sapidus*. Investigaciones revelaron que tal efecto es estimulado por la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH). La primera CHH completamente secuenciada fue la de *C. maenas* (Kegel *et al.*, 1989) y a partir de entonces se han aislado diversas isoformas de diferentes especies y estudiado su actividad.

La secreción de las CHHs depende de señales tanto internas como externas al organismo (Fig. 23). Se ha propuesto que la actividad de CHH es un mecanismo adaptativo frente a cambios ambientales, los cuales pueden llegar ocasionar estrés. Estas señales, activan la secreción de sustancias neurotransmisoras (por ejemplo, aminas biogénicas), las cuales de manera selectiva estimulan o inhiben a las células secretoras de CHHs (Webster *et al.*, 2012).

Aunque se ha demostrado que la expresión de CHHs ocurre en diferentes tejidos, el modelo actual de su mecanismo de acción principal está basado en lo descrito para OX-GS. Las células neurosecretoras funcionan mediante un sistema de retroalimentación negativa, donde niveles bajos de glucosa en la hemolinfa estimulan la liberación de la hormona, la cual a su vez activa a una guanilato ciclasa de membrana en los tejidos diana (músculo y hepatopáncreas, principalmente) incrementando la concentración de GMPc como segundo mensajero (Fig. 23). Estudios sugieren que la cascada de señalización incrementa la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa para romper el glucógeno, y que también suprime su síntesis inhibiendo la actividad de la glucógeno sintasa (Fanjul-Moles, 2006).

Por otro lado, se ha sugerido que niveles altos de glucosa en la hemolinfa funcionan como señal inhibitoria de la secreción de la hormona, y que además existe un segundo sistema por retroalimentación positiva, donde el lactato acumulado por una glucólisis intensa induce la secreción de la hormona (Fanjul-Moles, 2006).

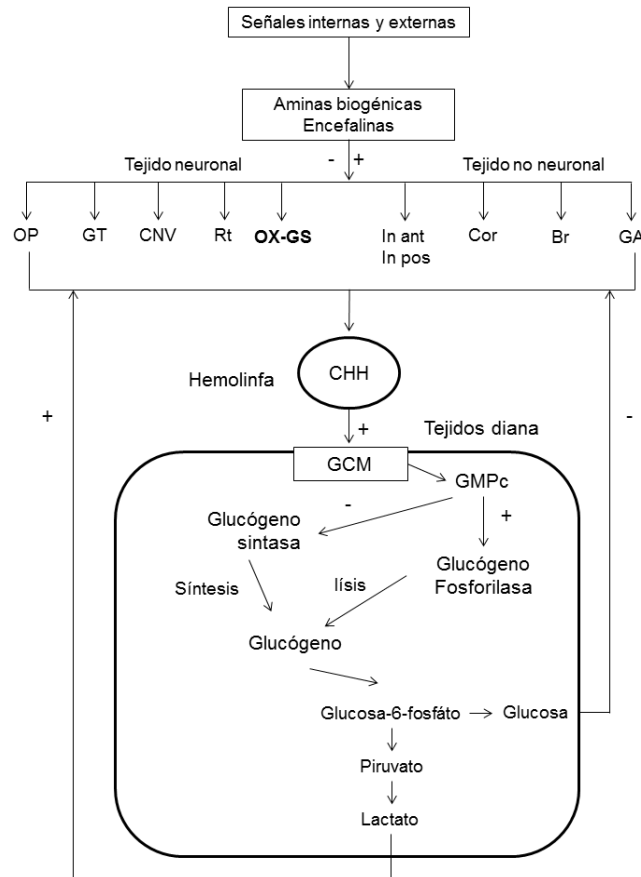


Figura 23. Modelo de la regulación de las secreción de la CHH. +, estimulación; -, inhibición; OP, órgano pericárdico; GT, ganglio torácico; CNV, cordón nervioso ventral; Rt, retina; OX-GS, complejo OX-GS; In ant, intestino anterior; In pos, intestino posterior; Cor, corazón; Br, branquias; GA, glándula antenal; GCM, guanilil ciclasa membranal; GMPc, guanosín monofosfato cíclico. Modificado de Fanjul-Moles (2006).

La CHH como muchos neuropéptidos es pleiotrópica, y se han propuesto diversas funciones en procesos como la muda, el crecimiento, la reproducción, el balance iónico y la absorción de agua (Webster, 2015).

Existen indicios de que la CHH, además de estar involucrada en el metabolismo de la glucosa, pudiera estar involucrada en el metabolismo de otras biomoléculas como los lípidos. En cangrejos, la inyección de hormona provoca la movilización de varias clases de lípidos desde sus reservas a la hemolinfa (Santos *et al.*, 1997).

La forma clásica de evaluar la actividad de las CHHs nativas purificadas parcial o totalmente, se realiza de manera similar al esquema propuesto por Kleinholz y Keller (1973), en el cual se inyecta el material que contiene la hormona a especímenes

mantenidos en ayuno previo, y alrededor de 1-2 horas post-inyección se les extrae hemolinfa para determinar los niveles de glucosa. A los organismos control comúnmente se les inyecta solución salina (Fingerman y Radhakrishnan, 1986). Este tipo de ensayo también es utilizado para probar la actividad de rCHHs (Gu *et al.*, 2000; Ohira *et al.*, 2003; Udomkit *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha sugerido que la actividad hiperglucémica de las CHHs se ve influenciada por la amidación del C-terminal (Katayama *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2010). Trabajos con péptidos rCHHs que de manera nativa presentan esa modificación, han revelado que las versiones sin amidar tienen menor actividad hiperglucémica en comparación de versiones amidadas *in vitro*. Por lo tanto, es importante evaluar el papel de esta modificación sobre la actividad rCHH-B2 (la cual teóricamente presenta un C-terminal amidado), utilizando péptidos recombinantes amidados *in vitro*.

En el presente capítulo se realizaron una serie de experimentos con las versiones recombinantes de las isoformas CHH-B1, CHH-B2, y CHH-B2 amidada con miras a esclarecer su efecto en los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa en *L. vannamei*.

3.2 Objetivos

1. Evaluar la actividad hiperglucémica de rCHH-B1 y rCHH-B2 en *L. vannamei*.
2. Estudiar el efecto de los péptidos recombinantes sobre los niveles de triglicéridos en la hemolinfa del camarón blanco.
3. Estudiar el papel de la amidación sobre la actividad de rCHH-B2.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Crecimiento y mantenimiento de camarones

Se adquirieron 20,000 post-larvas de *L. vannamei* (PL₁₂) en la granja comercial Acuacultura Mahr (La Paz, B.C.S, México), las cuales se distribuyeron en estanques de 2000 L con agua de mar (26 °C, 35 ‰, 5.8 ± 0.5 mg/L de oxígeno disuelto) en un invernadero del CICESE. El fotoperiodo se mantuvo natural y diariamente se realizó un recambio de agua al 100%. Los camarones se alimentaron con dieta comercial con 35%

de proteína correspondiente al 4% de su peso corporal, dividido en 3 raciones diarias durante la etapa de post-larva y en 2 raciones a partir de la etapa juvenil. Los restos de alimento y las heces se removieron diariamente por sifoneo. Los organismos fueron mantenidos en estos estanques hasta alcanzar la talla requerida para los bioensayos de actividad, los cuales se realizaron en las instalaciones del laboratorio húmedo del departamento de Biotecnología Marina del CICESE, el cual permite realizar experimentos bajo condiciones controladas.

3.3.2. Efecto de los neuropéptidos recombinantes sobre algunas respuestas metabólicas en la hemolinfa

3.3.2.1 Evaluación de la actividad de los péptidos recombinantes

3.3.2.1.1 Condiciones experimentales

Se realizó un ensayo para determinar si los péptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 presentaban actividad hiperglucémica *in vivo* y eran por lo tanto, biológicamente activos. Para ello se seleccionaron 12 juveniles (5.5 ± 1.6 g), los cuales fueron colocados individualmente dentro de contenedores de 3.5 L de capacidad sumergidos dentro de un estanque circular con capacidad para 200 L (Fig. 24). Los organismos fueron aclimatados 7 días en agua de mar bajo las siguientes condiciones: 26 °C, 35 ‰, 5.8 ± 0.5 mg/L de oxígeno disuelto y fotoperiodo natural. Diariamente se realizó un recambio de agua al 100%, se les dio alimento comercial 35% de proteína equivalente al 4% de su peso corporal en dos raciones diarias, y se removieron los restos de heces y alimento de las cubetas.

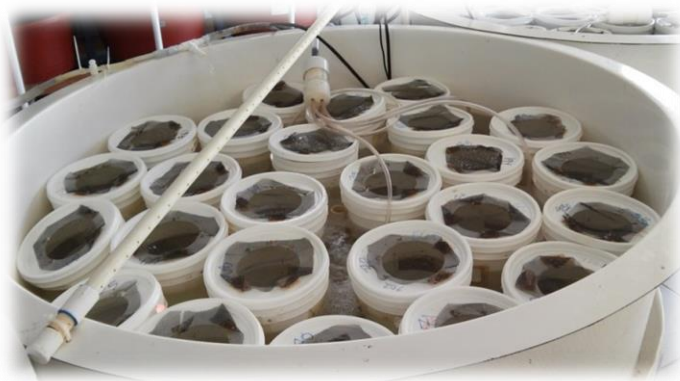


Figura 24. Estanques experimentales de 200 L

3.3.2.1.2 Seguimiento del ciclo de la muda y ablación

Posterior al periodo de aclimatación, se inició el registro del ciclo de muda individual. Un ciclo de muda se determinó como el intervalo de tiempo entre dos eventos de muda consecutivos, representados por la presencia de exuvias en la cubeta. A partir de este dato, la intermuda (estadio C) se estimó como la mitad de ese intervalo. Durante la primera intermuda, se realizó la ablación de un pedúnculo ocular mediante la extirpación desde su base con unas tijeras y la cauterización de la herida (Fig. 25). Durante la segunda intermuda, cada camarón fue incluido en el ensayo con un ayuno previo de 24 h.

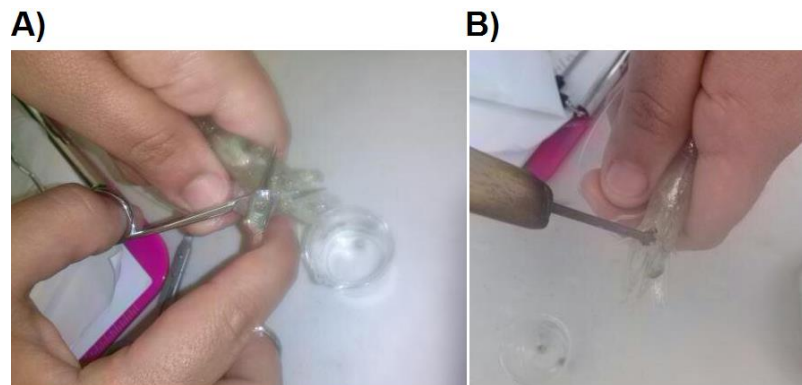


Figura 25. Procedimiento de ablación de pedúnculo ocular. A), Corte; B), cauterización.

3.3.2.1.3 Tratamientos y controles experimentales

Se inyectaron 3 organismos con 5 μg de rCHH-B1 y 3 con rCHH-B2 disueltas en 50 μL de PBS. Cada inyección se realizó con una jeringa hipodérmica estéril de 0.5 mL (31 G) a través de la membrana artrodial en el quinto par de pereopodos. Como control negativo se inyectaron 3 organismos con 50 μL PBS, y como referencia basal de los niveles de glucosa se muestrearon 3 organismos sin inyectar.

3.3.2.2 Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa

3.3.2.2.1 Condiciones experimentales

Se aclimataron 200 camarones sub-adultos (12.9 ± 2.4 g) durante 10 días bajo las condiciones descritas anteriormente (apartado 3.3.2.1.1). En este experimento se les proporcionó dieta comercial enriquecida mezclándola con un 4% de harina de calamar para mejorar la supervivencia de los organismos durante el experimento.

3.3.2.2.2 Seguimiento del ciclo de la muda y ablación

La intermuda se determinó como se mencionó en la sección 3.3.2.1.2. Esta vez los individuos fueron ablacionados bilateralmente, efectuando la extirpación del primer pedúnculo durante la primera intermuda y la del segundo pedúnculo en la siguiente intermuda. Durante ambas ablaciones, los pedúnculos oculares fueron recuperados y se disectaron las GS para realizar la preparación de extractos. Durante la tercera intermuda cada individuo fue incluido en el ensayo con un ayuno previo de 24 h.

3.3.2.2.3 Extractos de glándulas del seno

Las GS congeladas fueron homogenizadas en frío en 1 mL de PBS con un pistilo estéril. El homogenado se centrifugó a $10000 \times g$ y $4^\circ C$ durante 15 min, y el sobrenadante fue recuperado, liofilizado y resuspendido en PBS agregando 50 μL de PBS por cada 2 GS.

3.3.2.2.4 Tratamientos y controles experimentales

El ensayo se realizó con un total de 56 organismos. Se inyectaron lotes de 6-7 organismos con diferentes dosis de rCHH-B1: 5, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 pmol disuelta en 50 μL de PBS, de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.3.2.1.4. Otro grupo de organismos fue inyectado con 50 μL de extracto equivalente a 2 GS. Como control negativo se inyectaron organismos con 50 μL de PBS.

3.3.2.3 Efecto de la dosis y la amidación C-terminal de rCHH-B2 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa

3.3.2.3.1 Condiciones experimentales

Se seleccionaron 137 juveniles (6.9 ± 1.3 g), los cuales fueron aclimatados durante 10 días y mantenidos bajo las condiciones descritas anteriormente (apartado 3.3.2.1.1).

3.3.2.3.2 Seguimiento del ciclo de la muda y ablación bilateral

La intermuda se determinó posterior al periodo de aclimatación según lo descrito en la sección 3.3.2.1.2. En la primera intermuda, se procedió a ablacionar bilateralmente a los organismos. A partir de los pedúnculos extirpados se llevó a cabo la disección de las GS para elaborar extractos según lo descrito en el apartado 3.3.2.2.3, sólo que esta vez se prepararon 50 μ L de PBS por cada 4 GS. Una vez ablacionados, los organismos fueron puestos en ayuno durante 48 h previas al ensayo.

3.3.2.3.3 Tratamientos y controles experimentales

Los bioensayos con la rCHH-B2 se realizaron con un total de 74 organismos, los cuales fueron separados en lotes de 6-13 camarones para ser inyectados con diferentes dosis de rCHH-B2: 5, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 pmol disueltos en 50 μ L de PBS como se indica en el apartado 3.3.2.1.3. Otro grupo de organismos se inyectó con 50 μ L de extracto de 4 GS. Como control negativo un grupo de organismos se inyectó con 50 μ L de PBS. Además, para determinar el efecto de la amidación sobre la actividad hiperglucémica, se inyectó rCHH-B2-NH₂ (ver sección 2.4.3) a una dosis de 100 pmol disuelta en 50 μ L de PBS.

3.3.2.4 Toma de muestras de hemolinfa, procesado y cuantificación de las variables metabólicas

En todos los experimentos descritos anteriormente, 1 hora posterior a la inyección se extrajo hemolinfa de cada organismo con una jeringa hipodérmica estéril de 1 ml (27 G) a través de la parte dorsal del primer segmento abdominal. La hemolinfa se mezcló en proporción 2:1 con “solución salina de camarón” (SSS) (450 mM NaCl, 10mM KCl, 10 mM EDTA.Na, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/Kg) como anticoagulante (Vargas-Albores

et al., 1993). Adicionalmente, a los organismos del ensayo detallado en la sección 3.3.2.1 inyectados con rCHH-B2, se les tomó otra muestra 2 h después de la aplicación del tratamiento. Las muestras se centrifugaron 5 min (855 xg, 4 °C) y el plasma fue recuperado y almacenado a -80 °C hasta su análisis. La cuantificación de la glucosa se realizó con el reactivo Liquid glucose (oxidase) (Pointe scientific), según las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente, en las muestras de los ensayos de dosis-respuesta (apartados 3.3.2.2 y 3.3.2.3) se determinaron los niveles de triglicéridos con el kit Triglyceride (GPO) Liquid (Pointe scientific) según las especificaciones del fabricante.

Todos los análisis de las muestras se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific) con una celda de cuarzo de 1 cm y 10 mm de paso de luz.

3.3.2.5 Análisis estadísticos

Los resultados de los ensayos de actividad biológica se analizaron estadísticamente con el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software). En todos los casos, los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron corroborados mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Debido a que los datos en todos los casos no cumplieron con ambos supuestos, estos fueron analizados mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre tratamientos y controles fueron identificadas mediante una prueba *a posteriori* de Dunn. El nivel de significancia para los análisis fue de $p < 0.05$. Los datos fueron expresados como la mediana \pm el intervalo de confianza (IC) al 95 %.

3.4 Resultados

3.4.1. Efecto de los neuropéptidos recombinantes sobre algunas respuestas metabólicas en la hemolinfa

3.4.1.1 Evaluación de la actividad de los péptidos recombinantes purificados

Mediante un ensayo *in vivo* (Fig. 26) se demostró que ambos péptidos recombinantes expresados en *P. pastoris* y purificados por RP-HPLC presentaron actividad hiperglucémica. Los niveles máximos de glucosa en organismos ablacionados

unilateralmente se obtuvieron a 1 h postinyección: 34.41 ± 2.94 para los organismos inyectados con rCHH-B1 y 30.27 ± 10.60 mg/dL para rCHH-B2. Estos niveles fueron significativamente mayores a los obtenidos en los organismos sin inyectar (10.91 ± 2.40 mg/dL) ~3.2 veces con rCHH-B1 y ~2.8 veces con rCHH-B2, y también a los niveles en los organismos inyectados con PBS (18.21 ± 2.47 mg/dL), ~2 veces mayores con rCHH-B1 y ~1.7 veces mayores con rCHH-B2.

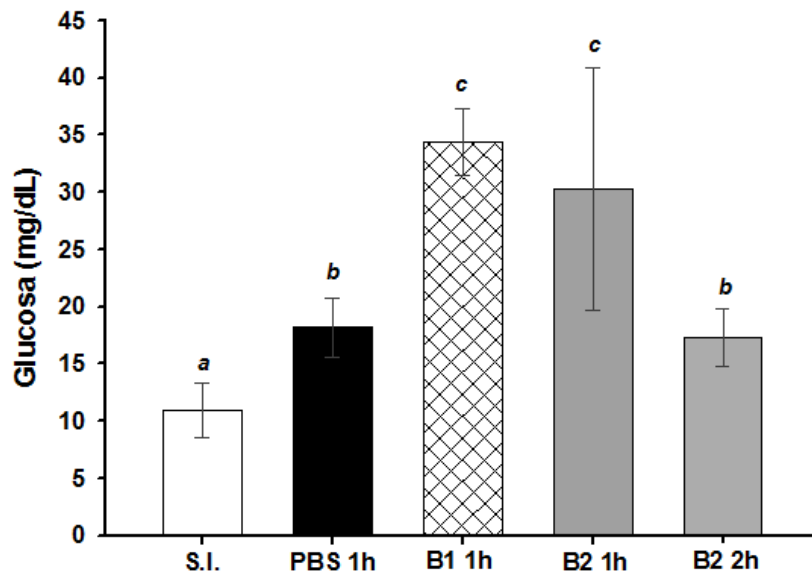


Figura 26. Niveles de glucosa obtenidos en el ensayo de actividad con los péptidos purificados. S.I., control sin inyectar; PBS, PBS 1X; B1, rCHH-B1; B2, rCHH-B2 (1 y 2h post inyección). Los resultados se expresan como las mediana \pm IC al 95%. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.4.1.2 Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa

Los resultados del ensayo de dosis-respuesta para rCHH-B1 (Fig. 27) revelaron que los niveles de glucosa aumentaron significativamente ($p < 0.05$) de manera dependiente a la dosis a partir de 10 pmol (0.09 μ g) de péptido recombinante. La respuesta máxima fue de 24.6 ± 1.0 mg/dL de glucosa con una dosis de 250 pmol (2.21 μ g), la cual fue alrededor de 8 veces más que el control con PBS, y fue similar al efecto de la inyección del extracto de glándulas del seno (25.8 ± 1.8 mg/dL).

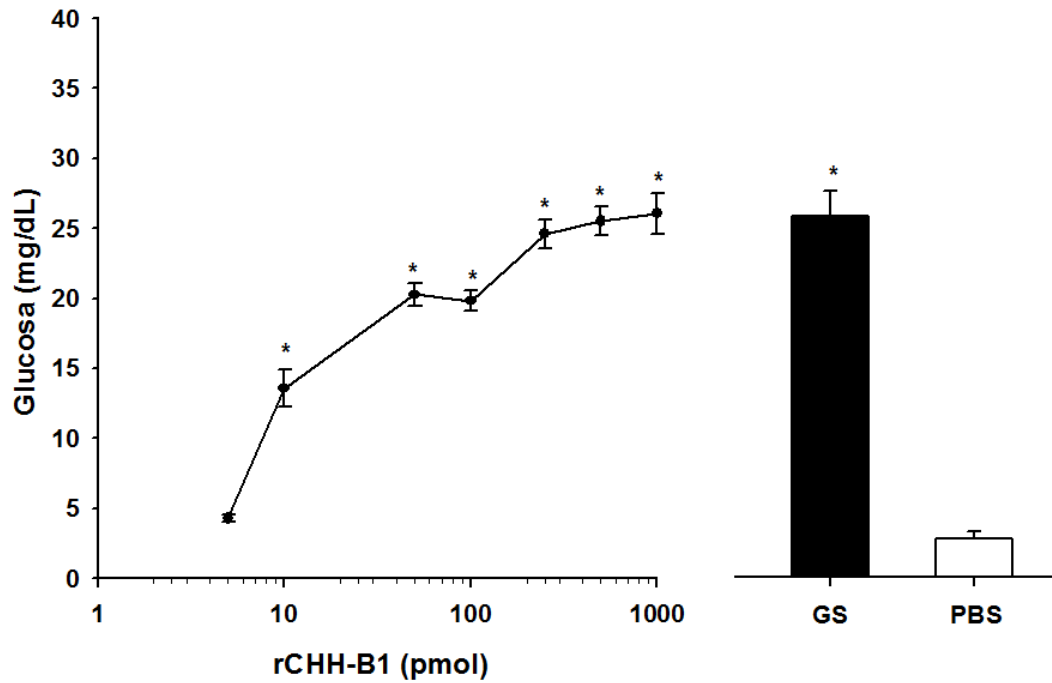


Figura 27. Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa. PBS, control negativo con PBS; GS, extracto equivalente a 2 GS. Los resultados se expresan como las mediana \pm IC al 95%. *, indican las diferencias significativas con respecto al control negativo ($p < 0.05$).

Por otro lado, el péptido rCHH-B1 presentó un efecto significativo sobre la concentración plasmática de triglicéridos a partir de 5 pmol (Fig. 28) e independiente de la dosis de hormona. Los valores mayores se registraron con 1000 pmol de hormona (104 ± 9.05 mg/dL), el cual fue superior a lo obtenido al inyectar el extracto de glándulas (81.24 ± 5.99 mg/dL).

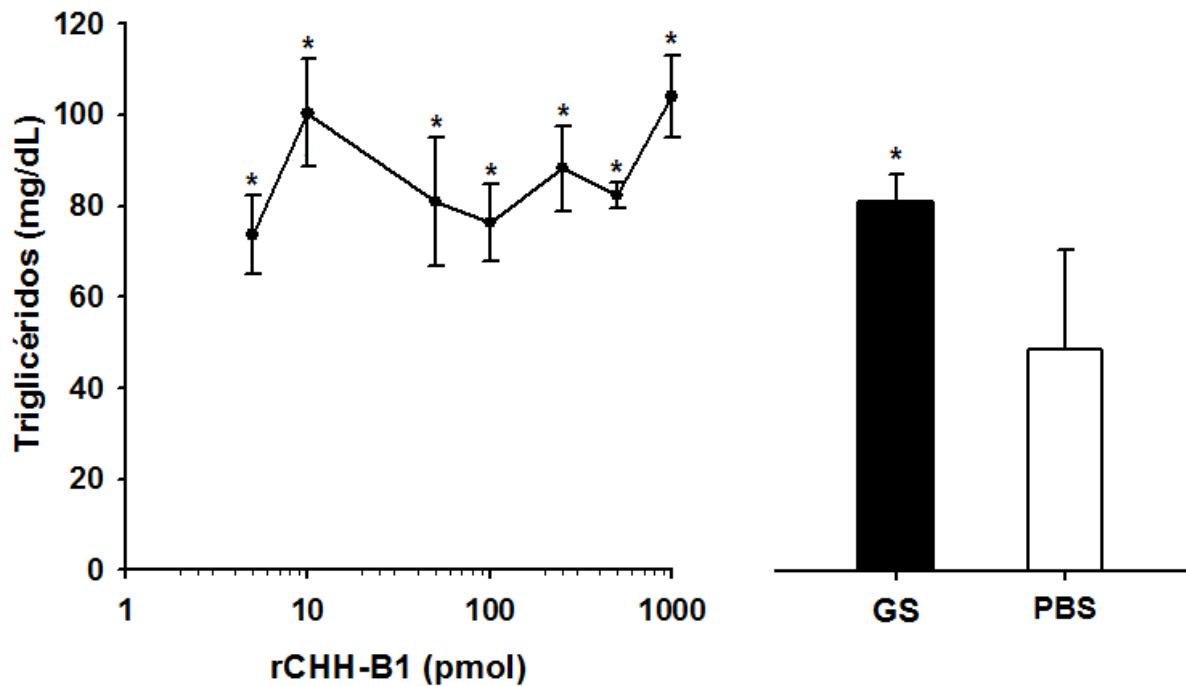


Figura 28. Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre los niveles de triglicéridos en la hemolinfa. PBS, control negativo con PBS; GS, extracto equivalente a 2 GS. Los resultados se expresan como las mediana \pm IC al 95%. *, indican las diferencias significativas con respecto al control negativo ($p < 0.05$).

3.4.1.3 Efecto de la dosis y la amidación C-terminal de rCHH-B2 sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en la hemolinfa

El neuropéptido rCHH-B2 tuvo un efecto hiperglucémico dependiente de la dosis en juveniles ablacionados bilateralmente (Fig. 29). La respuesta fue significativa a partir de 5 pmol de hormona y alcanzó un nivel máximo (31.53 ± 2.50 mg/dL) al inyectar 500 pmol, el cual fue alrededor de dos veces mayor que el efecto del PBS y fue menor que el efecto del extracto de GS (36.12 ± 1.24 mg/dL).

Por otro lado, el nivel de respuesta obtenido al inyectar el 100 pmol del péptido amidado *in vitro* fue de 31.33 ± 1.67 mg/dL, el cual fue 12.9 % mayor al obtenido con 100 pmol del péptido sin amidar, pero menor que el efecto del extracto de GS.

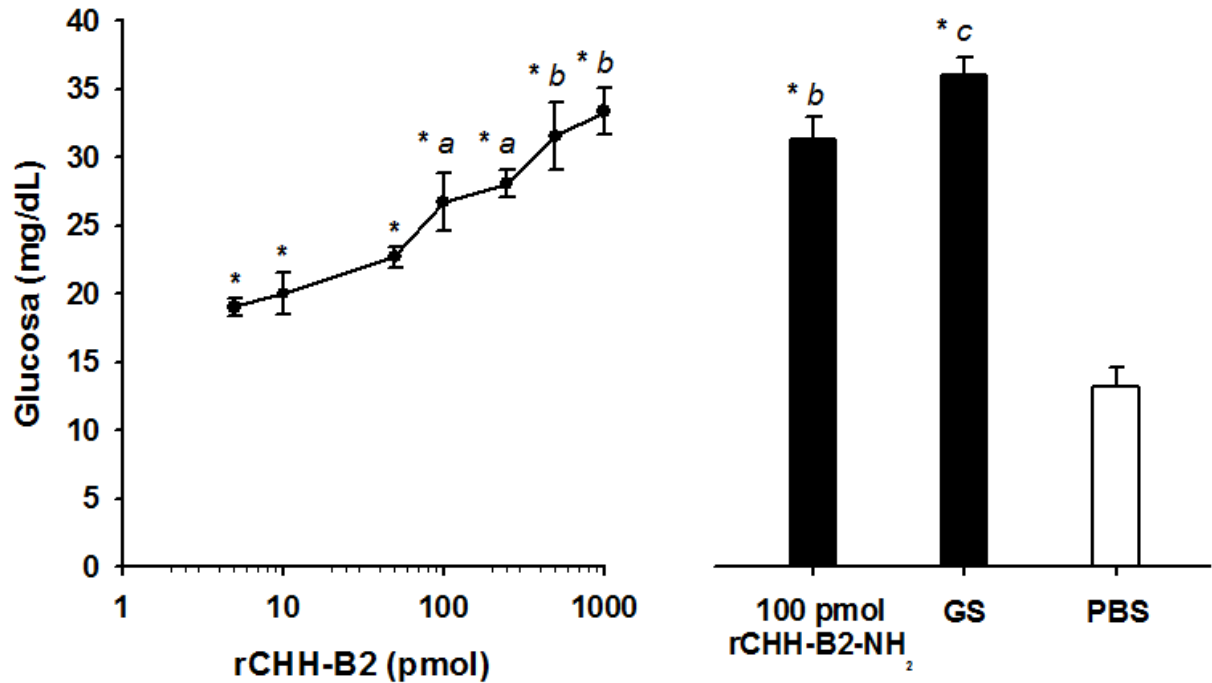


Figura 29. Efecto de la dosis de rCHH-B2 sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa. PBS, control negativo con PBS; GS, extracto equivalente a 4 GS. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0.05$). Diferentes letras señalan las diferencias significativas entre las dosis a partir de 100 pmol de hormona, 4 GS y los 100 pmol de rCHH-B2-NH₂ ($p < 0.05$).

El péptido rCHH-B2 al igual que rCHH-B1 demostró elevar la concentración de triglicéridos en la hemolinfa de camarones ablacionados bilateralmente (Fig. 30). En este caso, el efecto si fue dependiente de la dosis. La respuesta fue detectable a partir de 5 pmol, e incrementó progresivamente hasta una respuesta máxima con 1000 pmol (84.00 ± 12.27 mg/dL), la cual fue casi 6 veces mayor que la obtenida con PBS. Sin embargo, la respuesta observada con el extracto de GS (58.36 ± 7.48 mg/dL) no fue estadísticamente diferente de la de la dosis de 500 pmol (62.18 ± 8.62 mg/dL) y de lo obtenido con la hormona sin amidar.

Por otra parte, 100 pmol de la versión amidada generó una respuesta ~28 % mayor que 100 pmol del péptido sin amidar, lo cual también fue comparable al efecto observado con 500 pmol de hormona recombinante sin amidar.

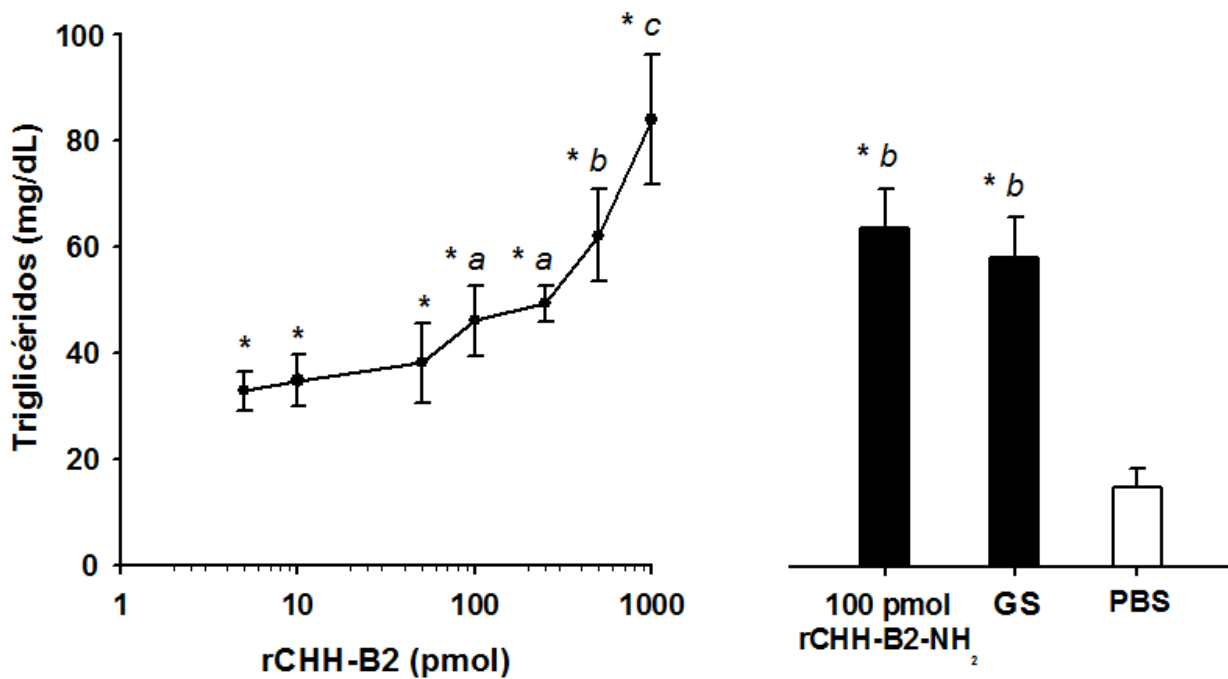


Figura 30. Efecto de la dosis de rCHH-B2 sobre los niveles de triglicéridos en la hemolinfa. PBS, control negativo con PBS; GS, extracto equivalente a 4 GS. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0.05$). Diferentes letras señalan las diferencias significativas entre las dosis a partir de 100 pmol de hormona, 4 GS y los 100 pmol de rCHH-B2-NH₂ ($p < 0.05$).

3.5 Discusión

En crustáceos los niveles de glucosa en la hemolinfa están regulados hormonalmente por los péptidos CHH (Fanjul-Moles., 2006; Chung *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios de actividad biológica de pares de isoformas CHH/CHH-L, señalan que a pesar de su semejanza en la región N-terminal, las isoformas CHH-L carecen de actividad hiperglucémica. Experimentos con rCHHs relacionan lo anterior con la falta de amidación en el extremo C-terminal (Ohira *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2010). No obstante, el péptido rCHH-L PO-CHH de *C. sapidus*, presentó actividad hiperglucémica a dosis altas (150-200 pmol) (Katayama y Chung, 2009), lo que sugiere que es importante estudiar la actividad biológica de los péptidos recombinantes en función de la dosis aplicada, antes de descartar funciones, ya que la actividad puede ser influenciada por el sistema de expresión en el cual son producidas (procariota o eucariota, tipo de vector), y los métodos utilizados para la purificación del péptido, los cuales repercuten en su plegado, estructura y conformación.

En este trabajo, ambas isoformas presentaron actividad hiperglucémica *in vivo* dependiente de la dosis por lo cual la estructura y plegado de los péptidos expresados en *P. pastoris* fueron adecuadas para su actividad biológica. Previamente, el péptido rCHH-B1 expresado como proteína de fusión presentó actividad hiperglucémica *in vivo* en camarones ablacionados unilateralmente aun con un C-terminal adicional (Sánchez *et al.*, 2008). En este mismo sentido, los experimentos del presente trabajo realizados con la hormona rCHH-B1 con la secuencia idéntica a la de la hormona nativa de la GS de *L. vannamei*, confirmaron que aunque es una isoforma CHH-L y que por lo tanto se expresó con un C-terminal libre, presentó actividad hiperglucémica alta y similar a los niveles presentados por CHHs amidadas (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009).

Por otra parte, es la primera vez que se reporta la actividad hiperglucémica de la isoforma CHH-B2 en *L. vannamei*. De manera comparativa, y aunque las condiciones experimentales no fueron las mismas, el efecto dosis-respuesta producido por rCHH-B2 fue menos marcado que con rCHH-B1, pero fue significativo a partir de la dosis más baja. Esto sugiere que ambas isoformas difieren en potencia en cuanto a su capacidad de activar el catabolismo del glucógeno.

Por otro lado en *C. sapidus* se ha demostrado que las isoformas ES-CHH y PO-CHH (CHH-L) presentan sitios de unión de reconocimiento en los mismos tejidos pero con diferente afinidad y capacidad para elevar el GMPc como segundo mensajero (Kataya y Chung, 2009). Esto pudiera ocurrir con las isoformas de *L. vannamei*, ya que las variaciones de actividad entre ambas podrían deberse también a diferencias en las cascadas de señalización celular.

Además, ambas isoformas fueron capaces de incrementar directa o indirectamente la concentración de triglicéridos en la hemolinfa. En crustáceos los triglicéridos representan el ~90% de los lípidos en crustáceos y son transportados en la hemolinfa por lipoproteínas de alta densidad (Chittó *et al.*, 2009;). Los triglicéridos en crustáceos son obtenidos a través de los lípidos ingeridos en la dieta (Pascual *et al.*, 2003), sin embargo también pueden ser sintetizados en el hepatopáncreas, su principal sitio de almacenamiento (Pellon-Maison *et al.*, 2009).

Santos *et al.* (1997) reportan que la inyección de CHH en cangrejos provoca un incremento transitorio en la concentración de diferentes tipos de lípidos en la hemolinfa, incluyendo los triglicéridos. Los autores proponen que esta respuesta ocurre ante una demanda fuerte de energía por parte de los tejidos, donde la CHH además de estimular la glucogenólisis promueve la liberación de lípidos para la beta-oxidación de ácidos grasos, proceso que provocaría la acumulación de citrato, el cual es un inhibidor de la glucólisis lo que cambiaría el metabolismo al uso casi exclusivo de lípidos como fuente de energía (Santos *et al.*, 1997).

Por otro lado, la CHH ha sido considerada un análogo funcional de la hormona glucagón de vertebrados (Sedlmeier y Keller, 1981). La hormona glucagón, en condiciones de ayuno, además de estimular la glucogenólisis produciendo hiperglucemia, estimula la gluconeogénesis a partir de precursores no glúcidos a fin de aportar glucosa al sistema nervioso (Urich, 1990). Por lo tanto, las rCHHs podrían tener un efecto similar. Sin embargo, en vertebrados la hiperglucemia y gluconeogénesis en estado de estrés está regulada por el incremento en el cortisol una hormona esteroidea, mientras que en crustáceos se cree que la CHH cubre una función similar, lo cual sólo se ha comprobado con respecto a la movilización de glucosa (Lorenzon *et al.*, 2004).

En crustáceos se ha demostrado que la gluconeogénesis ocurre en el hepatopáncreas, músculo y branquias de los crustáceos (Martins *et al.*, 2011), tejidos diana de las CHHs. Los triglicéridos pueden ser hidrolizados en ácidos grasos y glicerol, el cual es un precursor de la glucosa vía gluconeogénesis en animales (Murray *et al.*, 2003). De manera comparada, en vertebrados omnívoros, el transporte sanguíneo de triglicéridos desde el hígado hacia los tejidos se da por lipoproteínas de bajo peso molecular (Murray *et al.*, 2003). Se ha observado que en crustáceos los triglicéridos se movilizan desde sus reservas a la hemolinfa en condiciones de privación del alimento y de estrés (Hsieh *et al.*, 2008; Pellon-Maison *et al.*, 2009).

Sin embargo, estudios en *M. japonicus* sugieren que la CHH no está involucrada en la gluconeogénesis ya que la ablación bilateral no cambia los niveles de expresión de los transcritos de la fosfoenolpiruvato carboxinasa ni de la fructosa 1,6-bifosfatasa, enzimas involucradas en ese proceso (Nagai *et al.*, 2011). Sin embargo, alternativamente a través del efecto hiperglucémico y la oxidación de lípidos se podría haber estimulado

este proceso, puesto que altos niveles de ATP y citrato estimulan la gluconeogénesis incrementando la actividad de la fructosa 1,6-bifosfatasa e inhibiendo la glucólisis (Berg *et al.*, 2002).

A fin de conocer si las rCHHs de *L. vannamei* tienen un efecto lipolítico, se podrían determinar los niveles de triglicéridos y glicerol en hepatopáncreas, y de ácidos grasos libres en hemolinfa (además de los triglicéridos). Por otro lado, una disminución del glicerol hepatopancreático podría indicar su uso para regenerar las reservas de triglicéridos y/o la producción de glucosa por gluconeogénesis, como sugieren Vinagre y Chung (2016). Esto fue sugerido por los autores ante la disminución de triglicéridos y glicerol en relación al aumento en los niveles de expresión de CHH en *Ocypode quadrata*.

Las diferencias en las respuestas de estas hormonas pueden estar relacionadas a las condiciones de los ensayos. En el ensayo con rCHH-B1, desde la primera ablación hasta el muestreo pasaron semanas, al contrario del ensayo con rCHH-B2, donde sólo pasaron dos días desde la ablación bilateral. En *Penaeus chinensis* se ha demostrado que los organismos sometidos a este proceso rara vez sobreviven más de tres mudas consecutivas, posiblemente por el desgaste fisiológico como consecuencia del desbalance hormonal (Chu y Chow, 1992). Por lo tanto, el papel propuesto de ambas CHHs en el metabolismo de lípidos debe ser correctamente analizado en *L. vannamei* bajo las mismas condiciones y midiendo también otro tipo de lípidos, como los ácidos grasos libres que aporten mayor información sobre el metabolismo de los lípidos en esta especie.

La amidación incrementó la actividad hiperglucémica del péptido rCHH-B2, coincidiendo con lo observado para los péptidos recombinantes amidados de *M. japonicus*, *S. olivacea* y *A. leptodactylus*. Los análisis espectrales de estos péptidos revelaron que las estructuras secundarias son similares a las de las hormonas nativas, por lo cual dicha modificación podría favorecer el plegado correcto del péptido recombinante (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). Esto podría ocurrir con el péptido rCHH-B2, el cual al amidarse *in vitro*, es de esperarse que adquiriera una estructura cercana al péptido nativo, lo cual no solo tuvo efecto sobre la actividad hiperglucémica sino también sobre su capacidad de incrementar

los niveles de triglicéridos, lo cual sugiere que tiene un papel importante en la movilización de las reservas de energía cuando son requeridas por los tejidos.

Estudios realizados con péptidos que de manera natural están amidados pero que se expresaron *in vitro* en sus versiones recombinantes sin amidar y amidados, presentaron actividad biológica baja (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009). Esto no fue el caso de la hormona rCHH-B2, ya que aún sin amidar promovió el incremento de los niveles de glucosa de *L. vannamei* a niveles incluso mayores a los obtenidos con rCHH-B1.

La actividad de la neurohormona rCHH-B1 fue 3 veces mayor a la reportada para otros péptidos recombinantes amidados *in vitro* (utilizando la misma concentración) como rPej-SGP-I-amida (Katayama *et al.*, 2002) y rPej-SGP-III-amida (Nagai *et al.*, 2009) de *M. japonicus*, producidas en *E. coli*, y *P. pastoris* (Ohira *et al.*, 2003), respectivamente. Además fue 2 veces más alta que la del péptido rPej-SGP-VII producida en *E. coli*. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren dos cosas: la primera, que ambos péptidos recombinantes presentaron estructuras cercanas a los péptidos nativos; y la segunda, que aunque la amidación C-terminal es importante para las isoformas que naturalmente lo presentan, no es estrictamente necesaria para la actividad hiperglucémica de las isoformas CHH/CHH-L de peneidos.

Al respecto, tanto la región N-terminal como C-terminal han sido consideradas importantes para su actividad hiperglucémica de las CHHs, sin que exista aun un consenso. Algunos autores, sugieren que la presencia de aminoácidos extras en el C-terminal afecta la actividad hiperglucémica de las rCHHs (Zarubin *et al.*, 2009), al contrario de la presencia de regiones adicionales en el N-terminal (Gu *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 2002; Mettullo *et al.*, 2004a). A pesar de esto, hay estudios como el de Metulio *et al* (2004) que señalan la importancia de la región N-terminal para la actividad hiperglucémica, ya que la delección de motivos estructurales en esa región, nulifica dicha función en las rCHHs, mientras que mutantes sin el dominio estructural 5 (A5) de la región C-terminal retienen la actividad. Los motivos de la región N-terminal (A1-A3) en las CHHs están altamente conservados, pero no así los de la región C-terminal (A4-A5) (Zheng *et al.*, 2010). Particularmente, el motivo A5 que es considerado importante para la especificidad de las especies y para la divergencia funcional entre péptidos CHH y MIH

(Chen *et al.*, 2005) está ausente en los péptidos CHH-L. Por otro lado, se ha observado que mutantes donde el residuo Phe³ es sustituido o isomerizado cambia la conformación y actividad del péptido por lo cual la región N-terminal parece estar implicada en la unión a receptores (Mosco *et al.*, 2015).

Es posible que en el caso de las isoformas CHH/CHH-L de peneidos la región N-terminal sea importante para la unión a receptores puesto que ambos péptidos de *L. vannamei* tuvieron actividad hiperglucémica y comparten la mayor parte de esta región. Sin embargo, debido al alto grado de conservación en la región N-terminal entre las isoformas CHH/CHH-L analizadas de varios crustáceos (capítulo 1, sección 6.4.4.1), las diferencias entre las secuencias del C-terminal podrían ser importantes para explicar los contrastes en actividad con rCHH-B2, y la divergencia funcional con otros péptidos CHH-L de otras especies. Es posible que algunos o todos los residuos en el C-terminal sean importantes para su estructura y actividad biológica. Por otro lado, las funciones de los péptidos de *L. vannamei* pueden verse influenciadas por otros factores como la expresión de receptores en tejidos específicos así como a su especificidad y afinidad por los mismos.

3.6 Conclusiones

Ambos péptidos recombinantes de *L. vannamei* sin amidar presentaron actividad hiperglucémica dependiente de la dosis. El péptido rCHH-B2 tuvo un mayor efecto con una menor dosis en comparación con rCHH-B1. El nivel máximo de respuesta se obtuvo con 250 pmol de rCHH-B1 pmol y 500 pmol para rCHH-B2. Estos resultados sugieren diferencias entre la potencia hiperglucémica de ambas isoformas que podría deberse a divergencias en la secuencia de la región C-terminal que pueden ser determinantes en su estructura, influenciando tanto su especificidad y afinidad por los receptores en los tejidos.

Tanto rCHH-B1 como rCHH-B2 promovieron la movilización de triglicéridos a la hemolinfa del camarón, encontrándose un efecto dosis-dependiente sólo para rCHH-B2. Este efecto podría ser producto de la estimulación de la movilización de lípidos desde sus reservas para ser utilizados como fuente de energía y posiblemente también podría ser usado como fuente de glicerol para la síntesis de glucosa vía gluconeogénesis.

La amidación *in vitro* del péptido rCHH-B2 provocó en *L. vannamei* un incremento de la actividad hiperglucémica y la movilización de triglicéridos en relación al péptido sin amidar. Esto sugiere que la amidación es importante para la actividad biológica del péptido, probablemente debido a que el péptido recombinante amidado adopta a una conformación más parecida a la de la forma nativa expresada en el camarón con respecto a la versión sin amidar.

Estos resultados sugieren que aunque la amidación tiene un papel significativo en el incremento de la actividad biológica de las isoformas tipo CHH como la CHH-B2, ésta no es indispensable para su actividad. Por otro lado, en el caso de CHH-B1 que pertenece a las isoformas tipo CHH-L que carecen del grupo amida en el C-terminal, ésta presentó actividad hiperglucémica alta lo cual sugiere que la secuencia de dicha región podría ser determinante en su función.

Capítulo 4. Efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 en los procesos de osmorregulación

4.1 Introducción

La salinidad es uno de los factores ambientales que más afecta el desempeño fisiológico de los organismos acuáticos, ya que los cambios en la misma pueden propiciar una condición de estrés con costo metabólico, repercutiendo en procesos como el crecimiento, maduración y supervivencia de los organismos (Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Re *et al.*, 2006).

El camarón blanco *L. vannamei*, es un organismo eurihalino con un punto iso-osmótico entre 25-26‰, pero capaz de habitar aguas con salinidades entre 1-50‰. Esta especie, presenta un patrón de osmorregulación hiper-hiposmótico, manteniendo la osmolaridad interna arriba de la ambiental en condiciones hipo-osmóticas y debajo de la ambiental en condiciones hiper-osmóticas (Castille y Lawrence, 1981; Díaz *et al.*, 2001).

La osmolaridad de la hemolinfa se encuentra principalmente compuesta por los iones (Cl⁻, Na⁺ como los dominantes, y el resto K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺), los cuales representan el 90% de los solutos, mientras que el resto son compuestos orgánicos. Los crustáceos eurihalinos son capaces de regular la concentración de iones interna mediante la absorción activa en ambientes diluidos o su excreción a salinidades altas (Jasmani *et al.*, 2010).

La habilidad de un organismo de osmorregular a una salinidad o condición ambiental determinada puede ser evaluada mediante la capacidad osmorreguladora (CO), la cual se define como la diferencia de la presión osmótica de la hemolinfa y la presión osmótica del medio (Lignot *et al.*, 1997). La CO permite evaluar los cambios en el patrón de osmorregulación de los organismos no solo en relación con la salinidad ambiental, sino también con respecto a otras variables tanto ambientales como del organismo tales como temperatura, contaminantes, estadio de desarrollo, etapa del ciclo de muda, talla, y nutrición (Lignot *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2004; Re *et al.*, 2004).

La regulación iónica es un proceso llevado a cabo principalmente en las branquias posteriores, las cuales en varios decápodos se ha demostrado que posee un epitelio

compuesto de células con alta expresión de proteínas y enzimas involucradas en el transporte de iones (ionocitos) (Towle y Weihrauch, 2001; Henry *et al.*, 2012). Sin embargo, en camarones de la familia Penaeidae esto aún no está del todo claro; se ha sugerido que los ionocitos en las branquias de *M. japonicus* (Boauricha *et al.*, 1991; Boauricha *et al.*, 1994) están poco diferenciados, mientras que en *L. vannamei* se ha sugerido que están ausentes (Chong-Robles, 2015), por lo cual se ha propuesto que la función principal de las branquias en estas especies podría ser respiratoria más que relacionada al intercambio de iones (Charmantier *et al.*, 2009).

El modelo general a nivel molecular del movimiento de NaCl a través del epitelio branquial se basa en lo observado en organismos hiper-osmorreguladores (Fig. 31), donde la principal fuerza directriz la proporciona la actividad de la bomba ATPasa de Na^+/K^+ (ANK) y la ATPasa de H^+ tipo-V (ATPasa-V). La entrada de NaCl desde el exterior ocurre a través de los cotransportadores apicales $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. Sin embargo, en la cara apical también existen intercambiadores y canales que permiten el transporte independiente tanto de Na^+ como de Cl^- . El ingreso de Na^+ ocurre mediante el intercambiador Na^+/H^+ y canales de Na^+ , mientras que el Cl^- es transportado a través del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Charmantier *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2012).

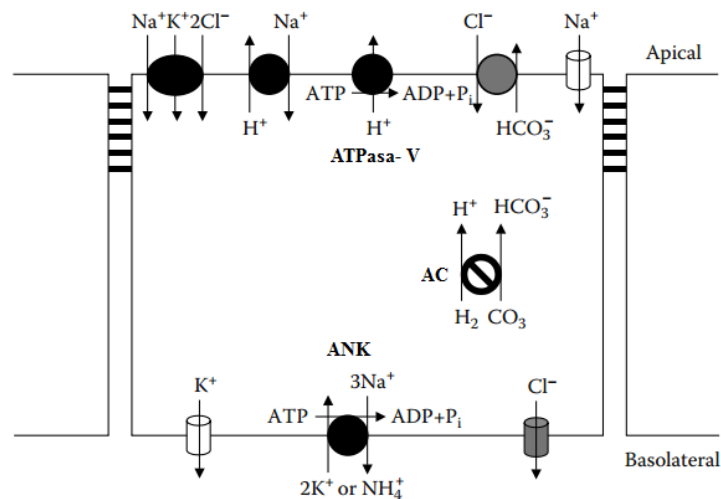


Figura 31. Modelo hipotético para el movimiento de NaCl a través del epitelio branquial en organismos hiper-osmorreguladores. En las membranas de las células epiteliales hay una serie de canales, cotransportadores y bombas encargadas de transportar iones desde el exterior hacia la hemolinfa. ATPasa-V, ATPasa de H^+ -tipo V; AC, anhidrasa carbónica; ANK, ATPasa de Na^+/K^+ (Modificado de Charmantier *et al.*, 2009).

Para que el intercambio de Na^+ a través de los canales apicales sea posible, se requiere la hiperpolarización de la membrana, la cual ocurre gracias al bombeo activo de H^+ por parte de la ATPasa-V. La enzima anhidrasa carbónica (AC) citosólica se encarga de proveer los iones H^+ y HCO_3^- necesarios para el funcionamiento de los canales de Na^+ y también del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ para el ingreso de Cl^- . Esto ocurre mediante la hidratación reversible del CO_2 procedente de la respiración, por lo cual este también es un método para la excreción de dicho desecho metabólico (Charmantier *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2012).

El transporte del NaCl desde el citosol de las células epiteliales hacia la hemolinfa ocurre mediante proteínas transportadoras localizadas en la cara basolateral. El Cl^- es transportado a través de canales, mientras que el Na^+ es bombeado activamente por la ANK, la cual excluye simultáneamente K^+ (o NH_4^+). El reciclaje de K^+ , hipotéticamente ocurre a través de canales basolaterales (Towle *et al.*, 2001; Lucu y Towle, 2003; Charmantier *et al.*, 2009).

La expresión y actividad de la ANK y AC en organismos eurihalinos parece ser sensible a la salinidad, incrementándose durante la aclimatación a bajas salinidades (Serrano *et al.*, 2007; Serrano y Henry, 2008). Sin embargo, su papel en condiciones hiper-osmóticas aún no está claro, ya se ha reportado en diferentes crustáceos que en alta salinidad no hay inducción de la expresión o actividad de estas enzimas (Henry, 2001; Henry, 2005; Wang *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015), mientras que en otros estudios se ha sugerido lo contrario (Jayasundara *et al.*, 2007; Roy, 2007; Li *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015a).

En cuanto al control neuroendócrino de la osmorregulación en crustáceos, se ha demostrado que la ablación de pedúnculos oculares provoca un efecto drástico sobre la osmolaridad y concentración de iones en la hemolinfa, lo cual se ve revertido por la inyección de homogenados o la reimplantación del tejido (Kato y Kamemoto, 1969; Charmantier *et al.*, 1984). En cuanto al papel de las CHHs en estos procesos se ha demostrado que la inyección de algunas isoformas de crustáceos provoca cambios en la osmolaridad, CO y absorción Na^+ (Charmantier-Daures *et al.*, 1994; Eckhardt *et al.*, 1995;

Spanings-Pierrot *et al.*, 2000 Serrano *et al.*, 2003). Por lo tanto, ésta hormona también podría estar involucrada en la regulación de esas respuestas en crustáceos.

Existen otros estudios en organismos eurihalinos que han sugerido que la actividad de la AC en crustáceos pudiera estar bajo control neuroendócrino. En cangrejos la ablación de los pedúnculos oculares incrementa la actividad de la AC, lo que sugiere la presencia de un inhibidor de la enzima en los pedúnculos oculares, puesto que la inyección de extractos de tejido revierte este efecto (Henry, 2006; Henry y Borst, 2006).

Experimentos realizados por nuestro laboratorio, sugieren que al menos una isoforma CHH de *L. vannamei* tiene un papel potencial en la osmorregulación. A nivel de ARNm, las tres isoformas presentan diferentes patrones de expresión bajo diferentes combinaciones de salinidad y temperatura. La isoforma CHH-B1 es la que parece tener una mayor dependencia del efecto de la salinidad, incrementando su expresión en condiciones hipo e hiper osmóticas (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Sigala-Andrade, 2010).

Por otro lado, la inyección de la isoforma recombinante CHH-B1, con etiquetas en la región C-terminal, a camarones sub-adultos aclimatados a 35 ‰ provocó el incremento de la CO (Camacho-Jiménez, 2011). También se ha observado que la isoforma rCHH-A restablece los valores de CO en organismos aclimatados en condiciones iso-osmóticas y posteriormente expuestos a un shock hipo-osmótico (Balderas-González, 2014).

Al respecto, Liu *et al.* (2014) demostraron que la isoforma equivalente a la CHH-A de Balderas-González (2014), modifica la actividad ANK en organismos transferidos desde una salinidad hiper-osmótica (31 ‰) a una iso-osmótica (26 ‰). Así mismo, la transferencia a condiciones de mayor hiper-osmoticidad (36 ‰), en organismos sin inyectar, provocó un incremento de los transcritos de éste neuropéptido en los pedúnculos oculares. Esta isoforma al igual que la CHH-B2 presentan la señal de amidación en el C-terminal (Lago-Lestón *et al.*, 2007), lo cual plantea la posibilidad de que esta isoforma tenga funciones similares a CHH-A.

La mayoría de los experimentos de osmorregulación con CHHs se han realizado en organismos aclimatados por lo que se conoce poco sobre el papel de estas hormonas bajo la exposición aguda a diferentes salinidades. Estas fluctuaciones pueden ocurrir en la naturaleza, principalmente durante las primeras etapas del ciclo de vida de los

organismos en los sistemas costeros. Considerando que la respuesta neuroendocrina es primordial para realizar ajustes fisiológicos rápidos, el presente capítulo se enfocó en la evaluación del efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 en diferentes respuestas fisiológicas relacionadas con los mecanismos de regulación iónica y osmótica bajo condiciones de estrés a corto plazo provocado por el cambio de salinidad.

4.2 Objetivos

1. Determinar el efecto de la dosis de rCHH-B1 y rCHH-B2 sobre la capacidad osmorreguladora en organismos mantenidos en agua de mar y ablacionados bilateralmente.
2. Analizar el efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 sobre la capacidad osmorreguladora y la concentración de diferentes osmolitos en la hemolinfa de camarones no ablacionados aclimatados a condiciones iso-osmóticas y posteriormente expuestos de manera aguda a salinidades extremas

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Efecto de la dosis de los péptidos recombinantes sobre la capacidad osmorreguladora

A cada organismo procedente de los ensayos de dosis-respuesta (capítulo 3, secciones 3.3.2.2 y 3.3.2.3), se le tomó una muestra de hemolinfa (10 μ L) como se describe en la sección 3.3.2.4 para cuantificar la presión osmótica interna utilizando un osmómetro de vapor (Wescor 5520), y a partir de ella se determinó la capacidad osmorreguladora (CO) mediante la substracción del valor de la presión osmótica del agua de mar (Lignot *et al.*, 1997).

Debido a que existen experimentos que demuestran que la ablación tiene un efecto osmótico (Charmantier *et al.*, 1984; Charmantier-Daures *et al.*, 1994), y a que el PBS (137 mM NaCl (p/v), 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.05%, pH 7.4, ~447 mOsmol/kg) presenta un presión osmótica distinta a la de la hemolinfa, como control se determinó la CO de organismos sin inyectar y sin ablacionar (valor basal), organismos inyectados con PBS sin ablacionar, y camarones ablacionados sin inyectar.

4.3.2 Efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 sobre la osmorregulación de *L. vannamei* aclimatado a condiciones iso-osmóticas y expuestos de manera aguda a salinidades extremas

4.3.2.1 Condiciones experimentales

Se seleccionaron 306 juveniles (7.3 ± 1.5 g), los cuales se aclimataron durante 7 días bajo las condiciones descritas anteriormente (apartado 3.3.2.1.1), exceptuando por la salinidad, la cual fue ajustada a condiciones iso-osmóticas (26 ± 1 ‰) (Díaz *et al.*, 2001) mezclando agua de mar con agua dulce. La salinidad fue monitoreada diariamente con un refractómetro de bolsillo y mantenida mediante un recambio diario del ~50%. Pasado el periodo de aclimatación se llevó a cabo el seguimiento del ciclo de muda según lo descrito en la sección 3.3.2.1.2.

4.3.2.2 Tratamientos y controles experimentales

Grupos de 81 organismos sin ablacionar en intermuda y con 24 h de ayuno fueron inyectados con 2 µg rCHH-B1 y rCHH-B2 respectivamente (Fig. 32) según lo descrito en el apartado 3.3.2.1.3. Como controles, a otros 81 organismos fueron inyectados se les suministró PBS. Una vez inyectados, de cada grupo experimental 27 organismos fueron expuestos a condiciones hipo-osmóticas (8 ‰) y otros 27 a condiciones hiper-osmóticas (45 ‰), la cuales fueron ajustadas agregando sal de mar al agua dulce y al agua de mar (35 ‰), respectivamente. Otros 27 organismos fueron mantenidos bajo condiciones iso-osmóticas (26 ‰). Por otro lado, se contó con un grupo control sin inyectar del cual 9 organismos fueron muestreados antes del cambio de salinidad, y 54 posterior a la exposición a las salinidades de estrés.

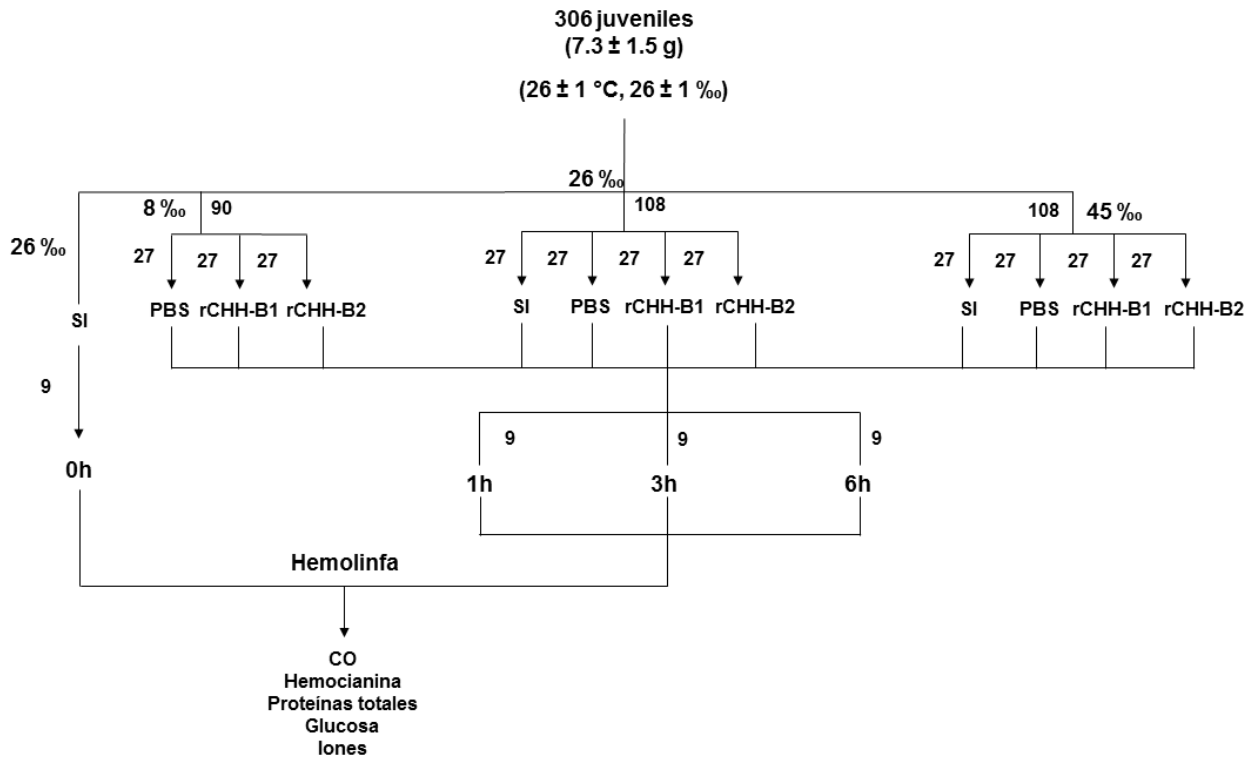


Figura 32. Diseño experimental del ensayo de exposición a diferentes condiciones osmóticas. Los organismos fueron aclimatados a 26 ‰ ($n=306$) para posteriormente ser inyectados con las hormonas o PBS y expuestos a salinidades de estrés (8 y 45 ‰) durante 1 , 3 y 6 h, tiempos durante los cuales se tomaron muestras de hemolinfa para determinar los niveles de osmolitos. SI, sin inyección; CO, capacidad osmorreguladora.

4.3.2.3 Toma y procesado de muestras de hemolinfa

De cada grupo experimental, a las 1 , 3 y 6 h posterior a la inyección y/o exposición al cambio de salinidad se extrajo hemolinfa de 9 organismos según lo descrito en el apartado 3.3.2.4.

Una parte de la hemolinfa muestreada fue mezclada con dos partes de solución anticoagulante SSS y otra con tres partes de heparina amónica (0.8 mg/mL, pH 7.3). Las muestras se procesaron como se describió anteriormente (3.3.2.4)

4.3.2.4 Capacidad osmorreguladora (CO)

La capacidad osmorreguladora se determinó como se describió en la sección 4. 3.1.

4.3.2.5 Osmolitos

4.3.2.5.1 Osmolitos orgánicos

4.3.2.5.1.1 Hemocianina

Se diluyeron 10 μL de hemolinfa en 990 μL de agua destilada en una cubeta espectrofotométrica de cuarzo de 1 cm^3 y se determinó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Spectronic 200 (Thermo Scientific). La concentración de hemocianina se calculó mediante la ecuación modificada de Hagerman (1983):

$$Hc = \left(\frac{Abs_{340nm}}{E} \right) (FD) \quad (1)$$

Dónde:

Hc, es la concentración de hemocianina en la hemolinfa en mmol/L

Abs 340 nm, es el valor de absorbancia de la muestra a 340 nm

E, es el coeficiente de extinción de 17.26 basado en un subunidad funcional de la hemocianina de crustáceos de 74 000 Da

FD, es el factor de dilución de la muestra

4.3.2.5.1.2 Glucosa y proteínas totales

A partir de la muestras disueltas en SSS se determinó la concentración de glucosa por triplicado con el reactivo glucosa oxidasa (Pointe Scientific) según las instrucciones del fabricante, y la concentración de proteínas totales con kit protein assay (Bio-Rad) adaptado a microplacas usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Anexo 2).

4.3.2.5.1.3 Relación hemocianina a proteínas totales

La concentración de proteínas totales fue transformada a mmol/L dividiendo la concentración en mg/L entre 66. La relación hemocianina a proteínas totales (hemocianina: proteínas totales) fue calculada como el cociente de la la concentración de

hemocianina (entre la de proteínas totales expresada en porcentaje (Chen y Cheng, 1993).

4.3.2.5.2 Iones

La concentración de iones en hemolinfa fue determinada a partir de las muestras heparinizadas. El Ca^{2+} fue analizado con el reactivo calcium Az III (Pointe Scientific), el K^{+} con el reactivo potassium (K) (Randox), el Na^{+} con un reactivo colorimétrico (Stanbio), y el Cl^{-} con el reactivo chloride reagent set (Pointe Scientific), de acuerdo con los protocolos de los fabricantes adaptados a microplaca (Anexo 3).

Así mismo, se determinó la concentración de cada ion en muestras de agua de las diferentes salinidades y se estimó la capacidad ionorreguladora (CI) para cada ion analizado, substrayendo la concentración del ion específico en el medio externo de la concentración del mismo en la hemolinfa.

4.3.3 Análisis estadísticos

Los resultados de los ensayos fueron analizados según la sección 3.3.2.5 (Exceptuando la relación hemocianina: proteínas totales). Debido a que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron analizados con las pruebas no paramétricas realizadas anteriormente. El nivel de significancia para los análisis fue de $p < 0.05$. Los datos fueron expresados como la mediana \pm el intervalo de confianza (IC) al 95 %.

4.4 Resultados

4.4.1 Efecto de la dosis de los péptidos recombinantes sobre la capacidad osmorreguladora

Los organismos inyectados del ensayo de dosis-respuesta con rCHH-B1 (Fig. 33), en general presentaron un patrón de osmorregulación hipo-osmótico en condiciones hiper-osmóticas del agua de mar (35 ‰). El péptido rCHH-B1 provocó un incremento significativo de la hipo-CO en sub-adultos ablacionados bilateralmente a partir de 100 pmol (-319.67 ± 7.07 mOsmol/kg) con respecto al control con PBS (-285.33 ± 15.49

mOsmol/kg). No se encontraron diferencias significativas al inyectar mayores dosis de hormona.

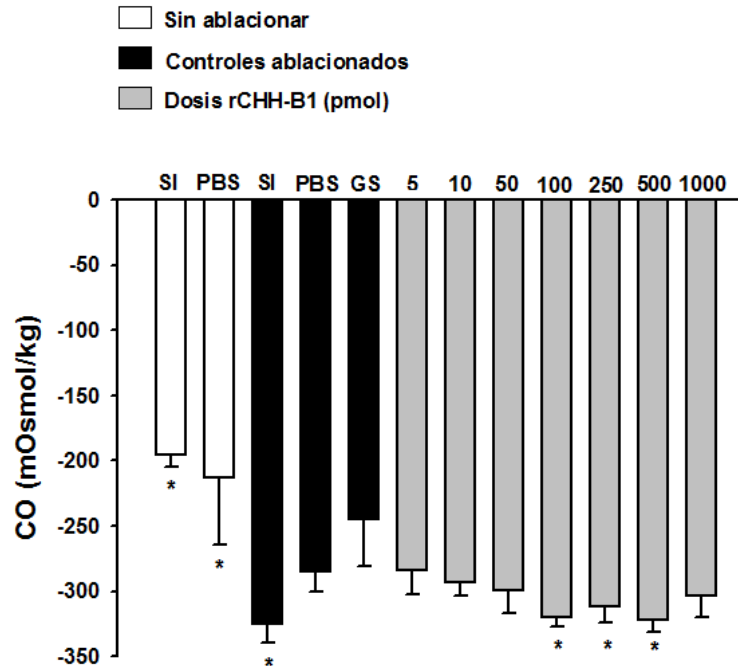


Figura 33. Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre la capacidad osmorreguladora (CO) de organismos ablacionados bilateralmente. SI, organismos sin inyectar; PBS, organismos inyectados con PBS; GS, extracto equivalente a 2 GS. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos ablacionados inyectados con PBS ($p < 0.05$).

Así mismo, los resultados sugieren que la ablación tuvo un efecto significativo sobre la hipo-CO en los organismos ablacionados sin inyectar (SI) ($p < 0.05$), el cual fue ~40% mayor con respecto a los no ablacionados sin inyectar (valor basal). El PBS tuvo un efecto significativo sólo en los organismos ablacionados ($p < 0.05$). La inyección de 2 GS provocó un descenso en la hipo-CO de los camarones ablacionados a valores equivalentes a la inyección con PBS en organismos sin ablacionar ($p < 0.05$). Además cabe mencionar, que el extracto de 2 GS tuvo un efecto estadísticamente equivalente a los valores de CO en organismos sin inyección y sin ablacionar ($p < 0.05$).

Al igual que el ensayo con rCHH-B1 en sub-adultos, los organismos juveniles en el ensayo de dosis-respuesta con rCHH-B2 (Fig. 34) presentaron un patrón de

osmorregulación hipo-osmótico en agua de mar. En este ensayo, los camarones ablacionados bilateralmente presentaron una disminución significativa de la hipo-CO a partir de 10 pmol de hormona (-226.00 ± 12.09 mOsmol/kg) en comparación con el control con PBS (-277.00 ± 27.20 mOsmol/kg). A partir de esa dosis, la hipo-CO no se modificó de manera significativa. Por otra parte, la hormona amidada (100 pmol) disminuyó la hipo-CO de manera significativa en ~15% comparada con el efecto de la misma dosis de péptido sin amidar ($p < 0.05$). El efecto de rCHH-B2-NH₂ fue comparable al efecto de 4 GS ($p < 0.05$).

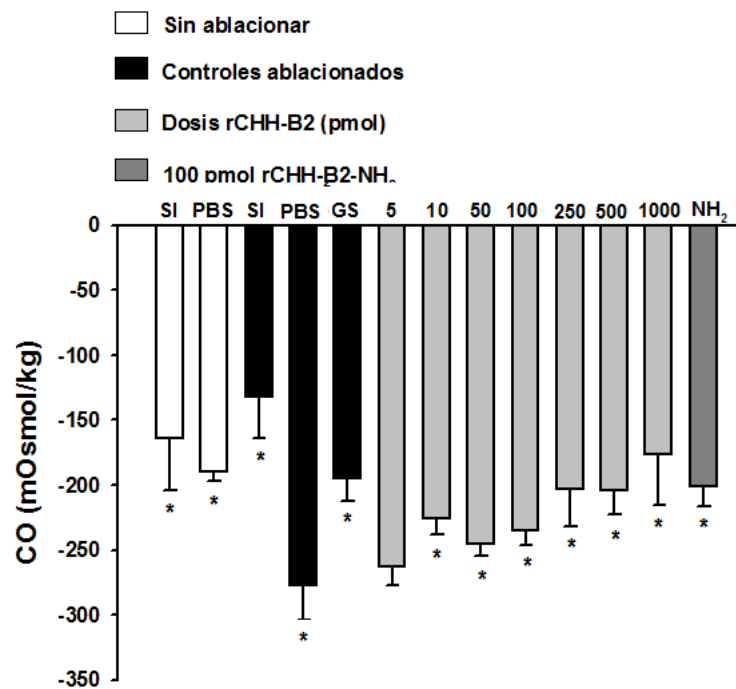


Figura 34. Efecto de la dosis de rCHH-B1 sobre la capacidad osmorreguladora (CO) de organismos ablacionados bilateralmente. SI, organismos sin inyectar; PBS, organismos inyectados con PBS; GS, extracto equivalente a 4 GS; NH₂, 100 pmol de rCHH-B2-NH₂. Los resultados se expresan como las medianas ± IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos ablacionados inyectados con PBS ($p < 0.05$).

Sin embargo, al contrario de rCHH-B1, la ablación no tuvo un efecto significativo sobre la hipo-CO ($p < 0.05$), tal como lo sugieren los resultados de los controles sin inyección. La inyección con PBS provocó un incremento significativo ($p < 0.05$) en los

organismos ablacionados. El extracto de glándulas no presentó diferencias en la hipo-CO con respecto a los organismos sin ablacionar y sin inyectar (basales).

4.4.2 Efecto de rCHH-B1 y rCHH-B2 sobre la osmorregulación de *L. vannamei* aclimatado a condiciones iso-osmóticas y expuesto de manera aguda a salinidades extremas

4.4.2.1 Capacidad osmorreguladora (CO)

Bajo condiciones iso-osmóticas la CO de los organismos se mantuvo cercana a 0 (Fig. 35). Ambas neurohormonas sólo tuvieron un efecto significativo a las 6 h postinyección con respecto a los organismos inyectados con PBS (15.00 ± 30.29 mOsmol/kg), así como en comparación con el valor inicial al tiempo 0 (-15.00 ± 10.93 mOsmol/kg) y, manifestándose como una disminución en la CO, la cual fue mayor en el grupo inyectado con rCHH-B2 (-45.00 ± 31.60 mOsmol/kg).

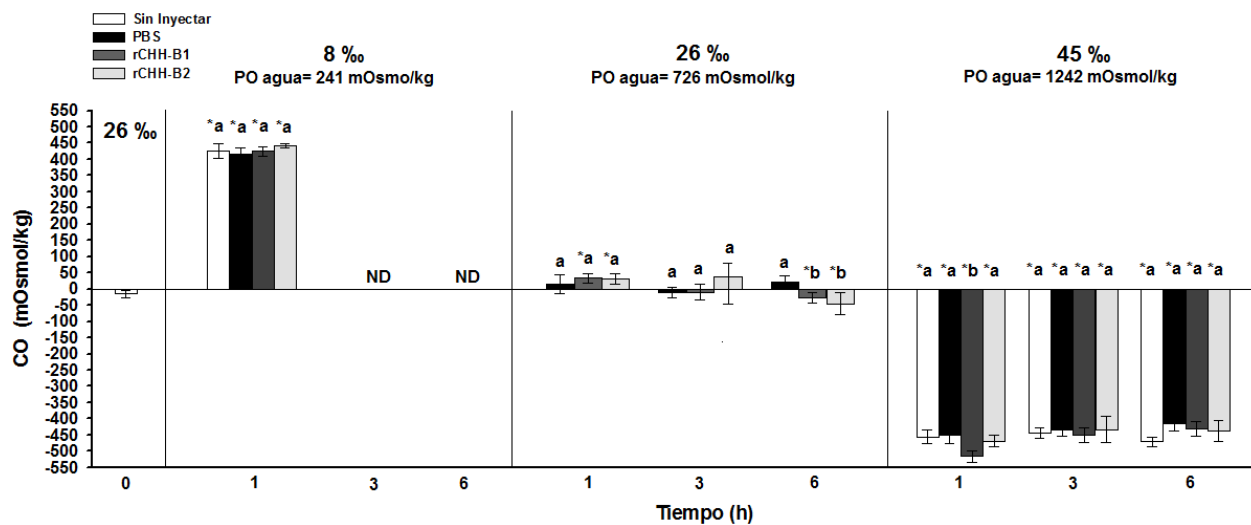


Figura 35. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad osmorreguladora (CO) de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera aguda a salinidades extremas. PO, presión osmótica; ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

En la salinidad de 8 ‰, los camarones se mantuvieron hiper-osmóticos a 1 h postinyección con respecto al medio externo. A 1 h postinyección no se registraron diferencias significativas entre tratamientos y controles, aunque los mayores valores fueron observados con rCHH-B2 (441.50 ± 7.82 mOsmol/kg). A partir de las 3 h los organismos presentaron un cambio de coloración en las branquias con respecto a los organismos basales y se empezó a registrar mortalidad, lo cual no permitió la toma de muestras a partir de ese tiempo.

Por otro, en la salinidad de 45 ‰, en todos los tiempos muestreados se obtuvo un patrón hipo-osmótico en la hemolinfa del camarón con respecto al medio externo. En estas condiciones sólo se observó un incremento en la hipo-CO después de 1 h en los animales inyectados con rCHH-B1 (-516.5 ± 16.76 mOsmol/kg), el cual fue significativo con respecto al control sin inyección (-444.50 ± 15.64 mOsmol/kg) y al PBS (-450 ± 28 mOsmol/kg).

4.4.2.3 Osmolitos

4.4.2.3.1 Osmolitos orgánicos

Los neuropéptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 provocaron un incremento significativo sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa de *L. vannamei* a 1 h postinyección (Fig. 36) en todas las salinidades con respecto al valor inicial (13.55 ± 0.94 mg/dL) y a los grupos control (sin inyección y PBS).

En la salinidad iso-osmótica se registró el valor más alto de glucosa registrado en el experimento, el cual correspondió al tratamiento con rCHH-B2 (45.63 ± 3.71 mg/dL), siendo ~34% mayor al efecto del PBS y ~20% superior al de rCHH-B1. Sin embargo, en las salinidades de estrés no hubo diferencias significativas entre los efectos hiperglucémicos de los péptidos recombinantes, los cuales en ambas condiciones fueron significativamente mayores a los obtenidos en los grupos control ($p < 0.05$). A partir de 3 h postinyección, los niveles de glucosa disminuyeron drásticamente a niveles iguales o inferiores al basal.

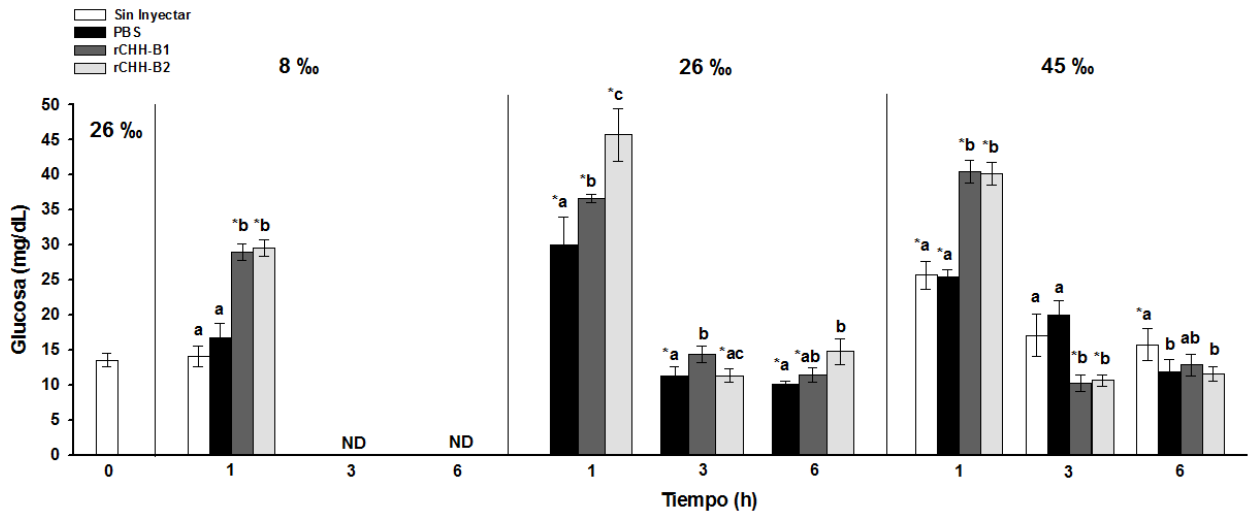


Figura 36. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en los niveles de glucosa de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

Con respecto a las proteínas totales (Fig. 37), en condiciones iso-osmóticas las hormonas promovieron el incremento significativo de los niveles de proteínas de la hemolinfa de los organismos a las 6 h postinyección sobre lo obtenido a las 0 h (127.12 ± 5.97 mg/dL). Este efecto fue mayor con rCHH-B2 (246.33 ± 18.65 mg/dL), siendo ~12% mayor al efecto de rCHH-B1 y ~23% al incremento provocado por el PBS.

De manera contraria, en 8 ‰, en general todos los organismos presentaron niveles de proteínas más bajos después de 1 h postinyección con respecto al valor inicial. Sin embargo, el efecto de las rCHHs no fue significativamente menor al del PBS. En 45 ‰ los péptidos provocaron un descenso significativo de las proteínas de la hemolinfa tanto en los organismos control sin inyección (~62%) como con el tratamiento con PBS (~58%) a las 6 h postinyección. Aunque el efecto fue mayor con rCHH-B2 (52.72 ± 6.40 mg/dL), este no fue diferente de la respuesta con rCHH-B1 (63.44 ± 7.63 mg/dL).

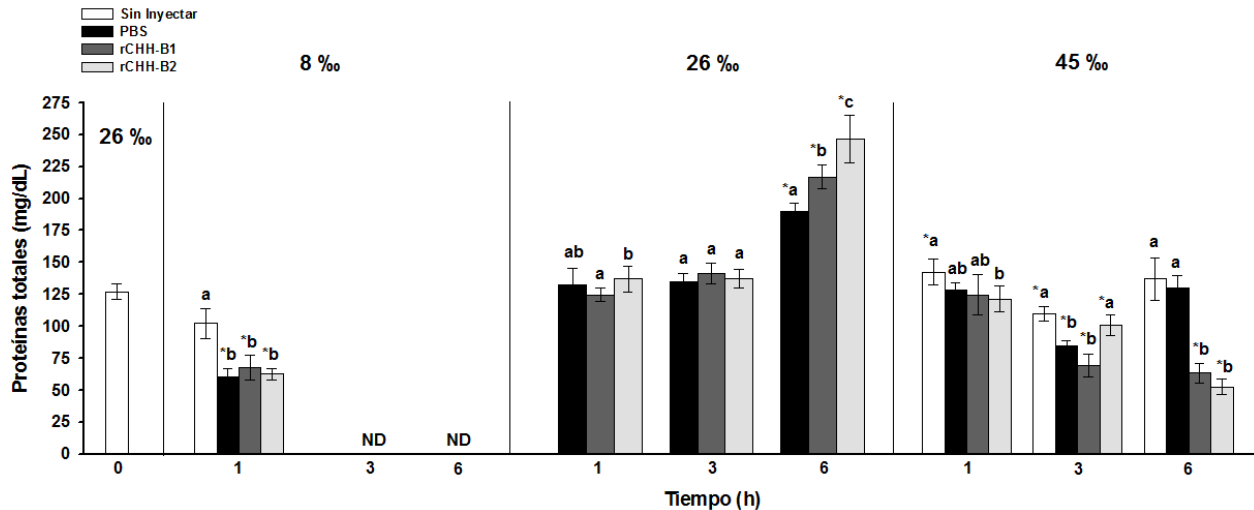


Figura 37. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en los niveles de proteínas totales de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

Los niveles de hemocianina (Fig. 38) bajo condiciones iso-osmóticas en los tratamientos con rCHHs no presentaron diferencias significativas tanto con el control basal (1.54 ± 0.21 mmol/L) y/o con PBS (1.45 ± 0.18 mmol/L). En baja salinidad, no se registraron diferencias entre tratamientos y controles. Por el contrario, en alta salinidad, y al igual a lo observado con proteínas totales, se registró un descenso significativo en los tratamientos con hormonas a las 6 h postinyección. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambas hormonas.

La relación hemocianina a proteínas totales (Fig. 39) en los organismos expuestos a baja salinidad se incrementó significativamente ($\sim 38\%$ con respecto al valor inicial) a 1 h postinyección. Por otro lado, en condiciones iso-osmóticas la relación disminuyó en al menos 35% a las 6 h postinyección en comparación con los primeros tiempos, tanto en los organismos inyectados con hormonas como con PBS. Finalmente en alta salinidad, la relación de los organismos inyectados con rCHHs no se vio modificada en gran medida con respecto al valor basal en ningún tiempo. Sin embargo, la relación hemocianina a proteínas totales fue al menos 20% superior a las 6 h postinyección en los organismos tratados con los péptidos con respecto a los controles, los cuales presentaron una disminución en los valores con respecto al valor inicial.

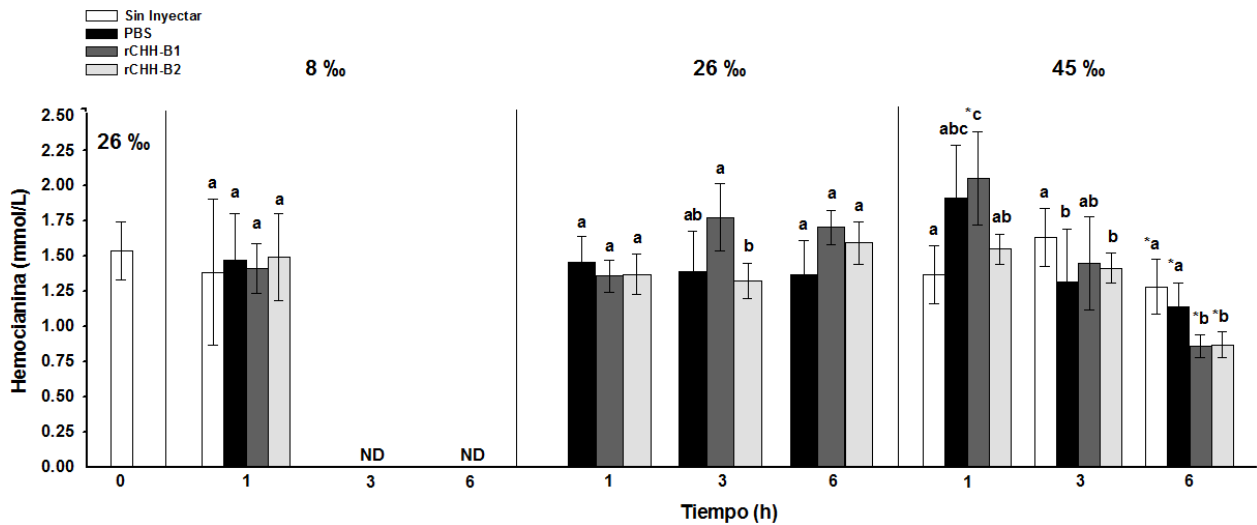


Figura 38. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en los niveles de hemocianina de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas ± IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

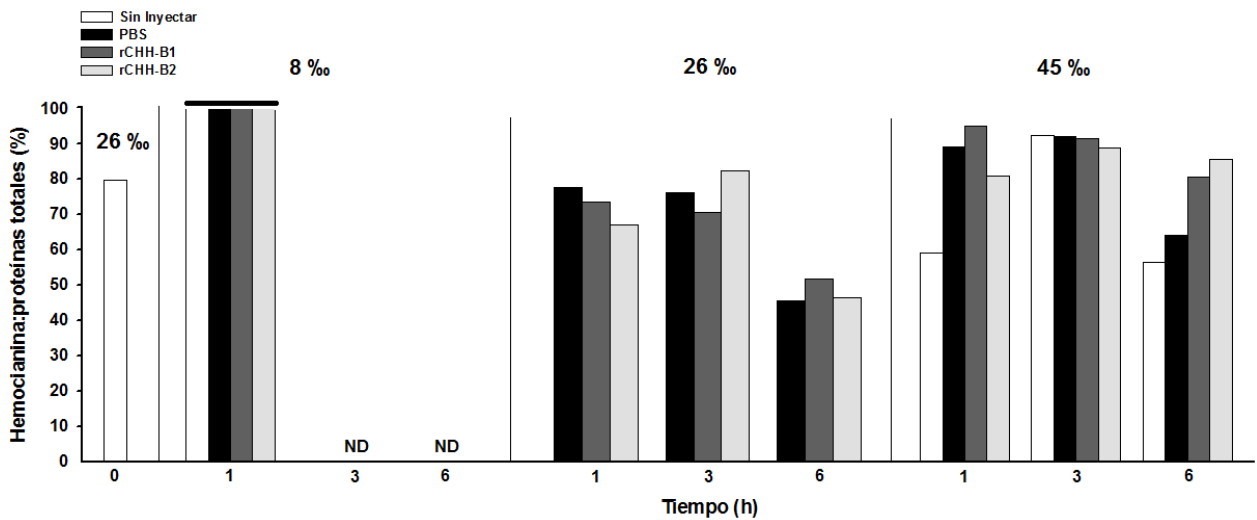


Figura 39. Relación hemocianina a proteínas totales de los organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas. La línea horizontal sólida sobre las barras indica valores superiores al 100%.

4.4.2.3.2 Iones

De acuerdo con los resultados de la CI para el ion Na^+ (Fig. 40), tanto en los organismos expuestos a 8 ‰ como los mantenidos a 26 ‰ no hubo diferencias entre grupos experimentales. Es importante notar que contrario a lo esperado, a baja salinidad

la CI del Na^+ fue cercana a 0, lo que significaría que las concentraciones internas y externas fueron similares.

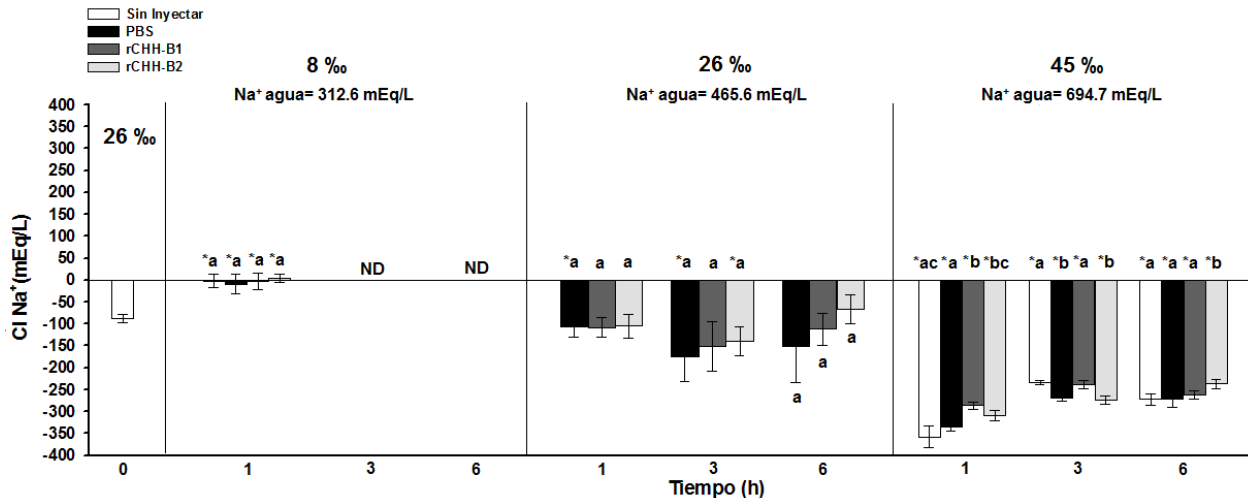


Figura 40. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion Na^+ de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

A 45 ‰, los organismos presentaron la mayor diferencia en la CI con respecto al valor inicial (-87.48 ± 8.41 mEq/L). Los organismos inyectados con rCHH-B1 presentaron una disminución significativa en la hipo-CI después de 1 h (-286.36 ± 7.68 mEq/L) en comparación a los controles sin inyección y PBS en ~ 20 y $\sim 14.5\%$, respectivamente. A partir de 3 h postinyección los valores regresaron a niveles equivalentes a los controles a esos mismos tiempos. En los camarones tratados con rCHH-B2, la hipo-CI fue disminuyendo gradualmente hasta presentar los niveles más bajos a las 6 h postinyección (-236.71 ± 10.26 mEq/L), la cual fue significativamente diferente a lo obtenido en los organismos sin inyectar e inyectados con PBS, en aproximadamente un $\sim 13\%$.

Por otro lado, a baja salinidad la CI del ion Cl^- (Fig.41) se modificó significativamente con respecto al nivel basal (-19.74 ± 11.19 mEq/L) a 1 h postinyección, no siendo significativamente diferente con respecto a los controles. Por otro lado, a 26 ‰, al igual que en la CI del Na^+ , no hubo un cambio significativo por efecto de las hormonas.

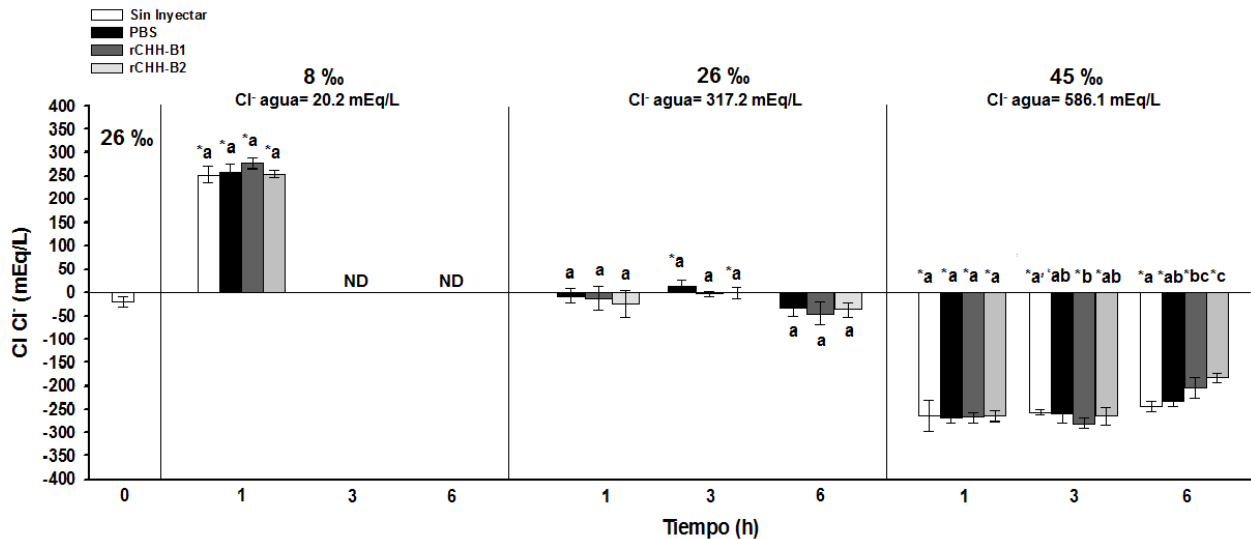


Figura 41. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion Cl^- de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

A alta salinidad, hubo una tendencia a la disminución en la hipo-Cl del ion Cl^- en los tratamientos con las hormonas recombinantes. La rCHH-B2 presentó diferencias significativas con respecto al control sin inyección y con PBS en alrededor del 13% a las 6 h postinyección.

A la salinidad de 8 ‰ la CI del ion K^+ (Fig. 42) presentó un incremento en todos los organismos con respecto al valor de base (-36.70 ± 0.50 mEq/L) a 1 h postinyección. En esta salinidad y tiempo, sólo hubo efecto significativo con rCHH-B2 (-10.36 ± 0.58 mEq/L), el cual al contrario del Na^+ y Cl^- consistió en una disminución de la CI del ion con respecto al valor sin inyección (-9.18 ± 1.09 mEq/L) y PBS (-9.01 ± 0.54 mEq/L).

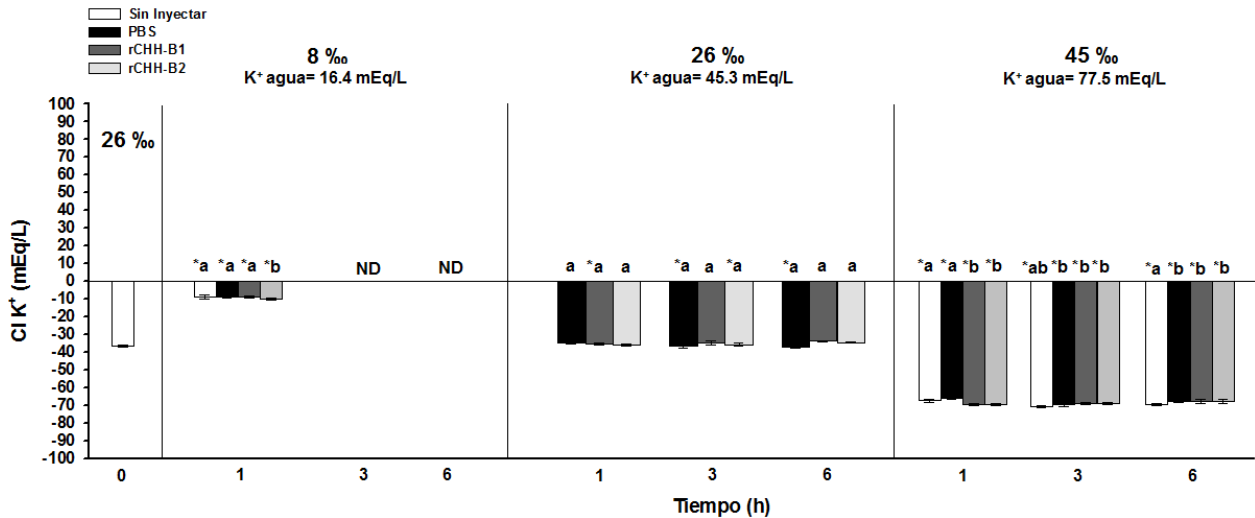


Figura 42. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la capacidad ionorreguladora (CI) del ion K⁺ de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

Como se esperaba en condiciones iso-osmóticas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control con PBS. Finalmente en condiciones de alta salinidad, sólo hubo un efecto de las hormonas después de 1 h, el cual se evidenció por el incremento en la hipo-CI del ion con respecto al valor sin inyección (-67.37 ± 0.80 mEq/L) y del PBS (-66.19 ± 0.42 mEq/L). Este cambio fue más notorio en el tratamiento con rCHH-B2 (-69.61 ± 0.50 mEq/L)

El valor basal de la CI para el ion Ca²⁺ de los camarones en intermuda (Fig. 43) fue de -58.80 ± 1.64 mEq/L. El único efecto significativo con respecto al PBS durante todo el experimento fue registrado en la salinidad iso-osmótica con rCHH-B2, en el cual los organismos presentaron una disminución gradual de la CI del ion hasta ser significativa a las 6 h postinyección (-56.54 ± 1.29 mEq/L) con respecto al control con PBS (-61.45 ± 0.71 mEq/L).

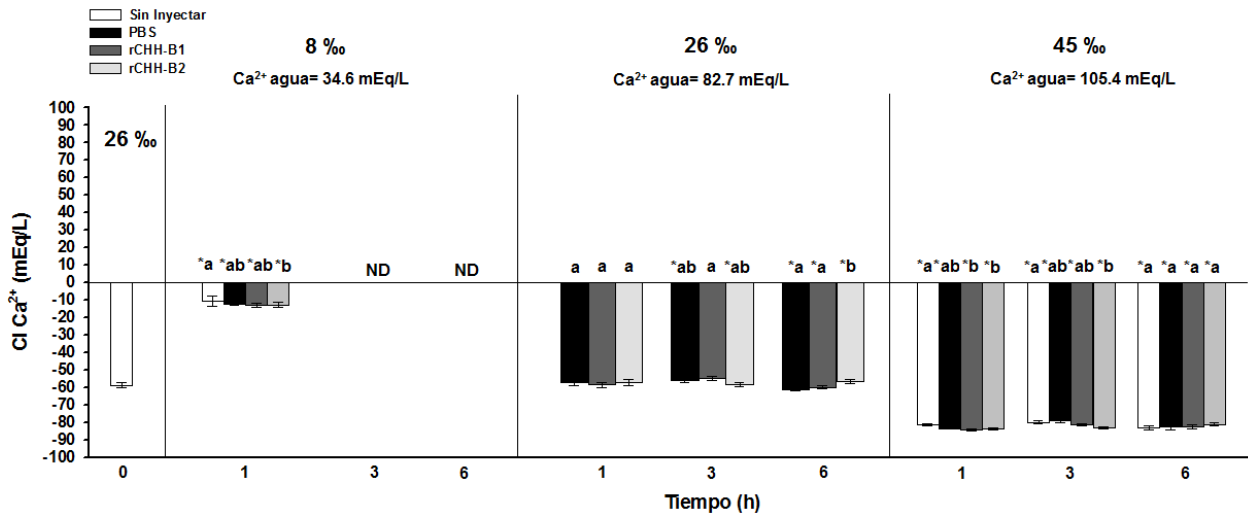


Figura 43. Efecto de la inyección de las neurohormonas recombinantes en la Cl del ion Ca^{+2} de organismos aclimatados a condiciones iso-osmóticas (26 ‰) y expuestos de manera a aguda a salinidades extremas. ND, no determinado. Los resultados se expresan como las medianas \pm IC al 95%. *, Diferencias significativas con respecto a los organismos sin inyectar a las 0 h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($p < 0.05$).

4.5 Discusión

Todos los crustáceos marinos cuentan con una capacidad limitada de regular sus condiciones osmóticas internas, las cuales tienden a fluctuar en relación a la salinidad ambiental (Charmantier *et al.*, 2009; Lignot y Charmantier, 2015). El camarón blanco pasa gran parte de su ciclo de vida en los estuarios, ambientes donde la salinidad suele variar con el ciclo de marea y la estación del año (Regnault, 1984).

Se ha demostrado que la capacidad de tolerancia a la salinidad en decápodos depende de su habilidad para osmorregular (Henry *et al.*, 2012) y que los mecanismos para llevarlo a cabo dependen de un control neuroendócrino (Charmantier y Charmantier-Daures, 1998; Charmantier *et al.*, 2009). En este sentido es que a las CHHs se les ha atribuido un papel importante en osmoregulación (Chung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Webster, 2015).

Para conocer si las isoformas rCHH-B1 y rCHH-B2 podrían participar en la osmorregulación se evaluó su efecto sobre un indicador fisiológico no específico del desempeño osmótico de los organismos como es la CO (Lignot *et al.*, 1999).

En organismos sub-adultos ablacionados aclimatados en agua de mar (35 ‰), la isoforma rCHH-B1 provocó un incremento en la hipo-CO a partir de 100 pmol a 1 h postinyección, mientras que rCHH-B2, por el contrario disminuyó la hipo-CO de juveniles a partir de 10 pmol de hormona. Este efecto que se vio potenciado por la amidación del C-terminal al comparar con la misma dosis de versión no amidada, lo cual sugiere que esta modificación es importante para las funciones biológicas del péptido asociadas a osmoregulación.

Aunque los resultados obtenidos sobre los efectos de las rCHHs sugieren su participación en los procesos de osmorregulación, las condiciones experimentales no permiten evidenciar que podrían tener diferentes mecanismos de acción bajo condiciones hiper-osmóticas, ya que hubo contrastes entre las tallas utilizadas en ambos ensayos y el método de ablación empleado, los cuales pudieron tener un efecto importante sobre los resultados obtenidos.

Con respecto a las tallas, Lignot *et al.* (1999) reportan en *Litopenaeus stylirostris* que la hipo-CO en agua de mar disminuye proporcionalmente con la talla (3-40 g) debido al incremento en la presión osmótica, por lo tanto los organismos adultos son mejores osmorreguladores en agua de mar que los juveniles, los cuales son hipo-reguladores fuertes y empiezan a perder esta habilidad con el incremento conforme avanzan hacia la etapa adulta en preparación a su migración al mar. La máxima capacidad de osmorregulación de los juveniles a baja salinidad y la pérdida de habilidad de hiperregular en esas condiciones durante la etapa adulta también se ha reportado en *L. vannamei* (Chong-Robles *et al.*, 2014).

En relación a los métodos de ablación empleados en ambos ensayos, en el experimento con rCHH-B1 desde la primera ablación hasta el muestreo pasaron semanas, mientras que en el experimento con rCHH-B2 los organismos se ablacionaron bilateralmente dos días antes de los muestreos. Por lo tanto, la diferencia temporal que los organismos permanecieron ablacionados fue marcada y pudo haber tenido un efecto en la CO.

Lo anterior se hizo evidente en la hipo-CO de los grupos sin inyección sin ablación con respecto a los ablacionados. En el ensayo con rCHH-B1 se registró un incremento

de la hipo-CO, mientras que con rCHH-B2 no hubo un efecto significativo sobre la CO producto de la ablación. Al respecto, algunos autores señalan que la ablación bilateral parece modificar la osmolaridad interna después de semanas (Charmantier *et al.*, 1984; Serrano *et al.*, 2003), debido al deterioro fisiológico causado por el desbalance hormonal (Chu y Chow, 1992). Además, aunque existen órganos neuroendocrinos secundarios que son fuente de neuropéptidos y neurotransmisores (Christie, 2010), nuestros resultados sugieren que fueron insuficientes para compensar las funciones del OX-GS a largo plazo.

Tomando en consideración los resultados del experimento anterior en alta salinidad, se llevaron a cabo experimentos con organismos expuestos a salinidades extremas en un periodo de tiempo corto para analizar el efecto de los péptidos recombinantes en respuesta al estrés osmótico.

Los organismos fueron aclimatados al punto iso-osmótico de la especie (Díaz *et al.*, 2001), la cual es una condición de ausencia de estrés osmótico. Bajo estas condiciones, la CO de los organismos se mantuvo cercana a 0. Esto ocurre porque en estas condiciones los crustáceos eurihalinos mantienen sus mecanismos de osmorregulación al mínimo, manteniendo una composición iónica similar a la del medio externo (Romano y Zeng, 2012). Por lo tanto, los tratamientos con hormonas no modificaron de forma significativa la CI de los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻.

Sin embargo, en estas condiciones las hormonas recombinantes provocaron una respuesta hiperglucémica (1 h) seguida por un incremento en la concentración de proteínas (6 h), la cual coincidió con la disminución en la CO producto de un incremento en la osmolaridad. La reducción en la relación hemocianina a proteínas en ese tiempo, indicó que el incremento fue en proteínas que no son hemocianina, ya que esta última no modificó su concentración. Esta respuesta sugiere algo similar a lo observado en experimentos anteriores (Capítulo 3), donde las hormonas movilizaron fuentes de energía alternativas a la glucosa (lípidos).

Los aminoácidos pueden usarse como combustible, y algunos de ellos como precursores de glucosa vía gluconeogénesis (Murray *et al.*, 2003). Esto se ha observado que ocurre en *L. vannamei* bajo condiciones de ayuno (Sánchez-Paz *et al.*, 2007) y estrés por manipulación (Aparicio-Simón *et al.*, 2010), donde los organismos bajo esas

condiciones utilizan la glucosa almacenada en forma de glucógeno, posteriormente utilizan los triglicéridos para obtener energía y finalmente catabolizan las proteínas. De ser así, en tiempos posteriores a 6 h, se esperaría que la concentración de proteínas disminuyera de nuevo y hubiese un incremento en la excreción nitrogenada por la desaminación de aminoácidos (Henry *et al.*, 2012).

En la salinidad hipo-osmótica no fue posible la toma de datos a partir de 3 h, ya que se registró muerte de organismos posiblemente asociado al cambio brusco de la salinidad y el estadio del organismo. Al respecto, se observó que las branquias en estos organismos presentaban una coloración mucho más oscura con respecto a los camarones iniciales. Al respecto, en *Portunus pelagicus* se ha observado que la exposición a salinidades extremas provoca cambios en el epitelio branquial y necrosis (Wangwibulkit y Boaphadung, 2010), por lo cual resultaría interesante estudiar el efecto del estrés osmótico sobre la histología de las branquias y otras estructuras dentro de la cámara branquial en diferentes estadios. En condiciones hiper-osmóticas no se presentó mortalidad en los organismos.

Aunque en ambas salinidades se observó una respuesta hiperglucémica, a baja salinidad, la concentración de proteínas en los grupos experimentales fue mucho menor (~52%) que en el grupo basal, y no correspondieron a hemocianina según la relación a proteínas totales. En contraste, a alta salinidad, especialmente en los tratamientos con las rCHHs, se observó una disminución más lenta en la concentración de proteínas, incluyendo hemocianina. Esto sugiere que la compensación osmótica a baja salinidad fue más costosa a nivel metabólico. Al respecto Rosas *et al* (1999) al someter a *Penaeus setiferus* bajo condiciones hipo-osmóticas reportaron un uso preferente de proteínas para obtener energía, lo cual incrementó la excreción de amonio. Esto ha sido observado también en *L. vannamei* (Díaz *et al.*, 2001) y *Metapenaeus monoceros* (Pillai y Diwan, 2002).

Sin embargo, el patrón de respuesta a alta salinidad, también es propio de una condición de estrés. Esto concuerda con lo observado por Re *et al.* (2009) en *L. stylirostris*, donde los organismos mantenidos en condiciones hiper-osmóticas presentaron una alta demanda de energía y una mayor excreción de amonio con respecto a los organismos en condiciones iso-osmóticas.

Se ha observado que en post-larvas de *L. vannamei* expuestas a agua dulce y posteriormente regresadas a agua de mar incrementan rápidamente la concentración de aminoácidos libres totales y la excreción de amonio, proponiendo que los organismos son capaces de resistir los cambios de salinidad manipulando el metabolismo del nitrógeno y la concentración de osmolitos orgánicos (Gómez-Jiménez *et al.*, 2004). En este trabajo, los juveniles, podrían estar utilizando este tipo de mecanismos de compensación para hacer frente al estrés osmótico.

La disminución de las proteínas en condiciones hiper-osmóticas fue mayor en los tratamientos con rCHHs. Estos resultados aunados al aumento observado en los niveles de triglicéridos mencionado en el capítulo anterior, sugiere que las hormonas podrían modular los mecanismos de compensación dependientes del uso de carbohidratos, lípidos y proteínas en condiciones de estrés hiper-osmótico.

En cuanto a la CO, bajo condiciones hipo-osmóticas (8 ‰) los organismos se mantuvieron hiper-osmóticos con respecto al medio externo y al menos a 1 h postinyección, las hormonas no se observó un efecto significativo. A baja salinidad, la CI de Na⁺ fue cercana a 0 y no presentó diferencias entre grupos experimentales, como ocurrió con el Cl⁻. Sin embargo, en estas condiciones la concentración de NaCl a 1 h postinyección estuvo entre 500-600 mEq/L (mOsmol/kg) en todos los tratamientos, la cual fue superior a la del medio externo (332.8 mEq/L) y represento ~89% de la osmolaridad (652 mOsmol/kg) de la hemolinfa. Estos datos son similares a los presentados por Castille y Lawrence (1981), en juveniles de peneidos en salinidades de 5 y 10 ‰, en las cuales esos iones representan el 86 y 79% de la presión osmótica interna, respectivamente.

Con respecto al K⁺, la disminución significativa en la CI en el tratamiento con rCHH-B2 indicó una reducción en la concentración de este ion. En general, a baja salinidad las concentraciones de iones fueron más bajas con respecto al valor inicial, lo que concuerda con lo observado por Mena-Herrera *et al.* (2011), donde después de 3h de la transferencia de *L. vannamei* adultos desde 40 ‰ a menores salinidades (30, 20, 10 y 0 ‰) tanto en hembras como en machos las concentraciones de Na⁺, Cl⁻ y K⁺ disminuyeron con la salinidad.

El efecto del estrés causado por el choque hipo-osmótico pudo haber tenido fuerte impacto sobre los mecanismos de compensación iónica en un nivel tal que no fueran detectables los efectos aislados de las hormonas, así como cambios en la secreción natural de otros factores neuroendócrinos de OX-GS. Por otro lado, al no tenerse conocimiento de los efectos en los siguientes puntos de muestreo, no se puede descartar aún que los péptidos tengan alguna función en estas condiciones.

Por otro lado en condiciones hiper-osmóticas las hipo-CIs incrementaron con respecto al valor inicial puesto que las concentraciones en el medio externo fueron mayores. Los péptidos recombinantes modificaron los valores de Na^+ y K^+ de manera estadísticamente significativa. Los organismos presentaron una menor hipo-CI del Na^+ y una mayor hipo-CI del K^+ con respecto a los controles 1 h posterior a la inyección coincidiendo con el pico de glucosa en la hemolinfa. Por otra parte, con rCHH-B2 la hipo-CI del Na^+ en tiempos posteriores y Cl^- fue disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar un mínimo después de 6 h, lo cual coincide con los niveles más bajos de proteínas en los tratamientos con hormonas.

Esto sugiere que ambos péptidos podrían tener un efecto modulador del movimiento de iones en la hemolinfa. En *P. marmoratus* y *A. leptodactylus* se ha propuesto que CHH incrementa en el influjo de Na^+ en los organismos (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003). El intercambio de iones ocurre en su mayoría a través de las branquias donde hay proteínas que se encargan de llevar a cabo esta función. Los modelos de transporte de NaCl a través del epitelio de las branquias se basan básicamente en la actividad ANK, cuya expresión y actividad responde a la salinidad (Charmantier *et al.*, 2009). En *L. vannamei*, una rCHH con alta homología de secuencia con CHH-A, después de su inyección incrementó la actividad ANK en juveniles aclimatados a condiciones iso e hiper-osmóticas (36 ‰) (Liu *et al.*, 2014). Por lo tanto las CHH-B1 y CHH-B2 de *L. vannamei* podrían estar involucradas en esta función.

Al respecto, en las branquias existen pequeños depósitos de glucógeno y es un tejido donde se ha observado que ocurre la gluconeogénesis (Jimenez y Kinsey, 2015). En *C. sapidus* se ha reportado la presencia de sitios de unión de CHH en las branquias e intestino (Katayama y Chung, 2009), en los cuales hay canales y enzimas que transportan iones (Lignot y Charmantier, 2015). En *L. vannamei* se ha documentado la

expresión de CHH-B1 en esos tejidos (Tiu *et al.*, 2007), por lo cual las isoformas podrían unirse a receptores directamente en esos tejidos. La rCHH-B1 podría tener una acción autócrina o parácrina estimulando los cambios metabólicos de manera local o mediante el efecto de movilización de las reservas energía a la hemolinfa.

Adicionalmente a la producción de orina concentrada en la glándula antenal, se ha sugerido que la regulación hipo-iónica a alta salinidad ocurre en parte mediante la excreción de iones a través de las estructuras branquiales mediante mecanismos actualmente desconocidos. Sin embargo, organismos juveniles de *L. vannamei* aclimatados a 30 ‰ y transferidos inmediatamente durante una semana a 45 ‰, se observó una mayor concentración de iones Na⁺ y Cl⁻. Estos resultados sugieren que los organismos utilizan otros mecanismos para regular su volumen intracelular y evitar la pérdida de agua, como la síntesis de osmolitos orgánicos, ya que bajo condiciones hiper-osmóticas se incrementaron las sustancias positivas a la ninhidrina en músculo, las cuales incluyen los aminoácidos libres (Roy *et al.*, 2007).

Al respecto, en *Macrobrachium olfersii* se ha observado que la transferencia de estos organismos de agua dulce a agua de mar a 21 ‰ provocó un incremento progresivo en la osmolaridad y concentración de iones a las 24 h, sin embargo, la concentración de aminoácidos libres en hemolinfa disminuyó mientras que en músculo, tejido nervioso y branquias incrementó. Esto sugiere que además de provenir de procesos intracelulares de síntesis *de novo* y catabolismo de proteínas, podría haber un influjo de aminoácidos desde la hemolinfa a los tejidos (McNamara *et al.* 2004). Esto proporcionaría una explicación alternativa para la disminución de las proteínas de la hemolinfa en los camarones inyectados con las CHH's y expuestos a condiciones hiper-osmóticas, lo que sugiere su participación en los procesos relacionados con el catabolismo de proteínas.

Estos procesos podrían haber contribuido a que en los organismos inyectados con rCHH-B1 y sometidos a condiciones hiper-osmóticas la CI de los iones se viera rápidamente re-establecida a valores comparables con los controles, a diferencia de rCHH-B2 en donde la CI del Na⁺ y Cl⁻ continuó disminuyendo. Muestreos en posteriores tiempos podrían ayudar a determinar si en algún momento existe un equilibrio con respecto a los grupos control.

Por otra parte, sorprendentemente a pesar del incremento en Na^+ a 1 h postinyección de rCHH-B1, la hipo-CO de los organismos en condiciones hiper-osmóticas se incrementó como consecuencia de una disminución en la osmolaridad interna, lo cual también se observó en el experimento con camarones ablacionados. Una posible explicación para esto podría ser que la isoforma rCHH-B1 esté involucrada en la absorción de agua que ocurre de manera natural durante la ecdisis, como lo sugieren los incrementos en la expresión de sus ARNm en OX-GS durante esa etapa (Tiu *et al.*, 2007).

Al respecto, Chung *et al.* (1999), encontraron que una CHH de *C. maenas* es secretada durante la muda por el intestino, durante la cual existe un incremento en el volumen de los organismos. De manera similar, Ventura-López *et al.* (2016) un nuevo transcrito de una isoforma CHH-L de *L. vannamei*, el cual incrementó su expresión en intestino considerablemente durante la premuda sugiriendo una función en la absorción de agua previo a la ecdisis.

Por otro lado, Fernandes-Santos (2002) documentó en *Ucides cordatus* que las tasas de ingesta de agua se incrementaron durante la hipo-regulación en agua de mar, junto con una disminución de Na^+ en los jugos gástricos; mientras que los fluídos de las células intestinales y la hemolinfa se mantuvieron iso-iónicos. Lo anterior sugirió que el transporte de agua está acoplado al de sodio, el cual a su vez de manera hipotética podría ser dependiente de la actividad ANK. De igual manera, rCHH-B1 pudiera tener un papel en la asociación de iones con gasto energético, permitiendo así la entrada de agua.

En general, la modulación de los efectos de rCHH-B1 podría depender de los sitios de secreción así como de la dosis liberada, tomando en cuenta que su expresión ocurre en múltiples tejidos y varía con el ciclo de muda (Tiu *et al.*, 2007).

El péptido rCHH-B2 también provocó un efecto sobre la concentración de Ca^{2+} de manera puntual a las 6 h en 26 ‰. Aunque esto no se observó en las salinidades de estrés podría ser un indicio de un posible papel en la regulación de las concentraciones de este catión, cuyos niveles en crustáceos muestran alta dependencia del ciclo de muda (Knowles y Carlisle, 1956; Freire *et al.*, 2008). Sin embargo, el papel de los péptidos CHH en la regulación del transporte de Ca^{2+} no ha sido explorado.

Se ha propuesto que el transporte de calcio transcelular en el epitelio de las branquias, hepatopáncreas y glándula antenal ocurre mediante canales dependientes de los gradientes generados por la ATPasa Na^+/K^+ y también mediante la actividad la ATPasa de Ca^{2+} , siendo un proceso demandante de energía (Ahearn *et al.*, 2004), por lo tanto las CHHs serían buenos candidatos reguladores de esos procesos.

Los resultados presentados en este capítulo proporcionan en conjunto un fuerte indicio de la participación de los péptidos CHH-B1 y CHH-B2 en la osmorregulación en *L. vannamei* y la respuesta a corto plazo al estrés provocado por los cambios de salinidad. Sin embargo, habría que estudiar más a detalle como estas señales inducen la secreción de las hormonas de los diferentes tejidos de manera natural, y si este tipo de respuestas también tienen alguna relación con la edad y el ciclo de muda.

4.6 Conclusiones

Los péptidos recombinantes tuvieron un efecto osmótico en camarones ablacionados. El péptido rCHH-B1 promovió un incremento de la hipo-CO en agua de mar a partir de 100 pmol, mientras que rCHH-B2 redujo la hipo-CO a partir de 10 pmol.

La amidación disminuyó la hipo-CO de rCHH-B2 en comparación con la misma concentración de la versión sin amidar, sugiriendo que esta modificación no solo tiene relevancia para la actividad hiperglucémica, si no para la función biológica del péptido en general, ya que posiblemente repercute sobre su estructura.

El método de ablación empleado en los experimentos de dosis-respuesta, afectó de manera distinta a los organismos a nivel osmótico. El efecto prolongado de la ablación en el ensayo con rCHH-B1 ocasionó un desbalance hormonal evidenciado por un incremento de la hipo-OC con respecto a los organismos sin ablacionar. Esto a diferencia de los organismos del ensayo con rCHH-B2, los cuales permanecieron ablacionados un periodo corto de tiempo.

Ambas rCHHs tuvieron efectos metabólicos en organismos expuestos a diferentes condiciones de salinidad. Independientemente de las salinidades, estas ocasionaron una respuesta hiperglucémica y un efecto sobre los niveles de proteínas, lo que sugiere que promueven la movilización de proteínas a la hemolinfa y su consumo bajo condiciones

de estrés en el camarón blanco. Esto podría estar relacionado a su uso para obtener energía o bien a procesos de regulación osmótica intracelular como la generación de osmolitos orgánicos.

La muerte de los organismos a partir de las 3h de exposición aguda a 8 ‰ junto con una menor cantidad de proteínas en la hemolinfa sugiere un gran estrés metabólico para organismos *L. vannamei*.

No se observaron efectos en las Cls y CO de la hemolinfa a 1 h postinyección de rCHH-B1 y rCHH-B2 en los organismos juveniles expuestos a condiciones hipo-osmóticas agudas. Esto pudo deberse a que el estrés agudo enmascaró algún efecto de las hormonas. Sin embargo, no se descarta que las hormonas modifiquen estas respuestas a mayor tiempo o en otro estadio del ciclo de vida.

Ambas neurohormonas modificaron la Cl de los iones Na^+ , Cl^- y K^+ en condiciones hiper-osmóticas, sugiriendo que promueven cambios en el transporte de NaCl, actuando directamente sobre los tejidos encargados de la osmorregulación o mediante un efecto indirecto de la energía generada por la movilización de las reservas metabólicas.

El incremento de la hipo-CO observado con el péptido rCHH-B1 bajo condiciones hiper-osmóticas se debió a una disminución de la presión osmótica. Estos resultados podrían asociarse a una posible función de la hormona en incorporación de agua en el organismo, la cual ocurre naturalmente durante la ecdisis, como lo sugieren estudios en esta y otras especies.

El péptido rCHH-B2 provocó un incremento puntual en la concentración de Ca^{2+} en condiciones iso-osmóticas, lo cual abre la posibilidad a futuras investigaciones del papel de las CHHs en el transporte de este ion.

Capítulo 5. Integración

5.1 Discusión general

El estudio de la endocrinología de crustáceos ha evolucionado considerablemente desde que en 1944, se descubrió el primer factor neuroendócrino en los pedúnculos oculares de cangrejos (Abramowitz *et al.*, 1944). Desde ese momento hasta la actualidad, se han identificado una gran cantidad de neuropéptidos, muchos de ellos pertenecientes a la familia CHH (Webster, 2015).

Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética se ha logrado la producción de neuropéptidos en escalas que ha permitido investigar sus estructuras y funciones con tan sólo conocer la secuencia de ARNm (Katayama *et al.*, 2013). Este enfoque actualmente se ha aplicado en nuestro grupo de trabajo para estudiar la actividad biológica de las CHHs de *L. vannamei*. A partir de la clonación del ADNc las isoformas CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 (Lago-Lestón *et al.*, 2007) se ha conseguido su producción utilizando sistemas de expresión basados en levadura *P. pastoris*, en cantidades suficientes para su estudio, permitiendo resolver problemas como la dificultad de purificar de las glándulas por su baja expresión y similitud estructural entre los péptidos de la familia CHH (Sánchez *et al.*, 2008; López-Rodríguez, 2009; Mancera-Flores, 2009; Camacho-Jiménez, 2011, Balderas-González, 2014; Arredondo-Espinoza, 2014).

Los péptidos CHH-B1 y CHH-B2 se han expresado y purificado como proteínas de fusión con regiones adicionales en el extremo C-terminal (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; López-Rodríguez, 2009). La actividad hiperglucémica ha sido determinada para el péptido CHH-B1 recombinante (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008), pero las funciones de CHH-B2 hasta este trabajo no habían sido exploradas. Por otra parte, se ha sugerido que la presencia de regiones adicionales pudieran tener un efecto en su actividad biológica (Sánchez-Castrejón, 2007).

Algunos autores han argumentado acerca de la importancia de esta región para la actividad biológica y la divergencia funcional entre los miembros de la familia CHH (Mettulio *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015). En las isoformas originadas mediante corte y empalme alternativo, el extremo C-terminal es altamente variable. Esto se ha observado

al comparar las secuencias (Fig. 16) de los péptidos maduros CHH-B1 y CHH-B2 con respecto a otras isoformas en otros crustáceos originadas de la misma manera.

Como generalidad, en todos los casos descritos a la fecha, los péptidos comparten los primeros 40 residuos de la región N-terminal y difieren en la secuencia restante. Uno de los péptidos posee un extremo carboxilo libre (CHH-B1), por lo cual es clasificado como un péptido tipo CHH (CHH-L) mientras que el otro posee un grupo amida (CHH-B2) el cual es una característica de las CHHs (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015).

Al respecto, el grupo amida se ha considerado la razón de la divergencia funcional de los péptidos CHH/CHH-L, donde la falta de la misma es la explicación más aceptada para la carencia o baja actividad hiperglucémica de las isoformas CHH-L (Lee *et al.*, 2014). Sin embargo, CHH-B1 es un péptido CHH-L con actividad hiperglucémica notable (Sánchez *et al.* 2008), indicando que las isoformas CHH/CHH-L de peneidos como *L. vannamei* pueden no ajustarse del todo a esas generalidades.

Esto fue validado gracias a la serie de experimentos realizados en este trabajo, utilizando versiones recombinantes de las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 expresadas en *P. pastoris* con una secuencia idéntica a la de los péptidos maduros de la glándula del seno. Estos péptidos al no tener regiones adicionales fusionadas a su secuencia, se esperaba presentaran una actividad más cercana a los péptidos nativos al no haber influencia de residuos adicionales en su conformación y plegado. Los péptidos fueron purificados por RP-HPLC como lo confirmaron los análisis por secuenciación N-terminal y Western blot con el anticuerpo diseñado a partir de la región conservada. Los rendimientos obtenidos fueron mayores que los reportados para otras hormonas de crustáceos expresadas sin etiquetas en levaduras (Ohira *et al.*, 2003; Udomkit *et al.*, 2004; Treerattrakool *et al.*, 2014), lo cual quiere decir que la metodología desarrollada en este trabajo fue exitosa.

Por otra parte, se purificó el péptido rCHH-B2 en su versión amidada (rCHH-B2-NH₂) como lo sugieren el perfil de la separación cromatográfica de la reacción de α -amidación *in vitro* utilizando una enzima PAM comercial que utilizó la glicina libre en el extremo C-terminal de rCHH-B2 como sustrato (Fig. 15). Este tipo de metodología se ha utilizado para producir péptidos rCHH amidados ya que los sistemas de expresión

basados en bacterias y levaduras no realizan este tipo de modificación postraducciona (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009; Ohira *et al.*, 2003). En animales superiores se ha detectado que ocurre en células nerviosas o endócrinas debido a que son las únicas que expresan la enzima PAM (Attenborough *et al.*, 2012). Sin embargo, aún falta validar la amidación del péptido por espectrometría de masas.

Los péptidos rCHH-B1 y rCHH-B2 presentaron similitudes y diferencias en sus efectos a lo largo de los experimentos realizados en este trabajo, los cuales se resumen en la Tabla 6.

Primeramente, en ensayos de tipo dosis-respuesta con organismos ablacionados (sección 3.4.1.3), ambas isoformas presentaron actividad hiperglucémica dependiente de la dosis. La actividad del péptido rCHH-B1 se consideró alta al ser comparada con la de péptidos recombinantes de otros peneidos que de manera natural presentan amidación y fueron amidados *in vitro* (Katayama *et al.*, 2002; Ohira *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2009) expresados en bacterias (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009) y en levaduras (Ohira *et al.*, 2003). Por lo tanto, se confirma que CHH-B1 es el primer péptido CHH-L encontrado en crustáceos con actividad hiperglucémica significativa (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015).

A lo anterior se suman los datos obtenidos con rCHH-B2, producido con una glicina libre C-terminal, la cual presentó actividad hiperglucémica alta a diferencia de otros péptidos que se han expresados de otra manera y presentan baja actividad sino se amidan *in vitro* (Katayama *et al.*, 2002; Ohira *et al.*, 2003; Mosco *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). No obstante, rCHH-B2-NH₂ presentó mayor actividad hiperglucémica que el péptido con la glicina libre.

Sin embargo, los resultados experimentales sugieren que esta modificación post-traducciona, aunque no es indispensable para conferir actividad hiperglucémica a los péptidos CHH/CHH-L, probablemente si lo es para la actividad completa de los péptidos que naturalmente la presentan como CHH-B2. Esto fue consistente con los datos obtenidos en otras respuestas como los efectos rCHH-B2-NH₂ sobre los niveles de triglicéridos (Fig. 29) y CO (Figs.34), los cuales se vieron magnificados con respecto a rCHH-B2. Esto quizás se relaciona con el impacto que tiene sobre la conformación de los

péptidos recombinantes, puesto que los péptidos amidados *in vitro* presentan un incremento en el contenido de hélices alfa con respecto a las versiones sin amidar (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). Sin embargo, ya que las versiones sin amidar retienen actividad hiperglucémica, aunque muy baja, se ha propuesto que en realidad todos los residuos de esta región podría jugar algún papel importante en las funciones de las CHHs (Katayama *et al.*, 2002).

Tabla 6. Resumen de los efectos de la inyección de las rCHHs sobre las respuestas metabólicas y osmorregulación bajo diferentes condiciones de salinidad

Salinidad	rCHH-B1				rCHH-B2			
	35‰*	Exposición aguda			35 ‰*	Exposición aguda		
		45 ‰	26 ‰	8 ‰**		45 ‰	26 ‰	8 ‰**
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteínas	ND	-	+	NE	ND	-	+	NE
Hemocianina	ND	-	+	NE	ND	NE	NE	NE
Triglicéridos	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	NE
CO	+	+	-	ND	-	NE	-	NE
CI	ND	+ K ⁺ -Na ⁺	NE	NE	ND	+ K ⁺ -Na ⁺ ,Cl ⁻	+ K ⁺ -Ca ²⁺	NE

CO, capacidad osmorreguladora; CI, capacidad ionorreguladora; +, incremento, -, disminución; ND, no determinado en esa condición; NE, no hubo efecto bajo esa condición. *, experimento con organismos ablacionados bilateralmente; **, sólo se determinaron datos a 1 h.

Para aclarar lo anterior, podrían hacerse estudios de mutaciones puntuales de ciertos residuos en esta región de los péptidos recombinantes y analizar cómo estas sustituciones con aminoácidos con otras propiedades modifican su actividad como se ha realizado en *Scylla olivacea* (Liu *et al.*, 2015); o bien realizar deleciones completas de los dominios hacia la región C-terminal como se hizo en *Nephrops norvegicus* (Mettulio *et al.*, 2004). Sin embargo, dada la alta homología de la región N-terminal en las isoformas CHH/CHH-L, puede que esa región también sea importante para las funciones de estos péptidos como lo señalan Liu *et al.* (2015) al encontrar que hay ciertos residuos importantes para la función hiperglucémica en los dominios A1 (N-terminal) y A5 (C-terminal) de las CHHs y como lo puntualizan también Mettulio *et al.* (2004) donde la deleción de ciertos dominios en la región N-terminal puede ocasionar desde una disminución hasta una pérdida total de función.

La capacidad de ambos neuropéptidos recombinantes de *L. vannamei* de elevar la concentración de triglicéridos en la hemolinfa y modificar la capacidad osmorreguladora (CO) de los organismos a 35 ‰ sugirió que son multifuncionales. El efecto sobre los triglicéridos fue independiente de la dosis con rCHH-B1 al contrario de rCHH-B2 donde sí hubo una clara dependencia de la dosis. En crustáceos el incremento de triglicéridos en la hemolinfa se ha observado ocurre en situaciones de estrés, por ejemplo la presencia de contaminación (Yang *et al.*, 2013), donde se ha observado un incremento en la secreción de CHH y los niveles de glucosa (Lorenzon, 2005). En ese estado, la demanda de energía se incrementa y los lípidos podrían funcionar como combustible (Santos *et al.*, 1997), particularmente los triglicéridos, además como fuente de glicerol el cual entra a la ruta gluconeogénica (Murray *et al.*, 2003).

En relación con lo anterior, los experimentos que realizamos con juveniles expuestos a diferentes condiciones de salinidad (apartado 4.4.2), las hormonas también promovieron el incremento de proteínas bajo condiciones iso-osmóticas y su disminución ante la exposición aguda a estrés hiper-osmótico. Por lo tanto, en general ambas hormonas podrían tener un papel en el metabolismo promoviendo la movilización y utilización de otras moléculas distintas a la glucosa, como los lípidos y proteínas, cuando los organismos tienen una alta demanda de energía a fin de preservar la homeostasis.

Esto es similar a lo observado en otros crustáceos donde la secreción de las CHHs y los niveles de glucosa se incrementan bajo otras condiciones de estrés como hipoxia (Webster, 1996), estrés térmico (Chang *et al.*, 1998), contaminación (Lorenzon *et al.*, 2004; Lorenzon *et al.*, 2005), y presencia patógenos (Lorenzon *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2013), por lo cual se ha propuesto como una molécula indicadora del estado de salud de los organismos (Chang, 2005).

Ambos péptidos tuvieron distintos efectos sobre la CO en organismos ablacionados aclimatados en condiciones hiper-osmóticas. La hormona CHH-B1 incrementó la hipo-CO en sub-adultos, lo cual también fue observado en juveniles sin ablacionar expuestos en forma aguda y por poco tiempo a una alta salinidad. La inyección de CHH-B2 en organismos juveniles ablacionados y aclimatados disminuyó la hipo-CO, a diferencia de los organismos expuestos a estrés salino agudo. Sin embargo, las condiciones del diseño experimental variaron entre los ensayos con rCHH-B1 y rCHH-B2 por lo que tal vez la edad y el tiempo que pasaron los organismos ablacionados bilateralmente en cada experimento influyeron en los resultados. Sin embargo, estos hallazgos apuntaron a un posible papel de las hormonas CHH-B1 y CHH-B2 en la osmorregulación, por lo cual posteriormente se estudió el efecto de las hormonas recombinantes en la respuesta al estrés osmótico a corto plazo. A la fecha este es el primer ensayo donde se estudia el papel de las CHHs ante la exposición aguda a salinidades extremas que incluye condiciones iso, hipo e hiper-osmóticas.

De manera general, las hormonas modificaron la CI de los iones Na^+ , Cl^- , y K^+ , al menos ante la exposición a condiciones hiper-osmóticas por lo cual podrían tener un papel importante en la compensación fisiológica ante cambios repentinos en la salinidad ambiental como ocurre frecuentemente en los estuarios (Lionard *et al.*, 2005).

La función de las CHHs en la osmorregulación podría ser en la modulación de la actividad ANK en las branquias como lo sugieren Liu *et al.* (2014), quienes observaron el incremento de la actividad ANK en las branquias bajo condiciones hiper-osmóticas por efecto de la inyección de una rCHH en *L. vannamei*. Análisis posteriores de las que las muestras colectadas de los ensayos de estrés agudo permitirán evaluar los cambios en la expresión del gen de la sub-unidad α de la ANK y comprobar esta hipótesis.

Aun cuando existen estudios en *L. vannamei* donde se ha detectado la expresión de transcritos (Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015) y la presencia de actividad de la ANK en branquias (Hurtado *et al.*, 2007; Jasmani *et al.*, 2010), un estudio reciente con marcaje por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal diseñado a partir de la ANK de *Gallus* (gallo) localizó a la ANK en estructuras dentro de la cámara branquial como el epipodito y branquiosteguito. Esto aunado a la presencia de un epitelio plano y poco diferenciado, sugiere que las branquias tienen una función más respiratoria que en osmorregulación (Chong-Robles, 2015). Por lo tanto, en un futuro se podría considerar explorar los cambios en expresión o actividad en las estructuras mencionadas.

El péptido rCHH-B1 en condiciones hiper-osmóticas ocasionó, en forma consistente en los dos experimentos, un incremento en la hipo-CO debido a una disminución en la presión osmótica. En *C. maenas* y *L. vannamei* se ha sugerido que CHH tiene una función en la absorción de agua al liberarse del intestino en alta cantidad (Chung y Webster, 2005; Ventura-López *et al.*, 2016). La hormona CHH-B1 se expresa en el intestino y su expresión en OX-GS se incrementa considerablemente durante la ecdisis por lo cual se ha sugerido esta función (Tiu *et al.*, 2007). En organismos marinos (peces y crustáceos), durante la hipo-regulación en condiciones hiper-osmóticas, la absorción intestinal de agua parece ser dependiente de la absorción activa de sodio (Fernandes-Santos, 2002; Grosell, 2006), lo cual es consistente con el papel metabólico de las CHHs.

Por lo tanto, la dosis, como también lo sugieren nuestros experimentos, así como el tejido secretor podrían ser determinantes en los efectos fisiológicos de las CHHs de *L. vannamei*. Esto se podría validar estudiando los cambios en la expresión en otros tejidos además del pedúnculo ocular de manera cíclica y en respuesta a la salinidad.

Desafortunadamente, no se pudieron obtener datos después de 1 h de la inyección bajo condiciones hipo-osmóticas ya que los organismos empezaron a presentar mortalidad a partir de 3 h, observándose daño en las branquias, lo cual en conjunto con un rápido descenso en las proteínas observado a 1 h postinyección podrían sugerir un alto gasto de energía por la necesidad de asimilación de iones de manera activa (Díaz *et al.*, 2001).

Los aminoácidos libres generados por el catabolismo de proteínas al ser desaminados pueden entrar a rutas biosintéticas (incluidas la gluconeogénesis) u oxidarse (Berg *et al.*, 2002). Es por ello que a baja salinidad se ha observado que la concentración de aminoácidos libres disminuye (Dalla, 1986) y la excreción de amonio se incrementa, lo cual favorece el intercambio de Na^+ vía ANK (Díaz *et al.*, 2001), al contrario de la alta salinidad donde aumentan los aminoácidos libres para contrarrestar la salida de agua y por lo tanto, la excreción de amonio es menor (Dalla, 1986; Díaz *et al.*, 2001). Esto podría explicar la baja en las proteínas en alta salinidad durante el experimento.

En los ensayos de estrés agudo en la salinidad de 8 ‰, algunos de los organismos de la talla empleada (7.3 ± 1.5 g) presentaron desarrollo de estructuras reproductivas propias de los machos (petasma), por lo cual en su mayoría podrían ya haber adquirido un patrón de osmorregulación más parecido al de la etapa adulta, donde hay pérdida de la habilidad de osmorregular a bajas salinidades, lo cual podría explicar la mortalidad de organismos bajo estas condiciones (Chong-Robles *et al.*, 2014). Sin embargo, Balderas-González (2015), quien estudió el efecto de CHH-A en sub-adultos expuestos de manera aguda a 10 ‰ no registró mortalidad en ningún punto de muestreo (1, 2 y 24 h). Por lo tanto, se tendrían que corroborar estos resultados y se podría hacer una comparativa con juveniles de menor talla. También sería interesante estudiar las respuestas promovidas por CHH bajo estrés osmótico en diferentes etapas del ciclo de vida, o bien los cambios en la expresión de las hormonas en dichas condiciones, ya que en general, en animales se ha observado que la respuesta hormonal se modifica con el desarrollo de los organismos (Strand, 1999) y en el caso particular de los péptidos de la familia CHH de *L. vannamei* también depende de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura y salinidad ambiental (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Tiu *et al.*, 2007; Shinji *et al.*, 2012).

El péptido rCHH-B2 incrementó las concentraciones de Ca^{2+} en condiciones iso-osmóticas a las 6 h lo que podría ser un indicio de un papel de la CHH en la regulación del Ca^{2+} , cuyos niveles en la hemolinfa y tejidos están influenciados directamente por el ciclo de muda siendo reabsorbido en la pre-muda y liberado de sus depósitos en la post-muda (Knowles y Carlisle, 1956; Freire *et al.*, 2008). Curiosamente, el transcrito *chh-B2* presenta mayor expresión durante la pre-muda y post-muda tardía (Tiu *et al.*, 2007), por

lo cual sería interesante corroborar los resultados de estos experimentos, en vista que los procesos de transporte de calcio son dependientes de energía y el papel metabólico de las CHHs (Ahearn *et al.*, 2004).

Los resultados de estos experimentos, sugieren que las diferencias entre las secuencias de ambas isoformas podrían dar lugar a cambios en estructura, lo que podría ser clave para los niveles de actividad y especificidad de funciones. Esto fue sugerido por los análisis predictivos a partir de las secuencias de aminoácidos (sección 2.4.4), donde ambos péptidos presentaron diferencias en sus propiedades físicas y químicas, y en contenido de estructuras secundarias según lo revelaron las herramientas de modelado tridimensional, lo cual se validó de manera experimental por FTIR (2.4.5).

Una de las diferencias más importantes encontradas tanto de manera teórica y experimental, fue un mayor contenido de hélices alfa en rCHH-B2. Las herramientas de modelado por homología sugirieron que esto se debió a que la hélice $\alpha 3$ es más extensa en rCHH-B2. El contenido de hélices alfa se ha visto que se incrementa en los péptidos amidados *in vitro* (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010) por lo cual habría que estudiar el efecto de la α -amidación en la estructura de rCHH-B2.

Otra cuestión a considerar, es que la presencia de receptores en un tejido para una hormona específica define su capacidad de respuesta a la misma (Nässel y Larhammar, 2013). En *C. maenas* (Chung y Webster, 2006) y *C. sapidus* (Katayama y Chung, 2009), la disponibilidad de sitios de unión en las membranas de los tejidos y afinidad por los mismos varían entre sus isoformas CHH, así como su habilidad para incrementar los niveles de segundos mensajeros (AMPc o GMPc). Esto podría ser investigado en *L. vannamei* con el fin de saber si las diferencias y similitudes en funciones podrían relacionarse también a esto.

Este trabajo proporciona un primer acercamiento a las funciones de CHH-B1 y CHH-B2 en el metabolismo, osmorregulación y la respuesta al estrés salino. Experimentos donde se analicen a nivel molecular los procesos que pudieran estar involucrados en los cambios observados ayudarán a esclarecer los mecanismos de acción de estas hormonas.

Adicionalmente, sería importante explorar la participación de las CHHs de *L. vannamei* en otros procesos como la muda y la reproducción, los cuales también son de alta demanda energética y donde a la fecha se han sugerido funciones para las CHHs (Lee *et al.*, 2007-, Tiu *et al.*, 2007; Tsuitsui *et al.*, 2013 Ventura-López *et al.*, 2016).

La metodología desarrollada en estos experimentos podría utilizarse para responder otras preguntas sobre el papel fisiológico de éstas y otras neurohormonas en especies utilizados como organismos modelo y especies de importancia comercial. Se espera que algún día los conocimientos fisiológicos generados en nuestro laboratorio sean aplicados en el desarrollo de biotecnologías que permitan, entre otras cosas, controlar procesos fisiológicos o monitorear el estado de salud de organismos tanto en cultivo como silvestres.

5.2 Conclusiones generales

Se evaluó la función de las hormonas recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 de *L. vannamei* en los procesos de movilización de las reservas de energía (glucosa, triglicéridos y proteínas) y de osmorregulación mediante bioensayos con organismos juveniles y sub-adultos ablacionados y sin ablacionar bajo diferentes condiciones de salinidad.

Los neuropéptidos se expresaron en la cepa X-33 *Pichia pastoris* como proteínas secretadas al medio de cultivo con una secuencia de aminoácidos idéntica a los péptidos nativos expresados en *L. vannamei*. Las hormonas se purificaron por RP-HPLC, como lo corroboraron los análisis de inmunodetección, utilizando un anticuerpo policlonal con capacidad de reconocimiento de la región conservada de ambos péptidos y mediante obtención de la secuencia de los primeros 6 aminoácidos N-terminales (DTFDHS) por degradación de Edman.

El alineamiento de las secuencias de CHH-B1 y CHH-B2 sugirió que ambas hormonas de *L. vannamei* tienen poca identidad entre sí (64.8%) y con otras isoformas CHH/CHH-L de otras especies en la región C-terminal, presentando más sustituciones con respecto a los péptidos de cangrejos braquiuros.

Los análisis *in silico* a partir de la secuencia predijeron que ambas isoformas varían considerablemente en sus propiedades físicas y químicas, en cuanto estructura

secundaria y tridimensional. Se encontró que rCHH-B2 presenta un mayor contenido de hélices α en la región C-terminal con respecto a rCHH-B1. Esto coincidió con los análisis de estructura secundaria por espectroscopia FTIR y sugiere diferencias en la afinidad con sus receptores.

Los ensayos realizados con organismos sub-adultos (rCHH-B1) y juveniles (rCHH-B2) ablacionados bilateralmente demostraron la capacidad de las rCHHs de movilizar glucosa y triglicéridos a la hemolinfa de manera dependiente de la dosis, excepto por el efecto de rCHH-B1 sobre los niveles de triglicéridos. Estos metabolitos pueden ser oxidados para obtener energía de manera complementaria a la glucólisis o para obtener glicerol como sustrato gluconeogénico.

Los resultados de la separación cromatográfica de la reacción de amidación de rCHH-B2 sugirieron que el péptido fue amidado *in vitro* (rCHH-B2-NH₂). rCHH-B2-NH₂ presentó un mayor efecto sobre la concentración de glucosa y triglicéridos con respecto a rCHH-B2 con 100 pmol de hormonas. Esto sugiere que el grupo amida C-terminal es importante para la actividad de las CHHs que la presentan. Sin embargo, el hecho de que CHH-B1 sea un péptido con C-terminal libre y promoviera un aumento en los niveles de glucosa y triglicéridos, sugiere que otros aminoácidos en las regiones N- o C-terminal pudieran ser claves para su función.

Ambas hormonas tuvieron efectos en la capacidad osmorreguladora (CO) de camarones sub-adultos y juveniles ablacionados bilateralmente aclimatados a 35 ‰ (hipo-CO), proporcionando un indicio de su participación en la osmorregulación.

En camarones juveniles sin ablacionar expuestos de manera aguda a diferentes condiciones de salinidad, las hormonas presentaron diferentes efectos a nivel metabólico y osmótico. En condiciones hipo-osmóticas no fue posible determinar las respuestas en todos los tiempos de muestreo debido a la mortalidad de los organismos, la cual pudo deberse al estrés.

A nivel metabólico, las rCHHs provocaron una respuesta hiperglucémica y en los niveles de proteínas, el cual fue dependiente de la salinidad provocando un incremento en condiciones iso-osmóticas y una disminución en hiper-osmóticas. De manera general, se propone que movilizan otras fuentes de energía alternativas a la glucosa, como proteínas

para realizar ajustes bajo condiciones de estrés (por ejemplo hiper-osmótico) o bien como mecanismo de ajuste del volumen celular mediante el catabolismo de proteínas para generar amino ácidos libres en alta salinidad.

A nivel osmótico, las rCHHs sólo modificaron la concentración de Na^+ , Cl^- y K^+ en condiciones hiper-osmóticas. Esto sugiere que podrían estimular los mecanismos moleculares para la incorporación de iones, por ejemplo la actividad ANK, ATPasa-V y AC. Por otra parte, rCHH-B2 incrementó los niveles de Ca^{2+} en condiciones iso-osmóticas. De corroborarse este resultado, podría representar una nueva función para las CHHs.

La modificación de la hipo-CO bajo condiciones hiper-osmóticas en respuesta a la inyección de rCHH-B1 fue debida a un incremento en la osmolaridad, lo cual podría relacionarse con la absorción de agua, como lo sugieren otros autores para ésta y otras CHH de otros organismos.

En general, los resultados sugieren que ambas isoformas tiene un papel fisiológico multifuncional en el metabolismo y osmorregulación. Las similitudes y diferencias funcionales encontradas entre ambas isoformas parecen tener una base estructural.

5.3 Perspectivas y recomendaciones

Para determinar que aminoácidos son indispensables para las funciones biológicas de rCHH-B1 y rCHH-B2 se podrían realizar ensayos con péptidos mutantes que presenten sustituciones en los dominios de la región N- y C-terminal considerados claves para su actividad biológica.

Se recomienda confirmar la amidación de rCHH-B2 por espectrometría de masas y por otro lado estudiar la estructura secundaria de rCHH-B2-NH₂ (por ejemplo FTIR) para ver si en ese sentido existe una explicación para el incremento los efectos del péptido amidado.

Sería interesante intentar purificar los péptidos de los tejidos endócrinos en cantidades suficientes que permitan comparar su estructura (y actividad) con respecto a los péptidos recombinantes y ver si son comparables. Una comparación robusta de las estructuras

tridimensionales podría realizarse mediante resonancia magnética nuclear (NMR) o cristalografía de rayos X.

El papel de las rCHHs en la movilización de lípidos y proteínas podría ser corroborado mediante el análisis de su efecto en las concentraciones de lípidos (triglicéridos, ácidos grasos libres, glicerol), proteínas totales, hemocianina, aminoácidos libres (esenciales y no esenciales) tanto en los tejidos de almacenamiento (músculo y hepatopáncreas) como en contraste con los niveles plasma.

Debido a que ambas hormonas influyen en el metabolismo, posiblemente intervengan en otros procesos que implican costo energético, como por ejemplo la reproducción y la muda, lo cual también lo sugieren sus patrones de expresión reportados en diferentes tejidos. En este sentido, sería de gran interés realizar ensayos donde se observe el efecto de las rCHHs sobre la síntesis de ecdiesteroides y la frecuencia de muda, así como en la expresión de genes relacionados con la maduración gonádica (por ejemplo vitelogenina).

Para completar la información obtenida en condiciones hipo-osmóticas se recomienda explorar las respuestas de osmorregulación analizadas en juveniles de menor talla.

Una visión más completa de las funciones en la regulación de los mecanismos de osmorregulación podrían determinarse evaluando el efecto sobre la excreción de amonio y la concentración de aminoácidos libres en diferentes tejidos y hemolinfa en organismos de diferentes estadios.

También sería útil determinar si existen cambios en la expresión de genes o actividad de proteínas involucradas en el transporte activo de iones (ANK, AC, ATPasa-V) en las estructuras con función osmorreguladora (branquias, epipoditos, branquiosteguitos, intestino y glándula antenal).

Para determinar si las CHHs tienen una función en el transporte de calcio, podrían realizarse estudios donde se evalúe su efecto en la expresión de genes relacionados con este proceso (por ejemplo ATPasa de Ca^{2+}), así como su relación con los cambios la expresión y secreción de CHHs a lo largo del ciclo de muda.

Lista de referencias bibliográficas

- Abramowitz, A.A., Hisaw, F.L. and Papandrea, N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *The Biological Bulletin*, 86(1), 1-5.
- Aguilar, M.B., Soyez, D., Falchetto, R., Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hubberman, A. (1995). Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Presence of a D-amino acid. *Peptides*, 16(8), 1375-1383.
- Ahearn, G.A., Prabir, K.M. and Mandal, A. (2004). Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 137(2), 247-257.
- Álvarez, J.D. (1988). Revisión bibliográfica enfermedades virales de crustáceos peneidos con especial referencia al continente Americano. *Veterinaria tropical*, 13, 103-126.
- An, Z., Chen, Y., Koomen, J.M. and Merkler, D.J. (2012). A mass spectrometry-based method for screen for α -amidated peptides, *Proteomics*, 12(2), 173-182.
- Aparicio-Simón, B., Piñón, M. Racotta, R. and Racotta, I.S. (2010). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture*, 298(3), 308-314.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Arredondo-Espinoza, R.C. (2014). *Expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante (rCHH-A) de Litopenaeus vannamei y su efecto en la modulación de los niveles de glucosa*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 54 p.
- Attenborough, R.M.F., Hayward, D.C., Kitahara, M.V., Miller, D.J. and Ball, E.E. (2012). A “neural” enzyme in nonbilaterian animals and algae: preneural origins for peptidylglycine α -amidating monooxygenase. *Molecular Biology and Evolution*, 29(10), 3095-3109.
- Balderas-González, V.Y. (2014). *Expresión y purificación de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante nativa (rCHH-A_N) y su participación en osmorregulación en Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 85 p.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. W.H. Freeman. 1050 pp.

- Böcking, D., Dirksen, H. and Keller, R. (2002). The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. In: Korand, W. (Ed). *The Crustacean Nervous System*. (pp. 84-97). Springer.
- Boauricha, N., Thuet, P., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., and Trilles, J.P. (1991). Na⁺-K⁺ ATPase and carbonic anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda, Penaeidea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A(2), 433-437.
- Boauricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P., Trilles, J.P. and Charmantier, G. (1994). Ontogeny of osmoregulatory structures in shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *The Biological Bulletin*, 186(1), 29-40.
- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. (2003). Invertebrates. *Sinauer*. 936 pp.
- Camacho-Jiménez, L. (2011). *Papel de la dopamina y de la neurohormona recombinante CHH-B1 en la modulación de respuestas fisiológicas en el camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 122 p.
- Camacho-Jiménez, L., Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M.E., Aguilar, M.B., Re, A.D. and Díaz, F. (2015). Hyperglycemic activity of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone B1 isoform (CHH-B1) of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Peptides*, 71, 32-39.
- Castille, F. and Lawrence, A.L. (1981). The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 68(1), 75-80.
- Cereginho, J.L. and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66.
- Chang, E.S., Keller, R. and Chang, S.A. (1998). Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*, Following Various Stresses. *General and Comparative Endocrinology*, 111(3), 359-366.
- Chang, E.S., Chang, S.A., Beltz, B.S. and Kravitz, E.A. (1999). Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *The Journal of Comparative Neurology*, 414(1), 50-56.
- Chang, E.S. (2005) Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. *Integrative and Comparative Biology*. 45(1), 43-50 p.

- Chang, C.C., Tsai, K.W., Hsiao, N.W., Chang, C.Y., Lin, C.L., Watson, R.D., and Lee, C.Y. (2010). Structural and functional comparisons and production of recombinant crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and CHH-like peptides from the mud crab *Scylla olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(1), 68-76.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. and Aiken, D.E. (1984). Neuroendocrine Control of Hydromineral Regulation in the American Lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards 1837 (Crustacea, Decapoda) 1. Juveniles. *General and Comparative Endocrinology*, 54(1), 8-19.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K.P.C., Aiken, D.E. and Van Herp, F. (1994). Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. *General and comparative endocrinology*, 94(3), 281-293 p.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. and Towle, D. (2009). *Osmotic and Ionic Regulation in Aquatic Arthropods* In: Evans, E.H. (Ed.). *Osmotic and Ionic Regulation, Cells and Animals* (pp. 165-230). CRC Press.
- Chen, J.C. and Cheng, S.Y. (1993). Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106(2), 293-296.
- Chen, S.H. Lin, C.Y. and Kuo, C.M. (2004). Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Marine Biotechnology*. 6(1), 83-94.
- Chen, S.H., Lin, C.Y. and Kuo, C.M. (2005). *In silico* analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Marine Biotechnology*, 7(3), 193-206.
- Chittó, A.L.F., Schein, V., Etges, R., Kucharski, L.C and Da Silva, R.S.M. (2009). Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. *Invertebrate biology*, 128(3), 261-268.
- Choi, J.H. and Lee, S.Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 625-635.
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L.M and Giffard, I. (2014). Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931 during post-embryonic development. *Aquaculture*, 422, 261-267.

- Chong-Robles, J. (2015). *Ontogenia de la capacidad osmorreguladora del camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 102 p.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1974). Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, 13(2), 211-222.
- Christie, A.E., Stemmler, E.A. and Dickinson, P.S. (2010). Crustacean neuropeptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(24), 4135-4169.
- Christie, A.E. (2011) Crustacean neuroendocrine systems and their signaling agents. *Cell Tissue Research*, 345(1), 41-67.
- Chu, K.H. and Chow, W.K. (1992). Effects of unilateral versus bilateral eyestalk ablation on moulting and growth of the shrimp, *Penaeus chinensis* (Osbeck, 1765) (Decapoda, Penaeidea). *Crustaceana*, 62(3), 225-233.
- Chung, J.S. and Webster, S.G. (1996). Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological relevance for crab hyperglycemic neuropeptides. *European Journal of Biochemistry*, 240(2), 358-364.
- Chung, J.S., Dirksen, H. and Webster, S.G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associate to ecdysis in the crab *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96(23), 13103-13107.
- Chung, J.S. and 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.
- Chung, J.S. and Webster, S.G. (2006). Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its secondmessengers on gills and hindgut of the green shore crab, *Carcinus maenas*: A possible osmoregulatory role. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2), 206-213.
- Chung, J.S., Zmora, N., Katayama, H. and Tsuitsui, N. (2010). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), 447-454.
- Dalla-Vía, G.J. (1986). Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*: II. Free amino acids. *Aquaculture*, 55(4), 307-316.
- De Kleijn, D.P.V. and Van Herp, F. (1998). Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33(2-3), 263–272.

- Díaz, F, Farfán, C., Sierra, E and Re, A.D. (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 34(2), 93-104.
- Dice, J.F. and Goldberg, A.L. (1975). Relationship between *in vivo* degradative rates and isoelectric points of proteins. *PNAS*, 79(10), 3893-3897.
- Dirksen, H., Böcking, D. and Heyn, U. (2001). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochemistry Journal*, 356(1), 159-170.
- Eckhardt, E., Pierrot, C., Thuet, P., Van Herp, F., Charmantier-Daures, M., Trilles, J. P. and Charmantier, G. (1995). Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *General and Comparative Endocrinology*, 99(2), 169–177.
- Fanjul-Moles, M.L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapods crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 142(3), 390-400.
- FAO. (2012). El estado mundial de la pesca y acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. 321 pp.
- Fernandes-Santos, M.C. (2002). Drinking and osmoregulation in the mangrove crab *Ucides cordatus* following exposure to benzene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 133(1), 29-42.
- Ferre, F. and Clote, P. (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl 2), W230-W232.
- Fingerman, M. and Radhakrishnan, E.V. (1986). A manual for hormone isolation and assay. CMFRI special publication 41. 46 pp.
- Freire, C.A., Onken, H. and McNamara, J.C. (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 151(3), 272-304.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., and Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J.M. (Ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. (pp. 571-607). Humana Press.
- Gallagher, S.R., Winston, S.E. and Fuller, S.A. (2003). Immunoblotting and immunodetection. In: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and K. Struhl. (Eds.). *Current Protocols in Molecular Biology* (10.81-24). John Wiley & Sons.

- Gómez-Jiménez, S., Urias-Reyes, A.A., Vazquez-Ortiz, F. and Hernandez-Watanabe, G. (2004). Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture*, 233(1), 573-581.
- Gong, H., Jiang, D.H., Lightner, D.V., Collins, C. and Brock, D. (2004). A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquaculture Nutrition*, 10(4), 227-236.
- Grosell, M. (2006). Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *The Journal of Experimental Biology*, 209(15), 2813-2827.
- Gu, P.L., Yu, K.L. and Chan, S.M. (2000). Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Letters*, 472(1), 122-128.
- Gu, P.L., Chu, K.H. and Chan, S.M. (2001). Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Research*, 303(1), 129-136.
- Hagerman, L. (1983). Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Marine Biology*, 17(1), 11-17.
- Henry, R.P. (2001). Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *The Journal of Experimental Biology*, 204(5), 991-1002.
- Henry, R.P. (2005). Critical salinity, sensitivity, and commitment of salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of two euryhaline species of decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 303(1), 45-56.
- Henry, R.P. (2006). Functional evidence for the presence of a carbonic anhydrase repressor in the eyestalk of the euryhaline green crab *Carcinus maenas*. *The Journal of Experimental Biology*, 209(13), 2595-2605.
- Henry, R.P. and Borst, D.W. (2006). Effects of eyestalk ablation on carbonic anhydrase activity in the euryhaline blue crab *Callinectes sapidus*: neuroendocrine control of enzyme expression. *Journal of Experimental Zoology*, 305(1), 23-32.
- Henry, R.P., Lucu, Č., Onken, H. and Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*, 3, 1-33.
- Holthius, L.B. (1980). FAO species catalogue. Vol. 1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO fisheries synopsis*, 125(1), 271.

- Hopkins, P.M. (2012). The eyes we have: a brief history of crustacean endocrinology. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3), 357-366.
- Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H. and Kuo, C.M. (2008). Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. 275(1), 332-341.
- Hsu, Y., Messinger, D.I., Chung, J.S., Webster, S.G.; De la Iglesia, H.O. and 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. *The Journal of Experimental Biology*, 209(16), 3241-3256.
- Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 121(1),191-208.
- Hurtado, M.A., Racotta, I.S., Civera, R., Ibarra, L., Hernández-Rodríguez, M. and Palacios, E. (2007). Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na⁺/K⁺-ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147(3), 703-710.
- Husain, M.Z. and Alikhan, M.A. (1979). Physiological adaptations in Crustacea to the environment: oxygen consumption as a function of body weight and environmental temperature in the terrestrial isopod, *Porcellio laevis* Latreille (Isopoda, Oniscoidea). *Crustaceana*, 36(6), 277-286.
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895-1898.
- Inan, M., Meagher, M.M., Plantz, B.A. and Sinha, J. (2004). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-T, *Papers in Biochemical Engineering*, 89(1), 102-112.
- Jasmani, S., Jayansakar, V., Shinji, J. and Wilder, M.N. (2010). Carbonic anhydrase and Na/K-ATPase activities during the molt cycle of low salinity-reared white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science*, 76(2), 219-225.
- Jayasundara, N., Towle, D.W., Weihrauch, D. and Spanings-Pierrot, C. (2007). Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase -subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. *The Journal of Experimental Biology*, 210(12), 2070-2081.
- Jimenez, A.G. and Kinsey, S.T. (2015). *Energetics and metabolic regulation*. In: Chang, E.S y M. Thiel. (Eds.). *The natural history of crustacean. Physiology*. (pp. 390-419).Oxford University Press.
- Kallen, J.L., Reijntjens, F.M.J., Peters, D.J.M. and Van Herp, F. (1986). Biochemical analyses of the crustacean hyperglycemic hormone of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *General and Comparative Endocrinology*, 61(12), 248-259.

- Kallen, J.L., Abrahamse, S.L. and Van Herp F. (1990). Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. *The Biological Bulletin*, 179(3), 351-357.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K. and Nagasawa, H. (2002). Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*, 23(9), 1537-1546.
- Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. and Nagasawa, H. (2003). The solution structure of Molt-inhibiting hormone from the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9620-9623.
- Katayama, H. and Chung J.S. (2009). The specific binding sites of eyestalk-and pericardial organ-crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) in multiple tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *The Journal of Experimental Biology*, 212(4), 542-549.
- Katayama, H., Ohira, T. and Nagasawa, H. (2013). Crustacean peptide hormones: Structure, gene expression and function. *Aqua-BioScience Monographs*, 6(2), 49-90.
- Kato, K.N. and Kamemoto, F.I. (1969). Neuroendocrine involvement in osmoregulation in the grapsid crab *Metopograpsus messor*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28(2), 665-674.
- Kato, I., Yonekura, H., Yamamoto, H. and Okamoto, H. (1990). Isolation and functional expression of pituitary peptidylglycine α -amidating enzyme mRNA. *FEBS*, 269(2), 319-323.
- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G. Peter-Katalinic, J. and Keller, R. (1989). Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Letters*, 255(1), 10-14.
- Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C. and Keller, R. (1991). Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family, *Peptides*, 12 (5), 909-913.
- Kim, K. and Seong, B.L. (2001). Peptide amidation: production of peptide hormones *in vivo* and *in vitro*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(4), 244-251.
- Kleinholz, L.H. and Keller, R. (1973). Comparative studies in crustacean neurosecretory hyperglycemic hormones. I. the initial survey. *General and Comparative Endocrinology*, 21(3), 554-564.
- Knowles, F.G.W. and Carlisle, D.B. (1956). Endocrine control in crustaceans. *Biological Reviews*, 31(4), 396-467.
- Kong, J. and Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.

- Krystek, S. R., Reichert, L.E. and Anderson, T.T. (1985). Analysis of computer-generated hydropathy profiles for human glycoprotein and lactogenic hormones. *Endocrinology*, 117(3), 1110-1124.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-85.
- Lago-Lestón, M.A., Ponce, E. and 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(1), 343-357.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Chemistry*, 26(2), 283-291
- Lee, S.G., Bader, B.D., Chang, E.S. and Mykles, D.L. (2007). Effects of elevated ecdysteroid on tissue expression of three guanylyl cyclases in the tropical land crab *Gecarcinus lateralis*: possible roles of neuropeptide signaling. *The Journal of Experimental Biology*, 210(18), 3245-3254.
- Lee, C., Tsai K., Tsai, W., Jiang, J. and Chen, Y. (2014). Crustacean hyperglycemic hormone: structural variants, physiological function, and cellular mechanism of action. *Journal of Marine Science and Technology*, 22(1), 75-81.
- Li., E., Arena, L., Chen, L., Quin, J.G. and Van Wormhoudt, A. (2009). Characterization and tissue-specific expression of the two glutamate dehydrogenase cDNAs in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 29(3), 379-386.
- Li, J., Ma, P., Liu, P. Chen, P. and Li, J. (2015). The roles of Na⁺/K⁺-ATPase -subunit gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in response to salinity stresses. *Fish & Shellfish Immunology*, 42, 264-271.
- Lignot, J.H., Trilles, J.P. and Charmantier, G. (1997). Effect of an organophosphorus insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda), *Marine Biology*, 128(2), 307-316.
- Lignot, J.H. Cochard, J.C., Soye, C., Lemaire, P. and Charmantier, G. (1999). Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 170(1), 79-92.
- Lignot, J.H. and Charmantier, G. (2015). *Osmoregulation and Excretion* In: Chang, E.S y M. Thiel. (Eds.). *The natural history of crustacean. Physiology*. (pp. 250-284).Oxford University Press.
- Lin, L., Chen, Y., Chang, Y. and Lee, C.Y. (2013). Neuroendocrine responses of a crustacean host to viral infection: Effects of infection of white spot syndrome virus on the expression and release of crustacean hyperglycemic hormone in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 164(2), 327-332.

- Lionard, M., Muylaert, K., Van Gansbeke, D. and Vyverman, W. (2005). Influence of changes in salinity and light intensity on growth of phytoplankton communities from the Schelde river and estuary (Belgium/The Netherlands). *Hydrobiologia*, 540(1-3), 105-115.
- Liu, M., Pan, L. and Zheng, L.D. (2014). Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides*, 53, 115-124.
- Liu, C.J., Huang, S.S., Toullec, J.Y., Chang, C.Y., Chen, Y.C., Huang, W.S. and Lee, C.Y. (2015). Functional assessment of residues in the amino- and carboxyl-termini of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the mud crab *Scylla olivacea* using point-mutated peptides. *PLOS One*, 10(3), e0134983.
- Liu, M., Liu, S., Hu, Y. and Pan, L. (2015a). Cloning and expression analysis of two carbonic anhydrase genes in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, induced by pH and salinity stresses. *Aquaculture*, 448, 391-400.
- López-Rodríguez, H. (2009). *Clonación y expresión de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de crustáceos de Litopenaeus vannamei (Liv2-CHH-SG2) en Pichia pastoris*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 66 p.
- Lorenzon, S., Giulianini, P.G. and Ferrero E.A. (1997). Lipopolysaccharide induced hyperglycemia is mediated by CHH release in crustaceans. *General and Comparative Endocrinology*, 108(3), 395-405.
- Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettullo, G. and Ferrero, E. (2004). Variation of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *The Journal of Experimental Biology*, 207(24), 4205-4213.
- Lorenzon, S. (2005). Hyperglycemic stress response in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 2, 132-141.
- Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettullo, G. and Ferrero, E. (2005). The role of biogenic amines and cHH in the crustacean hyperglycemic stress responses. *The Journal of Experimental Biology*, 208(17), 3341-3347.
- Lucu, Č. and Towle, D.W. (2003). Na⁺+K⁺ -ATPase in gills of aquatic crustacean. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 135(2), 195-214.
- Mancera-Flores, J.M. (2009). *Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales con capacidad de reconocimiento de la neurohormona Liv-CHH-SG1 de Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 106 p.
- Marco, H.G., W. Brandt, S. Stoeva, Voelter, W. and Gäde, G. (2000). Primary structures of a second hyperglycemic peptide and of two truncated forms in the spiny lobster, *Jasus lalandii*. *Peptides*, 21(1), 19-27.

- Martin J.W. and Davis, G.E. (2001). An updated classification of the recent crustacean. *Science Series 39*. The Natural History Museum of Los Angeles County. 124 p.
- Martins, T.L., Chittó, A.L., Rossetti, C.L., Brondani, C.K., Kucharski, L.C. and Da Silva, R.S.M. (2011). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 158(4), 400-405.
- McNamara, J.C., Rosa, J.C., Greene, L.J. and Agosto A. (2004). Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 37(3), 193-208.
- Mena-Herrera, A., Liñán-Cabello, M.A. and Díaz-Herrera, F. (2011). Effects of salinity on electrolyte levels (Na⁺, K⁺, and Cl⁻) in the hemolymph of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 5(Special Issue 1), 56-59.
- Mettulio, R., Giulianini, P.G., Ferrero, E.A., Lorenzon, S. and Edomi, P. (2004). Functional analysis of crustacean Hyperglycemic Hormone by in vivo assay with wild-type and mutant recombinant proteins. *Regulatory Peptides*, 119(3), 189-197.
- Mettulio, R., Edomi, E.A., Lorenzon, S. and Giulianini, P.G. (2004a). The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the prohormone but not in the mature peptide. *Peptides*, 25(11), 1899-1907.
- Montagné, N., Desdevises, Y., Soyez, D. and Toullec, J.Y. (2010). Molecular evolution of the crustacean hyperglycemic hormone family in ecdysozoans. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 62.
- Morera, Y., Lugo, J.M. Ramos, L., Rodríguez-Ramos, T., Huberman, A. and Estrada, M.P. (2012). A chimeric recombinant crustacean hyperglycemic hormone from *Litopenaeus schmitti* (Bunkenroad) obtained as C-terminus fusion protein boost hemolymph glucose concentration in *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 44(7), 1066-1075.
- Mosco, A., P. Edomi, C. Guarnaccia, S. Lorenzon, S. Pongor, Ferrero, E.A. and Giulianini, P.G. (2008). Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. *Regulatory Peptides*, 147(1), 88-95.
- Mosco, A., Zlatev, V., Guarnaccia, C. and Giulianini, P.G. (2015). Functional analysis of a mutated analogue of the crustacean hyperglycaemic hormone from the crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Zoology*. 323(2), 121-127.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill. 693 p.
- Nagai, C., H. Asazuma, S. Nagata, Ohira, T. and Nagasawa, H. (2009). A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides*, 30(3), 507-517.

- Nagai, C., Nagata, S. and Nagasawa, H. (2011). Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 172(2), 293-304.
- Nässel, D.K. and Larhammar, D. (2013). Neuropeptides and peptide hormones. In: Galizia, N.C. and P.M. Lledo. *Neuro-science. From molecule to behaviour: a university textbook*. (pp. 213-237). Springer Spektrum.
- Ohira, T., Katayama, H., Aida, K. and Nagasawa, H. (2003). Expression of a recombinant crustacean hyperglycemic hormone of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fisheries Science*, 69(1), 95-100.
- Ohira, T., Tsutsui, N., Nagasawa, H. and Wilder, M.N. (2006). Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormone from the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and their hyperglycemic activities. *Zoological Science*, 23(4), 383-391.
- Pascual, C., Gaxiola, G. and Rosas, C. (2003). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 142(4), 735-745.
- Pellon-Maison, M., García, C.F., Cattaneo, E.R., Coleman, E.A. and González-Baro, M.R. (2009). *Macrobrachium borellii* hepatopancreas contains a mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase which initiates triacylglycerol biosynthesis. *Lipids*, 44(4), 337-344.
- Pillai, B.R. and Diwan, A.D. (2002). Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(1), 45-52.
- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A. and Ross, L.G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931. *Aquaculture*, 157(1), 107-115.
- Prigge, S.T., Mains, R.E., Eipper, B.A. and Amzel, L.M. (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(8-9), 1236-1259.
- Re, A.D., Díaz, F., Sierra, E., and Gómez-Jiménez, S. (2004). Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuesto a diferentes combinación de temperatura y salinidad. *Ciencias Marinas*, 30(3), 443-453.
- Re, A.D., Díaz, F. and Valdez, G. (2006). Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. *Journal of Thermal Biology*, 31(6), 506-513.
- Re, A.D., Díaz, F., Valdez, G., Flores, M. and López, M. (2009). Physiological energetics of blue shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) juveniles acclimated to different salinities. *The Open Zoology Journal*, 2, 102-108.

- Re, A.D., Díaz, F., Ponce-Rivas, E., Giffard, I., Muñoz-Márquez, M.E. and Sigala-Andrade, H.M. (2012). Combined effect of temperature and salinity on the thermotolerance and osmotic pressure of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Thermal Biology*, 37(6), 413-418.
- Reddy, P.S. and Ramamurthi, R. (1999). Recent trends in crustacean endocrine research. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 65, 15-32.
- Regnault, M. (1984). Salinity-induced changes in ammonia excretion rate of shrimp *Crangon crangon* over a winter tidal cycle. *Marine Ecology*, 20(1-2), 119-125.
- Romano, N. and Zheng, C. (2012). Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334, 12-23.
- Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(5), 527-533.
- Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A. and Soto, L.A. (1999). The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234(1), 41-57.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P and Henry, R.P. (2007). Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147(2), 404-11.
- 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 Educación Superior de Ensenada, Baja California. 138 p.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, D., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A. and Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(2), 184-193.
- Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, M.B. and Díaz, F. (2008). Molecular cloning and expresión of a putative crustacean hyperglycemic hormone of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. *Electronic. Journal of Biotechnoly*, 11(4), Issue October.
- Santos, E.A., Maia-Nery, L.E., Keller, R. and Gonçalves, A.A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological Zoology*, 70(4), 415-420.
- Sasse, J. and Gallagher, S.R. (2003). Detection of proteins. In: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and K. Struhl. (Eds.). *Current Protocols in Molecular Biology* (supplement 63). John Wiley & Sons.

- Sedlemeier, D. and Keller, R. (1981). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. involvement of cyclic nucleotides. *General and Comparative Endocrinology*, 45(1), 82-90.
- Sefiani, M., Le Caer, J.P. and Soyez, D. (1996). Characterization of hyperglycemic and molt inhibiting activity from sinus glands of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *General and Comparative Endocrinology*, 103(1), 41-53.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F. and Spanings-Pierrot, C. (2003). Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus Leptodactylus*. *The Journal of Experimental Biology*, 206(6), 979-988.
- Serrano, L., Grousset, E., Charmantier, G. and 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*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(9), 1129-1140.
- Serrano, L., Towle, D.W., Charmantier, G. and Spanings-Pierrot, C. (2007). Expression of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit mRNA during embryonic development of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 2(2), 126-134.
- Serrano, L. and Henry, R.P. (2008). Differential expression and induction of two carbonic anhydrase isoforms in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 3(2), 186-193.
- Shinji, J., Kang, B.J., Okutsu, T., Banzai, K., Ohira, T., Tsuitsui, N. and Wilder, M.N. (2012). Changes in crustacean hyperglycemic hormones in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* subjected to air-exposure and low-salinity stresses. *Fisheries Science*, 78(4), 833-840.
- Shrivastava, S. and Princy, A. (2014). Crustacean hyperglycemic hormone family neurohormones: a prevailing tool to decipher the physiology of crustaceans. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 43(3), 434-440.
- Sigala-Andrade, H.M. (2010). *Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 del camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 100 p.
- Spanings-Pierrot, C., Soyez, D. Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. and Charmantier, G. (2000). Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 119(3), 340-350.
- Strand, F.L. (1999). *Neuropeptides: regulators of physiological processes*. Massachusetts Institute of Technology. 609 pp.

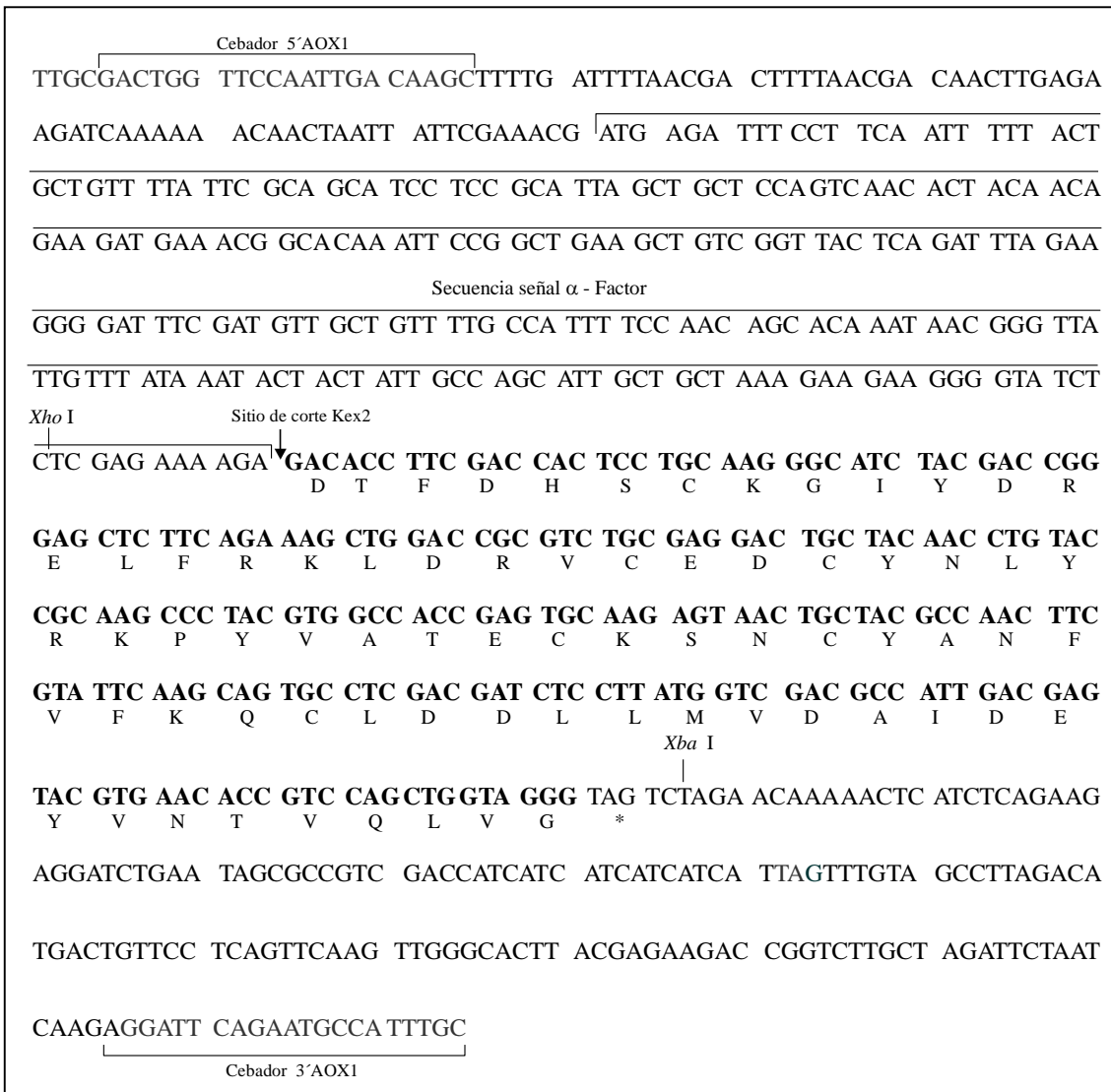
- Sun, P. (1995). Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(3), 262-268.
- Sun, H., Dong, J., Ren, C., Zhang, L., Dan, X., Chen, C., Zhang, Y. and Hu, C. (2015). Cloning and differential expression of Na,K-ATPase in *Penaeus vannamei*. *Marine Biology Research*, 11(9): 983-989.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 11(22), 4673-4680.
- Tiu, S.H.K., He, J. and Chan, S. (2007). The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed ion transport peptide (LvITP) for osmoregulation. *Gene*, 396(2), 226-235.
- Toullec, J., Serrano, L., Lopez, P., Soye, D. and Spanings-Pierrot, C. (2006). The crustacean hyperglycemic hormones from an euryhaline crab *Pachigrapsus marmoratus* and a fresh water crab *Potamon ibericum*: eyestalk and pericardial isoforms. *Peptides*, 27(6), 1269-1280.
- Towle, D.W. and Weihrauch, D. (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of transporters. *American Zoologist*, 41(4), 770-780.
- Towle, D.W., Paule, R.S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J. and Spanings-Pierrot, C. (2001). Na⁺+K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. *The Journal of Experimental Biology*, 204(22), 4005-4012.
- Treerattakool, S., Udomkit, A., Eurwilaichitr, L., Sothayanon, B. and Panyim, S. (2003). Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. *Marine Biotechnology*, 5(4), 373-379.
- Treerattrakool, S., Boonchoy, C., Urtagram, S. Panyim, S. and Udomkit, A. (2014). Functional characterization of recombinant gonad-inhibiting hormone (GIH) and implication of antibody neutralization on induction ovarian maturation in marine shrimp. *Aquaculture*, 428, 166-73.
- Tsuitsui, N., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., Wilder, M.N. and Aida, K. (2005). The effects of the crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsopenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 144(3), 232-239.
- Tsuitsui, N., Ohira, O., Okutsu, T., Shinji, J., Bae, S., Kang, B. and Wilder, M.N. (2013). Molecular cloning of a cDNA encoding vitellogenesis-inhibiting hormone in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and preparation of its recombinant peptide using an *E. coli* expression system. *Fisheries Science*, 79(3), 357-365.

- Tsuitsui, N., Nagakura-Nakamura, A., Nagai, C., Ohira, T., Wilder, M.N. and Nagasawa, H. (2013a). The ex vivo effects of eyestalk peptides on ovarian vitellogenin gene expression in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fisheries Science*, 79(1), 33-38.
- Udomkit, A., Treerattrakol, S. and Panyim, S. (2004). Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 298(1), 79-91 p.
- Urich, K. (1990). Comparative animal biochemistry. Springer-Verlag. 782 p.
- Valles-Jiménez, R., Cruz, P. and Pérez-Enríquez, R. (2005). Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*, 6(5), 475-484.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A. and Ochoa, J.L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies in penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A(2): 299-303.
- Ventura-López, C; Gómez-Anduro, G., Arcos, F.G., Llera-Herrera, R., Racotta, I.S. and Ibarra, A.M. (2016). A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra-eyestalk tissues. *Gene*, doi: 10.1016/j.gene.2016.02.011.
- Vinagre, A.S. and Chung, J.S. (2016). Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). *Marine Biology*, 163(1), 3-11.
- Wang, Y.J., Hayes, T.K., Holman, G.M., Chavez, A.R. and Keeley, L.L. (2000). Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts of *Penaeus vannamei*, *Peptides*, 21(4), 477-484.
- Wang, L., Wang, N., Liu, Y., Cai, D., Li, J. and Wang, A. (2012). Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress. *Molecular Biology Reports*, 39(6), 6427-6438.
- Wangwibulkit, S. and Boaphadung, S. (2010). The effects of salinity on haemolymph osmolality and histology of blue swimming crab (*Portunus pelagicus*). Proceedings of 16th AAS and 1st ISAT Symposium, Bangkok Thailand, August 25-27, 2010.
- Wanlem, S., Supamattaya, K., Tantikitti, C., Prasertsan, P. and Graidist, P. (2011). Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against bacterial infection, *Fish & Shellfish Immunology*, 30(3), 877-885.
- Webster, S.G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *The Journal of Experimental Biology*. 199, 1579-1585.

- Webster, S.G. (1998). Neuropeptides inhibiting growth and reproduction in crustaceans. In: Coast, G.M. and S.G. Webster (Eds.). *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. (pp 32-52) Cambridge University Press.
- Webster, S.G., Keller, R. and Dircksen H. (2012). The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 175(2), 217-233.
- Webster, S.G. (2015). *Endocrinology of metabolism and water balance: crustacean hyperglycemic hormone*. In: Chang, E.S y M. Thiel. (Eds.). *The natural history of crustacean. Physiology*. (pp. 36-67).Oxford University Press.
- Wu, S., Chen, Y., Huang, S., Tsai, W., Wu, H., Hsu, T. and Lee, C. (2012a). Demonstration of expression of a neuropeptide-encoding gene in crustacean hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 161(4), 463-468.
- Wu, H., Tsai, W., Huang, S., Chen, Y., Chen Y., Hsieh, Y. and Lee, C. (2012b). Identification of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and CHH-like peptides in the crayfish *Procambarus clarkii* and localization of functionally important regions of the CHH. *Zoological Studies*, 51(3), 288-297.
- Xia, X. (2007). Bioinformatics and the cell: modern approaches in genomics, proteomics and transcriptomics. Springer. 349 pp.
- Yang, W., Aida, K. and Nagasawa, H. (1997). Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides*, 18(4), 479-485.
- Yang, J., Liu, D., Jing, W., Dahms, D.U. and Wang, L. (2013). Effects of cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS One*, 8(10), e77569. doi:10.1371/journal.pone.0077569.
- Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T. and Naya, Y. (1994). Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *General and Comparative Endocrinology*; 95(3), 387-98.
- Yodmuang, S., Udomkit, A., Treerattrakool, S. and Panyim, S. (2004). Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312(1), 101-14.
- Zarubin, T.P., Chang, E.S. and 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*. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1231-1237.

- Zeugswetter, F.K. and Jarolim-Jensen, E. (2014). Body messaging: the endocrine systems. In: E. Jensen-Jarolim (Ed.). *Comparative medicine, anatomy and physiology*. (pp. 119-137). Springer-Verlag.
- Zheng, J., Chen, H.Y., Choi, C.Y., Roer, R.D. and Watson, R.D. (2010). Molecular cloning of putative crustacean hyperglycemic hormone (CHH) isoform from extra-eyestalk tissue of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and determination of temporal and spatial patterns of CHH gene expression. *General and Comparative Endocrinology*, 169(2), 174-181.
- Zhong, X. and Wright, J.F. (2013). Biological insights into therapeutic protein modifications throughout trafficking and their biopharmaceutical applications. *International Journal of Cell Biology*, 2013, 1-16.

B) Construcción pPICZαA-CHH-B2



2. Análisis de proteínas totales en hemolinfa con el reactivo Protein Assay (Bio-Rad)

A) Preparación del reactivo

- Según el volumen de solución de reactivo que se necesite, diluir 1 parte del reactivo concentrado en 4 partes de agua desionizada estéril. Para estimar la cantidad de solución necesario utilizar la siguiente ecuación:

$$(\# \text{ estándares o muestras}) (\# \text{ réplicas}) \times (0.2 \text{ mL}) = \text{volumen solución de reactivo}$$

2. Filtrar la solución al vacío con un filtro Whatman de 0.2 μm . La solución puede almacenarse hasta 60 días a 4 °C o 2 semanas a temperatura ambiente (15-25 °C).

B) Preparación de los estándares de albumina de suero bovino (BSA)

Preparar una solución stock de BSA a una concentración de 2 mg/mL, y diluir según la siguiente tabla:

Tabla 6. Preparación de los estándares de BSA.

Concentración de la curva estándar (mg/mL)	Volumen del stock (μL)	Volumen de agua destilada estéril (μL)	Volumen final (μL)
0.05	12.5	487.5	500
0.1	25	475	500
0.2	50	450	500
0.4	100	400	500
0.5	125	375	500

C) Preparación de las muestras problema

Tomar 5 μL de cada muestra de plasma y diluir en 995 μL de agua destilada estéril (1:200). Para cada réplica de la muestra problema se preparará una dilución.

D) Ensayo

1. Pipetear 10 μL de la muestra o punto de la curva estándar (cargar una réplica o dos por lectura) en un pozo de la microplaca. Considerar también el blanco sin muestra.
2. Añadir 200 μL del reactivo preparado en cada pozo y mezclar con un agitador para microplacas.
3. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras no deben incubarse más de una hora.
4. Leer la absorbancia a 595 nm.
5. Graficar los datos de absorbancia (y) obtenidos para los puntos de la curva estándar (x) y hacer el análisis de regresión lineal.

Dónde:

b= intercepto, m= pendiente, x= concentración (mg/mL), y= valores de absorbancia

Entonces:

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{abs muestra} - \text{abs blanco}) - (\text{intercepto})}{\text{pendiente}} (\text{FD})$$

Nota: El factor de dilución en este caso es 200, considerar también la dilución con el anticoagulante, por lo cual los valores se deben multiplicar por 3., puesto que a cada muestra de hemolinfa se le agregan 2 volúmenes de anticoagulante.

3. Análisis de iones en muestras de hemolinfa

A) Potasio (reactivo Randox)

1. Preparar el reactivo de trabajo R2 mezclando 1:1 la solución R2a y R2b. La mezcla es estable 30 días a temperatura ambiente y 60 días a 4 °C.
2. Precipitar las muestras. Agregar 15 µL de muestra a 150 µL de solución precipitante, mezclar y centrifugar 8 min a 12000 rpm.
3. Pipetear 20 µL del sobrenadante o del estándar y 200 µL del reactivo R2 en cada pozo. Agitar la placa e incubar al menos 5 min.
4. Medir la absorbancia a 578 nm
5. Substraer blanco de reactivo y hacer el cálculo de la concentración según la fórmula:

$$\text{Potasio} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar}} \right) (\text{Concentración estándar})$$

Considerar la dilución de la muestra con el anticoagulante. 1 mmol = 1 mEq/L.

B) Cloro (reactivo Pointe Scientific)

1. Pipetear 20 µL de muestra y 200 µL de reactivo en cada pozo.
2. Agitar la placa e incubar 5 min a temperatura ambiente.
3. Medir la absorbancia a 480 nm.
4. Substraer blanco de reactivo y hacer el cálculo de la concentración según la fórmula:

$$\text{Cloro} \left(\frac{\text{mEq}}{\text{L}} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia calibrador}} \right) (100)$$

Considerar la dilución de la muestra con el anticoagulante.

C) Calcio (reactivo Arsenazo III Pointe Scientific)

1. Pipetear 20 µL de muestra y 200 µL de reactivo en cada pozo.
2. Agitar la placa e incubar 5 min a temperatura ambiente.
3. Medir la absorbancia a 650 nm.
4. Substraer blanco de reactivo y hacer el cálculo de la concentración según la fórmula:

$$\text{Calcio} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estandar}} \right) (10)$$

Considerar la dilución de la muestra con el anticoagulante. 1 mg/dL = 0.5 mEq/L

C) Sodio (reactivo Stanbio)

1. Mezclar 1 parte de solución precipitante con 1 parte de muestra en heparina.
2. Incubar 5 min y centrifugar 10 min a velocidad máxima.
3. separar 75 µL del sobrenadante y agregar 375 µL del reactivo de color.
4. Incubar 10 min a temperatura ambiente y mezclar por vortex. Centrifugar 5 min a velocidad máxima.
6. Tomar 125 µL de sobrenadante por pozo y leer a 420 nm.
7. Hacer el cálculo de la concentración según la fórmula:

$$\text{Sodio} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = \left(\frac{\text{Abs Blanco} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Blanco} - \text{Abs Estándar}} \right) (10)$$

Considerar la dilución de la muestra con el anticoagulante. 1 mmol/L = 1 mEq/L