Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE LA FAMILIA PEPTIDICA MIH/GIH/CHH DE *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* EN DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRES

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

MARIA ASUNCION LAGO LESTON

ENSENADA, B. C., MARZO DEL 2001.

TESIS DEFENDIDA POR

María Asunción Lago Lestón

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Director del Comité

Dr. Fernando Bückle Ramírez

Miembro del Comité

Dr. Jorge de la Rosa Vélez

Miembro del Comité

Dr. Eric Mellink Bijtel

Miembro del Comité

Dr. Oscar Mtz de Ilarduya Rz/de Larramendi

Miembro del Comité

Dr. Facundo Márquez Rocha

Jefe del Departamento de Biotecnología Marina

Dr. Federico Graef Ziehl

Director de Estudios de Posgrado

16 de Marzo del 2001

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Y EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MARINA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA PEPTÍDICA MIH/GIH/CHH DE *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* EN DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS

TESIS DE MAESTRÍA

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

Presenta:

MARÍA ASUNCIÓN LAGO LESTÓN

Ensenada, Baja California, México. Marzo 2001.

RESUMEN de la Tesis de Maestría de **MARÍA ASUNCIÓN LAGO LESTÓN**, presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS con ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Marzo 2001.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA PEPTÍDICA MIH/GIH/CHH DE *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* EN DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

El complejo OX-GS es el órgano endocrino más importante de los crustáceos permitiéndole al animal responder a los cambios de su entorno. En este complejo se sintetiza la familia de neurohormonas MIH/GIH/CHH responsable de la regulación de procesos como el crecimiento y la reproducción. La endocrinología de crustáceos ha avanzado enormemente en los últimos años gracias a la utilización de las técnicas moleculares, que han permitido dilucidar las estructuras aminoácidicas y nucleotídicas de una amplia gama de neurohormonas. Sin embargo, todavía son escasos los pasos que se están dando hacia el entendimiento de la regulación a nivel génico. Este trabajo pretende ayudar al esclarecimiento de estos procesos reguladores mediante el estudio de la expresión de los genes que codifican las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH del camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

Mediante RT-PCR se observaron diferencias en la expresión de los genes *mih* y *chh*, destacando la presencia de un doble fragmento para *mih* en los camarones aclimatados a 20°C. Este fenómeno podría deberse al corte y empalme alternativo del gen para aclimatarse a esa temperatura. Asimismo, el estudio de la secuencia de *mih* muestra que este gen posee probablemente un par de intrones.

Además el estudio teórico de todas las secuencias depositadas en los bancos de proteínas y nucleótidos sugiere que el gen *mih* descrito para *P.vannamei* podría ser realmente *chh*.

Palabras clave: Neurohormonas, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, expresión génica, RT-PCR

ABSTRACT of the Thesis of **MARÍA ASUNCIÓN LAGO LESTÓN**, presented as partial requirement, to obtain the **MASTER IN SCIENCE** grade in **MARINE BIOTECHNOLOGY MARINA**. Ensenada, Baja California, Mexico. March 2001.

STUDY OF GENE EXPRESSION OF THE MIH/GIH/CHH PEPTIDE FAMILY OF *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* IN DIFFERENT STRESS CONDICTIONS.

The XO-SG complex is the single most important endocrine organ in Crustaceans, and allows the animal to respond to changes in the environment. In this complex, the neurohormone family MIH/GIH/CHH is synthesized. They are responsible for regulation of processes like growth and reproduction. Endocrinology of Crustaceans has advanced greatly in the last years, thanks to the use of molecular techniques, which have made possible to know the nucleotide and aminoacid structures of a wide range of neurohormones. However, very little advance has been done in the understanding of regulation at the gene level. This work tries to help to clarify these regulatory processes through the study of expression of genes coding for neurohormones of the family MIH/GIH/CHH of the shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in different conditions of temperature and salinity.

By means of RT-PCR, differences in expression of genes mih and chh were observed, specially regarding the presence of a double banding for mih in shrimps acclimatized to 20 °C. The phenomenon could be due to alternative splicing of the gene for adapting at that temperature.

Besides, study of *mih* sequence shows that this gene carries most probably two introns. In addition, theoretical study of all sequences stored in gene and protein databanks suggests that the allegedly *P.vannamei mih* gene could actually be a *chh*.

Key words: Neurohormones, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, gene expression, RT-PCR

A mis padres y a mi hermana.

Por su amor, su comprensión y su respeto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Ponce por toda la confianza depositada en mí y su apoyo para que la realización de este trabajo fuera posible.

A los miembros de mi comité de tesis, por sus críticas y sus sabios consejos.

Al Dr. Jorge de la Rosa y los miembros de su laboratorio: Yolanda, Clarissa y Luis, por aceptarme como un miembro más del grupo y por todo lo que me han ayudado y me han enseñado.

Al Dr. Fernando Bückle quien nos cedió desinteresadamente todas las muestras con las que se realizó este trabajo.

Al Dr. Oscar Martínez de Ilarduya por facilitarnos la realización de algunos experimentos y la obtención del material que necesitábamos de manera urgente.

Al CICESE por apoyarme económicamente con una beca de maestría durante un año y en otros periodos con becas de entrenamiento técnico.

A "BGB Tecno" y especialmente a su presidente Juan Manuel Balaguer por apoyar este trabajo con una beca de maestría completa durante cuatro meses.

A "Congeladora Internacional S. A. de C. V." y especialmente a su gerente José Rodolfo Zambrano por apoyar este trabajo con una beca de maestría parcial durante tres meses.

A Maite por facilitarme un lugar y los medios para la escritura de esta tesis a costa, muchas veces, de posponer su propio trabajo.

A mis compañeros de la maestría y del laboratorio de CICESE por haberme aguantado durante estos años y hacer que el trabajo fuera mucho más llevadero.

A todos los amigos que me han acompañado en estos dos años y que me han hecho sentir como en casa.

CONTENIDO **Página**

I. Introducción 1

I.1. Peneidos 1

I.2. Sistema neuroendocrino 3

I.3. Neurohormonas 7

II. Objetivos 15

III.1 Objetivo general 15

III.2 Objetivos particulares 15

III. Metodología 16

III.1. Aclimatación de los organismos 16

III.2. Extracción de ARN 17

III.3 Tratamiento con ADNasas 19

III.4. Síntesis de ADNc (ADN complementario) 21

III.5. Extracción de ADN 22

III.6. Diseño de cebadores 23

III.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 25

III.7. a. PCR a partir de ADN genómico 26

III.7.b. PCR a partir de ADNc (RT-PCR) 27

III.8. Cuantificación de los RT-PCRs 27

III.9. Preparación de fragmentos para secuenciar 28

CONTENIDO (continuación) **Página**

III.10. Clonación de los productos de PCR obtenidos con los cebadores diseñados para *gih* 29

III.10.a. Preparación de los fragmentos obtenidos 29

III.10.b. Ligación 30

III.10.c. Transformación 31

III.11. Extracción de ADN plasmídico 32

III.12. PCR a partir de ADN plasmídico 33

III.13. Estudio teórico de secuencias 33

IV. Resultados 36

IV.1. Extracción de ARN 36

IV.2. Síntesis de ADNc 37

IV.3. Extracción de ADN 38

IV.4. PCR a partir de ADN genómico 38

IV.5. PCR a partir de ADNc 39

IV.6. Estudio de expresión para los genes *mih* y *chh* 40

VI.6.a Comparación de las temperaturas frente a las salininades 40

IV.6.b. Comparación de las salinidades frente a las temperaturas 43

CONTENIDO (continuación) **Página**

IV.7. Clonación de un fragmento de *gih* 47

IV.8 Estudio teórico de secuencias 48

V. Discusión 60

V.1.Estudio de expresión 60

V.2. Estructura génica de *mih* 64

V.3. Estudio teórico de secuencias 65

VI. Conclusiones. 67

VII. Perspectivas 68

Bibliografía 69

Anexos 77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA **Página**

1. Ciclo de vida típico de los peneidos, sus diferentes estados y su habitat. Gráfico modificado a partir del de Bailey-Brook y Moss, 1992. 2

2. Anatomía del pedúnculo ocular de langosta, donde se muestra el complejo neuroendodrino. 5

3. Modelo del papel desempeñado por la familia peptídica MIH/GIH/CHH en las funciones de muda y reproducción. Esquema modificado del propuesto por De Kleijn y Van Herp (1998). 9

4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos de amplificación de *gih*. 30

5. Conjunto de todos los ARNs utilizados para la obtención de ADNc. 36

6. Fotografías de todos los ADNc utilizados para realizar los RT-PCR. 37

7. Extracciones de ADN genómico a partir del tejido muscular de *P. vannamei*. 38

8. A) PCR a partir de ADN genómico. B) PCR a partir de ADNc. 39

9. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 20 C. 41

10. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 24 C. 41

11. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 28 C. 42

12. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 32 C. 43

13. Electroforesis de los RT-PCR de S= 10 ‰ frente a las temperaturas. 43

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

FIGURA **Página**

14. Electroforesis de los RT-PCR de S= 16 ‰ frente a las temperaturas. 44

15. Electroforesis de los RT-PCR de S= 22 ‰ frente a las temperaturas. 45

16. Electroforesis de los RT-PCR de S= 28 ‰ frente a las temperaturas. 45

17. Electroforesis de los RT-PCR de S= 34 ‰ frente a las temperaturas. 46

18. Electroforesis de los RT-PCR de S= 40 ‰ frente a las temperaturas. 46

19. Mólecula de ADN recombinante (plásmido más ADN exógeno) 47

20. Electroforesis del producto de las amplificaciones realizadas a partir del ADN plasmídico. 48

21. Alineamiento de las secuencias de CHH de crustáceos. 49

22. Alineamiento de las secuencias de MIH de crustáceos. 50

23. Alineamiento de las secuencias de GIH de crustáceos. 50

24. Alineamiento de las secuencias de MIH, CHH de *P.vammamei* y GIH.de *H. americanus*. 50

25. Dendrograma de las regiones más conservadas de las secuencias de CHH de crustáceos. 52

26. Dendrograma de las regiones más conservadas de las secuencias de MIH de crustáceos. 54

27. Dendrograma de las regiones más conservadas de todas las secuencias de la familia peptídica CHH/MIH/GIH. 55

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

FIGURA **Página**

28. Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado a partir del ADN genómico y la secuencia de ADNc de *mih*, realizado con el programa MULTALIN 58

29. Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado a partir del ADN genómico y la secuencia de ADNc de *mih*, realizado con el programa BLAST 2 Sequences. 59

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I.	Número de secuencias peptídicas y nucleotídicas de algunas especies de crustáceos depositadas en los bancos de proteínas y genes del NIH.	14
II.	Número de pares de pedúnculos utilizados por condición.	36
III.	Porcentajes de similitud de las secuencias de CHH.	53
IV.	Porcentajes de similitud de las secuencias de MIH.	54
V.	Porcentajes de similitud de las secuencias de CHH y MIH. Se utilizaron las secuencias más representativas de cada grupo.	56

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Peneidos

Los Artrópodos, el mayor filum del Reino Animal, se caracterizan por tener algunos de sus apéndices fusionados y un exoesqueleto o cutícula que mudan periodicamente. Dentro de este filum se encuentra el subfilum Crustacea, que a su vez agrupa la clase Malacrostaca y ésta al orden Decapoda, al que pertenecen los camarones peneidos.

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas tiene catalogadas más de 300 especies de camarón que son, o pueden llegar a ser, de importancia comercial. De éstas, 110 pertenecen a la familia Peneidae y representan el 80% de las capturas camaroneras mundiales. Algunas de estas especies maduran, se reproducen y desovan en cautiverio con relativo éxito. Para que la Camaronicultura pueda seguir avanzando es necesario el desarrollo de tecnología que provea las herramientas necesarias para obtener un suplemento de post-larvas predecible y un buen conocimiento de la biología de las especies que se van a criar.

Entre las especies que hoy en día se reproducen en cautiverio, ocho tienen mayor importancia: *Penaeus chinensis, P. indicus, P. japonicus, P. merguiensis, P. monodon, P. stylirostris, P. vannamei* y *Metapenaeus ensis.* De éstas, *P. vannamei* y *P. stylirostris* son las principales especies que se cultivan en México y la primera representa un 10% del total de la producción camaronera mundial (Bailey-Broock y Moss, 1992).

El ciclo de vida de los peneidos incluye distintos estados y una amplia variedad de hábitat. Los organismos juveniles prefieren las aguas salobres de los estuarios mientras

que los adultos se encuentran en ambientes marinos. Son dioicos y tienen un aparato genital dimórfico. *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* poseen telico abierto, al contrario de las otras seis, lo que implica que la transferencia de esperma y el desove es simultáneo, la fertilización es externa y el desasarrollo de los huevos ocurre en la columna de agua.

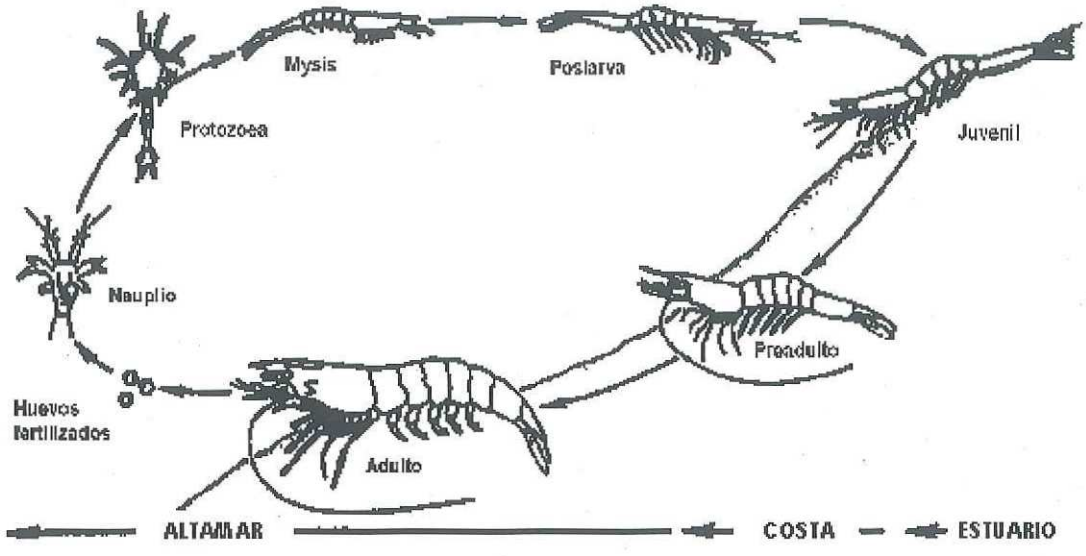


Figura 1. Ciclo de vida típico de los peneidos, sus diferentes estados y su habitat. Gráfico modificado a partir del de Bailey-Brook y Moss, 1992.

Entre los parámetros fisico-químicos que influyen en la reproducción de estos organismos se encuentran la temperatura del agua y su salinidad. En general, la salinidad utilizada en las granjas de cultivo está comprendida entre 28 y 36 ‰. Aunque la salinidad óptima para cada especie no ha sido determinada experimentalmente, este intervalo es ampliamente usado en los laboratorios comerciales y de investigación de camarón. Sin embargo, entre los acuicultores de *P. vannamei* hay preferencia por mantener una salinidad

del agua de 32 ‰ pues parece ser un estímulo positivo para que el organismo se pueda reproducir (Bray y Lawrence, 1992).

La temperatura suele mantenerse entre los 27 y 29 °C. Temperaturas inferiores a los 26°C reducen significativamente la capacidad reproductora de la mayoría de las especies. El incremento de la temperatura y de las horas de luz se consideran importantes para inducir al desove en muchas especies. En cambio, mantener estable la temperatura es un factor importante en el proceso de maduración de *P. vannamei* (Bray y Lawrence, 1992).

Sin embargo, apenas se sabe cómo influyen estos factores en los juveniles y cómo la modificación de los mismos afecta la fase reproductora. Dado que toleran rangos más altos de temperatura y salinidad, no se ha prestado demasiada atención a si influyen de forma directa en su desarrollo y su comportamiento sexual posterior.

I.2. Sistema neuroendocrino

Todos los seres vivos han desarrollado diferentes sistemas para mantenerse en contacto con el medio que les rodea y responder a los cambios que puedan ocurrir. Estas señales, ya sean de naturaleza física o química, se perciben a través de diferentes tipos de receptores y se transducen por medio de un amplio grupo de moléculas de distinta naturaleza química. En los vertebrados estos procesos son llevados a cabo por dos sistemas que actúan de forma integrada: el sistema nervioso y el sistema endocrino. Del éxito de la transducción de una señal depende que cada uno de los procesos que necesitan para sobrevivir se lleven a cabo de forma óptima.

Los crustáceos han desarrollado un complejo sistema neuroendocrino, que involucra elementos de regulación a corto, medio y largo plazo y que les permite responder a los factores externos ajustando sus funciones vitales a las necesidades de cada momento. Entre las condiciones externas que regulan estos factores destacan la temperatura, el fotoperiodo, la nutrición y el estrés (Ferraris *et al.,* 1994).

El primer órgano neurohormonal identificado en crustáceos fue la glándula del seno (GS), un conjunto de terminaciones axonales neurosecretoras situadas muy cerca de un gran seno de hemolinfa, donde libera sus productos, y que se localiza en el pedúnculo ocular (Fingerman, 1997). Los axones terminales que constituyen la GS se originan principalmente a partir de los cuerpos celulares de las neuronas localizados en el órgano X (OX), situado en la médula terminal del pedúnculo ocular. Como los productos secretados por la GS se sintetizan en los somas de las neuronas del OX se habla del sistema órgano X-glándula del seno (OX-GS), considerado el principal centro regulador neuroendocrino en los crustáceos. Estructural y funcionalmente, este centro, es comparable al eje hipotálamo-hipofisiario de vertebrados y al cuerpo cardiaco de los insectos (Beltz, 1988). El complejo OX-GS es un conglomerado formado por 150-200 células neurosecretoras (García y Aréchiga, 1998). Los neuropéptidos se sintetizan en los somas de las neuronas que forman el OX y de ahí se transportan a las terminaciones neuronales, que forman la GS, donde se almacenan hasta que son secretados a la hemolinfa. La importancia del complejo OX-GS se debe al gran número de neuropéptidos que sintetiza y, a la importancia de las funciones en las que éstos intervienen.

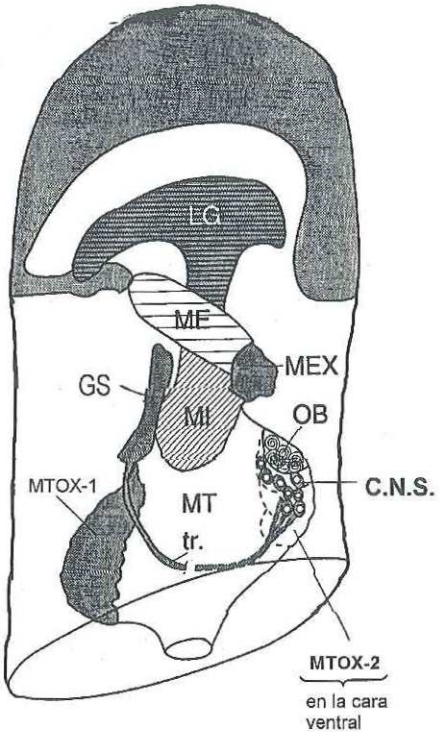


Figura 2. Anatomía del pedúnculo ocular de langosta, donde se muestra el complejo neuroendodrino OX-GS. LG: lámina ganglionar, ME: médula externa; MEX: médula externa del órgano X; MI: médula terminal; MTOX-1: médula terminal del OX-1;MTOX-2: médula terminal del OX-2; C.N.S: células neurosecretoras; OB: órgano de Bellonci; tr: tracto del conmplejo OX-GS. Van Herp, 1993.

Pero, a pesar de que este complejo es uno de los órganos endocrinos más importantes en los crustáceos, no es el único, existen también los órganos postcomisurales y los pericárdicos que, junto con el complejo OX-GS, constituyen las estructuras neurohemales. Los órganos postcomisurales son terminales axonales de estructura similar a los axones de la GS que almacenan y liberan neurohormonas y están situados en la comisura post-esofágica. Los órganos pericárdicos están situados en el seno venoso que

rodea al corazón y liberan neurohormonas que afectan a dicho órgano, controlando la amplitud y la frecuencia del latido (Fingerman, 1997).

Además de las estructuras neurohemales existen otros órganos no hemales que también presentan función endocrina: el órgano Y, la glándula androgénica, los ovarios, el órgano mandibular y los efectores pigmentarios. El órgano Y es considerado el principal órgano de la muda, porque es el encargado de secretar los ecdiesteroides, hormonas de naturaleza lipídica que inducen directamente el proceso de ecdisis o muda. La glándula androgénica, presente sólo en los machos, es responsable de la diferenciación del sistema reproductor masculino y de sus estructuras sexuales secundarias. Los ovarios se encargan de producir las hormonas que inducen al desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias de las hembras. El órgano mandibular, situado en la parte posterior del apodema, está unido al músculo mandibular, y en la mayoría de los crustáceos, se encuentra muy cerca del órgano Y. Este órgano secreta, entre otras sustancias, el metil farnesoato, encargado de regular los procesos relacionados con la reproducción y de estimular la síntesis de ecdiesteriodes por el órgano Y. Al metil farnesoato se le otorga una función análoga a la hormona juvenil de insectos (Chang, 1993). Los efectores pigmentarios son de dos tipos: cromatóforos y pigmentos retinales. Los primeros se localizan en el integumento y son responsables del cambio de color del animal. Los segundos, situados en el pedúnculo ocular y controlados tanto de forma hormonal como neural, contienen los pigmentos necesarios para responder a las diferentes intensidades de luz.

I.3. Neurohormonas

La mayoría de los procesos fisiológicos en los crustáceos están regulados por neurohormonas, principalmentemente de naturaleza peptídica. Se han identificado alrededor de veinte neurohormonas, aunque la función de alguna de ellas todavía no está bien definida.

Entre las neurohormonas secretadas por el complejo OX-GS se distinguen dos grupos peptídicos que han sido caracterizados químicamente. Por un lado están las hormonas cromatoforotróficas, de bajo peso molecular, y por otro las metabotróficas, de mayor peso molecular y que están implicadas en el control de los niveles de azúcar en la hemolinfa, muda y desarrollo gonadal. Dentro de estas últimas está la familia peptídica CHH/MIH/GIH, que tiene gran importancia en los procesos relacionados con reproducción, desarrollo y crecimiento, se ha encontrado únicamente en crustáceos (Beltz, 1988; Keller, 1992; Fingerman, 1997; García y Aréchiga, 1998).

La hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), ha sido la más estudiada del grupo y está involucrada principalmente en la regulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa, así como en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Además tiene un papel destacable en los procesos de muda (Chang *et al.*, 1990, Chang, 1993.; De Klejin y Van Herp, 1995) y reproducción (De Klejin y Van Herp, 1995; De Klejin y Van Herp, 1998). Aunque la existencia de esta hormona ya se conocía desde los años 40, la primera cuya estructura fue dilucidada fue la de *Carcinus maenas* (Kegel *et a.l*, 1989). Posteriormente ha sido descrita y caracterizada en diferentes especies (Chang *et al.*, 1990; Tensen *et al.*, 1991) e incluso se han descrito varias isoformas del neuropéptido dentro de una misma especie

(Tensen *et al.*, 1991; De Kleijn *et al.*, 1994b, 1995; Yang *et al.*, 1997; Davey *et al.*, 2000, Gu *et a.l*, 2000). Se ha observado también que existe un fenómeno de estereoepimerización en la tercera posición de la secuencia de aminoácidos, siendo la única diferencia entre las dos isoformas el cambio de un residuo de L-fenilalanina por D-fenilalanina en *Procambarus clarkii* (Yasuda *et al.*, 1994), *Homarus americanus* (Soyez *et al.*, 1994) y *Procambarus bouvieri* (Aguilar *et al.*, 1995). Ésto parece repercutir en variaciones en la duración de la señal en *H. americanus,* siendo más larga la respuesta hiperglucémica para la forma D que para la L (Soyez, 1994). Esta diferencia no se ha observado en *P. bouvieri* (Aguilar *et al.*, 1995).

La hormona inhibidora de la muda (MIH) es la responsable de mantener al animal en un período de intermuda. La inhibición de la muda se debe al efecto de MIH sobre la síntesis de su hormona antagónica (una hormona de naturaleza esteroidea) secretada por el órgano Y. El proceso de la muda del exoesqueleto en crustáceos decápodos es esencial para el desarrollo y maduración de los animales (Lachaise *et al.*, 1993). Este neuropéptido, ha sido caracterizado en un número amplio de especies (Klein *et al.*, 1993; Sun, 1994; Ohira *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 1996; Gu y Chan, 1998a; Umphrey *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1998) pero al contrario que la anterior no se han encontrado diferentes isoformas dentro de la misma especie.

La hormona inhibidora de las gónadas (GIH), también conocida como hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH), es la responsable de impedir la maduración del ovario y la vitelogénesis en las hembras y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en los machos. En las hembras, GIH actúa directamente sobre el ovario y, en los machos,

sobre glándula androgénica. En este caso, el número de especies donde el péptido ha sido descrito se reduce a tres: *H. americanus* (de Kleijn *et al.*, 1994b), *P. bouvieri* (Aguilar *et al.*, 1992) y *Armadillidium vulgare* (Grevé *et al.*, 1999). Aunque en el caso concreto de *H. americanus* están publicadas dos isoformas del péptido (Soyez *et al.*, 1991).

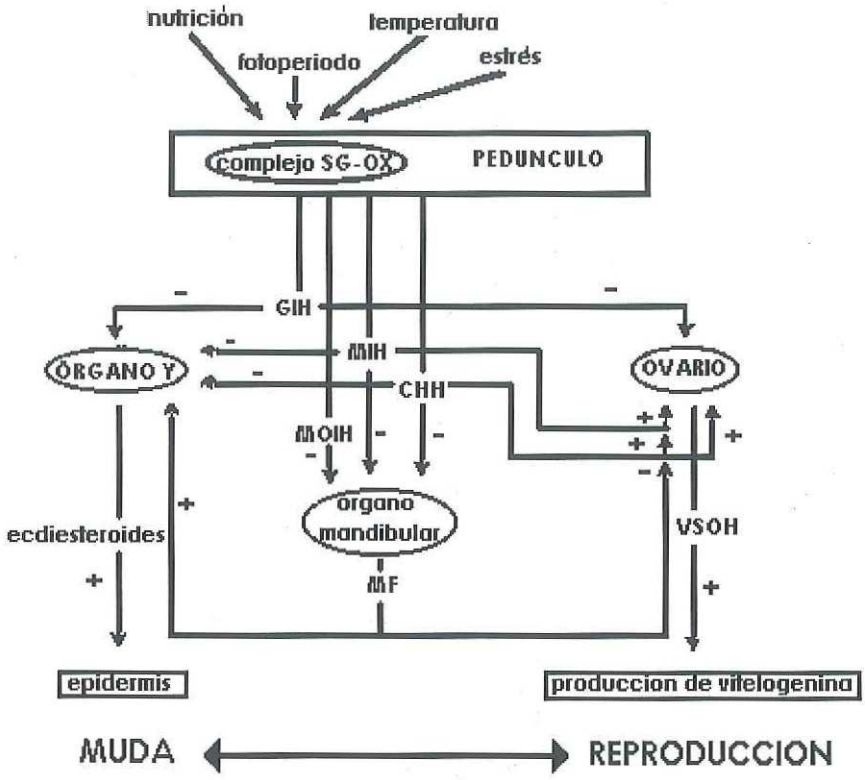


Figura 3. Modelo del papel desempeñado por la familia peptídica MIH/GIH/CHH en las funciones de muda y reproducción. Esquema modificado del propuesto por De Kleijn y Van Herp (1998).

Al final de los años veinte se descubrió la primera hormona de crustáceos. Desde esa fecha el conocimiento se ha ido ampliando, gracias al uso técnicas de endocrinología clásica y más recientemente utilizando las técnicas de la biología molecular (Fingerman, 1997). Las técnicas más frecuentes son (Chang, 1992):

Extirpación y reimplantación de un órgano. Este tipo de manipulaciones fueron muy frecuentes en los primeros experimentos que condujeron a determinar si un factor endocrino estaba involucrado en una función particular. En términos generales consisten en retirar el tejido endocrino susceptible de estudio y observar qué efecto, o efectos, se producen; posteriormente el mismo tejido procedente de otro animal se reimplanta para ver si se recupera la función original.

Inyección de un extracto de una glándula endocrina. Las glándulas se aislan y se homogenizan para que se libere la hormona almacenada. El homogenizado se inyecta a animales que carecen de glándula para ver si la función se recupera.

Purificación de la hormona. Se fracciona el tejido para purificar la hormona con diferentes solventes y cromatografías: cromatografía de capa fina, de gas líquido y cromatografía líquida de alta resolucción (HPLC). Una vez purificada, la hormona se puede caracterizar por su peso molecular, por su estructura (si es un esteroide) o se puede secuenciar (si es un péptido). La hormona purificada puede ser utilizada para realizar bioensayos, inyectándola al animal y estudiando su respuesta.

Ensayos inmunoquímicos. Para este objetivo se utilizan anticuerpos específicos y se observa si existe respuesta antigénica por parte de la hormona. Es muy común el uso del radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Técnicas moleculares. Permiten conocer la estructura nucleotídica de los genes que codifican las hormonas y estudiar su regulación. Estas técnicas son cada vez más frecuentes, pues aportan gran cantidad de información y ofrecen la posibilidad la de manipular los organismos a niveles que las anteriores no pueden lograr.

Gran parte del conocimiento sobre la fisiología de la reproducción y crecimiento de los crustáceos, y de los factores secretados por el complejo OX-GS se deben a la ablación del pedúnculo ocular y la extirpación de la SG. La ablación unilateral del pedúnculo ocular de hembras de crustáceos es una técnica para acelerar el desove que se viene realizando de forma rutinaria en las granjas de cultivo. Pero esta manipulación va en contra de la fisiología del animal, provocando diversas alteraciones entre las que se pueden destacar: ciclos de muda más cortos, desoves más frecuentes pero con un menor número de huevos por desove, en relación a las hembras criadas en el medio natural, así como una menor proporción de huevos eclosionados. Además, las hembras ablacionadas presentan una alta tasa de mortalidad (posiblemente porque se hacen más sensibles al ataque de patógenos) o un deterioro considerable y la tasa de fecundidad se reduce en las generaciones posteriores. Las larvas presentan escaso desarrollo y, en los nauplios aparecen anormalidades físicas con la consecuente disminución de su tasa de supervivencia y la de las postlarvas (Willian y Lawrence, 1992).

El desarrollo y uso de las técnicas de la biología molecular han dado un fuerte impulso al estudio de las neurohormonas y su regulación en crustáceos. Así, estudios de

protección a ARNasa han demostrado que la regulación génica de la hormona CHH se realiza a nivel de ARNm (De Kleijn *et al.*, 1994a). Hibridaciones *in situ* indican cuáles son los tipos celulares dentro del pedúnculo ocular (De Kleijn *et al.*, 1992) y en qué tejidos se expresan preferencialmente. Sun (1995) demostró que *mih* se expresa en el pedúnculo y en el cerebro de *P. vannamei* y observó una pequeña diferencia en la secuencia de nucleótidos entre la hormona que se expresa en el pedúnculo y la que se expresa en el cerebro, posiblemente debida a un polimorfismo. Escrutinios de genotecas e hibridaciones tipo "Southern" revelan que algunos genes que codifican estos neuropéptidos están agrupados en la misma región del cromosoma y que una misma hormona es codificada por varias copias del mismo gen (Gu y Chan, 1998a; Gu *et al.*, 2000). Usando hibridaciones con oligonucleótidos degenerados marcados y con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han clonado muchos ADN complementarios (ADNc), incluyendo al grupo de los peneidos entre los que se incluye a *P. vannamei.* Entre los ADNc que han sido clonados en los crustáceos se encuentran los que codifican la familia peptídica MIH/CHH/GIH. Las secuencias de los ADNc de muchas de estas hormonas están depositadas en el banco de genes del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos. Los primeros ADNc clonados fueron dos isoformas de CHH de la langosta *H. americanus* (Tensen *et al.*, 1991) y, con escrutinios de genotecas y reacciones de PCR se encontró la secuencia que codifica la preprohormona de GIH de *H. americanus* (Kleijn *et al.*, 1994b), la que codifica MIH del cangrejo *C. maenas* (Klein *et al.*, 1993) y las de CHH para el cangrejo de río *Orconectes limosus* (De Kleijn *et al.*,1994a) y *H. americanus* (De Kleijn *et al.*, 1995). En *P. bouvieri* están clonados los ADNc que codifican MIH (Aguilar *et al.*, 1996) y dos isoformas de

CHH (Huberman *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 1995). En camarones, se encuentran clonados los ADNc que codifican la MIH de *M. ensis* (Gu y Chan, 1998b); dos isoformas en *Penaeus japonicus* (Ohira *et al.*, 1998) y una en *P. vannamei* (Sun, 1994). Para los ADNc que codifican CHH están clonadas siete para *Penaeus monodon*, dos por Chen *et al.*, (1998), y Udomkit *et al.*, (2000) y cinco isoformas por Danvey *et al.*, (2000), cuatro en *P. japonicus* (Ohira *et al.*, 1998), dos para *M. ensis* (Gu y Chan, 1998a; Gu *et al.*, 2000) y una para *P. vannamei* (número de acceso: X99731). Para GIH, sólo está depositada la secuencia de *H. americanus* en el banco de genes, aunque se ha realizado una caracterización parcial de esta hormona en el acocil *P. bouvieri* (Aguilar *et al.*, 1992) y se conoce la secuencia peptídica de *A. vulgare*.

Actualmente *P. vannamei* es la especie que más secuencias tiene depositadas en el banco de genes del NIH (889 secuencias), sin embargo sólo 3 pertenecen a la familia CHH/MIH/GIH. Con 802 secuencias le sige *P. monodon*, entre las que se incluyen varias genotecas de ADNc de cefalotórax, pedúnculo ocular, pleópodo, hemocitos, etc. En cambio son únicamente 6 las secuencias aminoácidicas depositadas y 2 las nucleótidicas pertenecientes a la familia de las CHH. Las demás especies se encuentran a una distancia considerable de estas dos, siendo *P. clarkii* la siguiente con 80 secuencias nucleótidicas depositadas, pero sólo 3 son secuencias de CHH/MIH/GIH. En cambio, *H. americanus* es la que más secuencias peptídicas tiene depositadas, seis de las cuales pertenecen a este grupo de neuropéptidos.

En la tabla I se resumen el número de secuencias tanto peptídicas como nucleotídicas de algunas de las especies más estudiadas de crustáceos.

Tabla I. Número de secuencias peptídicas y nucleotídicas de algunas especies de crustáceos depositadas en los bancos de proteínas y genes del NIH.

Organismo	**Sec. nucleotídicas totales**	**Sec. peptídicas totales**	**Sec. peptídicas CHH/MIH/GIH**
Penaeus vannamei	889	60	3
P. monodon	802	66	6
P. japonicus	18	35	7
P. stylirostris	11	5	0
Metapenaeus ensis	10	13	7
Homarus americanus	43	131	6
Cancer pagurus	5	91	5
Carcinus maenas	41	5	2
Procambarus bouvieri	1	5	4
P. clarkii	80	34	3

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Estudiar las variaciones de expresión de los genes que codifican la familia peptídica CHH/MIH/GIH de la especie *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

II.2. Objetivos particulares

1.- Estudiar las diferencias de expresión a nivel de ARN mensajero de los genes que codifican la familia peptídica CHH/MIH/GIH de *P. vannamei* a diferentes temperaturas y salinidades.

2.- Clonar al menos un fragmento del gen que codifique la hormona GIH de *P. vannamei*.

3.- Realizar un estudio teórico de las secuencias de la familia peptídica CHH/MIH/GIH.

III. METODOLOGÍA

III. 1 Aclimatación de los organismos

Los camarones, *Penaeus vannamei*, fueron donados por el Dr. Bückle y su equipo de trabajo (Departamento de Acuicultura, CICESE) quienes realizaron el diseño del experimento y se ocuparon de todo el trabajo de mantenimiento de los experimentos de aclimatación.

Los camarones, en etapa juvenil, originarios de la granja camaronera "Génesis" de Puerto Peñasco (Sonora, México) con un peso promedio de 6 g se introdujeron en estanques de 1500 l a 24 °C, 6 ml/g de O_2 y 30 ‰ de salinidad, parámetros físico-químicos indicados por el productor. En esta etapa los animales fueron alimentados con "Camaronina" que contenía un 35 % de proteína.

Una vez alcanzada la talla adecuada para los experimentos, los juveniles se dividieron en cuatro estanques circulares de 400 l cada uno con las siguientes temperaturas: 20, 24, 28 y 32 °C y aproximadamente 34 ‰ de salinidad (salinidad del agua de la bahía de Ensenada). Se continuó alimentándolos con "Camaronina", con una dosis del 5 % del peso de los camarones. En estas condiciones permanecieron un mes, tiempo que necesitan para adaptarse a la temperatura.

Finalizado el periodo anterior fueron trasvasados a ocho estanques, cada uno en su interior con tres acuarios de 50 l. Cada par de estanque se fijo a una de las temperaturas, es decir, 20, 24, 28 y 32 °C y los acuarios en su interior a salinidades fijas de 10, 16, 22, 28,

34, y 40 ‰. El experimento se realizo dos veces. La primera vez se introdujeron 15 camarones por acuario y la segunda 10 camarones (N_t= 600).

Para aclimatarlos a la salinidad primero se introdujeron en los acuarios con las salinidades más próximas a la inicial y en días sucesivos en las demás salinidades. Los organismos permanecieron en estas condiciones una semana.

Finalizada la etapa de aclimatación, los camarones fueron medidos y pesados y todavía vivos se les extirpó ambos pedúnculos oculares. Los pedúnculos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se llevaron en hielo seco al ultracongelador, donde se mantuvieron a -70°C hasta que fueron procesados.

III. 2. Extracción de ARN

La extracción de ARN fue realizada siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi en 1987. El método consiste en una homogenización del tejido en una solución desnaturalizante que contiene tiocianato de guanidina, potente inhibidor de las ARNasas (enzimas que degradan la molécula de ARN). El protocolo detallado es el siguiente:

1.- Homogenizar el tejido, 100 mg aproximadamente, en 2 ml de solución desnaturalizante (4 M de tiocinato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio, sarcosil al 0.5%, 100 mM de β-mercaptoetanol y agua tratada con DEPC – dietil pirocarbonato -) con la ayuda de un homogenizador mecánico.

2.- Transferir el homogenizado a un tubo de 1.5 ml y añadir secuencialmente 0.1 volumen de acetato de sodio 2 M a pH= 4, 1 volumen de fenol saturado y 0.2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1).

3.- Mezclar muy bien, preferiblemente con vórtex, incubar en hielo de 5 a 15 minutos y centrifugar a 12000 xg durante 20 minutos a 4 °C.

4.- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir un volumen igual de isopropanol. Guardar a –80 °C durante 10-15 minutos.

5.- Centrifugar a 12000 xg durante 10 min a 4 °C y descartar el sobrenadante.

6.- Disolver el precipitado en 0.3 ml de solución desnaturalizante y añadir 0.3 ml de isopropanol. Precipitar durante 15 minutos a –80 °C.

7.- Centrifugar a 12000 xg durante 10 minutos a 4 °C y después descartar el sobrenadante.

8.- Resuspender el precipitado en 1 ml de etanol al 75 %, mezclar muy bien y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos.

9.- Sedimentar el ARN por centrifugación durante 15 minutos.

10.- Descartar el etanol y dejar secar suavemente el ARN hasta que se elimine el etanol. No debe permitirse que se seque en exceso porque después será muy difícil de disolver.

11.- Disolver en agua tratada con DEPC y guardarlo a –80 °C.

Al realizar las extracciones, se observó que la mayoría de las muestras presentaban una interfase proteínica muy grande (sobre todo las procedentes de organismos aclimatados a 28 y 32 °C), llegando a ocupar toda la mitad superior del tubo e impidiendo que pudiera obtenerse la fase acuosa. Esto se solucionó duplicando la cantidad de solución desnaturalizante en la que se homogenizaba el tejido y/o resuspendiendo la fase proteínica

en esta solución. Además, en muchos casos, también se realizó una reextracción con fenol-cloroformo, para eliminar restos de proteínas y disminuir la cantidad de pigmentos que quedaban disueltos en la fase acuosa.

Las extracciones se realizaron organismo por organismo llegándose a procesar unos 600 pares de pedúnculos, de los cuales sólo se usaron en los experimentos siguientes aquellas muestras que presentaban el ARN intacto.

Las muestras fueron seleccionadas mediante visualización en geles de agarosa al 1.2% con un 17.3 % formaldehido y cargadas con una solución que contenía formamida para que el ARN permaneciera desnaturalizado y no pudiera formar estructuras secundarias.

Una vez finalizadas las extracciones y la visualización de todas las muestras, los ARNs que presentaban la calidad deseada se reunieron en un mismo tubo, uno por cada condición y se fotografiaron. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con ADNasa (enzima que degrada ácidos nucleicos de doble cadena) para asegurar que la síntesis de ADN complementario (ADNc) no estuviera contaminada con restos de ADN y a la hora de amplificar se pudiera estar amplificando ADN genómico.

III. 3. Tratamiento con ADNasas

Para este paso se utilizó un enzima de la casa comercial Promega (RQ1 ADNasa I) y se siguió el protocolo que se encuentra en la página de internet de esta casa comercial (http://www.promega.com), para degradar completamente el ADN genómico que pudiera quedar en las muestras.

El protocolo usado fue el siguiente:

1.-Digerir la muestra de ARN con el enzima, estableciendo la siguiente reacción (añadir los componentes en el orden indicado):

1-2 µg/µl de ARN total disuelto en agua libre de nucleasas (x µl).

(100 – x) µl de agua libre de nucleasas.

10 µl de tampón 10X de ADNasa RQ1.

2 µl de ADNasa RQ1 libre de ARNasa.

2.- Incubar a 37ºC durante 15 minutos.

3.- Extraer el ARN con un volumen idéntico (100 µl) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (125:24:1) a pH 4.7

4.- Mezclar en vórtex durante 1 minuto y sedimentar por centrifugación a 12,000 x*g* durante 10 minutos.

5.- Transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo.

6.- Realizar una segunda extracción utilizando 100 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Mezclar con vórtex durante 3 minutos y centrifugar 3 minutos a 12,000 x*g*.

7.- Transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo.

8.- Precipitar el ARN añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M a pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol al 100%.

9.- Mezclar en vórtex y precipitar a –80ºC durante 15 minutos.

10.- Centrifugar a 12,000 x*g* durante 10 minutos a –4 °C.

11.- Lavar el ARN precipitado con 1 ml de etanol 70 % libre de ARNasas.

12.- Secar, no totalmente, en una estufa a 37°C entre 3 y 5 minutos, asegurándose de que no queden restos de etanol. Secar la muestra en exceso impide una buena disolución en agua.

13.- Disolver el ARN en 20-30 µl de agua libre de ARNasa.

14.- Visualizar las muestras en un gel de agarosa y formaldehído, para asegurarse que no se han degradado en el proceso y cuantificarlas por espectrofotometría (para el ARN una unidad de OD se corresponde con 40 µg/ml, para una longitud de onda de 260 nm).

III.4. Síntesis de ADNc (ADN complemetario)

A partir del ARN limpio de ADNasas se sintetizó ADNc utilizando un kit comercial ("First Strand cDNA Sintesis" -MCI Fermentas-). El ADNc es una molécula sintetizada *in vitro* a partir de ARN mensajero, gracias a la acción de un enzima conocido como transcriptasa reversa, que sintetiza ADN a partir de las cadenas de ARN mensajero, añadiendo deoxitiminas (dT) donde existen adeninas (A), en la cadena complementaria, en vez de uracilos (U), que es lo que añade la ARN polimerasa cuando sintetiza el ARN. Para que esta síntesis se lleve a cabo, la transcriptasa reversa necesita de un cebador, un oligonucleótido de dT, que se unirá a la cadena de adeninas que están presentes en el extremo 3' de la mayoría de las moléculas de ARN mensajero.

Este ADNc se utilizó para amplificar *chh, mih* y *actina-2* por PCR, y su síntesis se llevó a cabo siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Todas las reacciones se visualizaron y se fotografiaron para comprobar si la síntesis había sido eficaz.

III. 5. Extracción de ADN

El ADN se obtuvo a partir de músculo de camarón siguiendo un protocolo que había sido estandarizado para la obtención de ADN de pleópodos en el laboratorio del Dr.de la Rosa (Universidad Autónoma de Baja California).

El protocolo seguido fue:

1.- Homogenizar 500 mg de tejido en 500 µl del buffer de extracción (100 mM de EDTA, 10mM de Tris-HCl, a pH 7.5; 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 1µg/ml de proteinasa K)

2.- Incubar a 55°C durante 2 horas.

3.- Extraer con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar durante 10 minutos a 12000 x*g*.

4.- Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir el paso anterior.

5.- Añadir un volumen de cloroformo y centrifugar a 12000 x*g* durante 5 minutos, para lavar los restos de fenol. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir el lavado.

6.- Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 del volumen de NaCl 2 M y enfriar a –20 °C durante 30 minutos.

7.- Centrifugar a 12000 x*g* y vaciar el tubo.

8.- Lavar el precipitado con etanol al 70 % y centrifugar durante 5 minutos.

9.- Descartar el etanol y secar en a 65 °C durante 5-10 minutos para que el etanol se evapore totalmente.

10.- Resuspender la muestra en aproximadamente 100 µl de agua destilada.

11.- Añadir ARNasa y dejar a 37 °C toda la noche.

Este ADN fue utilizado para la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR - "Polimerase Chain Reaction"-).

III. 6. Diseño de cebadores

Los oligonucleótidos usados como cebadores o iniciadores en las reacciones de PCR se diseñaron a partir de las secuencias depositadas en el Banco de Genes del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), perteneciente al "National Institute of Health" (NIH). Para dos de los genes a estudiar *mih* (Sun, 1996; número de acceso S73824) y *chh* (número de acceso al banco de genes: X99731) se utilizó directamente la secuencia de los ADN complementarios (ADNc) de *P. vannamei.*

Para su diseño se uso el programa "Data Primer" de la Universidad de Stanford (http://genome-www.stanford.edu) que busca cual es el cebador más apropiado para las condiciones de temperatura y porcentaje de GC que se le indica, que en este caso fue una Tm o temperatura de fusión de 62 °C. El porcentaje de GC utilizado fue el que indicaba el propio programa.

Para asegurarse que las secuencias elegidas eran las más apropiadas para su uso en el PCR se utilizó un programa de la empresa Williamstone (http://www.williamstone.com/primer/calculator.cgi), que permite ver si existe la

formación de estructuras secundarias en los oligonucléotidos elegidos o si presentan complementariedad y pudieran unirse entre ellos. Asimismo, predice cual sería el producto de PCR teórico a obtener y el tamaño de éste.

Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

Para *mih*:

Forward: 5'- TTGAGAAGCTGCTGTCGTCCT -3'

Reverse: 5'- CTTGTTTCCTCCACATTAGCG -3'

Para *chh*:

Forward: 5'- TCACCAAACGCTCGCTCTTC -3'

Reverse: 5'- TGCATGCCAGTGCTTTATTCG -3'

Además de los cebadores de los genes objeto de estudio, se diseño uno para el gen de *actina-2* de *P. monodon* (Boonyawan, 1998 -sin publicar-, número de acceso AF100987) para usarlo como control para los experimentos de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), ya que éste es un gen que se expresa de forma constitutiva y por lo tanto no se ve afectado por las variaciones de temperatura y salinidad. La secuencia para estos oligonucleótidos se obtuvo, al igual que las dos primeras, directamente de la secuencia depositada en el banco de genes del NIH y siguiendo el mismo método para su diseño. Aunque la secuencia del gen de actina de *P. vannamei* no estaba depositada en el banco de genes en el momento del diseño de los cebadores, se utilizó directamente la de *P. monodon* porque haciendo diferentes alineamientos y

comparándola con genes homólogos se vio que está altamente conservada. Los oligonucleótidos elegidos fueron:

Forward: 5′- TGGTCGGTATGGGTCAGAAG –3′

Reverse: 5′- CGAACAGGTCCTTCCTGATG-3′

El cebador para el gen *gih* se diseño a partir de la secuencia aminoacídica del neuropéptido de *H. americanus* (de Kleijn *et al.*, 1995) depositada también en el banco de genes del NCBI (número de acceso X87192). En este caso lo que se hizo fue buscar las regiones que presentaran un menor número de degeneraciones (en la fecha en la que fue diseñado no había depositada ninguna otra secuencia de este gen) y que al menos amplificara teóricamente un fragmento de casi 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos diseñados para este gen fueron:

Forward: 5'- GCNTGGTTYACNAAYGAYGARTG -3'

Reverse: 5'- TTRACYAGHTARAGNGGYAC -3'

III. 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR consiste en una amplificación exponencial de un fragmento de ADN, para llevarlo a una concentración que lo haga detectable. Para realizarla se necesita de un cebador o iniciador, dNTPs, el enzima Taq polimerasa (ADN polimerasa que soporta altas temperaturas) y la solución amortiguadora

apropiada para el funcionamiento del enzima. La reacción se somete a varios ciclos (generalmente más de 25) cada uno de los cuales consiste en una desnaturalización, unión del cebador a la cadena inicial y extensión o polimerización.

III.7.a. PCR a partir de ADN genómico

Se realizaron varias reacciones de PCR a partir de ADN genómico, a fin de encontrar las mejores condiciones de amplificación. Los cebadores diseñados para los genes de la *actina-2 (act-2), mih y chh,* funcionaron muy bien a temperaturas de hibridación entre 60 y 68 °C, altamente restrictivas. Las condiciones establecidas para la amplificación de estos genes son las siguientes:

1) Primera desnaturalización: 94 °C durante 5 minutos

2) 30 ciclos:

-Desnaturalización: 94 °C durante 45 s

-Reasociación: 62 °C durante 45 s

-Polimerización: 72 °C durante 1 min 30 s

3) Polimerización final: 72 °C durante 7 min

Para *gih* se utilizaron las mismas condiciones de amplificación con la excepción de la temperatura de reasociación, que fue establecida en 52 °C y el número de ciclos de amplificación que fueron 35. En la mayoría de los casos en los que no se obtenía amplificación se repetía la amplificación utilizando como ADN molde entre 1-3 µl de la

primera reacción, es decir, se realizaba una reamplificación. Las codiciones para las reamplificaciones fueron las mismas que las utilizadas para amplificar el ADN genómico.

III.7.b. PCR a partir de ADNc (RT-PCR)

Los PCRs se realizaron a partir del ADNc sintentizado previamente. Primero se realizaron varias reacciones a diferentes ciclos: 25, 30, 35 y 40, a fin de fijar el número de ciclos de amplificación donde la reacción estuviera todavía en fase exponencial y de este modo el único factor limitante para la reacción fuera el ADNc.

Una vez fijado el número de ciclos los parámetros para la reacción de RT-PCR fueron los siguientes:

1) Primera desnaturalización: 94 °C durante 5 minutos

2) 30 ciclos:

-Desnaturalización: 94 °C durante 30 s

-Reasociación: 60 °C durante 30 s

-Polimerización: 72 °C durante 1 min

3) Polimerización final: 72 °C durante 5 min

III. 8. Cuantificación de los RT-PCRs

Establecidas las condiciones de amplificación, se realizaron los RT-PCRs, para los genes de *act-2, mih y chh,* a las muestras obtenidas a partir de los camarones aclimatados a las diferentes condiciones de temperatura y salinidad. Una vez realizadas se visualizaban

en un gel de agarosa al 1.5%. Las amplificaciones a partir de los cebadores de *act-2* se visualizaron y se normalizaron (ajustando el volumen de carga) para que la intensidad de las bandas en el gel fuera la misma. Como ya se había comentabo en uno de los apartados anteriores, *act-2* es un gen que se expresa de forma constitutiva, por tanto su expresión no se ve afectada por los cambios de temperatura y salinidad. De esta manera se puede utilizar este gen como control para corregir las pequeñas variaciones que ocurren en las reacciones de amplificación y en la síntesis de ADNc. Una vez ajustado el volumen de carga, por cada condición de temperatura y salinidad, se cargaron cantidades equivalentes de las amplificaciones de *chh* y *mih*.

Para observar las variaciones de expresión de estos genes en las condiciones establecidas, se realizaron varias electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, cargando en primer lugar las muestras amplificadas a partir de los cebadores del gen *act-2*. Se dejó que el gen migrara un mínimo de 10 minutos, se paró y se cargaron las muestras amplificadas a partir de los cebadores para *chh*. Se dejó migrar otra vez y por último se cargaron las muestras amplificadas con los cebadores para *mih*. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron fotografiados.

III. 9. Preparación de fragmentos para secuenciar

Los fragmentos obtenidos de *mih* y *chh* a partir del PCR de ADN genómico, se purificaron con el kit "PCR Concert" (GIBCO) y se enviaron a la compañía "Davis Sequencing" para su secuenciación y así poder asegurar que se estaban amplificando los genes que interesaban.

III. 10. Clonación de los productos de PCR obtenidos con los cebadores diseñados para *gih*.

La clonación es una técnica mediante la cual se producen múltiples copias de un plásmido u otro vector de clonación (al que previamente se le ha introducido un fragmento de ADN exógeno) por inserción de éste en un huésped adecuado capaz de realizar muchas copias y crecer en un cultivo. La bacteria *E. coli* es una de las más utilizadas para este fin.

III.10.a. Preparación de los fragmentos obtenidos

Los productos obtenidos de los PCR realizados con los cebadores para *gih* a partir de ADN genómico y de las reamplificaciones se corrieron en un gel de agarosa al 1.2%.

En la figura 4 se muestra cuales fueron los fragmentos clonados. En la línea 1 está el fragmento que se nombró como gih-pcr. Para obtener este fragmento se precipitó directamente la reacción de PCR usando el producto "Wizard PCR Preps" (PROMEGA). Los fragmentos de las líneas 2 y 3 se cortaron directamente del gel con un bisturí sobre la lámpara de luz ultravioleta. La purificación de estos fragmentos se llevó a cabo con el kit "GeneClean II" (BIO 101). Los fragmentos 2-a y 3-a se metieron en un mismo tubo, al igual que el 2-b y 3-b y se nombraron como gih-500 y gih-300 respectivamente.

El fragmento de la línea 1 procedía de una reamplificación de 2 µl de ADN genómico, el de la línea 2 de una amplificación directa de 4 µl de ADN génomico y el de la línea 3 de una reamplificación del anterior.

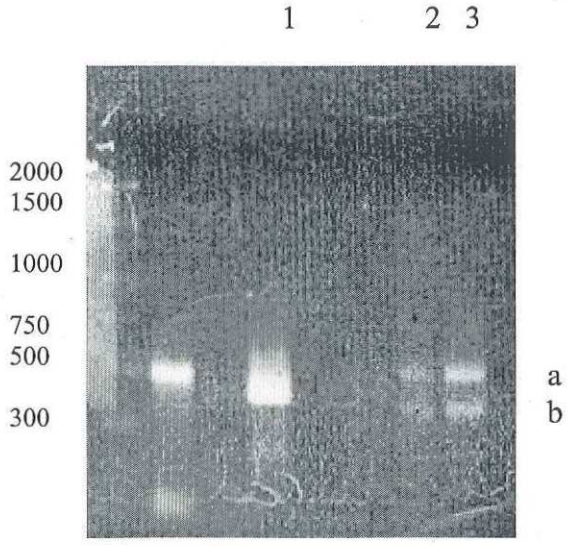


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos de amplificación de *gih*. En las líneas 1, 2 y 3 se muestran los fragmentos que se clonaron.

III.10.b. Ligación

La ligación consiste en unir un fragmento de ADN exógeno a una molécula de ADN o vector de clonación (en este caso un plásmido) que sirve como vehículo de transporte para introducir ese fragmento de ADN dentro de una célula bacteriana.

Para realizar este proceso, una vez purificados los fragmentos que se describieron en el apartado anterior se ligaron al vector pGEM-T Easy de PROMEGA. Este vector está linearizado y en sus extremos 5' posee una T lo que facilita mucho la inserción del fragmento de ADN, porque la Taq polimerasa posee actividad tranferasa terminal lo que implica que añade una A en los extremos 3'. Esta circunstancia facilita la unión del fragmento al plásmido y evita las digestiones con enzimas de restricción.

La reacción de ligación fue la siguiente:

Para una reacción de 10 µl se pusieron 5 µl de buffer 2X de ligación (específico para el plásmido), 1 µl del plásmido, 1 µl del ADN a clonar, 1 µl del enzima ligasa T4 y se incubó 1h a temperatura ambiente.

Se realizaron tres reacciones de ligación, una por cada fragmento a clonar.

III.10.c. Transformación

La transformación es el proceso mediante el cual un plásmido es introducido dentro de una célula huésped, en este caso una bacteria.

Para llevarla a cabo se usaron cajas Petri con medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro de sodio puro, 15 g/l de agar y 950 ml de agua destilada) y ampicilina, y se les añadió 100 µl de IPTG a una concentración 100 µM y 20 µl de X-Gal a 50 mg/ml.

La reacción de transformación se realiza de la siguiente manera:

1.-Poner 50 µl células competentes de *E. coli*, cepa JM109 (PROMEGA) y 3 µl de la reacción de ligación.

2.-Darles un choque térmico de 45 segundos a 42 °C e inmediatamente enfriarlas en hielo durante 2 minutos.

3.- Pasado este tiempo, añadir 950 µl de medio 2XYT (igual que el medio LB pero con mayor cantidad de triptona y extracto de levadura) e incubar a 37 °C durante 1 h.

4.- Centrifugar suavemente a 3000 rpm, para que las células precipiten sin que se dañen y retirar parte del medio dejando unos 200 µl.

5.- Resuspender la reacción y añadirla a las cajas Petri preparadas con medio LB sólido (se preparó una una caja Petri por reacción), distribuyéndola homogéneamente.

6.- Incubar a 37 °C durante 12 h.

Después de que las colonias crecieron se picaron con un palillo las que presentaban color blanco (que son las que han introducido el fragmento de ADN) y se pusieron a crecer en medio LB líquido (igual que el sólido pero sin agar) en el agitador orbital a 275 rpm y 37 °C. Pasado el tiempo de crecimiento, cuando lás células alcanzan la fase exponencial (16 horas aproximadamete), se procedió a la extracción de ADN del plásmido.

III.11. Extracción de ADN plásmidico

Para poder amplificar el fragmento clonado se necesita extraer el ADN del plásmido. Para este fin se utilizó el siguiente protocolo (modificado del descrito por Sambrook *et al.*, 1989):

1.- Transferir las células del medio LB líquido a tubos de 1.5 ml y centrifugar 1 minuto a 14000 rpm.

2.- Resuspender en 1 ml de buffer SET (20% de sacarosa, 50 mM de tris-Cl a pH=7.6 y 50 mM de EDTA) y mezclar con el vórtex durante un minuto. Centrifugar durante 1.5 minutos.

3.- Resuspender en 150 µl de buffer SET, añadir 5 µl de buffer ARNasa (10 mg/ml de Ribonucleasa A en 0.1 M de acetato de sodio y 0.3 mM de EDTA precalentado a 80 °C y a pH=4.8). Mezclar con vórtex.

4.- Añadir 350 µl de mezcla lítica (1% SDS y 0.2 N de NaOH) y mezclar por inversión. Incubar en hielo durante 10 minutos.

5.- Agregar 250 µl de acetato de sodio 3 M a pH=4.8, mezclar invirtiendo el tubo e incubar en hielo durante 20 minutos.

6.- Centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm, preferiblemente a 4 °C.

7.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y añadir un volumen igual de isopropanol.

8.- Invertir, centrifugar 5 minutos y decantar el sobrenadante .

9.- Lavar con 1 ml de etanol al 70 %, centrifugar 5 minutos y decantar el etanol.

10.- Secar 10 minutos al vacío y resuspender en 50 µl de TE.

III.12. PCR a partir de ADN plásmidico

Se realizaron varias amplificaciones a partir del ADN plasmídico utilizando como cebadores unas secuencias del plásmido que flanquean la zona donde se inserta el fragmento de ADN exógeno. Estos oligonucleótidos se llaman T7 y SP6.

Las condiciones de la reacción fueron las mismas que las utilizadas para la amplificación del ADN genómico.

III. 13. Estudio teórico de secuencias

Además del estudio teórico de las secuencias para el diseño de los cebadores se realizaron diferentes comparaciones entre las secuencias que existen de las hormonas de la familia, incluyendo también a MOIH. Estos estudios incluyeron: diferentes alineamientos,

creación de árboles filogenéticos, cálculos de porcentajes de similitud y divergencia, y búsquedas de regiones conservadas como las regiones de corte intrón-exón. Para realizarlos se utilizaron los siguientes programas:

BLAST (http//www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Compara una secuencia particular con todas las que tiene el banco de genes. Con este programa se compararon las secuencias de *mih* y *gih* con todas las depositadas en el banco de genes, Asimismo, se usó para comprobar que las secuencias de *mih* y *chh* que se habían amplificado a partir de ADN genómico eran las que se esperaban y para comprobar que los cebadores diseñados para los genes *mih, chh* y *act-2* eran secuencias específicas y no había posibilidad de que se unieran a otra secuencia del camarón.

BLAST 2 Sequences (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html). Alinea dos secuencias, ya sean peptídicas o nucleotídicas, y las compara buscando las regiones homólogas. Se utilizó para comparar la secuencia nucleotídica del ADNc de *mih* de *P. vanamei* depositada en el banco de genes, con el fragmento secuenciado obtenido a partir del PCR de ADN genómico.

MULTALING (http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html). Realiza alineamientos entre diferentes secuencias y construye el árbol filogenético de las secuencias alineadas. Se utilizó para realizar los alineamientos de las secuencias peptídicas de MIH, CHH, GIH, tanto de forma individual como entre ellas. También se obtuvieron los árboles filogenéneticos de estos alineamientos. Además se usó para alinear la secuencia nucleotídica del ADNc de *mih* de *P. vannamei* depositada en el banco de genes, con el

fragmento secuenciado obtenido a partir del PCR de ADN genómico. El programa fue desarrollado por Folencence Corpet (1998).

CLUSTALW (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl). Realiza alineamientos entre diferentes secuencias. Se utilizó para comprobar y corroborar los datos obtenidos utilizando el programa MULTALING.

DNAStar. Programa que realiza alineamientos, calcula porcentajes de similitud y divergergencia y construye árboles filogenéticos. Se utilizó para la construcción de las tablas de porcentajes de similitud y divergencia y, para realizar los mismos alineamientos y árboles filogenéticos que se realizaron con el programa MULTALING y reforzar los resultados obtenidos por este último.

SpliceWiew (http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html). Busca las posibles regiones donde pueda existir un sitio de corte y empalme. Se utilizó para estudiar la secuencia de *mih* obtenida a partir del PCR realizado a partir de ADN genómico.

Gene Finder (http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/gene-finder/gf.html). Al igual que el anterior busca regiones donde se pueda existir un posible sitio de corte y empalme. Las regiones obtenidas con ambos programas se analizaron y se localizaron en la secuencia del gen de *mih*.

ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.gov/gorf/orfig.cgi). Busca posibles marcos de lectura abiertos. Se utilizó para reforzar los resultados obtenidos por los dos programas anteriores.

IV. RESULTADOS

IV. 1. Extracción de ARN

Los ARNs extraídos fueron separados en un gel de agarosa y formaldehido y su integridad examinada. Para los análisis de expresión sólo se utilizaron aquellas muestras que mostraban el ARN intacto. Se perdieron dos condiciones, la 32 °C-28 ‰ y la de 24°C - 22 ‰ debido a problemas de conservación del tejido y de la condición 24 °C -16 ‰ sólo se pudo obtener ARN de dos individuos y en poca cantidad. El número de organismos (pares de pedúnculos) utilizados por condición se resume en la siguiente tabla y los ARN obtenidos se pueden observar en la figura 5:

Tabla II. Número de pares de pedúnculos utilizados por condición.

	10 ‰	**16 ‰**	**22 ‰**	**28 ‰**	**34 ‰**	**40 ‰**	**total**
20 °C	15	15	9	15	12	12	78
24 °C	15	2	0	15	15	15	62
28 °C	9	9	9	9	4	9	49
32 °C	4	8	8	0	8	8	36
total	43	34	26	39	39	44	225

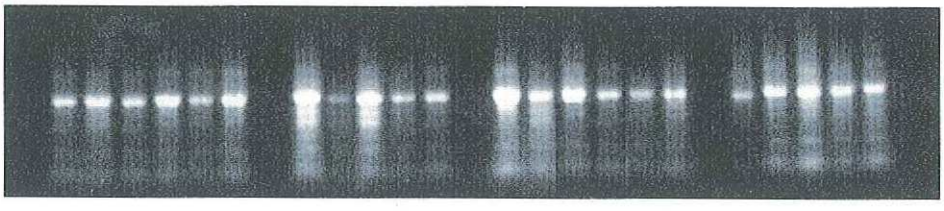


Figura 5. Conjunto de todos los ARNs utilizados para la obtención de ADNc. Las diferentes condiciones están ordenadas en orden creciente, comenzando por la 20°C -10 ‰ y terminando por la 32°C -40 ‰

IV.2. Síntesis de ADNc

Se utilizaron 3 µg de ARN tratados con ADNasa para sintetizar los ADN correspondientes. En la figura 6 se puede observar la calidad de los ADNc sintetizados:

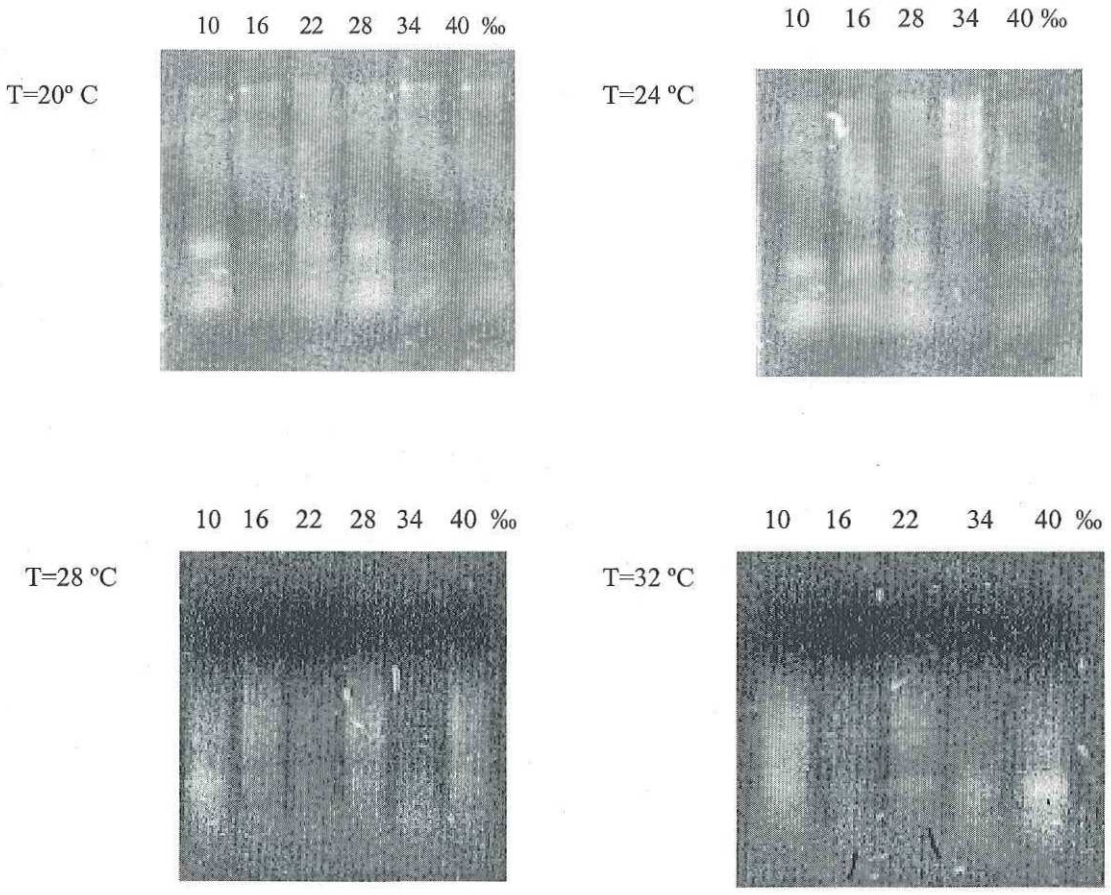


Figura 6. Fotografías de todos los ADNc utilizados para realizar los RT-PCR. En cada figura está indicada la temperatura y la salinidad de cada una de las muestras.

IV.3. Extracción de ADN

Como se puede ver en la figura 7, se obtuvieron, aproximadamente, 150 µg de ADN intacto por extracción. Este ADN fue utilizado para realizar diferentes amplificaciones con los genes de *mih, chh* y *gih*.

Figura 7. Extracciones de ADN genómico a partir del tejido muscular de *P. vannamei*. En cada carril se cargaron 3 µl de cada extracción.

IV.4. PCR a partir de ADN genómico

En las amplificaciones del gen *mih* se obtuvo un fragmento de unas 1000 pares de bases (pb), y en las de *chh* el fragmento amplificado fue de 700 pb (figura 8a).

Para *gih*, la amplificación a partir de ADN genómico rindió dos fragmentos con muy poca intensidad uno de 500 pb y otro de 300 pb aproximadamente. La intensidad de los fragmentos aumentó cuando una segunda reacción de la polimerasa se realizó utilizando como base para la amplificación 1µl de la primera reacción. También se obtuvo un tercer fragmento a partir de otra reacción de reamplificación (figura 4).

IV. 5. PCR a partir del ADNc

Las amplificaciones sobre ADNc para *mih* presentaron menor tamaño (alrededor de 500 pb) que las realizadas sobre el ADN genómico y en ocasiones (para la mayoría de las salinidades de los camarones aclimatados a 20 °C) apareció un segundo fragmento, menos intenso, pero muy visible, y unas 150 pb menor. Este segundo fragmento no se observó en ninguna otra temperatura ni en las amplificaciones del ADNc para *chh*.

Las amplificaciones realizadas para *chh* presentaban el mismo tamaño que las que se realizaron a partir del ADN genómico y no se observó ningún otro fragmento.

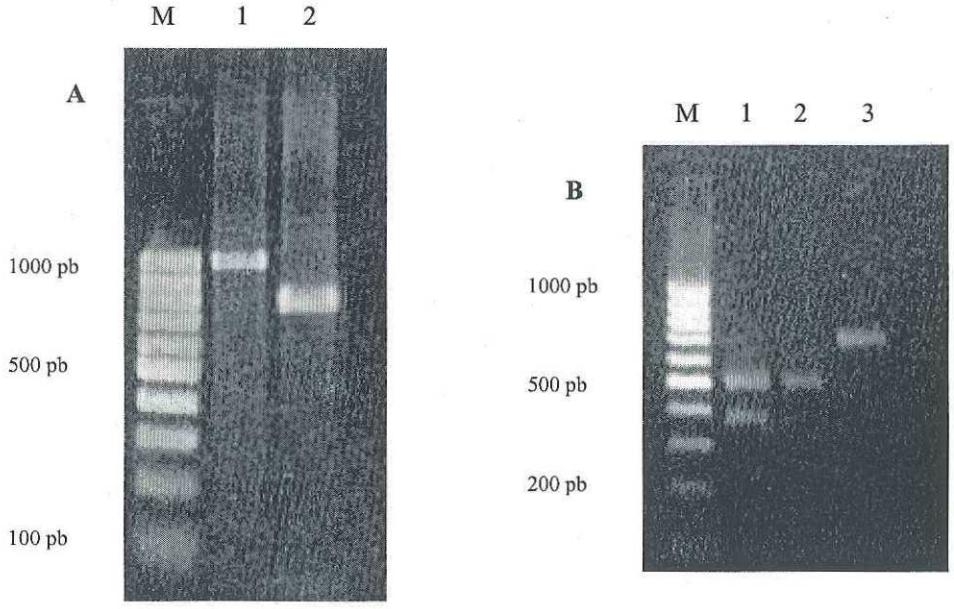


Figura 8. A) PCR a partir de ADN genómico: M) marcador de peso molecular; 1) *mih,* 2) *chh*. B) PCR a partir de ADNc: M) marcador de peso molecular, 1) *mih* obtenido a partir de las muestras de 20°C; 2) muestra representativa de *mih* en las otras condiciones, 3) *chh*.

IV. 6. Estudio de expresión para los genes *mih* y *chh*

El estudio de expresión se realizó sólo para los genes *mih* y *chh*, debido a la imposibilidad de encontrar un fragmento específico para el gen *gih*.

Una vez realizados todos los RT-PCRs para *mih, chh* y *actin-2* (control) para cada una de las condiciones a las que se sometieron los camarones, los resultados observados fueron los siguientes:

IV.6.a. Comparación de las temperaturas frente a las salinidades

En los camarones aclimatados a 20 °C se encontraron las siguientes diferencias entre las salinidades:

El gen *mih* se expresó más en aquellos animales que estuvieron a 40 ‰, y la expresión fue mucho menor en aquellos aclimatados a 10 ‰. En las demás condiciones las amplificaciones mostraron una intensidad similar. Sin embargo, como se puede observar en la figura 9, para *mih* apareció un segundo fragmento de menor tamaño en todas salinidades, a excepción de la de 28 ‰ y mostró mayor intensidad a 22 ‰. Este patrón de doble amplificación sólo se observó a esta temperatura y para el gen *mih* (figura 9).

El gen *chh*, siguió el mismo patrón que *mih* pero no apareció ningún otro fragmento de diferente tamaño.

Exceptuando la condición de 10 ‰ donde los niveles de expresión del gen fueron claramente menores, en el resto de las salinidades estas variaciones no fueron tan acusadas.

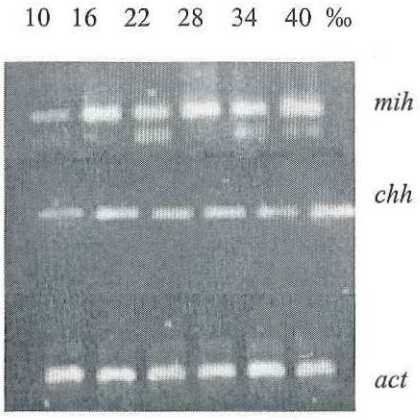


Figura 9. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 20 °C. Las salinidades están indicadas en la parte superior y en el lado derecho de la fotofrafia se indica la línea correspondiente a cada gen.

En la temperatura de 24 °C se encontró lo siguiente:

Para *mih,* la salinidad donde se observó mayor expresión fue 34 ‰, seguida de la de 40, 28 y 10 ‰ y, la condición con menor expresión fue 16 ‰. Para el gen *chh*, el patrón de expresión era prácticamente el mismo, aunque parece que la expresión a 10 ‰ era ligeramente mayor que a 40 y 28 ‰ (figura 10).

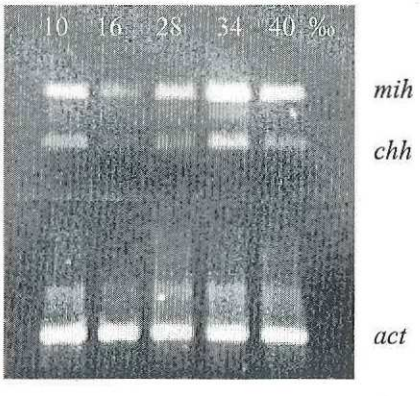


Figura 10. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de de T=24 °C Las salinidades están indicadas en la parte superior y en el lado derecho de la fotofrafia se indica la línea correspondiente a cada gen.

Para los organismos aclimatados a 28 °C se observó lo siguiente:.

En el gen *mih* la mayor expresión se dio a 28 ‰, seguida de 34, 16 y 10 ‰ con expresiones muy parecidas y por último 22 y 40 ‰. Por su parte el gen *chh* presentó mayor expresión a 10 ‰, seguida de la de 28 ‰. El resto de las condiciones se expresaron de forma muy parecida (figura 11).

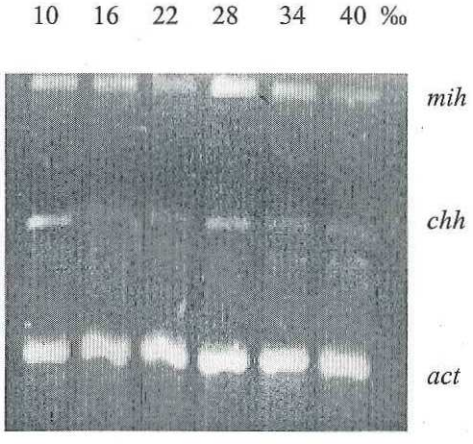


Figura 11. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 28 °C. Las salinidades están indicadas en la parte superior y en el lado derecho de la fotofrafia se indica la línea correspondiente a cada gen.

A la temperatura de 32 °C las diferencias observadas fueron las siguientes:

La expresión de *mih* fue mayor a 40 y 10 ‰ y menor a 34 ‰. Para *chh*, los niveles más altos de expresión coincidieron con *mih*, pero el menor se dio a 16 ‰. De todos modos, la intensidad de la banda en las condiciones que presentaron niveles mas bajos de expresión fue prácticamente la misma para *chh*. Para *mih*, la intensidad de las bandas en todas las condiciones tampoco presentó gran variación (figura 12).

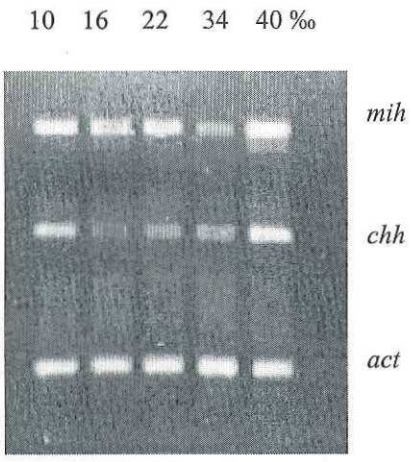


Figura 12. Electroforesis de los RT-PCR para las muestras de T= 32 °C. Las salinidades están indicadas en la parte superior y en el lado derecho de la fotofrafia se indica la línea correspondiente a cada gen.

IV.6.b. Comparación de las salinidades frente a las temperaturas

Cuando se compararon las salinidades frente a las temperaturas, lo que se encontró fue lo siguiente:

Para la salinidad de 10 ‰, *mih* se expresó con mayor intensidad a 28 °C, mientras que a 20 °C se observó la menor expresión. *chh* presentó el mismo patrón (figura 13).

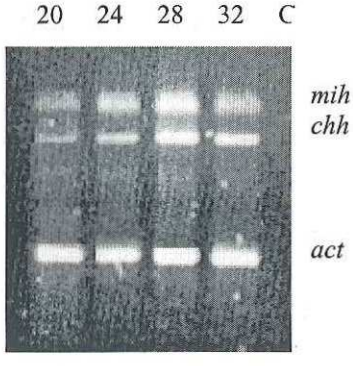


Figura 13. Electroforesis de los RT-PCR de S=10 ‰ frente a las temperaturas (parte superior de la fotografía). En el lado derecho se indica la línea correspondiente a cada gen.

A 16 ‰ la mayor expresión de *mih* se observó a 20 °C, seguida de 28 y 32 °C, siendo 24 °C la temperatura que mostraba menor expresión. Lo mismo se observó para *chh*.

En la figura 14 se puede ver que el carril de la temperatura de 20 °C presenta una banda muy ancha, en realidad son dos pero las bandas no migraron lo suficiente para permitir ver una separación más clara

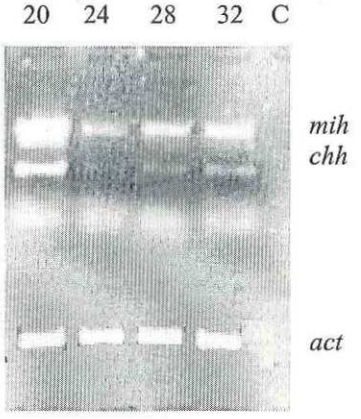


Figura 14. Electroforesis de los RT-PCR de S=16 ‰ frente a las temperaturas (parte superior de la fotografía). En el lado derecho se indica la línea correspondiente a cada gen.

En la salinidad 22 ‰ la temperatura a la que se vio mayor expresión fue 20 °C. A esta temperatura se observó también el doble fragmento, aunque tampoco están bien diferenciados porque no se dejó correr el gel suficiente tiempo para que pudiera observarse una mejor definición. La siguiente condición que presentó el nivel de expresión más alto fue 28 °C (figura 15).

El mismo patrón de expresión se vio para *chh*.

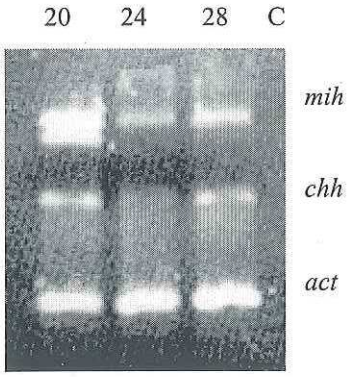


Figura 15. Electroforesis de los RT-PCR de S=22 ‰ frente a las temperaturas (parte superior de la fotografía). En el lado derecho se indica la línea correspondiente a cada gen.

A 28 ‰, las dos hormonas también siguieron el mismo patrón de expresión y éste fue una mayor expresión a 20 °C, seguido de 32 °C y finalmente 28 °C. En este caso en la espresión de 28 ‰ a 20 °C el segundo fragmento que se encuentró en las otras salinidades a esta temperatura no aparece (figura 16).

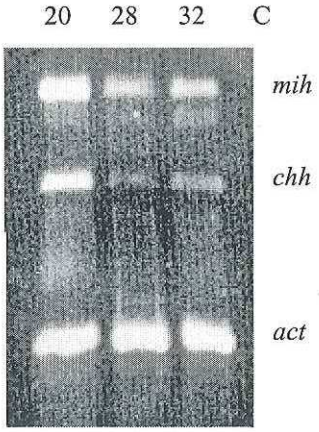


Figura 16. Electroforesis de los RT-PCR de S= 28 ‰ frente a las temperaturas (parte superior de la fotografía). En el lado derecho se indica la línea correspondiente a cada gen.

A 34 ‰, la temperatura de 24 °C fue la que tuvo mayor expresión de *mih*, seguida de 20 °C y por último 28 y 32 °C con un nivel de expresión prácticamente idéntico. Para *chh,* 20, 24 y 28 °C presentaron un nivel de expresión similar y a 28 °C fue donde se encuentró la menor expresión (figura 17).

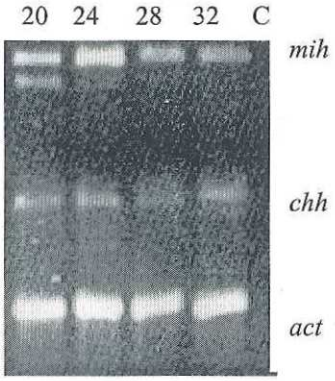


Figura 17. Electroforesis de los RT-PCR de S= 34 ‰ frente a las temperaturas (parte superior de la fotografía). En el lado derecho se indica la línea correspondiente a cada gen.

Y, por último, a 40 ‰, se encontró que *mih* presentaba mayor expresión a 20 °C y que a 28 °C prácticamente no se expresaba. En cambio *chh* se expresó mucho más a 32°C, seguida de 20 °C, pero la menor expresión también fue a 28 °C (figura 18).

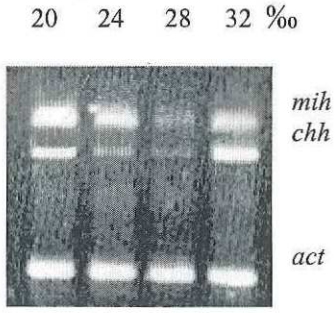


Figura 18. Electroforesis de los RT-PCR de S= 40 ‰ frente a las temperaturas (parte superior de la fotografía). En el lado derecho se indica la línea correspondiente a cada gen.

IV.7. Clonación de un fragmento de *gih*.

Los productos de amplificación de ADN genómico con los cebadores se clonaron en el vector pGEM-Easy. El resultado de la ligación se utilizó para transformar una cepa de *E. coli*. Se realizaron varias extracciones del ADN plasmídico de diferentes colonias que poseían los tres clones, gih-pcr, gih-300 y gih-500 (figura 4). En la figura 19 se puede ver el ADN del plásmido utilizado. Cada uno de ellos contiene uno de los fragmentos producto de las amplificaciones y reamplificaciones realizadas con los cebadores para gen *gih*.

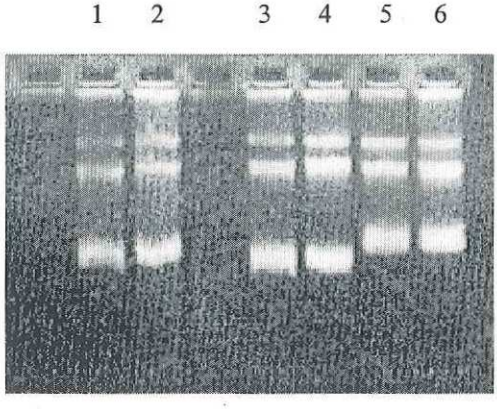


Figura 19. Mólecula de ADN recombinante (plásmido más ADN exógeno). Carriles 1 y 2 plásmido con el fragmento gih-500; carriles 3 y 4, plásmido con el fragmento gih-300 y carriles 5 y 6 plásmido con el fragmento gih-pcr.

Con este ADN se hicieron varios PCRs y se obtuvieron diferentes fragmentos que podrían ser secuencias parciales de *gih* (figura 20), el ADN plasmídico del que se obtuvieron mayor cantidad y mejores fragmentos fue el que poseía el fragmento gih-pcr (carriles 1-6). Los fragmentos que interesan son los que tienen un tamaño parecido a los que fueron clonados y se indican en la figura se encuentran con una flecha.

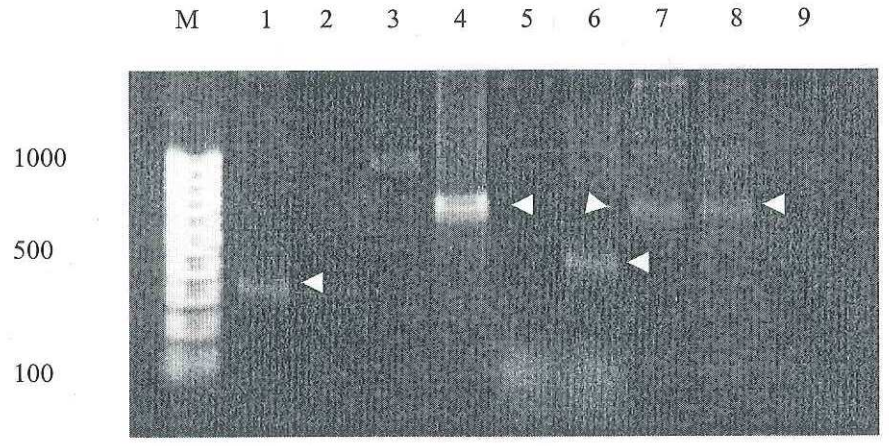


Figura 20. Electroforesis del producto de las amplificaciones realizadas a partir del ADN plasmídico. Las amplificaciones del carril 1, 3, 4 y 6 proceden de clononias que contenían el fragmento gih-pcr, las del carril 7 y 8 de colonias con el fragmento gih-300. Las colonias con el fragmento gih-500 no presentaron amplificación. M, marcador de peso molecular.

Los fragmentos señalados con las flechas deberán ser purificados y secuenciados, para confirmar si son realmente los fragmentos esperados.

IV. 8. Estudio teórico de secuencias

Actualmente están depositadas 50 secuencias aminoacídicas de la familia peptídica CHH/MIH/GIH (incluyendo 3 de MOIH -hormona inhibidora del órgano mandibular-). De estas 50, CHH ocupa el primer lugar con 35, MIH el segundo con 10 y GIH con 2 (aunque la de *A. vulgare* no está depositada en el banco de genes del NIH).

Con las secuencias peptídicas y nucleotídicas se realizaron diferentes alineamientos para ver el porcentaje de homología que existía entre ellas y qué regiones eran las más conservadas. En las figuras siguientes se muestran los alineamientos con todas las secuencias aminoácidicas de MIH, CHH, y GIH, así como uno de CHH y MIH de *P.*

vannamei y GIH de *H. americanus*. (figuras 21, 22 , 23 y 24). Los alineamientos se realizaron con el programa MULTALIN (diseñado por Florence Corpet, de acceso libre a través de Internet). Paralelamente se realizaron otros alineamientos utilizando el programa CLUSTALW (del NIH) y el DNAStar, con resultados idénticos.

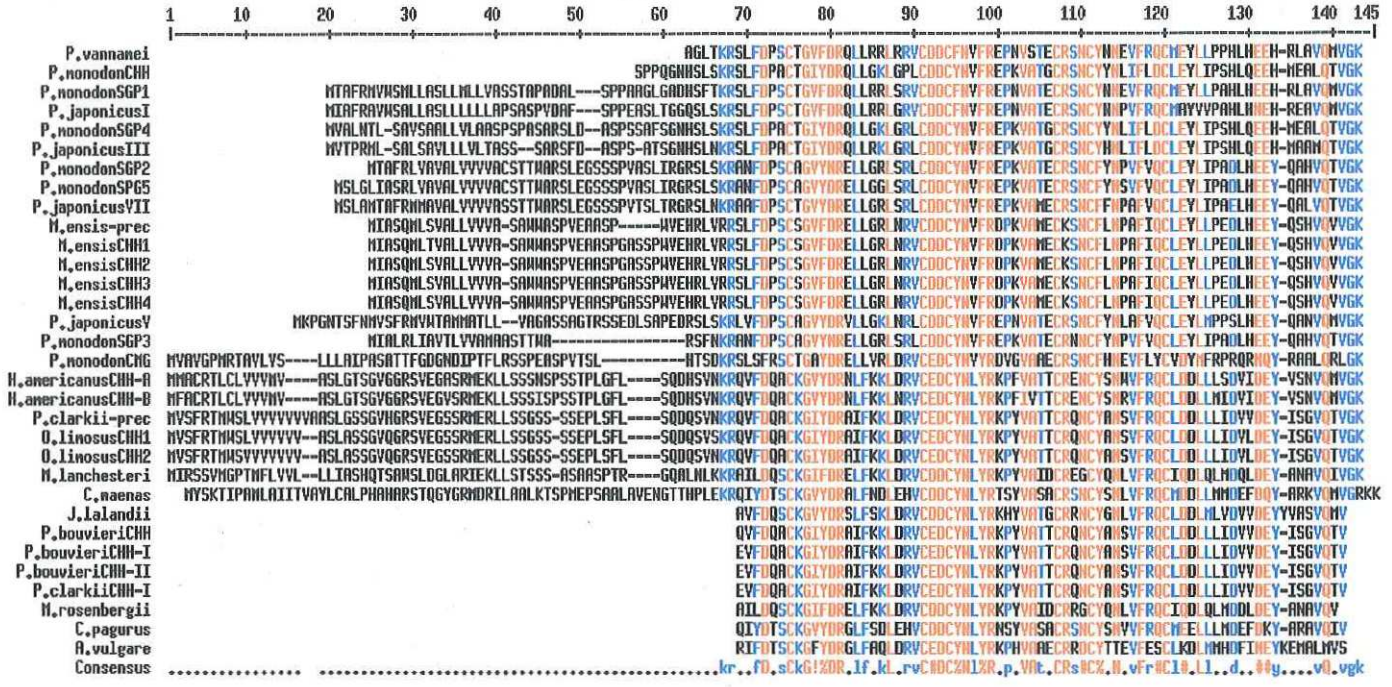


Figura. 21. Alineamiento de las secuencias de CHH. En rojo se señalan las regiones idénticas en todas las secuencias y en azul las que están presentes mayoritariamente.

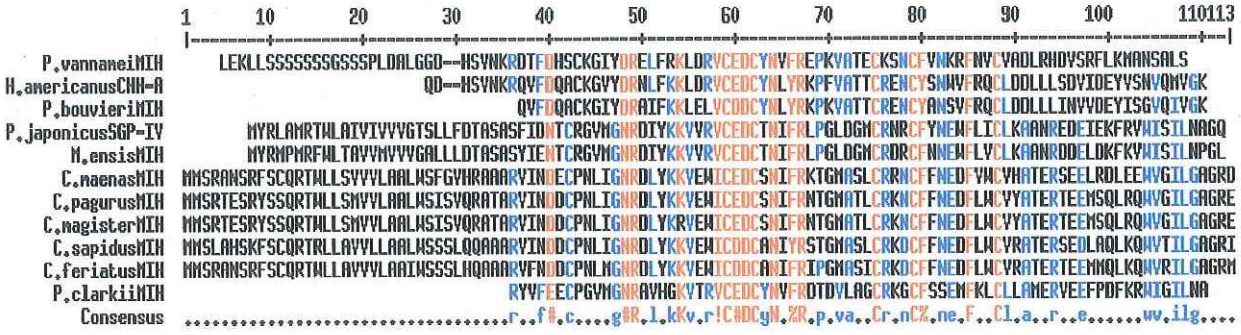


Figura. 22. Alineamiento de las secuencias de MIH. En rojo se señalan las regiones idénticas en todas las secuencias y en azul las que están presentes mayoritariamente.

Figura 23. Alineamiento de las secuencias de GIH. En rojo se señalan las regiones idénticas en todas las secuencias y en azul las que están presentes mayoritariamente.

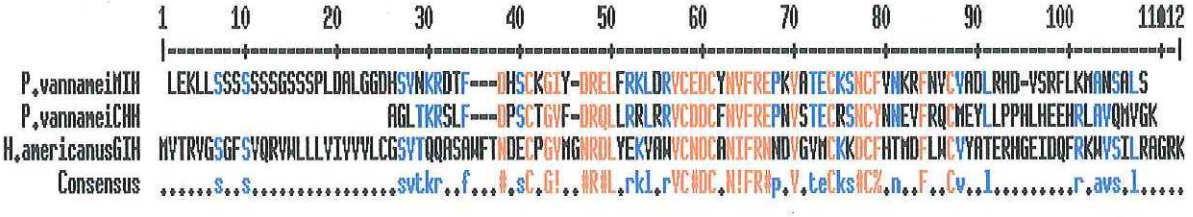


Figura 24. Alineamiento de las secuencias de MIH, CHH de *P. vammamei* y GIH de *H. americanus*. En rojo se señalan las regiones idénticas en todas las secuencias y en azul las que están presentes mayoritariamente.

Los resultados obtenidos mostraron que las secuencias de CHH presentaban mayor grado de homología entre ellas que los de MIH y GIH. MIH de *P. vannamei* comparte casi un 50% con la secuencia de CHH-A de *H. americanus,* un porcentaje más alto que el que comparte con otras MIH. Asimismo, las secuencias de GIH, MIH y MOIH presentaban más similitud entre ellas (50-60 %) que cuando se comparaban con las de CHH (un 40% aproximadamente), dando la impresión de ser un subgrupo dentro de la misma familia.

En los árboles filogenéticos (figuras 25, 26 y 27) y tablas de porcentajes de similitud (tablas III, IV y V) que se muestran a continuación, se refuerzan estos resultados. En el árbol de las CHH se diferenciaron dos grupos principales, uno que engloba las secuencias de los camarones y otro donde están cangrejos y langostas. En el brazo más alejado de este último grupo se encuentra *A. vulgare*. La tabla de porcentajes de similitud confirmó estos resultados, y *P. vannamei* comparte más del 60% de su secuencia con los miembros de este grupo, llegando a compartir un 96% de similitud con el péptido SPG-1 de *P. monodon*. En el árbol de las MIH también se diferenciaron dos grupos. Uno engloba a la mayoría de las secuencias de MIH y en el otro se encuentra la de *P. vannamei*, la CHH-A de *H. americanus* y la MIH de *P. bouvieri*.

En el árbol realizado con todas las secuencias de la familia, ambas hormonas de *P. vannamei* quedaron incluídas en el grupo donde estaban la mayoría de los peneidos. En este árbol se observaron dos grupos: el que incluye la mayoría de las MIH y GIH, y el de las CHH (donde también hay una secuencia de MOIH y la de MIH de *P. bouvieri*).

Todos estos resultados indican que la MIH de *P. vannamei* está más relacionada con las CHHs que con otras MIHs.

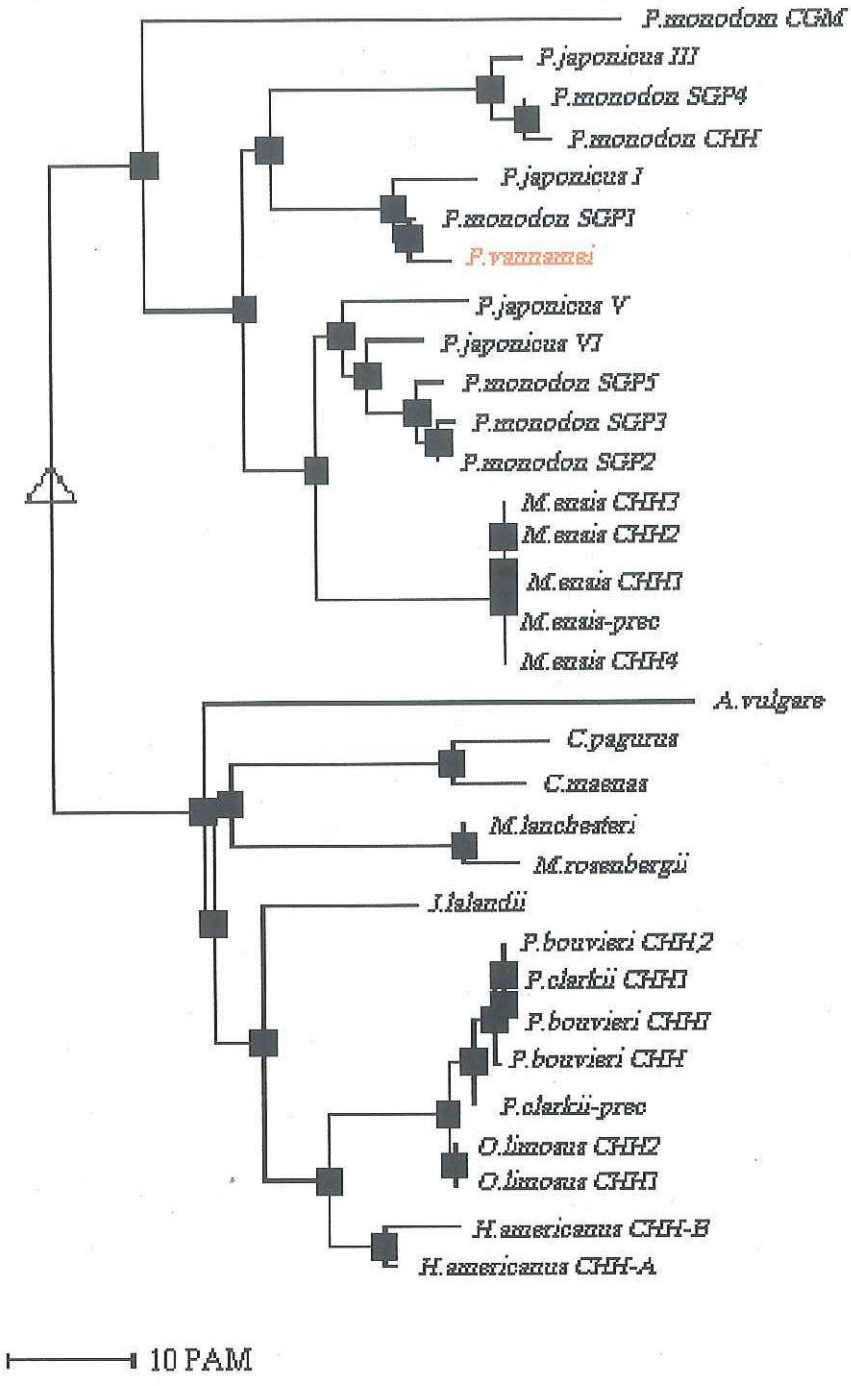


Figura. 25. Dendrograma de las regiones más conservadas de las secuencias de CHH.

Tabla III. Porcentajes de similitud de las secuencias de CHH. En rojo se destacan los valores más altos para las secuencias de *P. vannamei*.

Porcentaje de similitud

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	*A.vulgare* CHH		52.1	49.3	58.9	59.2	56.2	53.4	54.9	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	54.8	54.8	43.8	39.7	45.2	42.5	43.8	39.7	43.8	43.8	43.8	41.1	45.2	42.5	54.8	54.8	54.8	54.8	54.8
2	*C.maenas* CHH	50		85.1	62.5	61.2	60.3	61.2	62	47.5	47.5	47.5	47.5	47.5	58.8	58.8	48.8	43.8	48.8	46.2	43.4	44.7	52.6	48.7	47.4	43.4	50	50	60.3	58.9	58.9	58.9	61.8
3	*C.pagurus* CHH	49.3	14.9		60.8	59.8	59.9	63.5	62	48.6	48.6	48.6	48.6	48.6	58.1	58.1	46.6	43.2	47.3	47.3	43.2	41.9	52.7	48.6	47.3	43.2	50	51.4	57.5	56.2	56.2	56.2	58.1
4	*H.americanus* CHHa	43.1	36.2	38.4		92.5	72.6	65	64.8	51.2	51.2	51.2	51.2	51.2	82.5	83.0	51.2	53.8	56.2	51.2	51.3	46.1	55.3	53.9	53.9	52.6	55.3	51.2	62.2	80.8	80.8	80.8	84.2
5	*H.americanus* CHHb	45.8	37.5	42.5	7.5		67.1	60	59.2	50	50	50	50	50	78.8	80	48.8	50	55	48.8	47.4	42.1	52.6	51.3	51.3	48.7	52.6	50	78.1	76.7	76.7	76.7	80.3
6	*J.latensii* CHH	42.3	34.7	36.6	22.2	27.8		65.8	69	45.2	45.2	45.2	45.2	45.2	69.5	68.5	47.9	47.9	54.8	47.9	46.6	42.5	49.3	50.7	50.7	47.9	52.1	47.9	69.9	69.9	69.9	69.9	69.9
7	*M.lanchesteri* CHH	45.8	37.5	35.6	35	40	31.9		95.8	43.8	46.8	46.8	46.8	49.8	69.2	66.2	50	47.5	48.8	48.8	47.4	46.1	52.6	51.3	51.3	48.7	52.6	50	65.8	65.8	65.8	65.8	68.4
8	*M.rosenbergii* CHH	42.3	38	38	35.2	40.8	30	4.2		49.3	49.3	49.3	49.3	49.3	67.6	67.6	47.9	45.1	46.5	46.5	43.7	42.3	49.3	47.9	47.9	45.1	49.3	47.9	66.2	66.2	66.2	66.2	66.2
9	*M.ensis* CHH1	56.9	50.6	50	49.4	50.6	50	50.6	50		100	100	100	100	47.5	47.5	63.8	60	70	75	60.5	51.3	69.7	76.3	75	61.8	75	66.2	47.9	47.9	47.9	47.9	50
10	*M.ensis* CHH2	56.9	50.6	50	49.4	50.6	50	50.6	50	0		100	100	100	47.5	47.5	63.8	60	70	75	60.5	51.3	69.7	76.3	75	61.8	75	66.2	47.9	47.9	47.9	47.9	50
11	*M.ensis* CHH3	56.9	50.6	50	49.4	50.6	50	50.6	50	0	0		100	100	47.5	47.5	63.8	60	70	75	60.5	51.3	69.7	76.3	75	61.8	75	66.2	47.9	47.9	47.9	47.9	50
12	*M.ensis* CHH4	56.9	50.6	50	49.4	50.6	50	50.6	50	0	0	0		100	47.5	47.5	63.8	60	70	75	60.5	51.3	69.7	76.3	75	61.8	75	66.2	47.9	47.9	47.9	47.9	50
13	*M.ensis* CHHprec	56.9	50.6	50	49.4	50.6	50	50.6	50	0	0	0	0		47.5	47.5	63.8	60	70	75	60.5	51.3	69.7	76.3	75	61.8	75	66.2	47.9	47.9	47.9	47.9	50
14	*O.limosus* CHH1	45.8	40	41.1	17.5	21.2	26.4	33.8	32.4	53.2	53.2	53.2	53.2	53.2		98.8	50	51.2	52.5	48.8	51.3	44.7	51.3	52.6	52.6	52.6	55.3	47.5	97.3	95.9	95.9	95.9	98.7
15	*O.limosus* CHH2	45.8	40	41.1	16.2	20	26.4	33.8	32.4	53.2	53.2	53.2	53.2	53.2	1.2		48.8	52.5	51.2	50	51.3	44.7	51.3	52.6	52.6	52.6	55.3	47.5	97.3	95.9	95.9	95.9	98.7
16	*P.japonicus* CHH1	58.3	49.4	51.4	48.1	50.6	47.2	50.6	52.9	36.2	36.2	36.2	36.2	36.2	49.4	50.6		67.5	66.2	66.2	67.1	53.9	90.8	67.1	65.8	68.4	65.8	85	45.2	45.2	45.2	45.2	48.7
17	*P.japonicus* CHH3	61.1	53.2	55.6	45.6	49.4	48.6	51.9	54.3	40	40	40	40	40	48.1	45.8	32.5		67.5	70	93.4	51.3	71.1	68.4	67.1	68.4	67.5	69.7	67.5	49.3	49.3	49.3	52.6
18	*P.japonicus* CHH5	56.9	48.1	50	44.3	45.6	41.7	48.1	50	30	30	30	30	30	46.8	48.1	33.8	32.5		80	68.4	50	69.7	81.6	80.3	69.7	82.9	67.5	49.3	49.3	49.3	49.3	52.6
19	*P.japonicus* CHH7	58.3	50.6	50	48.1	50.6	50	49.4	51.4	25	25	25	25	25	50.6	49.4	33.8	30	20		68.4	52.6	71.1	69.5	86.2	69.7	88.2	65	46.6	46.6	46.6	46.6	50
20	*P.monodon* CHH	59.7	54.7	56.9	48	52	49.3	53.3	57.1	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5	48	48	32.9	6.6	31.6	31.6		48.7	68.4	68.4	67.1	69.7	69.7	67.1	47.9	47.9	47.9	47.9	51.3
21	*P.monodon* CMG	54.2	52	56.9	53.3	57.3	54.9	53.3	57.1	46.7	48.7	48.7	48.7	48.7	54.7	54.7	46.1	48.7	50	47.4	51.3		53.9	51.3	50	50	51.3	53.9	41.1	41.1	41.1	41.1	44.7
22	*P.monodon* SGP1	58.3	45.3	47.2	44	46.7	45.1	48	51.4	30.3	30.3	30.3	30.3	30.3	46	46	9.2	28.9	30.3	28.9	31.6	46.1		71.1	69.7	69.7	71.1	98.1	67.9	47.9	47.9	47.9	51.3
23	*P.monodon* SGP2	56.9	46	48.6	45.3	48	46.5	46.7	50	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	46.7	46.7	32.9	31.6	18.4	10.5	31.6	48.7	28.9		98.7	69.7	98.1	67.1	49.3	49.3	49.3	49.3	52.6
24	*P.monodon* SGP3	56.9	49.3	50	45.3	48	46.5	46.7	50	25	25	25	25	25	46.7	46.7	34.2	32.9	19.7	11.8	32.9	50	30.3	1.3		68.4	94.7	65.8	49.3	49.3	49.3	49.3	52.6
25	*P.monodon* SGP4	58.3	54.7	56.9	46.7	50.7	47.9	52	55.7	38.2	38.2	38.2	38.2	38.2	46.7	46.7	31.6	5.3	30.3	30.3	1.3	50	30.3	30.3	31.6		71.1	68.4	49.3	49.3	49.3	49.3	52.6
26	*P.monodon* SGP5	55.6	45.7	47.2	44	46.7	45.1	45.3	48.6	25	25	25	25	25	44	44	34.2	30.3	17.1	11.8	30.3	48.7	28.9	3.9	5.3	28.9		67.1	52.1	52.1	52.1	52.1	55.3
27	*P.vannamei* CHH	59.7	48.1	48.6	48.1	49.4	45.8	50.6	52.9	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	51.9	51.9	15	32.5	32.5	35	32.9	46.1	3.9	32.9	34.2	31.6	32.9		46.6	46.6	46.6	46.6	50
28	*P. bouvieri* CHH	45.1	39.7	42.3	17.8	21.9	25	32.9	32.9	51.4	51.4	51.4	51.4	51.4	1.4	1.4	51.4	48.6	48.6	51.4	49.3	56.3	49.3	47.9	47.9	47.9	45.1	51.4		99.6	98.6	98.6	98.6
29	*P. bouvieri* CHH1	45.1	39.7	42.3	17.8	21.9	25	32.9	32.9	51.4	51.4	51.4	51.4	51.4	2.7	2.7	52.8	48.6	48.6	51.4	49.3	56.3	49.3	47.9	47.9	47.9	45.1	51.4	1.4		100	100	97.3
30	*P. bouvieri* CHH2	45.1	39.7	42.3	17.8	21.9	25	32.9	32.9	51.4	51.4	51.4	51.4	51.4	2.7	2.7	52.8	48.6	48.6	51.4	49.3	56.3	49.3	47.9	47.9	47.9	45.1	51.4	1.4	0		100	97.3
31	*P.clarkii* CHH1	45.1	39.7	42.3	17.8	21.9	25	32.9	32.9	51.4	51.4	51.4	51.4	51.4	2.7	2.7	52.8	48.6	48.6	51.4	49.3	56.3	49.3	47.9	47.9	47.9	45.1	51.4	1.4	0	0		97.3
32	*P.clarkii* CHHprec	45.8	36.8	41.1	15.8	19.7	23.9	31.6	33.8	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	1.3	1.3	50.7	46.7	46.7	49.3	46	54.7	46	46.7	46.7	46.7	44	49.3	0	0	0	0	

Porcentaje de divergencia

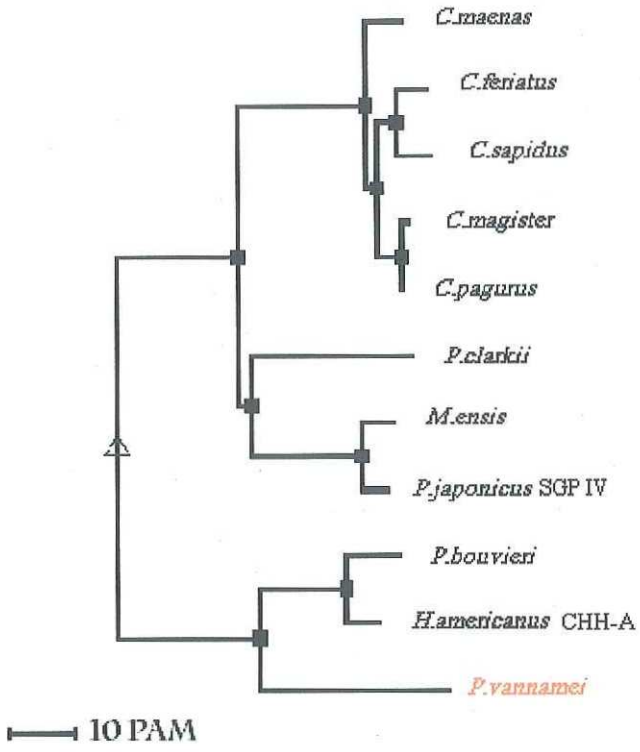


Figura 26. Dendrograma de las regiones más conservadas de las secuencias de las secuencias de MIH.

Tabla IV. Porcentajes de similitud de las secuencias de MIH. En rojo se destacan los valores más altos para las secuencias de *P. vannamei.*

Porcentaje de similitud

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	*C.feriatus* MIH		74.4	82.1	84.6	80.8	26.9	46.8	46.8	29.2	29.7	44
2	*C.maenas* MIH	25.6		83.3	79.5	82.1	30.8	45.5	45.5	31.9	31.1	46.7
3	*C.pagurus* MIH	17.9	16.7		82.1	98.7	29.5	45.5	48.1	31.9	31.3	45.3
4	*C.sapidus* MIH	15.4	20.5	17.9		80.8	28.2	44.2	42.9	27.8	31.1	41.3
5	*C.magister* MIH	19.2	17.5	1.3	19.2		28.2	44.2	46.8	30.6	29.7	44
6	*H.americanus* MIHa	71.6	68.9	70.3	71.6	71.6		27.3	28.6	48.6	79.7	29.3
7	*M.ensis* MIH	53.2	54.5	54.5	55.8	55.8	65.8		85.7	30.6	27	49.3
8	*P.japonicus* SGP-IV	53.2	54.5	51.9	57.1	53.2	64.4	14.3		27.8	25.7	48
9	***P.vannamei* MIH**	71.8	71.8	69	74.6	70.4	52.8	67.1	67.1		44.4	29.2
10	*P.bouvieri* MIH	71.2	72.6	72.6	72.6	74	20.3	68.1	68.1	52.9		27
11	*P.clarkii* MIH	56	53.3	54.7	58.7	56	69	50.7	52	66.2	71.4	

Porcentaje de divergencia

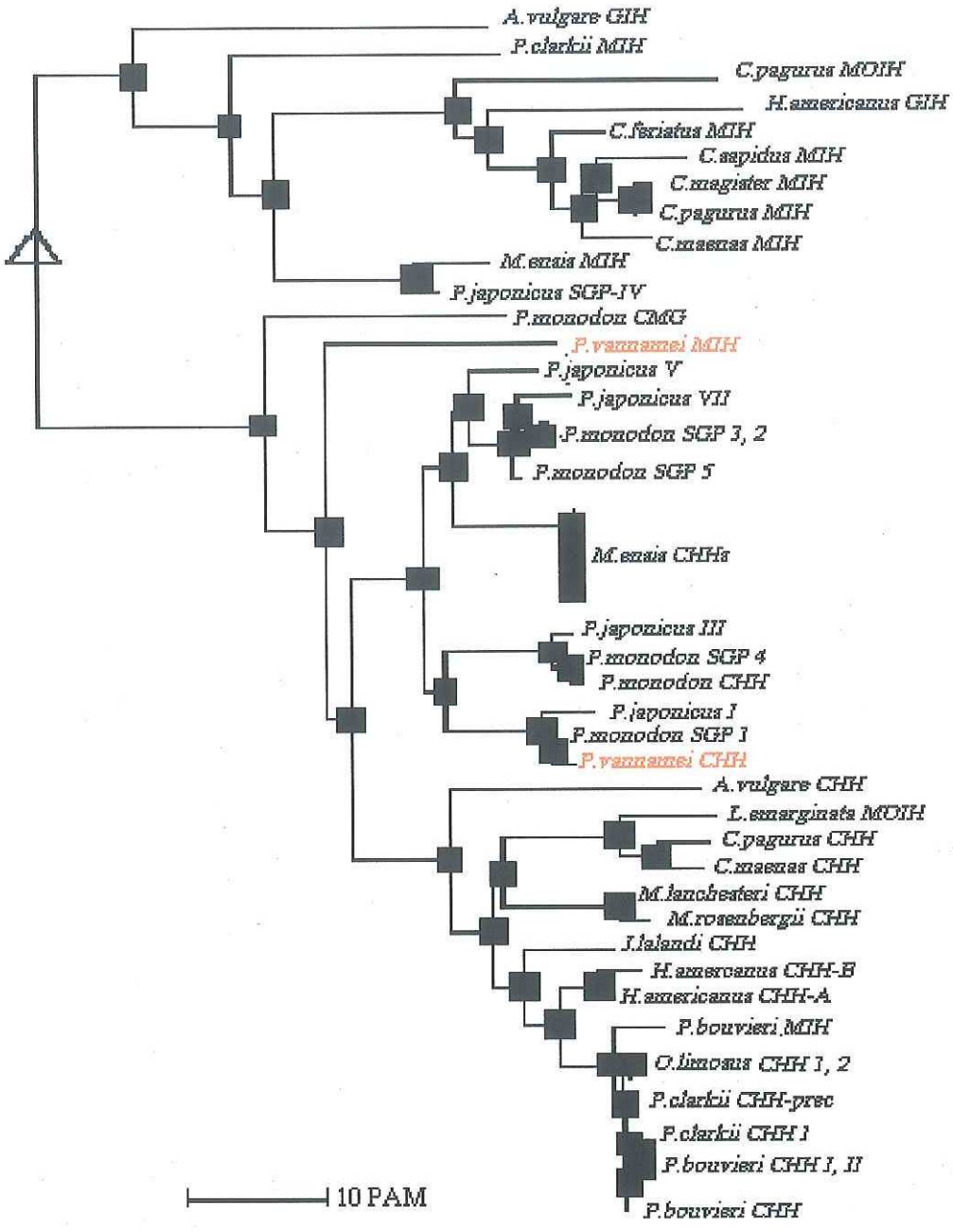


Figura 27. Dendrograma de las regiones más conservadas de todas las secuencias de la familia peptídica CHH/MIH/GIH.

Tabla V. Porcentajes de similitud de las secuencias de CHH y MIH. Se utilizaron las secuencias más representativas de cada grupo. En rojo se destacan los valores más altos para las secuencias de *P. vannamei*.

Porcentaje de similitud

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 *A.vulgare* CHH		24.7	52.1	27.4	49.3	23.3	26	23.3	58.9	56.2	56.2	53.4	54.9	42.5	30.1	54.8	43.8	30.1	39.7	43.8	43.8	42.5	45.8	54.8	54.8	49.3	28.8
2 *C.feriatus* MIH	72.6		29.5	74.4	29.7	82.1	84.6	80.8	26.9	25.6	23.3	29.5	28.2	26.9	46.8	25.6	26.9	46.8	30.3	31.6	28.9	26.9	29.2	24.7	26.3	29.7	44
3 *C.maenas* CHH	50	73.7		29.5	85.1	29.5	30.8	29.5	62.5	61.3	60.3	61.3	62	47.5	23.4	58.8	48.8	22.1	43.4	44.7	52.6	50	40.3	60.3	61.8	60.8	26.7
4 *C.maenas* MIH	72.6	25.6	75		31.1	83.3	79.5	82.1	30.8	28.2	26	32.1	32.4	25.6	45.5	30.8	26.9	45.5	30.3	31.6	27.6	25.6	31.9	28.8	30.3	31.1	46.7
5 *C.pagurus* CHH	49.3	74.3	14.9	74.3		31.1	31.1	31.1	60.8	56.8	58.9	63.5	62	48.6	27	58.1	48.6	25.7	43.2	41.9	52.7	51.4	38.9	57.5	58.1	59.5	25.7
6 *C.pagurus* MIH	76.7	17.9	75	16.7	74.3		82.1	98.7	29.5	28.2	24.7	29.5	28.2	25.6	45.5	29.5	28.2	48.1	31.6	35.5	30.3	28.2	31.9	28.8	30.3	31.1	45.3
7 *C.sapidus* MIH	74	15.4	73.7	20.5	74.3	17.9		80.8	28.2	25.6	24.7	33.3	33.8	24.4	44.2	28.2	24.4	42.9	28.9	32.9	26.3	24.4	27.8	26	27.6	31.1	41.3
8 *C.magister* MIH	76.7	19.2	75	17.9	74.3	1.3	19.2		28.2	26.9	23.3	28.2	26.8	26.9	44.2	28.2	29.5	46.8	30.3	36.8	31.6	29.5	30.6	27.4	28.9	29.7	44
9 *H.americanus* CHHa	43.1	73	36.2	70.3	38.4	71.6	73	73		92.5	72.6	65	64.8	51.2	27.3	82.5	51.2	28.6	51.3	46.1	55.3	51.2	48.6	82.2	84.2	79.7	29.3
10 *H.americanus* CHHb	45.8	74.3	37.5	73	42.5	73	75.7	74.3	7.5		67.1	60	59.2	50	27.3	78.8	48.8	28.6	47.4	42.1	52.6	50	44.4	78.1	80.3	77	28
11 *J.lalandii* CHH	42.3	73.6	34.7	72.2	36.6	73.6	73.6	75	22.2	27.8		65.8	69	45.2	26	68.5	47.9	26	46.6	42.5	49.3	47.9	47.2	69.9	69.9	65.8	28.8
12 *M.lanchesteri* CHH	45.8	74.3	37.5	74.3	35.6	77	73	78.4	35	40	31.9		95.8	48.8	28.6	66.2	50	26	47.4	46.1	52.6	50	44.4	65.8	68.4	66.2	25.3
13 *M.rosenbergii* CHH	42.3	73.2	38	71.8	38	76.1	70.4	77.5	35.2	40.8	30	4.2		49.3	29.6	67.6	47.9	26.8	43.7	42.3	49.3	47.9	45.1	66.2	66.2	62	23.9
14 *M.ensis* CHHorec	56.9	74.3	50.6	77	50	77	78.4	75.7	49.4	50.6	50	50.6	50		24.7	47.5	63.7	28.6	60.5	51.3	69.7	66.2	48.6	47.9	50	50	30.7
15 *M.ensis* MIH	69.9	53.2	74.7	54.5	73	54.5	55.8	55.8	66.2	66.2	69.4	70.3	69	70.3		29.9	23.4	85.7	22.4	27.6	25	24.7	30.6	30.1	28.9	27	49.3
16 *O.limosus* CHH	45.8	74.3	40	71.6	41.1	73	74.3	74.3	17.5	21.2	26.4	33.8	32.4	53.2	66.2		50	27.3	51.3	44.7	51.3	47.5	47.2	97.3	98.7	89.2	29.3
17 *P.japonivus* CHH1	58.3	74.3	49.4	75.7	51.4	74.3	78.4	73	48.1	50.6	47.2	50.6	52.9	36.2	71.6	49.4		24.7	67.1	53.9	90.8	85	45.8	45.2	48.7	47.3	24
18 *P.japonicus* MIH	68.5	53.2	74.7	54.5	73	51.9	57.1	53.2	64.9	64.9	69.4	71.6	70.4	66.2	14.3	67.6	70.3		26.3	28.9	27.6	27.3	27.8	28.8	27.6	25.7	48
19 *P.monodon* CHH	59.7	71.6	54.7	73	56.9	73	74.3	74.3	48	52	49.3	53.3	57.1	39.5	73	48	32.9	68.9		48.7	68.4	67.1	47.2	47.9	51.3	51.4	28
20 *P.monodon* CGM	54.2	70.3	52	70.3	56.9	66.2	68.9	64.9	53.3	57.3	54.9	53.3	57.1	48.7	68.9	54.7	46.1	67.6	51.3		53.9	53.9	47.2	41.1	44.7	39.2	33.3
21 *P.monodon* SPG1	58.3	73	45.3	75.7	47.2	73	77	71.6	44	46.7	45.1	48	51.4	30.3	70.3	48	9.2	67.6	31.6	46.1	96.1	45.8	47.9	51.3	50	28
22 *P.vannamei* CHH	59.7	74.3	48.1	77	48.6	74.3	78.4	73	48.1	49.4	45.8	50.6	52.9	33.8	70.3	51.9	15	67.6	32.9	46.1	3.9	44.4	46.6	50	48.6	28
23 *P.vannamei* MIH	50	71.4	57.7	71.4	58	68.6	74.3	70	50.7	55.1	50.7	52.2	49.3	49.3	68.6	50.7	50.7	68.6	50.7	52.2	50.7	52.2	47.2	47.2	44.4	29.2
24 *P.bouvieri* CHH	45.1	73.6	39.7	72.2	42.3	72.2	75	73.6	17.8	21.9	25	32.9	32.9	51.4	66.7	1.4	51.4	66.7	49.3	56.3	49.3	51.4	48.5	98.6	89	28.8
25 *P.clarkii* CHH	45.8	74.3	36.8	73	41.1	73	75.7	74.3	15.8	19.7	23.9	31.6	33.8	50.7	67.6	1.3	50.7	67.6	48	54.7	48	49.3	49.3	0	90.5	30.7
26 *P.bouvieri* MIH	50.7	71.2	39.2	72.6	40.3	72.6	72.6	74	21.6	24.3	29.2	33.8	37.1	50.7	71.2	10.8	50.7	71.2	47.2	59.7	48.6	50.7	52.2	9.6	9.6	27	
27 *P.clarkii* MIH	68.1	56	71.2	53.3	72.6	54.7	58.7	56	69.9	71.2	69.4	74	73.2	68.5	50.7	71.2	74	52	71.2	64.4	72.6	72.6	68.6	70.4	71.2	73.6	

Porcentaje de divergencia

Las secuencias de los fragmentos obtenidos a partir de la amplificación de ADN génomico fueron enviadas a secuenciar y se confirmó que eran de las secuencias de *mih* y *chh*. La secuencia de *mih* presentaba mayor tamaño que el fragmento resultante de la amplificación a partir de ADNc. Para averiguar si esta diferencia de tamaño se debía a la presencia de intrones, se alinearon la secuencia obtenida a partir del ADN genómico, (un fragmento de unas 700 pb) y la secuencia del ADNc depositada en el banco de genes (figuras 28 y 29). Paralelamente a estos estudios también se realizaron otros para encontrar regiones potenciales de corte y empalme en la secuencia obtenida a partir del ADN genómico. Los resultados de esta búsqueda fueron:

Sitios donantes:

POSICION	EXON	INTRON
170	CAA	GTAAGA
406	CAG	GTCCAA

Sitios aceptores

POSICION	INTRON	EXON
306	ACGTTTTAG	TTGC
407	AAAAAACAG	GTCC

El sitio donante de la posición 170 y el aceptor de la 407 se encontraron en la secuencia, así como la secuencia conservada GT/AG conocida como la regla de Chambon,

que aparece en la mayoría de las regiones de corte y empalme. Esta secuencia se encuentra situada en los nucleótidos 210 y 211 del brazo donante y los 444 y 445 del brazo aceptor en el alineamiento realizado por MULTALIN y en las posiciones 170 y 407 del realizado por "BLAST 2 Sequences".

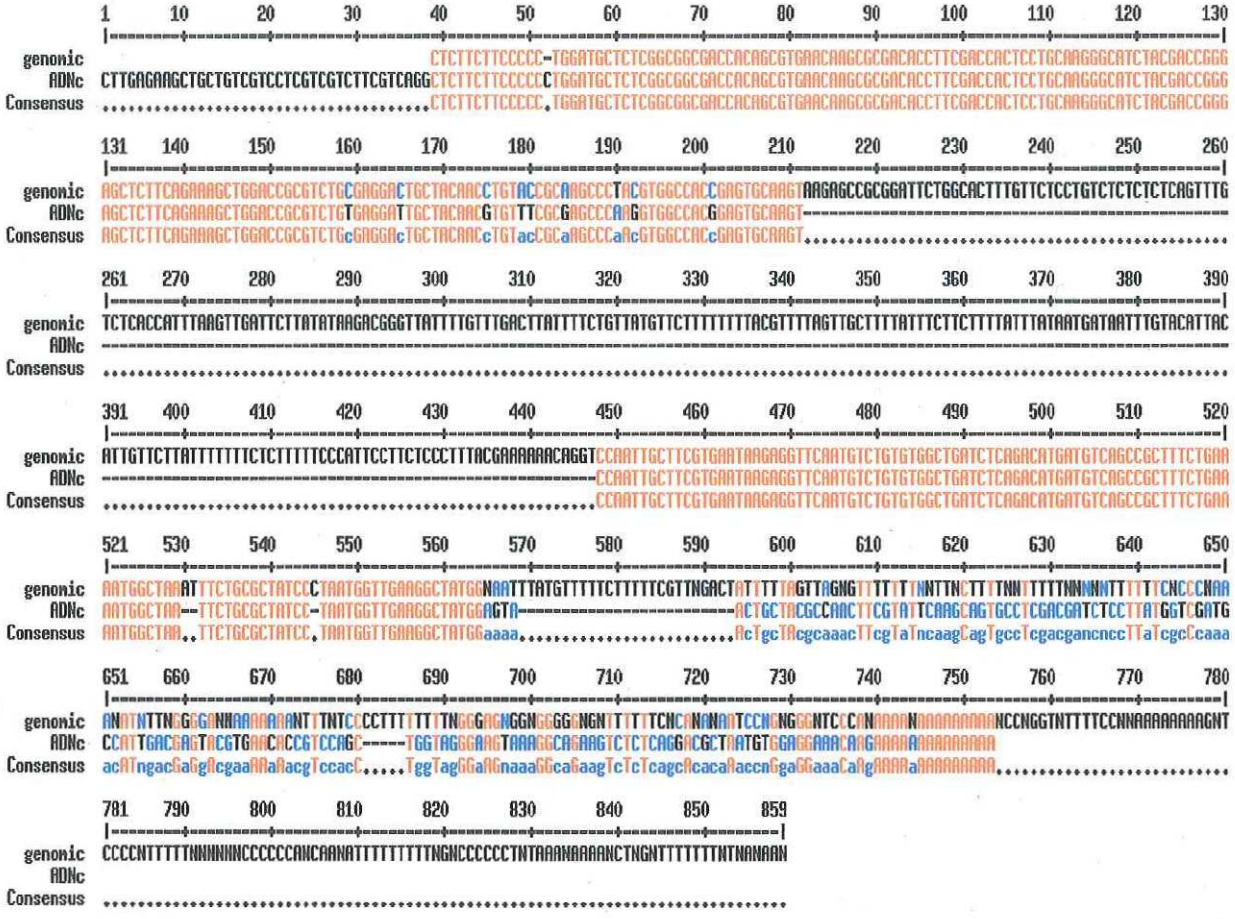


Figura 28. Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado a partir del ADN genómico y la secuencia de ADNc de *mih*, realizado con el programa MULTALIN.

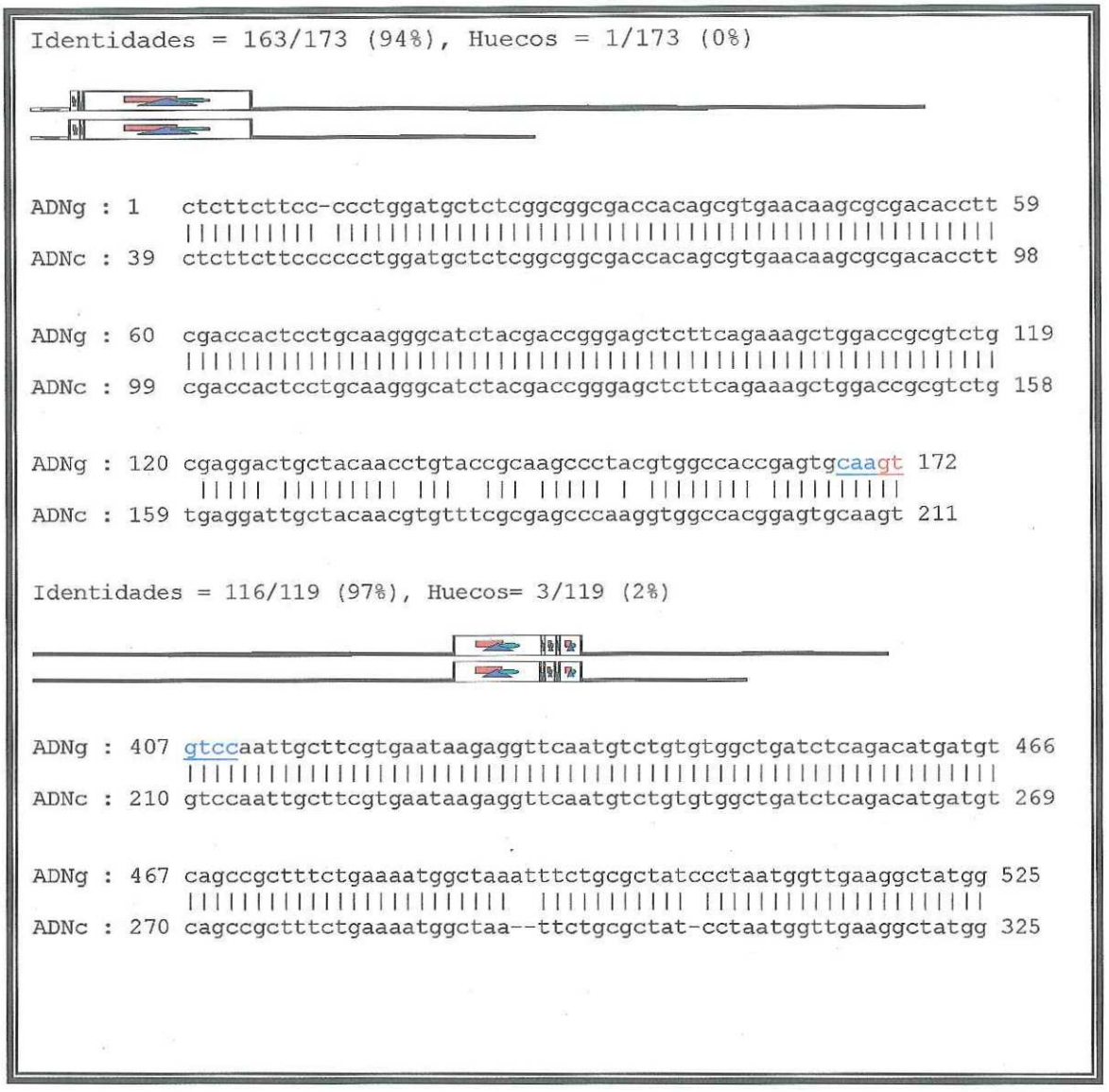


Figura 29. Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado a partir del ADN genómico y la secuencia de ADNc de *mih*, realizado con el programa BLAST 2 Sequences. Las bases de la regla de Chambon están indicadas en rojo.

V. DISCUSION

V.1. Estudio de expresión

La técnica de RT-PCR se ha convertido en una herramienta rutinaria para el estudio de la expresión de genes a nivel transcripcional. Si se compara con técnicas basadas en hibridación de sondas homólogas (hibridación tipo Northern), presenta mayor sensibilidad (se necesita menor cantidad de muestra). Si se compara con técnicas inmunocitoquímicas, donde se utilizan anticuerpos que reconocen los miembros de la misma familia de proteínas en diferentes especies, pero no disciernen entre isotipos o isoformas, el RT-PCR puede diferenciar específicamente un miembro de una familia génica si se cuenta con los cebadores apropiados.

Hasta la fecha los únicos estudios de expresión realizados para la familia CHH/MIH/GIH se han centrado en localizar cuales son los tejidos en los que se expresan las hormonas, pero ninguno en qué condiciones externas favorecen o inhiben la expresión. En este sentido, el estudio de expresión de los genes *mih* y *chh* presentó claras diferencias en la síntesis de sus ARN mensajeros dependiendo de las condiciones a las que los camarones fueron aclimatados. El hecho de que el patrón de expresión de *mih* y *chh* sea prácticamente el mismo, aunque la expresión del primero sea aparentemente mayor, podría indicar que MIH se necesita en mayor cantidad. Otra posibilidad es que sea una hormona multifuncional, es decir, que además de inhibir la síntesis de ecdiesteroides pueda estar regulando otras funciones y, por tanto, no sería extraño que sea más abundante. Este hecho ya ha sido descrito en otras hormonas de la misma familia, principalmente en CHHs, y

comienza a ser considerado una de las características de esta familia. Así, Santos *et al.*, (1997) encontraron que CHH interviene en el metabolismo de lípidos, aumentando los niveles de fosfolípidos en la hemolinfa y de triglicéridos en el pedúnculo de *C. maenas* o, como lo hace MIH, inhibiendo la síntesis de ecdiesteroides (Keller *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1990, Sefiani *et al.*,1996). También se ha demostrado que puede inhibir la síntesis de proteínas en el ovario (Khayat *et al.*, 1998; Gu y Chan, 1998b) y del metilfarnesoato en el órgano mandibular (Liu *et al.*, 1997). Recientemente, se la ha relacionado con el control de la osmorregulación, porque estimula el influjo de Na^+ e incrementa la diferencia de potencial eléctrico transepitelial en las branquias de *Pachygrapsus marmoratus* (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000). Además, hay que tener presente que la hormona inhibidora de la muda descrita para *P. vannamei* fue clonada mediante una técnica conocida como RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), utilizando como cebadores unos oligonucleotidos degenerados diseñados a partir de la secuencia del péptido CHH-A de *H. americanus* (Sun, 1994).

En el presente estudio, se observaron variaciones en los niveles de expresión de los genes tanto a diferentes salinidades como a diferentes temperaturas. Dentro de las salinidades experimentales la mayor expresión se obtuvo a 28 y 40 ‰, coincidiendo con los camarones que presentaron mayor talla y peso en el experimento(Bückle *et al.*, 1999). En cambio, la salinidad a la que la expresión fue menor presentó más variación, aunque las diferencias encontradas no fueron muy pronunciadas. Cabe señalar que en el caso concreto de 24 °C la menor expresión se dio a 16 ‰. Ésto podría deberse a que en esta condición sólo se pudo obtener ARN de dos individuos (tabla II) lo que pudo repercutir en una menor

síntesis de ese ADNc. Todas las salinidades utilizadas en el experimento son salinidades en las que la especie vive en el medio natural y 28 ‰ está considerada la salinidad más adecuada para criar la especie en cautiverio, por tanto, no es extraño que sea en esta condición donde se encuentre la mayor tasa de crecimiento y, en consecuencia, la mayor expresión de hormonas, como CHH, relacionadas con el crecimiento del animal. Sin embargo, para MIH, este hecho podría parecer contradictorio porque el animal para crecer necesita mudar y los datos indicarían que esta salinidad propicia que la muda permanezca inhibida. La explicación a este hecho podría ofrecerse desde dos puntos de vista: por un lado que MIH, tenga otras funciones además de inhibir la síntesis de ecdiesteroides, como ocurre con otras hormonas de la familia. O bien, que realmente no sea MIH, sino una CHH, ya que, por un lado, el patrón de expresión de *mih* coincide con el de *chh* y, por otro; no hay que olvidar que para la clonación de *mih* se usaron cebadores de una *chh* y no se realizó ningún bioensayo para comprobar la actividad del péptido. También, hay que tener en cuenta que cuando se realizó el experimento de aclimatación la mayoría de los animales se encontraban en etapa de intermuda y, por tanto, la expresión de *mih* debe ser alta.

Cuando se compararon los niveles de expresión a las diferentes temperaturas, la mayor expresión se observó a temperaturas bajas, principalmente a 20 °C, con la excepción de 10 ‰, que presentó la menor expresión en ambos genes, algo normal si se tiene en cuenta que son unas condiciones desfavorables para el animal y, por tanto, su actividad metabólica debería ser baja. Sin embargo, a partir de 16 ‰, la mayor expresión se dio a 20°C, para ambos genes. Aquí también se encontró un mismo patrón de expresión para *mih* y *chh*. Además, en el patrón de expresión de *mih*, a esta temperatura, se vio la presencia de

un segundo fragmento 100 pb menor en la mayoría de las salinidades, excepto en 28 ‰. En principio, este hecho sugiere un fuerte proceso de regulación para adaptarse a bajas temperaturas, ya que el mayor índice de supervivencia se dio a la temperatura más alta del experimento (Bückle *et al.*, 1999).

Estos resultados indican que la salinidad no es un factor tan crítico para los juveniles de la especie, de ahí que las diferencias de expresión no sean muy pronunciadas. De hecho, de forma natural suelen vivir en zonas estuarinas donde las variaciones de sal en el agua son importantes. En cambio, la temperatura parece ser un factor más crítico. Las temperaturas más favorables para un crecimiento óptimo están por encima de los 30 °C. Entonces, si se trata de *mih*, es normal que su expresión sea muy alta, pues 20 °C fue la temperatura del experimento menos conveniente para que el animal mude. Además la aparición del segundo fragmento sugiere un fuerte proceso regulatorio a esta temperatura. Esta regulación parece, a primera vista, un proceso de corte y empalme alternativo del mismo gen, dando un producto diferente, por lo que será necesario secuenciar los dos fragmentos para poder confirmarlo. Alternativamente, también podría tratarse de otro gen cuya expresión se activa a bajas temperaturas, que amplifica con los cebadores de *mih* y que es necesario para que el animal pueda adaptarse a esas condiciones.

V.2. Estructura génica de *mih*

Cuando se realizaron los PCRs a partir de ADN genómico y de ADNc se encontró que el fragmento del gen *mih* obtenido a partir de ADN genómico era mayor que el obtenido a partir de ADNc. Al secuenciar el fragmento mayor se confirmó la presencia de una región que no está presente en la secuencia de ADNc depositada en el banco de genes. Los alineamientos entre el fragmento secuenciado y la secuencia del ADNc parece confirmar la presencia de al menos un intrón de 234 pb (se necesitaría secuenciar el fragmento completo para saber si hay más de uno). Además, en los análisis realizados para encontrar regiones potenciales de corte y empalme en la secuencia obtenida a partir del ADN genómico, situaron la secuencia de unión entre exón-intrón GT/AG (regla de Chambon) en ese fragmento de 234 pb (figuras 28 y 29). Pero la diferencia de tamaño entre el fragmento amplificado a partir del ADN genómico y el amplificado a partir del ADNc fue de 500 pb, lo que hace suponer que posiblemente exista otro intrón. La presencia de intrones en los genes de la familia petídica CHH/MIH/GIH ya ha sido publicada en otras especies como *M. ensis* (Gu y Chan, 1998), donde *mih* que posee dos intrones, y *chh* también otros dos, pero solo uno de ellos se encuentra dentro de la región codificadora (Gu y Chan, 1998b; Gu *et al.*, 2000). Una organización génica similar podría darse en *mih* de *P. vannamei*. El gen *mih* de *C. feriatus* (Chan *et al.*, 1998) y *C. pagurus* (Lu *et al.*, 2000) también poseen otros dos intrones, al contrario que el gen del péptido CMG de *P. monodon* que sólo presenta un intrón (Udomkit *et al.*, 1999). La existencia de intrones, en los genes de estos neuropéptidos, apoyaría la tesis de corte y empalme alternativo para explicar el patrón de expresión de los fragmentos que aparecieron a 20 °C.

V.3. Estudio teórico de secuencias

En el estudio teórico de secuencias aminoácidicas se pueden observar algunas características de la familia como los seis residuos de cisteina conservados en toda la familia y entre los cuales se forman tres puentes disulfuro, así como el alto grado de homología entre las secuencias. Tanto para el grupo de CHH como para el de MIH los porcentajes de similitud entre la región conservada de cada grupo está, en la mayoría de los casos, por encima del 45% (tablas III y IV). Sin embargo, CHH de *P.vannamei* presenta mayor grado de similitud dentro de su grupo que MIH dentro del suyo, donde el valor de similitud más alto es 48.6%. Y cuando se compararon las secuencias de ambos grupos entre ellas, algo que llamó mucho la atención es que los valores de similitud de MIH de *P vannamei* fueron más altos comparada con el grupo de las CHH que con el suyo y dentro de éste con el péptido que más homología presenta es con la isoforma CHH-A de *H. americanus* y con CHH de *M. ensis.* Este hecho no es tan sorprendente, pues para la clonación de *mih* de *P. vannamei* (Sun, 1994) se utilizaron cebadores de la secuencia de este péptido de *H. americanus* y posiblemente lo que se clonó fue una isoforma de *chh.* Podría pensarse que los cebadores diseñados para *mih* de *P. vannamei,* no eran los suficientemente específicos y que también se unirían a otras secuencias relacionadas. Pero ésto se descartó pues el oligonucleotido diseñado como cebador se alineó con todas las secuencias del banco de genes del NIH, mediante un BLASTN (anexo 2) y se comprobó que era una secuencia que no pertenecía a la familia.

En los árboles filogenéticos también se pueden observar las relaciones de MIH con las CHH. En el árbol del grupo de las MIH (figura 26) se encuentra dentro del mismo grupo que *H. americanus* y *P. bouvieri* y separada de especies de su mismo género que supuestamente deberían estar más próximas genéticamente, como ocurre en el grupo de CHH (figura 25) y en el árbol donde se compararon todas las secuencias está dentro del grupo de las CHH muy relacionadas con especies de su mismo género. En un estudio realizado por Lacombe *et al.,* (1999), utilizando programas diferentes, se obtuvieron resultados similares (anexo 4). En ese estudio también incluyen la secuencia del péptido transportador de iones (ITP) clonado por Meredith *et al.,* (1996) y que muestra grandes semejanzas con la familia CHH/MIH/GIH. Todos estos datos se ven reforzados por los resultados obtenidos del BLASTP (anexo 1), cuando se comparó la secuencia peptídica de MIH con todas las secuencias depositadas en el banco de genes del NCBI del NIH, quedando patente la mayor relación de MIH de *P. vannamei* con las CHHs.

Tanto los resultados del estudio teórico como los resultados del estudio de expresión, donde el patrón de expresión de los genes *mih* y *chh* es el mismo, parecen apuntar a que el gen *mih* clonado por Sun en realidad es *chh*, aunque no puede descartarse que posea también la actividad de inhibición de la muda. Además hay que tener en cuenta que en el año que el gen fue clonado se conocían muy pocas secuencias nucleotídicas y peptídicas de esta familia, por tanto, el autor no pudo hacer los alineamientos que se realizaron en éste y otros trabajos.

VI. CONCLUSIONES

1.-La expresión de los genes *mih* y *chh* está controlada por las variaciones de temperatura y salinidad, pero la temperatura es un factor de regulación más fuerte que la salinidad.

2.- A 20 °C la expresión de *mih* presenta dos fragmentos diferentes que podrían haberse producido por corte y empalme alternativo del gen.

3.- Las salinidades donde se ha encontrado la mayor expresión coinciden con las condiciones de cultivo consideradas óptimas para el crecimiento de la especie.

4.- La estructura de *mih* presenta al menos un intrón dentro de la secuencia codificadora y probablemente exista otro.

5.- Proponemos que el gen publicado como *mih* de *P. vannamei* es realmente *chh*, basándonos tanto en el patrón similar de expresión de *mih* y *chh*, como en el alto grado de homología de *mih* con las secuencias de *chh*.

VII. PERSPECTIVAS

1.- Secuenciar totalmente el fragmento de *mih* amplificado a partir de genómico para comprobar el número de intrones que posee el gen.

2.- Secuenciar los dos fragmentos de *mih* obtenidos a 20 ºC para comprobar si se trata de corte y empalme alternativo del gen o bien de una isoforma que se expresa a esa temperatura.

3.- Continuar con la clonación de, al menos, un fragmento de *gih* y realizar el mismo estudio de expresión que se ha realizado para los genes de *mih* y *chh*.

4.- Realizar algún bioensayo para dilucidar la actividad fisiológica de MIH.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, M. B.; Quackenbush, L. S., Hunt, D. T., Shabanowitz, J. y Huberman, A. 1992. "Identification, purification and initial caracterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortomann)". Comp. Biochem. Physiol., 102B(3):491-498

Aguilar, M. B.; Soyez D.; Falchetto, R.; Arnott, D.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. y Huberman, A. 1995. "Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustaceanhyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): presence of a D-amino acid". Peptides;16(8):1375-83 p.

Aguilar, M. B.; Falchetto, R.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; y Huberman, A. 1996. "Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann)". Peptides 17(3):367-74.

Bailey-Brook, J. H. y Moss S. M. 1992. "Penaeid taxonomy biology and zoogeography". In: Fast, A. W. and Lester, L. J.(ed) "Marine Shrimp Culture: Principles and Practices". Elsevier Science Plubisers B. V. Amsterdam. 9-29 p.

Beltz, B. A. 1998. "Crustacean neurohormones". En: Laufer, H., and Downer, R. G. H (ed.) "Endocrinology of Selected Invertebrate Types". Alan R. Liss, Inc. New York:, 235-258 p.

Bray, W. A. y Lawrence, A. L. 1992. "Reproduction of *penaeus* species in captivity". In: Fast, A.W. and Lester, L.J.(ed) "Marine Shrimp Culture: Principles and Practices". Elsevier Science Plubisers B.V. Amsterdam. 93-170 p.

Bückle, L. F., Baron, B. y Hernandez, M. 1999. "Osmoregulation of *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) juveniles at different temperature and salinity". En prensa

Chan, S. M., Chen X.G. y Gu, P.L. 1998. "PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*)". Gene, 224: 23-33.p.

Chang, E. S., Prestwich, G. D., y Bruce, M. J. 1990. "Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*". Biochem. Biophys. Res. Commun 171(2):818-26 p.

Chang, E. S. 1992. "Reproduction of penaeus species in captivity". In: Fast, A.W. and Lester, L.J.(ed) "Marine Shrimp Culture: Principles and Practices". Elsevier Science Plubisers B. V. Amsterdam.53-91 p.

Chang, E. S 1993. "Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans". Annu. Rev. Entomol. 38:161-80 p.

Chen, H. Y., Cheng, J .H. y Huang, C. J. "Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone-like neuropeptides from the tiger prawn *Penaeus monodon*". En prensa

Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987 "Single step method of RNA isolation by acid guanidium thyocyanate-phenol-chloroform extraction". Anal. Biochem. 162: 156-159 p.

Corpet, F. 1988. "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". Nucl. Acids Res. 16 (22): 10881-10890 p.

Davey, M. L., Hall, M. R., Willis, R. H., Oliver, R. W. A., Thurn, M. y Wilson, K. J. 2000. "Five crustacean hyperglycemis family hormones of *Penaeus monodon*:

complementary DNA sequence and identification in single sinus glands by electrospray ionization–Fourier transform mass spectrmetry". Mar. Biotechnol. 2 (1): 80-91 p.

De Kleijn, D. P. V., Coenen, T., Laverdure, A. M., Tensen, C. P. y Van Herp, F. 1992. "Localitation of mensseger RNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad-inhibiting hormone in the x-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus*". Neuroscience, 51(1): 121-128 p.

De Kleijn, D. P. V., Janssen, K. P. C., Martens, G. J. M. y Van Herp, F. 1994a. "Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic hormones (CHH) mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*". Eur. J. Biochem. 224: 623-628 p.

De Kleijn, D. P. V., Sleutels, F. J. G. T., Martens, G. J. M. y Van Herp, F. 1994b "Cloning and expression of mRNA encoding prepro gonad inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*". FEBS Lett. 353: 255-258 p.

De Kleijn, D. V. P., De Leeuw, E. P. H., Van de Berg, M. C., Martens, G. J. M. y Van Herp, F. 1995. "Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*". Biochim. Biophys. Acta, 1260: 62-66 p.

De Kleijn, D. P. V. y Van Herp, F. 1995. "Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea". Comp. Biochem. Physiol. 112 (4): 573-579 p.

De Kleijn, D. P. V. y Van Herp, F. 1998. "Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans". Invert. Reprod. Develop. 33(2-3):263-272 p.

Ferraris, J. D., Fauchald, K y Kensley, B. 1994. "Physiological responses to fluctation in temperature or salinity in invertebrates". Mar. Biol. 120: 397-406.

Finferman, M. 1997. "Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis". Physiol. Zool. 70(3):257-69 p.

García U. y Aréchiga H. 1998. "Regulation of crustacean neurosecretory cell activity" Cell. Mol. Neurobiol. 18(1):81-99 p.

Grève, P., Sorokine, O., Berges, T., Lacombe, C., Van Dorsselaer, A. y Martin, G. 1999. "Isolation and amino acid sequence of a peptide with vitellogenesis inhibiting activity from the terrestial isopod *Armadillidium vulgare*". Gen. Comp. Endocrinol. 115: 406-414 p.

Gu, P. L. y Chan, S. M. 1998a. "Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*". Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 7(3):214-20 p

Gu, P. L y Chan, S. M. 1998b. "The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster". FEBS Lett., 441(3):397-403 p.

Gu, P. L., Yu, K. L, y Chan, S. M. 2000. "Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins". FEBS Lett. 472(1): 122-8 p.

Huberman, A., Aguilar, M. B.; Brew, K., Shabanowitz, J. y Hunt, D. F. 1993. "Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-

I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison". Peptides,14(1):7-16 p.

Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J. y Keller, R. 1989. "Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas"*. FEBS Lett. 255(1): 10-4 p.

Keller, R. 1992. "Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects". Experientia, 48(5):439-48 p.

Khayat, M., Yang, W., Aida, K., Nagasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B. y Lubzens, E. 1998. "Hyperglycaemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in in vitro-incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*". Gen Comp Endocrinol. 110(3): 307-18 p.

Klein, J. M., Mangerich. S., de Kleijn, D. P., Keller, R., y Weidemann, W.M. 1993. "Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor". FEBS Lett., 334(1):139-42 p.

Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M. y Lafont, R. 1993 "The molting gland of crustaceans: localization, activity and endocrine control". J Crust. Biol. 13(2): 198-234 p.

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

Liu, L., Laufer, H., Wang, Y. Y Hayes, T. 1997. "A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a crustacean".Biochem. Biophys. Res. Commun. 237(3): 694-701 p.

Lu, W., Wainwright, G., Webster, S. G., Rees, H. H. y Turner, P. C. 2000. "Clustering of mandibular organ-inhibiting hormone and moult-inhibiting hormone genes in the crab, *Cancer pagurus*, and implications for regulation of expression". Gene. 253(2): 197-207 p.

Meredith, J.; Ring, M., Macins, A; Marschall, J., Cheng, N.N. Theilmann, D.; Brock, H.W.y Phillips, J.E. 1996. "Locust Ion Transport Peptide (ITP): primary structure, cDNA and expression in a Bacilovirus system". J. Exp. Biol. 199: 1053-1061 p.

Ohira, T., Watanabe, T., Nagasawa, H. y Aida, K. 1998. "Molecular cloning of cDNAs encoding four crustacean hyperglycemic hormones and a molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*". Proceedings of the XIII International Congress of Comparative 83-86 p.

Santos, E. A., Nery, L. E., Keller, R. y Goncalves, A. A.1997. "Evidence for the involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism" Physiol. Zool., 70: 415-420 p.

Sefiani, M., Le Caer, J. P. y Soyez, D. 1996."Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei"*. Gen. Comp. Endocrinol., 103(1): 41-53 p.

Shambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed". Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Soyez, D., Le Caer, J. P., Noel, P. Y. y Rossier, J. 1991. "Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus"*. Neuropeptides. 20(1): 25-32 p.

Soyez, D., Van Herp, F., Rossier, J., Le Caer J.P., Tensen C.P.y Lafont, R. 1994. "Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. D-amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides". J Biol Chem. 269(28):18295-8 p.

Soyez, D. 1997. "Ocurrence and diversity of neuropeptides from the crustacean hyperglycemic hormone family in Arthropods (A short review)". Ann. NY Acad. Sci. 814: 319-323 p.

Spanings-Pierrot, C., Soyez, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. y Charmantier, P. 2000. "Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Phachygrapsus marmoratus*". Gen. Comp. Endocrinol., 119: 340-350 p.

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

Sun, P. S. 1995. "Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*". Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4(3):262-8 p.

Tensen,C. P., De Kleijn,D. P. y Van Herp, F. 1991 "Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*". Eur. J. Biochem., 200(1):103-6 p.

Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B. y Panyim, S. "Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure". 2000. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 244: 145-156 p.

Umphrey, H. R., Lee, K. J., Watson, R. D. y Spaziani, E. 1998. "Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab *Cancer magister*". Mol. Cell Endocrinol. 136(2):145-9.

Van Herp, F. 1992 "Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea". Invert. Reprod. Develop. 22(1-3): 21-30 p.

Van Herp, F. 1993. "Importance of reproductive biological knowledge for application of biotechnology in aquaculture: crustaceans as an example". J. Mar. Biotechnol. 1: 17-20 p.

Willian, A. B. y Lawrence, A. L. 1992. Reproduction of penaeus species in captivity. En: Ed. Fast, A. W. and Lester L. J. (ed). "Marine Shrimp Culture: Principles and Practices" Elsevier Science Plubisers B. V. Amsterdam. 93-170 p.

Yasuda, A.; Yasuda, Y.; Fujita, T. y Naya Y. 1994. "Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplycity of molecular forms by stereoinversion and diverse funtions". Gen. Comp. 95: 387-398.

Yang, W. J., Aida, K. y Nagasawa, H. 1997. "Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kumura prawn, *Penaeus japonicus*". Peptides. 18 (4): 479-485 p.

ANEXOS

A.1. Resultados del BLASTP para MIH de *P.vannamei*

NCBI **BLAST Search Results** BLAST Entrez ?

BLASTP 2.1.2 [Nov-13-2000]

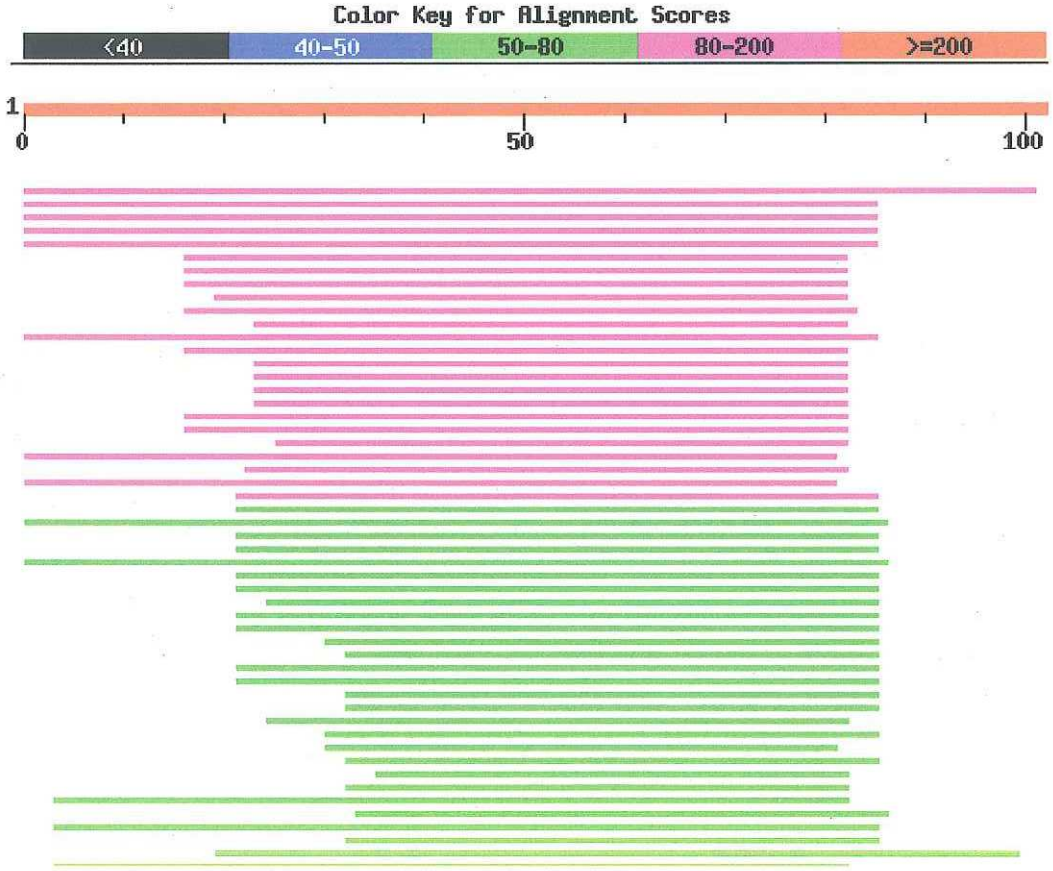
Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 982916573-18949-125

Database: nr
637,382 sequences; 201,036,963 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Distribution of 91 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:

	Score (bits)	E Value
gi|1709034|sp|P55322|MIH_PENVA MOLT-INHIBITING HORMONE LIKE...	163	7e-40
gi|2507588|sp|P19806|CHHA_HOMAM CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	95	2e-19
gi|1093946|prf||2105187B hyperglycemic hormone:ISOTYPE=B [H...	93	8e-19
gi|1078947|pir||S52118 hyperglycemic hormone CHH-B - Americ...	93	1e-18
gi|2497919|sp|Q25154|CHHB_HOMAM CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	92	2e-18
gi|12585202|sp|O97383|CHH1_PENMO CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC H...	91	3e-18
gi|5921748|sp|O15982|CHH7_PENJP CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	89	2e-17
gi|12585204|sp|O97386|CHH4_PENMO CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC H...	89	2e-17
gi|2497922|sp|Q94676|CHH3_PENJP CRUSTACEAN HYPOGLYCEMIC HOR...	88	3e-17
gi|5921746|sp|O15980|CHH1_PENJP CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	87	7e-17
gi|7453857|gb|AAF63028.1|AF247160_1 (AF247160) hyperglycemi...	86	8e-17
gi|12643389|sp|Q25683|CHH_PROCL CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	86	1e-16
gi|12585205|sp|O97387|CHH5_PENMO CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC H...	85	2e-16
gi|5565850|gb|AAD45233.1|AF109776_1 (AF109776) hyperglycemi...	84	3e-16
gi|4008138|gb|AAD11813.1| (AF109775) hyperglycemic hormone-...	84	3e-16
gi|5565852|gb|AAD45234.1|AF109777_1 (AF109777) hyperglycemi...	84	3e-16
gi|5921747|sp|O15981|CHH5_PENJP CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC 5 ...	84	5e-16
gi|12585208|sp|Q9U5D2|CHH2_PENJP CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC H...	84	6e-16
gi|12643320|sp|O97384|CHH2_PENMO CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC H...	83	7e-16
gi|12585203|sp|O97385|CHH3_PENMO CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC H...	83	1e-15
gi|2497921|sp|Q25588|CHH2_ORCLI CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	83	1e-15
gi|4138873|gb|AAD03606.1| (AF104930) hyperglycemic hormone ...	81	3e-15
gi|2497920|sp|Q25589|CHH1_ORCLI CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	81	5e-15
gi|11093825|gb|AAG29434.1|AF286083_1 (AF286083) CHH (PO-typ...	81	6e-15
gi|11093821|gb|AAG29432.1|AF286081_1 (AF286081) CHH (PO-typ...	79	1e-14
gi|11093843|gb|AAG29443.1|AF286092_1 (AF286092) CHH (PO-typ...	79	1e-14
gi|6851377|gb|AAF29534.1| (AF219382) crustacean hyperglycem...	79	1e-14
gi|11093827|gb|AAG29435.1|AF286084_1 (AF286084) CHH (PO-typ...	79	2e-14
gi|11093845|gb|AAG29444.1|AF286093_1 (AF286093) CHH (PO-typ...	79	2e-14
gi|5921750|sp|O77220|CHH_MACLE CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HOR...	79	2e-14
gi|6016591|sp|P56688|MOIH_LIBEM MANDIBULAR ORGAN-INHIBITING...	79	2e-14
gi|11093847|gb|AAG29445.1|AF286094_1 (AF286094) CHH (PO-typ...	79	2e-14
gi|11093831|gb|AAG29437.1|AF286086_1 (AF286086) CHH (PO-typ...	78	2e-14
gi|11093829|gb|AAG29436.1|AF286085_1 (AF286085) CHH (PO-typ...	78	3e-14
gi|299247|gb|AAB25534.1| crustacean hyperglycemic hormone i...	77	5e-14
gi|2497924|sp|P55845|CHH_PROBO CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HOR...	77	6e-14
gi|11093823|gb|AAG29433.1|AF286082_1 (AF286082) CHH (PO-typ...	77	7e-14
gi|116299|sp|P14944|CHH_CARMA CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORM...	76	1e-13
gi|930026|emb|CAA38611.1| (X54842) hyperglycemic hormone A ...	74	3e-13
gi|2851473|sp|Q10987|MIH_PROBO MOLT-INHIBITING HORMONE PREC...	74	4e-13
gi|7107418|gb|AAF36407.1|AF233295_1 (AF233295) neuropeptide...	74	4e-13
gi|228307|prf||1802398A crustacean hyperglycemic hormone [O...	74	4e-13
gi|102750|pir||A35897 molt-inhibiting peptide - American lo...	74	4e-13
gi|478578|pir||S17650 hyperglycemic hormone A - American lo...	74	5e-13
gi|4138875|gb|AAD03607.1| (AF104931) hyperglycemic hormone ...	74	6e-13
gi|8928016|sp|P81700|CHH6_PENJP CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	73	8e-13
gi|6016403|sp|Q26492|ITPL_SCHGR ION TRANSPORT PEPTIDE-LIKE ...	73	1e-12
gi|3954982|emb|CAA10269.1| (AJ130968) Crustacean Hyperglyce...	73	1e-12
gi|930071|emb|CAA38612.1| (X54843) hyperglycemic hormone B ...	73	1e-12
gi|6016404|sp|Q26491|ITP_SCHGR ION TRANSPORT PEPTIDE PRECUR...	73	2e-12
gi|478579|pir||S17651 hyperglycemic hormone B - American lo...	72	2e-12
gi|7291806|gb|AAF47226.1| (AE003464) CG13586 gene product [...	71	4e-12
gi|3121856|sp|P81206|CHH1_MACRS CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HO...	71	5e-12
gi|298269|gb|AAB25454.1| crustacean hyperglycemic hormone, ...	71	5e-12

gi|399248|sp|P30814|CHH_ARMVU CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORM...	70	6e-12
gi|11093817|gb|AAG29430.1|AF286079_1 (AF286079) CHH (XO-typ...	69	1e-11
gi|11093815|gb|AAG29429.1|AF286078_1 (AF286078) CHH (XO-typ...	69	1e-11
gi|4433634|gb|AAD20821.1| (AF107733) prepro ion transport-1...	69	1e-11
gi|11093819|gb|AAG29431.1|AF286080_1 (AF286080) CHH (XO-typ...	69	1e-11
gi|5921749|sp|P56687|CHH_JASLA CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HOR...	69	2e-11
gi|4433632|gb|AAD20820.1| (AF107732) prepro ion transport p...	68	2e-11
gi|7007410|dbj|BAA90831.1| (AB031074) BmCHHL [Bombyx mori]	67	6e-11
gi|7447228|pir||JC5628 mandibular organ inhibiting hormone ...	66	1e-10
gi|11093833|gb|AAG29438.1|AF286087_1 (AF286087) CHH (PO-typ...	64	5e-10
gi|2497923|sp|Q26181|CHH_PENVA CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HOR...	63	1e-09
gi|84641|pir||S05665 hyperglycemic hormone - green crab	63	1e-09
gi|3287747|sp|P81032|CHH_CANPG CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HOR...	62	2e-09
gi|11093841|gb|AAG29442.1|AF286091_1 (AF286091) CHH (XO-typ...	61	5e-09
gi|11181634|gb|AAG32670.1|AF288680_1 (AF288680) CHH preproh...	56	1e-07
gi|286158|dbj|BAA03462.1| (D14610) molting inhibiting hormo...	55	3e-07
gi|11181637|gb|AAG32672.1|AF288681_2 (AF288681) CHH (XO-typ...	54	7e-07
gi|6166551|sp|P55847|MIH_PENJP MOLT-INHIBITING HORMONE PREC...	53	8e-07
gi|9931077|emb|CAC05346.1| (AJ276104) moult-inhibiting horm...	51	4e-06
gi|6016571|sp|O76534|MIH_METEN PROBABLE MOLT-INHIBITING HOR...	51	4e-06
gi|2497927|sp|Q27225|MIH_CARMA MOLT-INHIBITING HORMONE PREC...	51	6e-06
gi|6016570|sp|O61389|MIH_CANMG MOLT-INHIBITING HORMONE PREC...	50	8e-06
gi|2497926|sp|P55846|MIH_CANPG MOLT-INHIBITING HORMONE (MIH...	49	1e-05
gi|3776532|gb|AAC64785.1| (AF092945) molt-inhibiting hormon...	49	2e-05
gi|228090|prf||1716410A molt-inhibiting hormone [Carcinus m...	47	5e-05
gi|6453320|emb|CAB61425.1| (AJ245379) mandibular organ-inhi...	47	7e-05
gi|1699371|gb|AAB37491.1| Pej-SGP-IV=peptide with molt-inhi...	47	8e-05
gi|6453318|emb|CAB61424.1| (AJ245378) mandibular organ-inhi...	46	1e-04
gi|2497929|sp|P55848|MIH_PROCL MOLT-INHIBITING HORMONE (MIH...	46	1e-04
gi|3287873|sp|P81035|MOH2_CANPG MANDIBULAR ORGAN-INHIBITING...	45	2e-04
gi|264115|gb|AAB25068.1| ion-transport peptide, Scg-ITP=neu...	45	3e-04
gi|3287872|sp|P81034|MOH1_CANPG MANDIBULAR ORGAN-INHIBITING...	45	3e-04
gi|1709033|sp|P55321|MIH_CALSI MOLT-INHIBITING HORMONE PREC...	44	4e-04
gi|84628|pir||A60216 hyperglycemic hormone homolog - Americ...	44	5e-04
gi|345419|pir||A45586 vitellogenesis inhibiting hormone, Ho...	43	0.001
gi|1707905|sp|P55320|GIH_HOMAM GONAD-INHIBITING HORMONE PRE...	42	0.003
gi|6136717|sp|Q23247|YH82_CAEEL HYPOTHETICAL 12.4 KD PROTEI...	32	2.6

A.2. Resultados del BLASTN para los cebadores de *mih*

NCBI **BLAST Search Results** BLAST Entrez ?

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_form.maphttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_form.map

BLASTN 2.1.2 [Nov-13-2000]

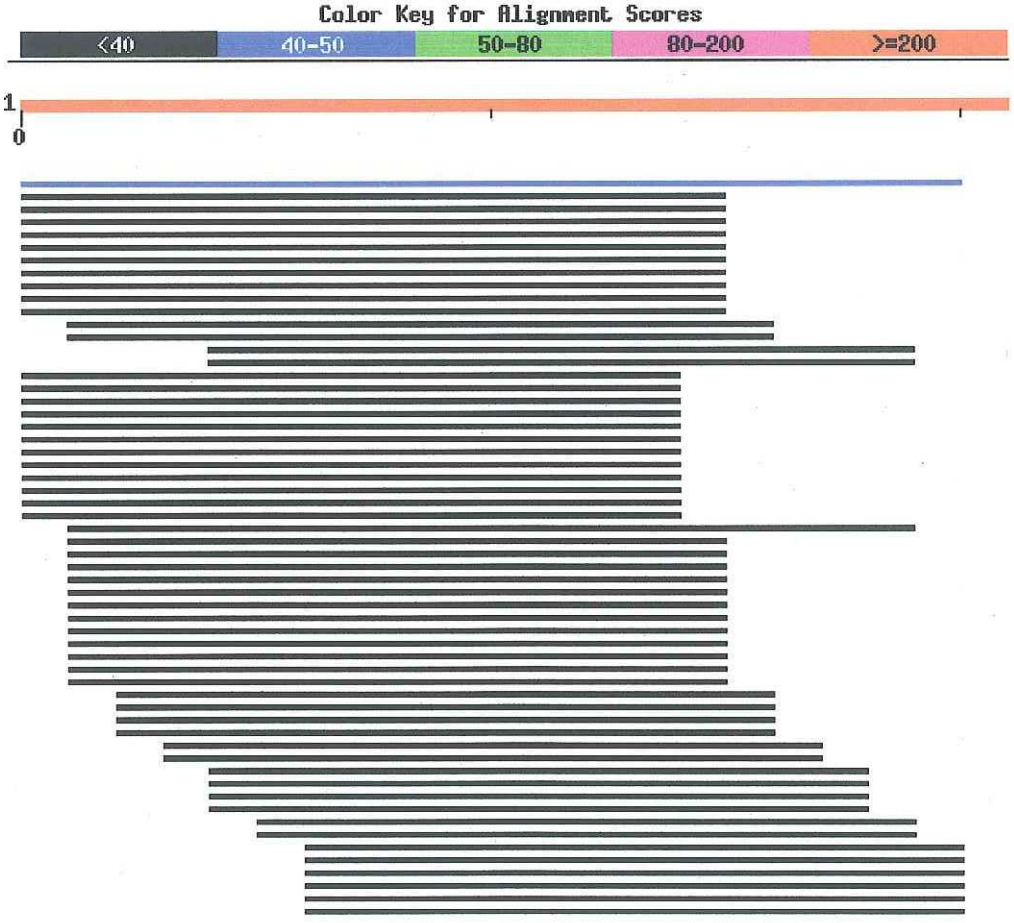
Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 982916709-19891-31115

Database: nt
804,486 sequences; 2,815,731,498 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the BLAST FAQs

Distribution of 86 Blast Hits on the Query Sequence

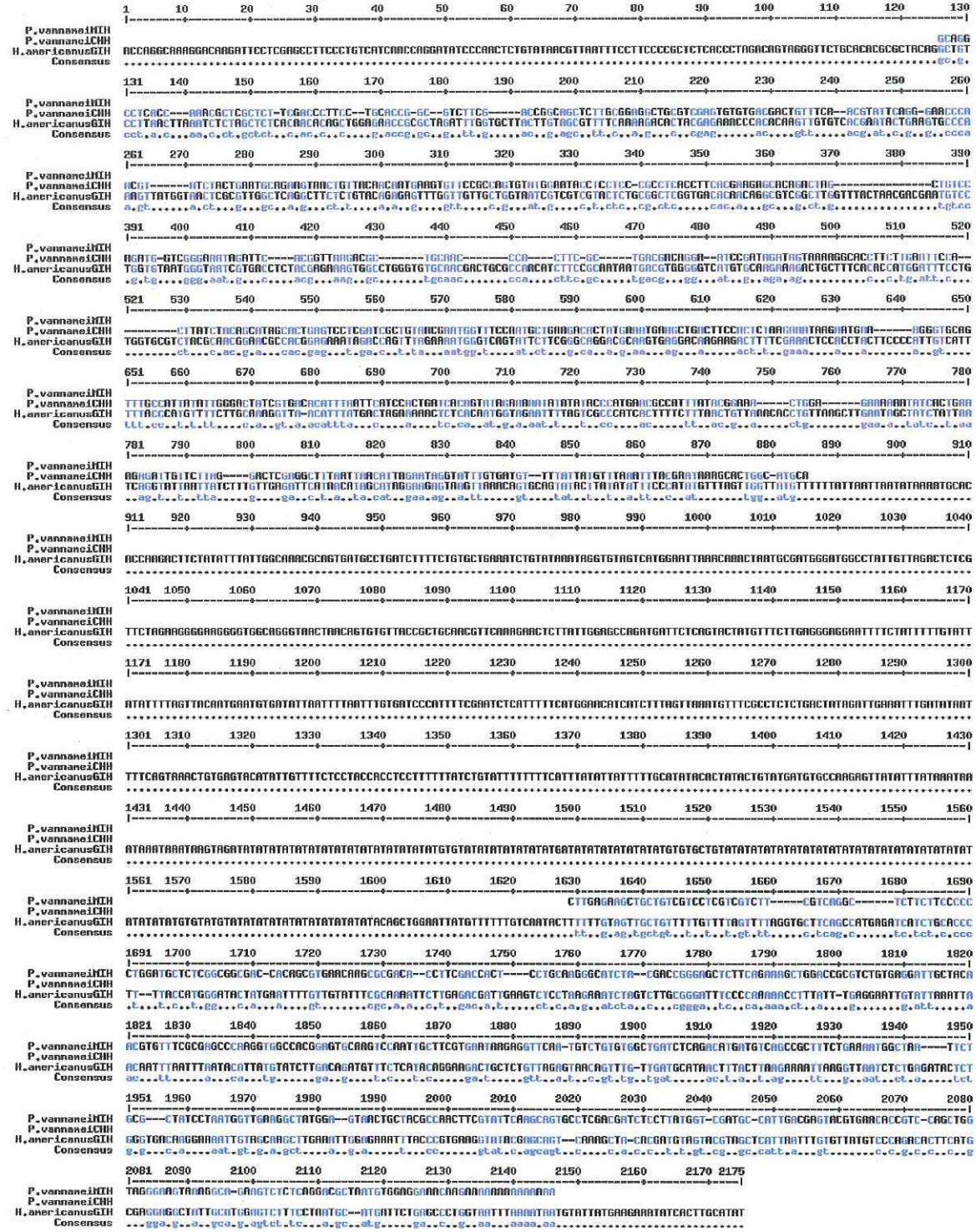


Sequences producing significant alignments:

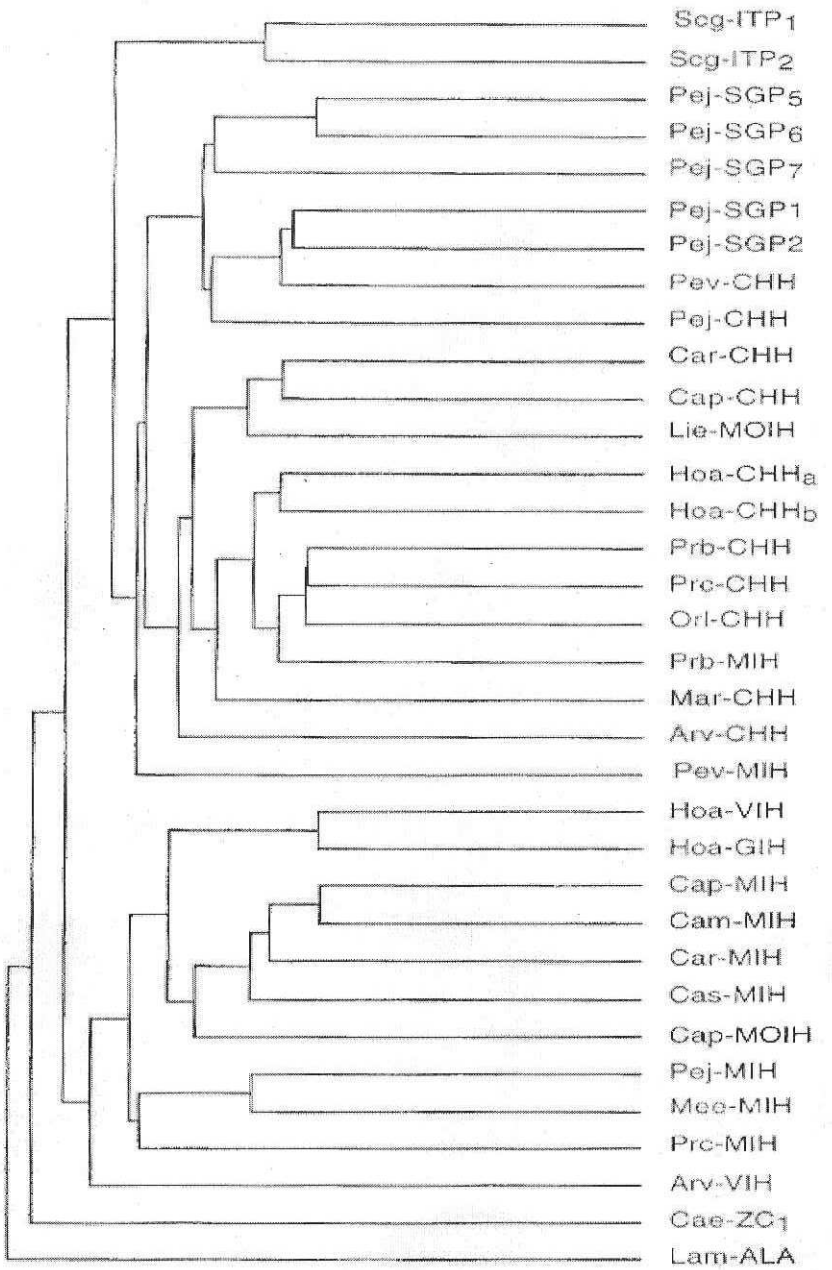
	Score (bits)	E Value
gi|687991|gb|S73824.1|S73824 MIH-like neuropeptide/molt-inh...	42	0.002
gi|11181790|gb|AC068906.12|AC068906 Mus musculus chromosome...	32	2.3
gi|12736184|ref|XM 006497.2| Homo sapiens ras inhibitor (RI...	32	2.3
gi|11119488|gb|AC034109.22|AC034109 Mus musculus chromosome...	32	2.3
gi|11119485|gb|AC034108.24|AC034108 Mus musculus chromosome...	32	2.3
gi|6755601|ref|NM 011439.1| Mus musculus SRY-box containing...	32	2.3
gi|10799420|gb|AC058787.20|AC058787 Mus musculus chromosome...	32	2.3
gi|7291893|gb|AE003466.1|AE003466 Drosophila melanogaster g...	32	2.3
gi|3687201|gb|AC004805.1|AC004805 Homo sapiens Xp22 bins 16...	32	2.3
gi|6478137|emb|AL109984.14|HSJ831D17 Human DNA sequence fro...	32	2.3
gi|3819398|emb|AJ234615.1|HVU234615 Hordeum vulgare genomic...	32	2.3
gi|2578092|emb|AL008633.1|HS345B16 Human DNA sequence from ...	32	2.3
gi|1292885|emb|X59601.1|RNPLECT Rat mRNA for plectin	32	2.3
gi|2764543|emb|AJ000740.1|MMAJ740 Mus Musculus mRNA for HMG...	32	2.3
gi|3077735|dbj|AB006329.1|AB006329 Mus musculus mSox13 mRNA...	32	2.3
gi|12742309|ref|XM 009518.2| Homo sapiens WNT1 inducible si...	30	8.9
gi|12737843|ref|XM 007027.2| Homo sapiens uracil-DNA glycos...	30	8.9
gi|4507922|ref|NM 003881.1| Homo sapiens WNT1 inducible sig...	30	8.9
gi|191647|gb|M59866.1|MUSACTCA4 Mouse alpha-cardiac actin g...	30	8.9
gi|191644|gb|M26773.1|MUSACTCA1 Mouse alpha-cardiac actin g...	30	8.9
gi|11178100|gb|AC003059.15|AC003059 Mouse Chromosome 10 BAC...	30	8.9
gi|6224978|ref|NM 003362.1| Homo sapiens uracil-DNA glycosy...	30	8.9
gi|10800351|gb|AC084154.1|CELY22D7AR Caenorhabditis elegans...	30	8.9
gi|10728886|gb|AE003665.2|AE003665 Drosophila melanogaster ...	30	8.9
gi|10728794|gb|AE003646.2|AE003646 Drosophila melanogaster ...	30	8.9
gi|10727575|gb|AE003818.2|AE003818 Drosophila melanogaster ...	30	8.9
gi|10726731|gb|AE003745.2|AE003745 Drosophila melanogaster ...	30	8.9
gi|7299815|gb|AE003702.1|AE003702 Drosophila melanogaster g...	30	8.9
gi|4753237|gb|AC006372.2|AC006372 Homo sapiens BAC clone RP...	30	8.9
gi|9628932|ref|NC 001731.1| Molluscum contagiosum virus sub...	30	8.9
gi|9625334|gb|AC026694.4|AC026694 Homo sapiens chromosome 5...	30	8.9
gi|8439781|gb|AC007637.9|AC007637 Homo sapiens 12q24 BAC RC...	30	8.9
gi|7287753|gb|AE003412.1|DROSADH06 Drosophila melanogaster,...	30	8.9
gi|4156135|gb|AC005058.1|AC005058 Homo sapiens BAC clone CT...	30	8.9
gi|5901714|gb|AF159914.1|AF159914 Euplotes crassus transpos...	30	8.9
gi|5901713|gb|AF159913.1|AF159913 Euplotes crassus transpos...	30	8.9
gi|5901711|gb|AF159912.1|EUCR1TEC2 Euplotes crassus transpo...	30	8.9
gi|4731053|gb|AC007452.1|AC007452 Drosophila melanogaster, ...	30	8.9
gi|3322916|gb|AE001237.1|AE001237 Treponema pallidum sectio...	30	8.9
gi|4038072|gb|AC006198.1|AC006198 Homo sapiens, clone hRPK....	30	8.9
gi|4028582|gb|AF100780.1|AF100780 Homo sapiens connective t...	30	8.9
gi|3462835|gb|AF083500.1|AF083500 Homo sapiens connective t...	30	8.9
gi|1491943|gb|U60315.1|MCU60315 Molluscum contagiosum virus...	30	8.9
gi|2760340|gb|U60590.1|CFU60590 Canis familiaris TTX-resist...	30	8.9
gi|3328191|gb|AF074604.1|AF074604 Homo sapiens connective t...	30	8.9
gi|3168609|gb|AC004364.1|AC004364 Drosophila melanogaster D...	30	8.9
gi|11611020|emb|AL357992.14|AL357992 Human DNA sequence fro...	30	8.9
gi|459581|emb|Z30662.1|CET16H12 Caenorhabditis elegans cosm...	30	8.9
gi|11121193|emb|AL109810.13|HS1097F14 Human DNA sequence fr...	30	8.9
gi|1263454|emb|Z70780.1|CEF46B6 Caenorhabditis elegans cosm...	30	8.9
gi|2459994|gb|AF012244.1|AF012244 Mus musculus cerberus-lik...	30	8.9
gi|9369125|emb|AL355537.11|AL355537 Human DNA sequence from...	30	8.9
gi|8217575|emb|AL139352.16|AL139352 Human DNA sequence from...	30	8.9
gi|6522989|emb|AL079338.15|HSJ841K13 Human DNA sequence fro...	30	8.9

gi|8246884|emb|AL138775.6|AL138775	Human DNA sequence from ...	30	8.9
gi|9367464|emb|AL389899.1|NCB7J19	Neurospora crassa DNA lin...	30	8.9
gi|2105313|gb|U86939.1|MCU86939	Molluscum contagiosum virus...	30	8.9
gi|5002625|emb|AL022329.9|HS407F11	Human DNA sequence from ...	30	8.9
gi|5263010|emb|AL022328.21|HS402G11	Human DNA sequence from...	30	8.9
gi|7801052|emb|AL355933.1|NCB8B20	Neurospora crassa DNA lin...	30	8.9
gi|6808253|emb|AL137725.1|HSM802268	Homo sapiens mRNA; cDNA...	30	8.9
gi|1717739|gb|AD000020.1|MSGY348	Mycobacterium tuberculosis...	30	8.9
gi|4835272|emb|Z97635.10|HS438L4	Human DNA sequence from cl...	30	8.9
gi|64906|emb|X16106.1|XLMYODMR	Xenopus laevis myoD gene for...	30	8.9
gi|296213|emb|Z22557.1|TCCP69GNA	T.congolense P69 antigen gene	30	8.9
gi|44604|emb|X65618.1|MTISDNA	M.tuberculosis insertion elem...	30	8.9
gi|3261714|emb|Z92539.1|MTCY10G2	Mycobacterium tuberculosis...	30	8.9
gi|3261774|emb|Z95584.1|MTCI65	Mycobacterium tuberculosis H...	30	8.9
gi|44557|emb|X69463.1|MT34KAA	M.tuberculosis gene for 34K p...	30	8.9
gi|11994984|dbj|AP003009.1|AP003009	Mesorhizobium loti DNA,...	30	8.9
gi|1296802|emb|X89398.1|HSUNGGENE	H.sapiens ung gene for ur...	30	8.9
gi|37598|emb|X15653.1|HSUNG	Human cDNA for uracil-DNA glyco...	30	8.9
gi|10434622|dbj|AK022941.1|AK022941	Homo sapiens cDNA FLJ12...	30	8.9
gi|7768674|dbj|AP001699.1|AP001699	Homo sapiens genomic DNA...	30	8.9
gi|7768671|dbj|AP001691.1|AP001691	Homo sapiens genomic DNA...	30	8.9
gi|7670559|dbj|AP001605.1|AP001605	Homo sapiens genomic DNA...	30	8.9
gi|214587|gb|M31116.1|XELMF1	X.laevis MyoD1 homologue (mf1)...	30	8.9
gi|6580081|dbj|AP000402.2|AP000402	Homo sapiens genomic DNA...	30	8.9
gi|1850820|emb|Y09008.1|HS09008	H.sapiens mRNA for uracil-D...	30	8.9
gi|1504081|emb|Y07567.1|DMTF125II	D.melanogaster mRNA for T...	30	8.9
gi|1370075|emb|X98235.1|DMTF125	D.melanogaster mRNA for TF1...	30	8.9
gi|349837|gb|L23420.1|TRBGRP78	Trypanosoma cruzi endoplasmi...	30	8.9
gi|304808|gb|L12446.1|DROSHPSHP	Drosophila melanogaster SH3...	30	8.9
gi|290276|gb|L13173.1|DROSEQE	Drosophila melanogaster mRNA ...	30	8.9
gi|974781|emb|Z49150.1|CBKPMETGN	C.blumei kinetoplast met g...	30	8.9
gi|2943799|dbj|AB011403.1|AB011403	Rice black streaked dwar...	30	8.9

A.3 Alineamiento de la secuencias nucleótidicas de *mih* y *chh* de *P .vanamei* y *gih* de *H. americanus.*



A.4. Dendograma realizado por Lacombe et al., 1999, utilizando el programa PileUp con 30 secuencias de la familia peptídica CHH/MIH/GIH, 2 del insecto *Schistocerca gregaria*, otra del nematodo *Caenorhabditis elegans* y la de la araña *Latrodectus mactans*.



A.5. Permiso del autor para el uso de la figura 2 en la tesis.

Date: Thu, 15 Mar 2001 14:35:03 +0100
From: Francois van Herp <franco@sci.kun.nl>
To: malago@cicese.mx
Subject: request

>Dear Colleague,

You can use the figure without problems. I wish you all the best with the preparation of your thesis.

Yours sincerely,

F.van Herp

>From malago@cicese.mx Tue Mar 13 12:52:15 2001
>Return-Path: <malago@cicese.mx>
>Date: Tue, 13 Mar 2001 03:52:08 -0800 (PST)
>From: Ma Asuncion Lago Leston <malago@cicese.mx>
>To: franco@sci.kun.nl
>Subject: request
>
>
>
>Dear Dr Van Herp:
>My name is Asuncion Lago and I am a M.Sc. student at Cicese (Ensenada,
>Mexico). My project deals with gene expression of mih and chh in Peneaeus
>vannamei in different conditions of temperature and salinity. I am now
>writing my Thesis and, in its introduction, I'd like to include the
>figure 3 from your paper "Importance of reproductive biological knowledge
>for application of biotechnology in aquaculture: Crustaceans as an
>example" in J. Mar. Biotechnol.(1993) 1: 17-20, depicting a scheme of the
>anatomy of an eyestalk.
>I'd greatly appreciate if you gave me permission to include it in my
>Thesis. I'd like to use it to show the location and structure of the
>complex Organ X-Sinus gland. It is the clearest picture I have found so
>far and I think it is a super introduction for the system.
>Thank you very much in advance and sorry for the inconveniences.
>Sincerely
>
>Asuncion Lago Leston
>Dpt. of Marine Biotechnology
>CICESE
>Mexico
>e-mail: malago@cicese.mx
>