

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



---

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

---

**Expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos  
recombinante (rCHH-A) de *Litopenaeus vannamei* y su efecto  
en la modulación de los niveles de glucosa**

Tesis

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

Presenta:

**Roberto Carlos Arredondo Espinoza**

Ensenada, Baja California, México  
2014

Tesis defendida por

**Roberto Carlos Arredondo Espinoza**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
Director del Comité

---

Dra. Edna Sánchez Castrejón  
Miembro del Comité

---

Dra. María Enriqueta Muñoz Márquez  
Miembro del Comité

---

Dr. Jaime Farber Lorda  
Miembro del Comité

---

Dra. Rufina Hernández  
Coordinador del Posgrado en  
ciencias de la vida

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de Estudios de Posgrado

*Octubre, 2014*

Resumen de la tesis que presenta **Roberto Carlos Arredondo Espinoza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación a Biotecnología Marina.

## **Expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante (rCHH-A) de *Litopenaeus vannamei* y su efecto en la modulación de los niveles de glucosa**

Resumen elaborado por:

---

Roberto Carlos Arredondo Espinoza

La respuesta fisiológica de los crustáceos está regulada en gran medida por un conjunto neurohormonas de origen peptídico. La hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), el miembro más abundante de la familia peptídica CHH/MIH/GIH/MOIH, es producida en el pedúnculo ocular. De las tres isoformas de CHH que se han clonado de *Litopenaeus vannamei*, CHH-A resulta de gran interés ya que tiene el extremo C-terminal amidado, lo que pudiera ser importante para su actividad hiperglucémica. Este trabajo pretende llevar a cabo la clonación, expresión y purificación de la neurohormona CHH-A, utilizando los sistemas de expresión: *E. coli* BL21 DE3 y *Pichia pastoris* SMD1168H, con la finalidad de comparar los niveles de expresión de CHH-A entre los sistemas y evaluar su efecto en la regulación de los niveles de glucosa en *L. vannamei*. Para la clonación y mejor expresión de CHH-A, la secuencia del gen *chhA* fue optimizada con codones preferenciales para *E. coli* (plásmido CHHA-pUC57), amplificada por PCR y digerida con las mismas enzimas de restricción que el plásmido pET44a(+). Los productos fueron ligados y transformados a células de *E. coli* TOP10 y la construcción fue analizada por PCR y secuenciación.

Asimismo, se montaron las condiciones para optimizar la expresión de CHH-A con un C-terminal adicional (*c-myc*, His-tag) en *P. pastoris* bajo el control de promotor inducible por metanol. Se probaron diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) y concentraciones de metanol (1, 2 y 4%), encontrándose una mayor expresión con 2% de metanol a las 24 h de cultivo en medio complejo de nutrientes. rCHH-A<sub>His</sub> fue purificada por cromatografía de afinidad, analizada por geles de Tricina-SDS-PAGE y su identidad corroborada utilizando anticuerpos contra el epítipo *c-myc*. La hormona fue expresada, purificada y cuantificada a partir de un mayor volumen (100 ml), obteniéndose un rendimiento de 1.89 mg/L. Para determinar el efecto de rCHH-A<sub>His</sub> en los niveles de glucosa de la hemolinfa del camarón, se inyectó la neurohormona a organismos juveniles a los cuales se les ablacionó un pedúnculo ocular, así como PBS y extracto de glándulas de dos pedúnculos oculares. Una hora post-inyección se tomó muestra de hemolinfa y la concentración de glucosa fue analizada. Los resultados mostraron que rCHH-A<sub>His</sub> tuvo efecto en la modulación de los niveles de glucosa.

Palabras clave: **CHH-A, neurohormona recombinante, *Litopenaeus vannamei*.**

Abstract of the thesis presented by **Roberto Carlos Arredondo Espinoza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science with orientation in Marine Biotechnology.

**Expression of recombinant crustacean hyperglycemic hormone (rCHH-A) of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and it's role in the modulation of glucose levels.**

Abstract by:

---

Roberto Carlos Arredondo Espinoza

Most of the crustaceans physiology is regulated by a set of peptide neurohormones. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH), the most abundant member of the peptide family CHH/MIH/GIH/MOIH, is produced in the eyestalk. From the three isoforms that have been already cloned in *Litopenaeus vannamei*, CHH-A is very interesting because it has the amidated C-terminal, which could be important for its hyperglycemic activity. This work intended to perform the cloning, expression and purification of the neurohormone CHH-A, using the expression systems: *E. coli* BL21 DE3 and *Pichia pastoris* SMD1168H, in order to compare the expression levels of CHH-A between the expression systems and its effect on the regulation of glucose levels in *L. vannamei*. For cloning and better expression of CHH-A, the *chhA* gene sequence was optimized with the preferential codons for *E. coli* (plasmid CHHA-pUC57), amplified by PCR, digested with the same restriction enzymes as the plasmid pET44a (+). The products were ligated and transformed into *E. coli* TOP10 cells and the construction was analyzed by PCR and sequencing.

Furthermore, the conditions to optimize expression of CHH-A with an additional C-terminal (*c-myc*, 6xHis) were set in *P. pastoris* under the control of a methanol-inducible promoter. Different times (24, 48 and 72 h) and methanol concentration (1, 2 and 4%) were tested. Results showed an increased expression of rCHH-A<sub>His</sub> with 2% methanol for 24 hours of culture using complex medium. rCHH-A<sub>His</sub> was purified by affinity chromatography, analyzed by Tricine-SDS-PAGE gel and its identity was confirmed using antibodies against the *c-myc* epitope. The hormone was expressed, purified and quantified from a larger volume (100 ml) to give a yield of 1.89 mg / L. To determine the effect of rCHH-A<sub>His</sub> on the glucose levels of the shrimp hemolymph, the neurohormone was injected to juvenile organisms unilaterally ablated as well as PBS and crude extract from two eyestalks. One hour post-injection a hemolymph sample was taken and glucose concentration determined. The results showed hyperglycemic activity of rCHH-A<sub>His</sub> in the modulation of glucose levels.

Keywords: **CHH-A, recombinant neurohormone, *Litopenaeus vannamei*.**

## Dedicatoria

*A Dios, a mis padres y familiares que siempre me han apoyado durante mis estudios.*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que a través de su Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), me otorgó una beca para la realización de mis estudios de maestría.

Nuevamente al CONACyT por el apoyo económico para la realización de la parte experimental a través del proyecto de ciencia básica a cargo de la Dra. Elizabeth Ponce Rivas.

A todo el personal académico de Ciencias de la Vida, quienes han proporcionado sus conocimientos generación tras generación.

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas por recibirme como su estudiante y por instruirme mediante buenos consejos pero especialmente por tenerme paciencia.

A la Dra. Edna Sánchez por su gran apoyo en el laboratorio y durante el escrito de este trabajo.

A los miembros de mi comité compuesto por la Dra. Enriqueta, el Dr. Jaime, la Dra. Elizabeth y la Dra. Edna, por sus comentarios y sugerencias que fueron de gran ayuda.

Al técnico Ernesto Lerma por su apoyo en la construcción de los sistemas para el mantenimiento de los camarones.

A mis compañeros de laboratorio M. C. Ernesto, M. C. Laura L., Dr. Ignacio y a mis compañeros de generación, quienes me brindaron su amistad y su apoyo.

A mis compañeras y más cercanas amigas Laura Camacho y Yesenia Balderas con quienes compartí experiencias tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis Padres Mario y Ma. Dolores que siempre me han apoyado en mis estudios.

A Claudia Tapia por su apoyo moral e incondicional que fue muy importante al final de este periodo de tiempo en el posgrado.

# Tabla de contenido

	<i><b>Página</b></i>
<b>Resumen español</b> .....	i
<b>Resumen inglés</b> .....	ii
<b>Dedicatorias</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Lista de Figuras</b> .....	vii
<b>1. Introducción</b> .....	2
<b>2. Antecedentes</b> .....	4
2.1 Sistema neuroendocrino de crustáceos.....	4
2.2 Neurohormonas producidas por el OX-GS.....	5
2.2.1 Hormonas Hiperglucémicas de Crustáceos (CHH).....	5
2.3 Sistemas de expresión.....	7
2.4 Neurohormonas hiperglucémicas de crustáceos en <i>L. vannamei</i> .....	9
<b>3. Justificación</b> .....	14
<b>4. Objetivos</b> .....	15
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	16
5.1 Clonación de CHH-A en el vector pET44a(+).....	16
5.1.1 Obtención y digestión del plásmido pET44a(+).....	17
5.1.2 Obtención y digestión del fragmento optimizado <i>chhA</i> .....	18
<b>5.2 Optimización de la expresión de CHH-A en <i>P. pastoris</i></b> .....	21
5.2.1 Optimización de las condiciones de expresión de CHH-A <sub>His</sub> .....	22
5.2.1.1 Inducción con medio complejo (BMMY).....	23
5.2.1.2 Inducción con medio mínimo (BMM).....	23

## Tabla de contenido (continuación)

5.2.1.3 Análisis geles de Tricina-SDS-PAGE.....	24
5.2.1.4 Inmunodetección de proteínas recombinantes (Western Blot) .....	24
5.2.2 Expresión de CHH-A <sub>His</sub> en un mayor volumen.....	25
5.2.3 Purificación de CHH-A <sub>His</sub> mediante cromatografía de afinidad .....	25
5.3 Ensayo de actividad biológica de la neurohormona recombinante CHH-A <sub>His</sub> .....	26
<b>6. Resultados y Discusión .....</b>	<b>28</b>
6.1 Clonación de CHH-A en el vector pET44a(+) .....	28
6.1.1 Obtención y digestión del plásmido pET44a(+) .....	29
6.1.2 Obtención del fragmento optimizado <i>chhA</i> .....	31
6.1.3 Ligación del vector pET44a(+) con el fragmento <i>chhA</i> .....	35
6.2 Optimización de la expresión de CHH-A en <i>P. pastoris</i> .....	37
6.2.1. Inducción con medio complejo (BMMY) y medio mínimo (BMM).....	37
6.2.2 Purificación y cuantificación de rCHH-A <sub>His</sub> .....	41
6.3 Ensayo de actividad biológica de la neurohormona recombinante CHH-A <sub>His</sub> .....	44
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>47</b>
<b>8. Perspectivas .....</b>	<b>48</b>
<b>Lista de referencias.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>54</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema del pedúnculo ocular de un crustáceo.....	5
2	Esquema de hidrólisis de glucógeno vía CHH.....	6
3	Sistema de expresión pET44a(+) y BL21 DE3.....	9
4	Secuencia teórica de aminoácidos de CHH-A.....	11
5	Esquema del vector de expresión pET44a(+). .....	17
6	Esquema del vector de expresión pPICZ $\alpha$ A.....	22
7	Estrategias de clonación en el vector pET44a(+). .....	28
8	Evaluación de extracción del plásmido pET44a(+). .....	29
9	Digestión de prueba de pET44a(+) con <i>EcoRI</i> y <i>PshAI</i> . .....	30
10	Doble digestión de pET44a(+). .....	31
11	Comparación de la secuencia de <i>chhA</i> y <i>chhA</i> optimizada...	32
12	Evaluación de xtracción del plásmido CHHA-pUC57.....	32
13	Obtención de <i>chhA</i> mediante digestión de CHHA-pUC57 con <i>EcoRI</i> y <i>PshAI</i> . .....	33
14	Gradiente de amplificación de <i>chhA</i> . .....	34
15	Evaluación de amplificación de <i>chhA</i> . .....	35
16	Análisis de colonias transformadas.....	36
17	Síntesis de CHH-A <sub>His</sub> en medio complejo de nutrientes.....	38
18	Síntesis de CHH-A <sub>His</sub> en medio mínimo de nutrientes.....	39
19	Análisis de condiciones de expresión de CHH-A <sub>His</sub> mediante Western Blot. ....	40
20	Análisis de purificación de CHH-A <sub>His</sub> mediante Western Blot	42
21	Curva estándar de albúmina de suero bovino.....	43
22	Análisis de actividad hiperglucémica de CHH-A <sub>His</sub> . .....	45

# 1. Introducción

---

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es una especie nativa de las costas del Pacífico desde México hasta América del Sur. Debido al agotamiento de sus poblaciones silvestres ha sido ampliamente cultivada en sistemas extensivos, intensivos y semi-intensivos (Frías-Espéricueta *et al*, 1999). *L. vannamei* es un organismo eurihalino con alto rango de tolerancia a la salinidad (0.5-45 ‰) y temperatura ( $\approx$  15-30°C). Asimismo ha mostrado ser una especie con alta resistencia a algunas enfermedades. Tales características hacen que este organismo sea modelo para su cultivo (Davis *et al*, 2004).

En este sentido, el estudio de los procesos fisiológicos y endocrinos de los mecanismos que controlan el crecimiento, maduración, reproducción y respuesta al estrés, se han vuelto cada vez más importantes debido a que estos organismos se encuentran sometidos a constantes episodios de estrés, tales como cambios de salinidad, temperatura y oxígeno disponible (Huberman, 2000). Tales procesos son regulados a partir de un sistema endocrino, el cual se compone de estructuras clásicas derivadas de tejido epitelial o de origen nervioso. El estudio de dichas estructuras se ha visto favorecido por el uso de técnicas de endocrinología clásica, con el apoyo de técnicas ofrecidas por la bioquímica y biología molecular para la identificación de tejidos endocrinos, genes, y neurotransmisores (Fingerman, 1997).

El Órgano X-Glándula del Seno (OX-GS) es el principal centro neuroendocrino en crustáceos y es ahí donde se producen una gran cantidad de neurohormonas de naturaleza peptídica, siendo la Hormona Hiperglucémica de Crustáceos (CHH) la más abundante. En *L. vannamei* existen tres isoformas diferentes de CHHs, dos de ellas producidas por corte y empalme alternativo (CHH-B1 y B2) y la tercera, CHH-A, que se produce a partir de un gen diferente. Esta hormona resulta de gran interés ya que tiene una secuencia en el extremo C-terminal que sugiere que esta forma está amidada, lo que pudiera ser importante para su actividad hiperglucémica.

El desarrollo de técnicas de biología molecular ha dado un fuerte impulso al conocimiento sobre neurohormonas que participan en regulaciones endocrinas en crustáceos, ya que la cantidad de hormonas obtenidas a partir de tejidos es reducida. Actualmente se cuenta con diversos métodos para producir proteínas recombinantes implementando sistemas de expresión tanto procariotas como eucariotas para clonar y expresar neurohormonas recombinantes y llevar a cabo ensayos de actividad biológica.

En este sentido, el presente trabajo pretende llevar a cabo la clonación, expresión y purificación de la neurohormona CHH-A en dos sistemas de expresión: uno bacteriano (*Escherichia coli*) y el otro eucariota (*Pichia pastoris*), con la finalidad expresarla como proteína de fusión en estos sistemas, comparar los niveles de expresión y evaluar el efecto de la hormona recombinante producida en la modulación de los niveles de glucosa en camarones juveniles de *L. vannamei*.

## 2. Antecedentes

---

### 2.1 Sistema neuroendocrino de crustáceos

Los crustáceos, como todos los seres vivos, están expuestos a cambios en su ambiente. Sin embargo, al ser organismos reguladores, mantienen constantes las condiciones de su medio interno, dentro de unos límites estrechos, frente a la variación de las condiciones del medio externo. Esta habilidad es mediada por un conjunto de órganos denominado sistema neuroendocrino, el cual les permite adaptarse involucrando elementos que actúan a corto, mediano y largo plazo, y a responder a factores externos ajustando las funciones vitales que sean necesarias (Keller, 1994). Los órganos que componen este sistema en los crustáceos se clasifican en neurales como el Órgano X-Glándula del Seno (OX-GS), el Órgano Pericárdico y el Órgano Postcomisural, y de origen epitelial como lo son el Órgano Y, la Glándula Androgénica, el Órgano Mandibular y el Ovario (De Kleijn *et al*, 1995; Fingerman, 1997).

El centro de este sistema regulador es el OX-GS, el cual se encuentra en la *medulla terminalis* del pedúnculo ocular (Fig. 1) y es el encargado de producir una gran diversidad de neurohormonas (Fingerman, 1997). Esta interacción se lleva a cabo cuando las neurohormonas producidas en el soma de la célula nerviosa neurosecretora (OX) son transportadas mediante vesículas hasta sus terminales axónicas donde se alojan, formando así la glándula del seno (GS) y que en conjunto se conoce como el complejo OX-GS (De Kleijn *et al*, 1995; Hopkins 2012). La importancia del complejo OX-GS se debe a que presenta una gran diversidad de neuropéptidos responsables de llevar a cabo funciones endocrinas de gran importancia (García y Arechiga, 1998).

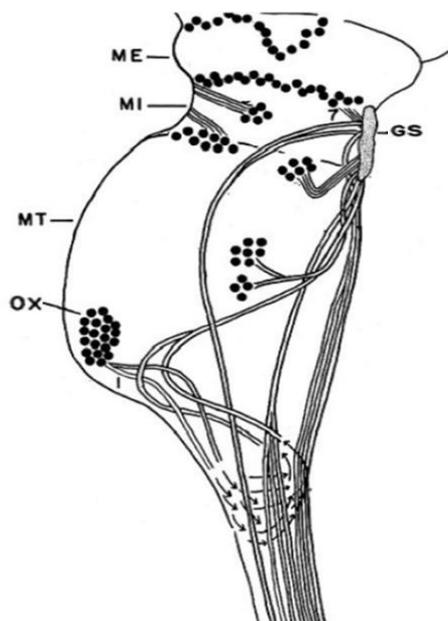


Figura 1: Esquema del pedúnculo ocular de crustáceos. *medulla terminalis* (MT), órgano X (OX), medula interna (MI), medula externa (ME), glándula del seno (GS). Modificado de Hopkins, 2012.

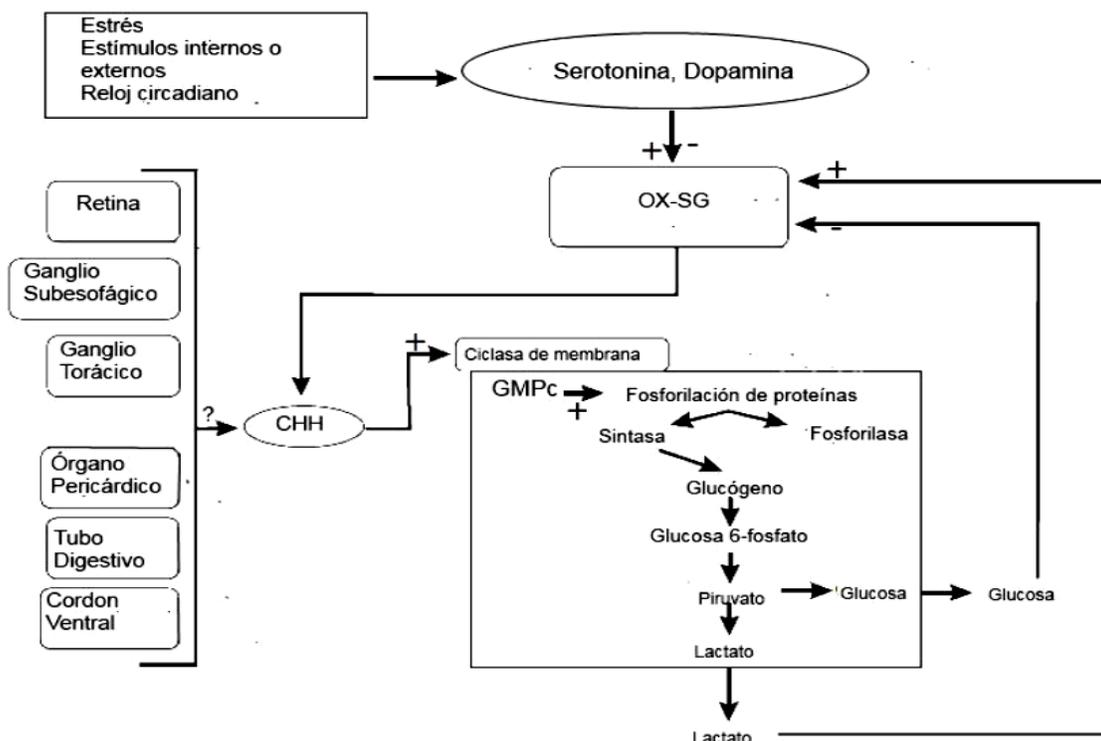
## 2.2 Neurohormonas producidas por el OX-GS

En crustáceos, muchos procesos fisiológicos son regulados por las neurohormonas de la GS (Aguilar *et al*, 1995). A la fecha se han identificado varias neurohormonas, como las Hormonas Hiperglucémicas de Crustáceos (CHH), la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH), la Hormona Inhibidora de Gónadas (GIH) y la Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular (MOIH), que en conjunto forman la familia peptídica CHH/MIH/GIH/MOIH (Fanjul-Moles, 2006). Esta familia se subdivide en la subfamilia CHH, también llamada subfamilia CHH I y la subfamilia MIH/GIH/MOIH o CHH II. Estas neurohormonas regulan varios procesos fisiológicos como el crecimiento, la maduración y la reproducción. Su secreción responde tanto a factores internos como el ciclo de muda, crecimiento y maduración y a factores externos como la temperatura y la salinidad (Serrano *et al*, 2004; Lago-Lestón *et al*, 2007).

### 2.2.1 Hormonas Hiperglucémicas de Crustáceos (CHH)

Se ha determinado que las CHH poseen principalmente la función de promover el aumento de los niveles de glucosa en hemolinfa, tal regulación es inducida por la

liberación de CHH a partir del OX-GS (Keller *et al*, 1994; Webster *et al*, 1996; Chang *et al*, 1998; Chen *et al*, 2005). La CHH es dirigida al tejidos blanco como el músculo y el hepatopáncreas, donde estimula ciclasas de membrana y posteriormente mediante un proceso de señalización celular se lleva a cabo la fosforilación e inhibición de enzimas que detiene la producción de glucógeno, promoviendo su hidrólisis (Fanjul-Moles, 2006) (Figura 2).



**Figura 2:** Hidrólisis de glucógeno para el aumento de glucosa en hemolinfa vía CHH. Tomado de Fanjul-Moles, 2006.

Por otra parte, se ha observado que algunas CHH's pueden ser pleiotrópicas, dado que además de tener actividad hiperglucémica, pueden tener otra actividad adicional, por ejemplo la inhibición de la muda, como sucede con la CHH de *Homarus americanus* (Chang *et al*, 1990) y participar en la regulación de otros procesos fisiológicos como la estimulación del metabolismo de lípidos (Santos *et al*, 1997), la osmoregulación (Charmantier-Daures *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 2003), la inhibición de la síntesis de

ecdisteroides en el órgano Y (Spaziani, 1989), inhibición de la síntesis de proteínas y vitelogénesis en ovarios (Fingerman, 2009) y del metil farnesoato en el órgano mandibular (Laufer *et al.*, 1987). Dado lo anterior, se sugiere que tiene otros órganos blanco debido a que, a nivel celular, se ha observado que eleva los niveles de nucleótidos cíclicos (segundos mensajeros en la amplificación de la señalización celular) como AMPc y GMPc en una gran variedad de tejidos (Böcking *et al.*, 2002; Chung y Webster, 2003; Treerattrakool *et al.*, 2006).

Las CHH's poseen modificaciones postraduccionales que potencializan su actividad como en el caso de la amidación. Estas proteínas adquieren otras características a partir de la incorporación del grupo amida, al cambiar la carga en el C-terminal de negativa a neutra, lo cual pudiera incrementar la afinidad por el receptor de CHH, o bien, permitir un mejor plegamiento de CHH (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008). Por otra parte, Chang y colaboradores (2010) observaron que las hormonas amidadas poseen más  $\alpha$ -hélices en su estructura a diferencia de las no amidadas, lo cual sugiere que la amidación del C-terminal permite cambios estructurales importantes para la función de CHH. La amidación de las hormonas en el C-terminal se ha relacionado con el incremento de la actividad hiperglucémica (Kim y Seong, 2001; Nagai *et al.*, 2009; Ohira *et al.*, 2003).

### **2.3 Sistemas de expresión**

En las últimas tres décadas, se ha utilizado como sistema de expresión a la bacteria *Escherichia coli*, sin embargo su empleo para producir proteínas de origen eucariota ha presentado inconvenientes, en algunos casos, dado que no cuenta con la maquinaria intracelular para llevar a cabo modificaciones postraduccionales, lo cual repercute directamente en la obtención de una proteína recombinante viable en función de su estructura primaria, secundaria, terciaria y características funcionales. Esto limita los tipos de proteínas que este sistema pudiera expresar. Por otra parte, el empleo de sistemas de expresión eucariota como el de la levadura *Pichia pastoris*, ha permitido la producción de proteínas recombinantes más complejas, debido a que tiene la capacidad para llevar a cabo el plegamiento de las proteínas recombinantes y modificaciones postraduccionales. Por otro lado, con el uso de vectores de expresión

con la señal de secreción unida a la proteína recombinante, permite que su purificación sea más sencilla, dado que la cantidad de proteínas secretadas naturalmente por *P. pastoris* al medio de cultivo es baja (Daly y Hearn, 2005).

Los avances en ingeniería genética han permitido el desarrollo de técnicas y nuevos sistemas de expresión procariontes para contender con estos problemas asociados a los sistemas bacterianos como *E. coli* que no realizan modificaciones postraduccionales, producen proteínas como cuerpos de inclusión y las proteínas producidas presentan baja solubilidad. Un ejemplo de estos sistemas son los vectores de expresión pET que trabajan en conjunto con la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Fig. 3). En este sistema de expresión, la ARN polimerasa T7 localizada en el genoma de la bacteria, la cual es la encargada de la transcripción de la proteína recombinante en el vector pET. La transcripción de la ARN polimerasa T7 en esta cepa, se encuentra regulada por el operador *lac*, lo que indica que la expresión es mediada por el inductor Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Las proteínas recombinantes producidas utilizando *E. coli* BL21 (DE3) y vectores tipo pET, están unidas a etiquetas que le confieren solubilidad (Nus-tag), y que le permiten una purificación mediante cromatografía de afinidad (His-tag).

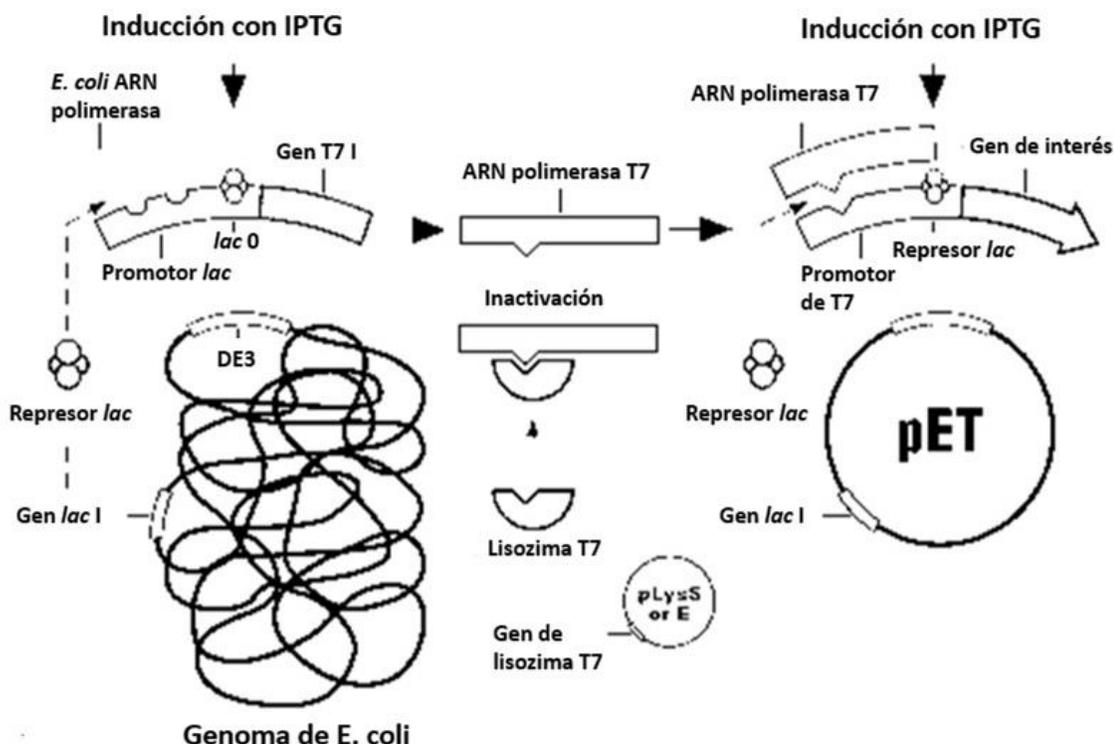


Figura 3: Sistema de expresión con la cepa de *E. coli* BL21 DE3 con plásmidos tipo pET. Ambos inducidos por IPTG (modificado de <http://bbs.biogo.net/simple/?t164376.html>).

A la fecha, tanto sistemas procariontes como eucariotes, se han utilizado para la producción de diferentes neurohormonas en crustáceos, tales como, *Gecarcinus lateralis* (Lee *et al*, 2007), *Cancer pagurus* (Chung *et al*, 1998; Webster *et al*, 1996), *Procambarus bouvieri* (Huberman *et al*, 1993; Aguilar *et al*, 1995), *Homarus americanus* (De Kleijn *et al*, 1995; Chang *et al*, 1990) *Macrobrachium rosenbergii* (Chen *et al*, 2004), *Sillia olivacea* (Chang *et al*, 2010) y *L. vannamei* (Lago-Lestón *et al*, 2007; Sánchez-Castrejón *et al*, 2008) entre otros.

## 2.4 Neurohormonas hiperglucémicas de crustáceos en *L. vannamei*

En el caso particular de *L. vannamei* se han encontrado dos genes que codifican para tres neurohormonas. Las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 son producidas por el corte y empalme alternativo del gen *chhB*, mientras que el gen *chhA* da lugar a la tercera neurohormona nombrada como CHH-A. El transcrito de la isoforma para la neurohormona CHH-B1 se compone de 4 exones y 3 intrones, dando lugar a un péptido

maduro de 73 aminoácidos, mientras que el transcrito de la isoforma CHH-B2 presenta 3 exones y 2 intrones, da lugar a un péptido maduro de 74 aminoácidos. Por otro lado, la secuencia parcial del gen *chhA*, muestra la presencia de 2 exones y un pequeño intrón. Sin embargo, con base a la estructura de otras CHH's se sugiere la existencia de un exón adicional en el extremo 5', lo que indicaría que *chhA* posee los 3 exones y 2 intrones característicos de las CHH's. El exón I pudiera incluir una pequeña porción del péptido señal, mientras que en el exón 2 pudiera presentarse el resto de esta y a su vez el péptido relacionado con el precursor de CHH (CPRP por sus siglas en inglés). El sitio de procesamiento (KR) puede ser observado en la primer parte del exón II, seguido de los primeros 40 aminoácidos del péptido maduro (Fig. 4). En el extremo C-terminal se puede observar el sitio de procesamiento (GK) para una proteinasa. Esta secuencia conserva los 6 residuos cisteínas presentes en todas las CHH. El péptido maduro comprende de 74 aminoácidos, los cuales le proporcionarán un peso teórico de 9.1 kDa (Lago-Lestón *et al*, 2007).

chh gene	TCACCAAACGCTCGCTCTTCGACCCTTCTGCACCGGCGTCTTCGACCGGCAGCTCTTGC	60
Liv-CHH	T <b>K R</b> S L F D P S <b>C</b> T G V F D R Q L L	
chh gene	GGAGGCTGCGTCGAGTGTGTGACGACTGTTTCAACGTATTCAGGGAAACCAACGTATCTA	120
Liv-CHH	R R L R R V <b>C</b> D D <b>C</b> F N V F R E P N V S	
chh gene	CTGAATGCAGGTCCGTCATCTATGGATTTCCCTTTTTTTTACATTTCCCTACATCAATACC	180
Liv-CHH	T E <b>C</b> R-----	
chh gene	CTTTGCACGATATCAGTTTTCATTGCATATGACACGGAAGGCTGTCTAAGGCACCCATCTT	240
Liv-CHH	-----INTRON-----	
chh gene	TGACACTAATCACATATTTTTTACAGAAAGTAACGTGTACAACAATGAAGTGTTCCGCCAGT	300
Liv-CHH	----- S N <b>C</b> Y N N E V F R Q	
chh gene	GTATGGAATACCTCCTCCCGCCTCACCTTCACGAAGAGCACAGACTAGCTGTCCAGATGG	360
Liv-CHH	<b>C</b> M E Y L L P P H L H E E H R L A V Q M	
chh gene	TCGGAAATAGATTACGGTTAAGACGCTGCAACCCACTTCGCTGACGACAGGAATCCGA	420
Liv-CHH	V G K *	
chh gene	TGATAGTAAAAGGCACCCCTAATTCCTACTTATTCTACAGCATAGCACTGAGTCCTCGATCG	480
chh gene	CTGTAAACGAATGGTTTCCAATGCTGAAGACTTATACTATGAAATGAAGCTGACTTCCACT	540
chh gene	CTAAGAAATAAGAATGAAAGGGTGCAGTTTGCCATTATATTGGGACTATCGTGACACATT	600
chh gene	TAGTTCGGCCACTGATCACAGTATAGAAAATATATATACCCATGAACGCCATTTATCAGG	660
chh gene	AAACTGGAGAAAAAATATCACTGAAAGAGATTGTTCTTAGGACTCGAGGCTTTAATTAAC	720
chh gene	ATTAGAATAGGTATTGTGATGTTTTATTATGTTTAAATTTACGAATAAAGGACTGGCAT	780
chh gene	GCA	783

**Figura 4: Secuencia teórica de aminoácidos para el péptido maduro de la neurohormona CHH-A. Los aminoácidos KR subrayados indican el sitio de procesamiento potencial, los seis residuos de cisteína conservados en Negritas, unión exón-intrón se remarca en gris, los intrones se marca con línea punteada y el asterisco hace referencia al codón de término. Tomado de Lago-Lestón, 2007.**

La secuencia que codifica para el péptido maduro (cDNA) de las tres neurohormonas ya han sido clonados en *E. coli* (Sánchez-Castrejón, 2007), de las cuales, la neurohormona CHH-B1 fue expresada en la levadura *Pichia pastoris* para evaluar su actividad hiperglucémica y se expresó con una región adicional en el C-terminal que contiene la etiqueta *c-myc*, que permitió identificarla con anticuerpos comerciales anti-*c-myc* y una región His-tag, para su purificación mediante una columna de afinidad, las cuales no interfirieron en su actividad (Sánchez-Castrejón, 2007 y Camacho-Jimenez, 2011). Esta isoforma recombinante con el C-terminal adicional fue utilizada también para evaluar su actividad inhibidora de la muda como sucede con la CHH de *H. americanus* descrita por Chang y colaboradores (1990). Aunque CHH-B1 fue descrita por Sun (1995) como una MIH, esta no presenta la glicina en la posición 12, que es característica del grupo de las MIH, en cambio sí contiene la secuencia del péptido relacionado con el precursor de CHH (CPRP), presente sólo en las CHH. Los resultados mostraron que esta isoforma tiene actividad hiperglucémica pero no inhibió

el proceso de muda, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el C-terminal interfiriera en esta actividad (Sánchez *et al*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la secuencia del péptido maduro de CHH-A tiene la terminación GK, esto sugiere que su extremo C-terminal está amidado (Lago-Lestón *et al*, 2007). El bloqueo del extremo C-terminal por un grupo amida, puede ser importante para su actividad biológica como se ha encontrado en otras proteínas de crustáceos, principalmente para la hiperglucemia (Ohira *et al*, 2003 y Fanjul-Moles, 2006).

Para el estudio de la actividad de estas neurohormonas se han empleado sistemas de expresión como alternativa para su obtención, dado la poca cantidad que se obtiene a partir la GS y a la dificultad de purificación debido a la similitud que existe entre las neurohormonas de la familia peptídica. Uno de los sistemas de expresión utilizados es la bacteria *E. coli*, con el cual Wanlem y colaboradores (2011), expresaron la neurohormona rLV-CHH, del camarón blanco *L. vannamei*, fusionada en el N-terminal a las etiquetas His-tag y al epítipo V5. Esta neurohormona, cuya secuencia corresponde a CHH-A, se inyectó a organismos juveniles y se observó un aumento en los niveles de glucosa en hemolinfa. Asimismo Liu y colaboradores (2013), al realizar bioensayos con la hormona LvCHH producida en *E. coli*, y que también corresponde en secuencia a la CHH-A, sugieren la participación de esta CHH en respuesta de osmoregulación. La expresión de CHH-A a nivel de ARNm, ha sido estudiada en diferentes salinidades, temperaturas y tejidos mostrando una alta expresión en comparación con las otras dos isoformas de *L. vannamei* en algunas de las condiciones probadas (Sigala, 2010; Liu, 2013).

La neurohormona de estudio CHH-A fue clonada por Sánchez-Castrejón (2007) en el vector pPICZ $\alpha$ A, con el cual transformó la cepa de *P. pastoris* KM71 que posee un genotipo deficiente en la producción de la enzima histidina deshidrogenasa (*his4*). La construcción contiene un C-terminal adicional (*c-myc*, His-tag), al cual se integró el sitio de corte para la enterocinasa, lo que permite remover las etiquetas *c-myc* y His-tag de la hormona una vez que haya sido identificada y purificada. Se intentó expresar la neurohormona CHH-A en este sistema, pero no se logró detectar en el medio de cultivo. La construcción de CHH-A<sub>His</sub> se corroboró mediante secuenciación y expresión del

ARNm, donde se observó que llevaba a cabo el proceso de transcripción pero no el de traducción. Debido a lo anterior, recientemente se llevó a cabo una transformación de la cepa SMD1168H de *P. pastoris*, con genotipo deficiente en la producción de la enzima peptidasa A (*pep4*), la cual activa a la carboxipeptidasa Y y a la proteasa B1, haciendo a esta cepa deficiente en proteasas. Sin embargo, no se han realizado ensayos para la evaluación de su actividad hiperglucémica.

El uso de sistemas de expresión eucariota como el de la levadura *P. pastoris* puede llevar a cabo el plegamiento de las proteínas recombinantes y su secreción al medio de cultivo. El empleo de este sistema de expresión en nuestro grupo para producir tanto hormonas con un C-terminal adicional como proteínas recombinantes lo más parecidas a las nativas ha favorecido el avance en cuanto a su estudio. Sin embargo, la producción de las formas sin el C-terminal adicional, tanto a partir de sistemas procariontes como eucariotes, requiere un proceso más extenso, debido a su purificación por métodos cromatográficos y a su vez, que requiere contar con anticuerpos policlonales que permitan su detección.

Trabajos recientes como el de Nagai *et al* (2009) y el de Inoue *et al* (2011) han mostrado la efectividad de utilizar sistemas de expresión como el pET *E. coli* BL21 (DE3) para obtener CHH's recombinantes lo más parecidas a las nativas con actividad biológica, produciéndose como proteínas de fusión solubles, con la posibilidad de remover el extremo N-terminal adicional del péptido maduro una vez que han sido purificadas.

Con base a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo expresar la isoforma recombinante CHH-A en un sistema de expresión procarionte (*E. coli*) y uno eucariota (*P. pastoris*) para evaluar su efecto en la modulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa del camarón blanco.

### 3. Justificación

---

El estudio de la endocrinología de los decápodos ha tomado importancia debido a la gran demanda comercial de estos organismos a nivel mundial. Sin embargo, para el caso del camarón blanco *L. vannamei*, a pesar de ser uno de los organismos más cultivados, se tienen pocos avances sobre el conocimiento del papel de las CHH en la regulación de los procesos fisiológicos.

De las tres hormonas hiperglucémicas de crustáceos identificadas en *L. vannamei* (CHH-B1, CHH-B2 y CHH-A), se ha demostrado, que CHH-B1 recombinante con un C-terminal adicional promueve el aumento de los niveles de glucosa en la hemolinfa, lo cual nos sugiere que la producción de CHH-A en un sistema de expresión eucariota con un C-terminal adicional, pudiera también presentar actividad hiperglucémica. Asimismo, el empleo de un sistema de expresión procariota como el que se plantea en este trabajo para la expresión de CHH-A, contribuirá a la obtención del neuropéptido lo más parecido al producido naturalmente por el camarón blanco, el cual sería producido en forma soluble y con el plegamiento correcto.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó como propósito la expresión de rCHH-A como proteína de fusión en sistemas de expresión procariota y eucariota. La comparación entre estos sistemas de expresión permitirá determinar el método más sencillo y rápido para la obtención de la neurohormona recombinante CHH-A activa y en suficientes cantidades para llevar a cabo ensayos de actividad biológica. En particular, este trabajo se centró en la evaluación del efecto de la hormona recombinante CHH-A en la modulación de los niveles de glucosa en *L. vannamei*.

## 4. Objetivos

---

### 4.1 Objetivo General

Llevar a cabo la expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante (CHH-A) en dos sistemas de expresión y evaluar su efecto en la regulación de los niveles de glucosa en *Litopenaeus vannamei*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Clonar la hormona CHH-A como proteína de fusión en un vector de expresión procariota (*Escherichia coli*).
- Determinar las condiciones óptimas de expresión y purificación de la neurohormona CHH-A con un C-terminal adicional (His-tag, *c-myc*, enterocinasa) en *Pichia pastoris* y compararla con el nivel de expresión en *E.coli*.
- Evaluar el efecto de la hormona recombinante CHH-A en la modulación de los niveles de glucosa en hemolinfa en el camarón blanco.

## 5. Materiales y métodos

---

### 5.1 Clonación de CHH-A en el vector pET44a(+)

Para la expresión de la neurohormona CHH-A de *L. vannamei* en un sistema de expresión procariota, se seleccionó el vector de expresión pET44a(+) (Novagen) (Fig. 5A). Este vector está diseñado para clonar y expresar altos niveles de péptidos recombinantes, donde la transcripción es mediada por el promotor de la ARN polimerasa T7, que a su vez posee un promotor *lacI* regulado por el operador *lac* y es inducida por la presencia de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Este vector, posee la resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>) y cuenta con etiquetas Nus-tag, la cual promueve la solubilidad de la proteína producida, y la His-tag, que por su afinidad al Ni-NTA (Ni-ácido nitrilotriacético), permite la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad. Las proteínas recombinantes se expresan como proteínas fusionadas a dichas etiquetas adicionales en el N-terminal. Una vez expresada la proteína de interés, el vector incluye un sitio de reconocimiento para la endoproteasa enterocinasa (DDDDK), lo que permite que quede con el N-terminal libre evitando que dichas etiquetas interfieran en la actividad de la proteína producida (Fig. 5B).

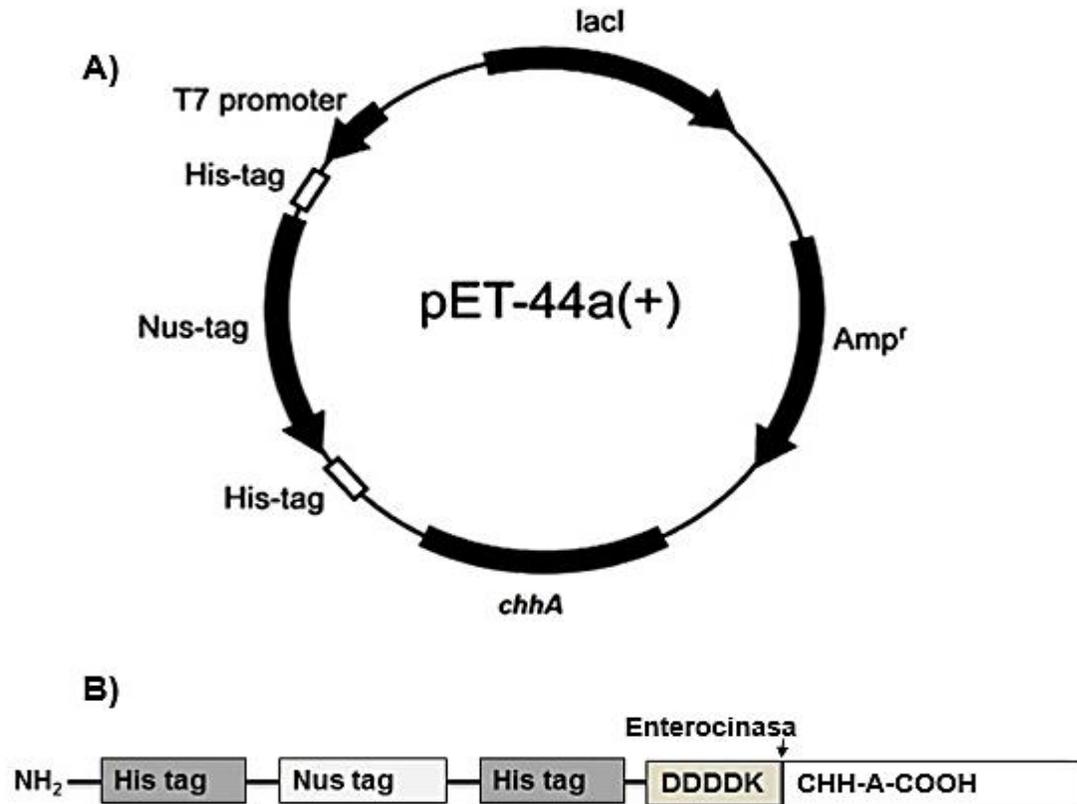


Figura 5: Esquema del vector pET44a(+). A: regiones que conforman al vector de expresión; B: expresión de CHH-A como proteína de fusión. Modificado de pET44a-c(+) vector (Novagen, cat: 711223)

### 5.1.1 Obtención y digestión del plásmido pET44a(+)

Con el propósito de contar con la cantidad suficiente del vector, a partir de células de *E. coli* transformadas con pET44a(+), se llevó a cabo la extracción de plásmido mediante lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

La transformación de células electrocompetentes *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) se llevó a cabo utilizando el equipo MicroPulser (BioRad) utilizando las condiciones para cubetas de 1 mm (2.5 Kv; 25  $\mu$ F; 200  $\Omega$ ). Las células transformadas se crecieron en un medio selectivo agar LB (triptona 1%; extracto de levadura 0.5%; NaCl 0.5%; agar 1.5%; pH 7.0) con carbencilina (50  $\mu$ g/ml) y se incubaron a 37°C hasta obtener colonias aisladas, varias de las cuales fueron seleccionadas para inocularlas en medio LB (triptona 1%;

extracto de levadura 0.5%; NaCl 0.5%) y se procedió con la extracción mediante lisis alcalina.

El plásmido obtenido fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific®) y fue evaluado en geles de agarosa (1%) preteñidos con bromuro de etidio. Para la electroforesis se utilizó TBE 1X (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) y 80 v constantes. Posteriormente, el gel se analizó en un transiluminador y fue fotodocumentado.

A partir del plásmido obtenido, se elaboró una digestión de prueba con las enzimas *EcoRI* (Promega) y *PshAI* (New England Bio Labs), para evaluar su actividad. En la digestión se evaluaron los tiempos de 6 y 12 horas de incubación, con el propósito de obtener digestiones totales. Las reacciones de digestión fueron por separado, en un volumen total de 30 µl. Para el caso de *EcoRI*, la reacción consistió de Buffer H (2X), *EcoRI* (1 U), pET44a(+) (7.43 µg/µl) y BSA (100 µg/ml) y para *PshAI*: NEBuffer4 (1X), *PshAI* (1 U), pET44a(+) (7.43 µg/µl) y BSA (100 µg/ml).

Una vez evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa, se procedió a digerir una mayor cantidad de plásmido y a purificarlo mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 1.2%. La banda de interés fue escindida y purificada utilizando el kit Pure Link® Quick Gel Extraction (Invitrogen), el producto fue evaluado, cuantificado y almacenado a -20°C hasta su empleo.

### **5.1.2 Obtención y digestión del fragmento optimizado *chhA***

En el proceso de clonación de *chhA* se consideró su origen, es decir, al ser una proteína eucariota que se expresará en un sistema de expresión procariota, el uso de codones preferencial para cada aminoácido difiere entre estos organismos, por lo tanto, para producir la neurohormona recombinante CHH-A, la secuencia del gen (*chhA*) que codifica para esta, fue sintetizada por la empresa GenScript, donde se optimizó de acuerdo al uso de codones preferenciales para *E. coli*. La secuencia optimizada y flanqueada por los sitios de restricción *PshAI* y *EcoRI* se recibió clonada en el plásmido pUC57. A esta construcción se hará referencia como pUC57-CHHA<sub>H</sub>.

Con la finalidad de obtener una buena cantidad del fragmento, se consideraron dos estrategias: la primera consistió en la extracción del plásmido pUC57-CHHA que fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *PshAI*, siguiendo el protocolo mencionado en el apartado 5.1.1. En la segunda estrategia, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó el fragmento a partir de pUC57-CHHA<sub>H</sub> como ADN templado, y de la misma forma, el fragmento fue digerido con las enzimas de restricción mencionadas.

Para la primera estrategia, el plásmido pUC57-CHHA<sub>H</sub> se utilizó para transformar células electrocompetentes, siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 5.1.1. Las transformantes obtenidas se colocaron en medio selectivo con el antibiótico carbencilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C hasta obtener colonias aisladas, las cuales se inocularon en 5 ml de LB para proceder con la extracción de plásmido. El plásmido extraído se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (1%). Una vez cuantificado, se procedió con su digestión donde se utilizaron las enzimas de restricción *PshAI* y *EcoRI* y un total de 3 reacciones. La digestión se evaluó mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa.

Por otra parte, la segunda estrategia consistió en el diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia optimizada a partir de CHHA-pUC57, en dichos oligos se incluyeron los sitios de restricción para las enzimas *PshAI* y *EcoRI*. Para el caso del sentido (*PshFop*) la secuencia fue 5' ACGACGACAAGAGTCTCTTTGACCCG3' y el antisentido (*EcoRop*) 5' CCGGAATTCTTAACCGACCATTTGGA3'. Las condiciones óptimas de amplificación se establecieron mediante un gradiente de temperatura que comprende de 58-68°C con un aumento cada 2°C. La reacción de PCR de un volumen total de 20 µl, se compuso de GoTaq greenBuffer (1X), MgCl<sub>2</sub> (2 µM), dNTP's (0.2 µM), *PshFop* y *EcoRop* (0.2 µM cada uno), plásmido pUC57 (4.74 µg/µl) y 1.2 U. de enzima GoTaq® polimerasa (Promega). El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 seg), alineamiento (de 58°C a 70°C durante 30 seg) y extensión (72°C por 30 seg). Por último, la extensión final a 72°C por 5 min. Las reacciones se almacenaron a -20°C para ser analizadas posteriormente en un gel de agarosa al 1.5%.

Una vez establecidas para la amplificación de la secuencia optimizada, se llevaron a cabo 9 reacciones de 20  $\mu$ l y el fragmento de interés fue recuperado de un gel preparativo de agarosa al 1.2% utilizando el kit de purificación a partir de geles de agarosa (Invitrogen). Una vez obtenida la cantidad suficiente de *chhA*, se procedió a la digestión con *PshAI* y *EcoRI*. El fragmento digerido se recuperó a partir de un gel de agarosa, se resuspendió en 50  $\mu$ l y se concentró hasta 20  $\mu$ l utilizando concentrador Vacufuge (Eppendorf). El producto purificado fue evaluado en un gel de agarosa, se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta su empleo para la ligación.

### 5.1.3 Ligación del vector pET44a(+) con el fragmento *chhA*

Al digerir tanto el vector como el fragmento con las enzimas de restricción, se obtienen productos con extremo romo en 5' (*PshAI*) y extremo cohesivo 3' saliente (*EcoRI*), los cuales favorecen la inserción del fragmento en la orientación correcta y conservando el marco de lectura adecuado para la expresión. La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando la enzima ADN T4 ligasa (Promega). Las reacciones de ligación fueron establecidas de acuerdo a lo sugerido por el proveedor. Por otra parte, se incluyó otra reacción de ligación considerando la relación molecular que existe entre el vector y el fragmento (Anexo 1). Por último, se incubaron a 4°C durante 12 h. Seguido del tiempo de incubación, se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente.

El producto de ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes *E. coli* TOP-10, las cuales se crecieron en medio selectivo LB agar con los antibióticos carbencilina (100  $\mu$ g/ml) y estreptomina (50  $\mu$ g /ml). Las colonias obtenidas fueron sembradas en el mismo medio selectivo para su posterior análisis mediante PCR de colonia. Se elaboró la reacción de PCR como se describió en el apartado 5.1.2, excepto que en este caso, se adicionó un fragmento de colonia como templado.

Para corroborar la clonación de *chhA* en el vector pET44a(+), se mandó secuenciar el plásmido correspondiente a la construcción pET44a(+)-CHHA<sub>His</sub> a la empresa SeqXcel.

## 5.2 Optimización de la expresión de CHH-A en *P. pastoris*

La levadura *Pichia pastoris* cuenta con 2 genes para metabolizar metanol. Tales genes son nombrados AOX1 y AOX2, los cuales sirven como herramienta para llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes. La transformación de estas células con vectores como pPICZ $\alpha$ A, en donde el gen de interés se encuentra fusionado al promotor AOX1, permite la recombinación homóloga con el promotor del gen AOX1 presente en el genoma de la levadura. Esto permite la incorporación del gen de interés al genoma de la levadura dando lugar a la síntesis de la proteína recombinante a partir de su inducción con metanol. Las proteínas recombinantes son secretadas mediante exocitosis hacia el medio de cultivo como sucede con otras proteínas de este organismo. Sin embargo, para su fácil identificación, las proteínas recombinantes se expresan como proteínas fusionadas a las etiquetas adicionales en el C-terminal como el epítotope *c-myc*, His-tag y sitios de reconocimiento para endoproteasas. La fusión de estas etiquetas a la proteína de interés permite su identificación mediante Inmunodetección (*c-myc*), purificarla por cromatografía de afinidad (His-tag) e incluye el sitio de reconocimiento para la endoproteasa enterocinasa para eliminar parte del C-terminal adicional. Asimismo, este vector también presenta la resistencia al antibiótico zeocina (Fig. 6).

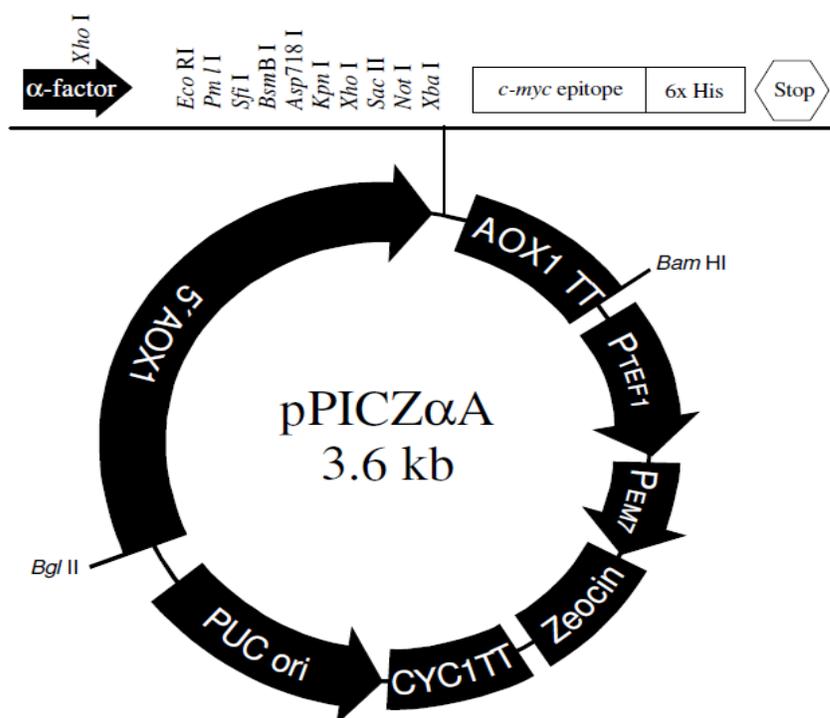


Figura 6: Esquema del vector de expresión pPICZ $\alpha$ A, donde se representa el promotor 5'AOX1 inducible con metanol, la resistencia al antibiótico zeocina, la señal de secreción ( $\alpha$ -factor) y el sitio de clonación múltiple (Invitrogen).

Para expresar la neurohormona CHH-A con el C-terminal adicional, se utilizó la cepa de *P. pastoris* SMD1168H transformada con el vector pPICZ $\alpha$ A, donde se encuentra clonada la secuencia de *chhA*. Dicha construcción tiene por nombre SMD1168H-CHH<sub>A</sub> y la neurohormona recombinante se ha nombrado como CHH-A<sub>His</sub>.

### 5.2.1 Optimización de las condiciones de expresión de CHH-A<sub>His</sub>

Con el propósito de producir una gran cantidad de la neurohormona recombinante CHH-A<sub>His</sub> se optimizaron las condiciones de expresión empleando dos diferentes medios de cultivo. Los medios utilizados para la expresión fueron: el medio complejo BMMY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, YNB 1.34%, D-biotina  $4 \times 10^{-5}$ , buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0), en el cual se produce buena cantidad de la proteína recombinante y reduce la actividad de proteasas, y el medio mínimo BMM (buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %), permite que se sintetice la proteína recombinante deseada con pocas proteínas accesorias de la levadura.

### 5.2.1.1 Inducción con medio complejo (BMMY)

A partir de la cepa SMD1168H-CHHA<sub>H</sub>, se tomó una asada de colonia fresca y se inoculó en 5 ml de YPD con el antibiótico zeocina (100 µg/ml), se incubó a 30°C con agitación (200 rpm) durante 24 h y se tomaron 400 µl, que fueron transferidos a 500 ml de BMGY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, YNB 1.34%, D-biotina  $4 \times 10^{-5}$ , solución de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, glicerol 1%). Se incubó a las mismas condiciones mencionadas hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica  $DO_{600} = 5$  (aproximadamente de 16 a 18 h). Posteriormente se tomaron 5 alícuotas de 100 ml de este cultivo y fueron centrifugadas a 2000 x g por 5 min. El sobrenadante fue decantado y las células resuspendidas en 20 ml de medio BMMY.

Para la expresión de CHH-A<sub>His</sub> se evaluaron diferentes concentraciones del inductor (metanol al 100%), siendo 0%, 1%, 2% y 4%. El cultivo se incubó durante 5 días a 30°C con agitación (200 rpm) y la adición de metanol se llevó a cabo cada 12 h según la concentración requerida. Diariamente se tomó una muestra de medio de cultivo de 1.2 ml (por duplicado) para su análisis mediante electroforesis desnaturalizante en geles de tricina-SDS-PAGE. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

### 5.2.1.2 Inducción con medio mínimo (BMM)

De la misma manera descrita previamente, se inició tomando una asada de colonia fresca de la cepa SMD1168H-CHHA<sub>H</sub> y se inoculó en 5 ml de YPD con el antibiótico zeocina (100 µg/ml). Posteriormente se incubó a 30°C con agitación (200 rpm) durante 24 h. De este inóculo, se transfirieron 500 µl a 500 ml de BMG (fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ % y glicerol 1%) y se procedió con el mismo protocolo descrito para inducción en medio complejo de nutrientes.

La inducción consistió en la adición de metanol, utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente. Se tomaron muestras cada 24 horas y se almacenaron a -20°C hasta su análisis en geles de tricina-SDS-PAGE.

### 5.2.1.3 Análisis geles de Tricina-SDS-PAGE

Las muestras obtenidas previamente fueron concentradas mediante precipitación con ácido tricloroacético, para lo cual, una vez que se adicionó a las muestras, se mezclaron por inversión y se incubaron a 4°C durante 12 horas. Posterior a este tiempo se centrifugó a velocidad máxima (11,000 x g) durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y lavado con 1 ml de acetona. El pellet se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 24 µl de solución desnaturalizante para la muestra (sample buffer) a una concentración de 2X (Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4% p/v, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004%). Las muestras fueron almacenadas a -20°C y previo a la electroforesis, se incubaron durante 10 min a 90°C.

Los geles de tricina-SDS-PAGE se elaboraron al 12.5%, según lo descrito por Schägger y von Jagow (1987) para proteínas de bajo peso molecular (1-100 kDa). Una vez preparadas las muestras, se procedió con la electroforesis en condiciones de 50 mA constantes y 170 v hasta que el azul de bromofenol saliera del gel. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie blue silver G250 stain (Candiano *et al*, 2004) y se destiñeron con agua destilada hasta obtener el contraste deseado.

### 5.2.1.4 Inmunodetección de proteínas recombinantes (Western Blot)

Para corroborar la presencia de la neurohormona recombinante CHH-A<sub>His</sub> mediante Western blot, se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante tricina-SDS-PAGE, del cual se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 µm (BioRad) mediante el método de transferencia semiseca, utilizando la solución Towbin 1X (Tris Base 250 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) como amortiguador y un sistema de transferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP). La electro transferencia se llevó a cabo a 200 mA constantes y 20 v durante una hora. Posteriormente, la membrana se incubó en 50 ml de solución bloqueadora PBST (PBS 1X y Tween20 0.05%) con leche descremada (Svelty) (5%), se incubó 12 horas a 4°C seguido de 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada. La solución bloqueadora fue retirada y la membrana transferida a una solución de PBST con 1% de leche descremada y el anticuerpo anti-c-myc-HRP (Roche) en una relación 1:2000. Se

incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada, posteriormente se lavó con PBST para retirar el exceso de anticuerpo y se procedió con la detección.

La detección de las proteínas recombinantes fue mediante quimioluminiscencia, se utilizó el kit Super Signal West Pico® (Thermo Scientific) en placas fotosensibles (Kodak) siguiendo lo descrito por el proveedor.

### **5.2.2 Expresión de CHH-A<sub>His</sub> en un mayor volumen**

Una vez establecidas las condiciones óptimas de la expresión de CHH-A<sub>His</sub>, se procedió utilizando dichas condiciones descritas previamente en el apartado 5.2.1., pero en esta ocasión para 2 lotes de 50 ml (cada uno) de medio inductor MMY. Una vez concluida la inducción, el cultivo fue centrifugado (2000 x g, 5 min) para recuperar el sobrenadante, el cual fue almacenado a -20°C hasta su análisis y purificación.

### **5.2.3 Purificación de CHH-A<sub>His</sub> mediante cromatografía de afinidad**

La presencia de la región His-tag en el extremo C-terminal, permitió llevar a cabo la purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando el kit ProBond Purification System® (Invitrogen), del cual se tomaron 1.2 ml de resina ProBond Nickel-Chelating, se colocó en una columna de plástico con capacidad de 10 ml y se equilibró con solución de unión (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). Previo a la adición de la muestra en la columna, se le ajustó el pH a 8.0 y se centrifugó (3000 x g, 10 min, 4 °C) para eliminar precipitados. Posteriormente, se pasó por la columna en dos ocasiones el volumen total de sobrenadante obtenido. La columna fue lavada con 20 ml de solución de lavado (Imidazol 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). La proteína fue eluída con solución de elución (Imidazol 250 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), en 5 fracciones de 500 µl cada una. Se tomaron 10 µl de muestra de cada fracción y se mezcló con 10 µl de solución desnaturizante para la muestra (2X), para su posterior análisis mediante Western blot como se describió en el apartado 5.2.1.4.

Del resultado del análisis de muestras mediante Western blot, las fracciones con mayor concentración de la proteína recombinante fueron mezcladas y dializadas utilizando los

cartuchos Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2 (Thermo Scientific) y PBS 1X como solución de diálisis, siguiendo las especificaciones del proveedor. Por último, se procedió a cuantificar la muestra utilizando el método del ácido bicinconínico (Pierce), siguiendo el protocolo de cuantificación con microplaca descrito por el proveedor. Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de placas Multiscan Go (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 562 nm.

### **5.3 Ensayo de actividad biológica de la neurohormona recombinante CHH-A<sub>His</sub>**

El efecto hiperglucémico de la neurohormona recombinante CHH-A<sub>His</sub> previamente purificada, fue evaluado en organismos juveniles de *L. vannamei*, los cuales se adquirieron en estadio postlarva (PL<sub>18</sub>) de la granja Acuacultura Mahr (La Paz, B. C. S.). Los organismos fueron mantenidos en estanques de 2000 litros hasta alcanzar la talla deseada. Las condiciones de temperatura ( $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ), salinidad (35 ‰), aireación ( $5.8 \pm 0.5$  mg/l) y recambio de agua (100%) fueron constantes. Diariamente se administró una dieta comercial (Aquaprofile, Purina) en una porción del 5% de su peso dividido en tres raciones. Por otra parte, se realizó también la limpieza retirando restos de comida, heces y mudas.

Una vez que alcanzaron el peso requerido (de 4 a 7 g), los organismos fueron colocados de forma individual en cubetas de 1 L y aclimatados por 10 días manteniendo las condiciones de temperatura, salinidad, aireación y recambio de agua previamente descritas. Para establecer la duración del ciclo de muda se llevó a cabo la observación de exubias en las cubetas experimentales y con ello se estableció el estadio de intermuda, el cual se encuentra a la mitad del ciclo de muda. Los organismos se ablacionaron de forma unilateral en intermuda, se dejaron en recuperación sin alimento durante 2 días y se realizó el ensayo.

El ensayo consistió en inyectar una dosis de 50 µl a través de la membrana artrodial de quinto pereiópodo utilizando una jeringa hipodérmica estéril de 1 ml (31G). Los ensayos incluyeron PBS 1X, como control negativo, una dosis equivalente a 2 extractos de pedúnculo ocular como control positivo, y 2 µg (172 pmol) de CHH-A<sub>His</sub> diluida en PBS 1X para evaluar el efecto hiperglucémico. Cada tratamiento consistió de 3 a 7

organismos. La extracción de hemolinfa (40  $\mu$ l) se llevó a cabo una hora después de la inyección y fue extraída del seno hemolinfático, situado entre ganglio cefalotorácico del cordón neural y el músculo estriado del camarón, utilizando una jeringa hipodérmica estéril de 1 ml (27G). El tiempo establecido para la extracción de hemolinfa fue con base al trabajo publicado por Wanlem (2011) quien determinó que la mayor respuesta hiperglucémica para esta neurohormona fue a 1 h post inyección. La hemolinfa extraída fue colocada en solución anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993) manteniendo una relación hemolinfa: anticoagulante de 1:2. Las muestras fueron centrifugadas (4,200 x g durante 5 min, 4 °C), el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -80°C hasta su análisis.

Para la determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa, se utilizó el kit Glucose Ox Reagent (Pointe Scientific. Inc.), siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. Las muestras fueron analizadas un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 500 nm. Cada muestra se analizó por triplicado y los datos fueron documentados, analizados (ANOVA de una vía) y graficados.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Clonación de CHH-A en el vector pET44a(+)

La estrategia de clonación desarrollada para diseñar la construcción pET44a(+)-CHHA<sub>H</sub> permitió que al seleccionar el sitio de clonación *Psh*AI, la secuencia de los dos primeros aminoácidos de CHH-A optimizada (serina y leucina) completarán el sitio de reconocimiento de esta enzima y a su vez, restablecer el sitio de reconocimiento para la enterocinasa (Fig. 7). Con esta estrategia es posible eliminar por completo el N-terminal adicional una vez que la proteína recombinante sea identificada y purificada. Asimismo este sistema permite también dejar el N-terminal libre utilizando el sistema de *Sma*I y trombina, el cual ha sido utilizado para expresar una CHH (rPej-SGP-VII) de *Marsupenaeus japonicus* (Nagai *et al*, 2009) y por Inoue *et al* (2011) para expresar otra CHH (rPej-SGP-I) de *M. japonicus*.

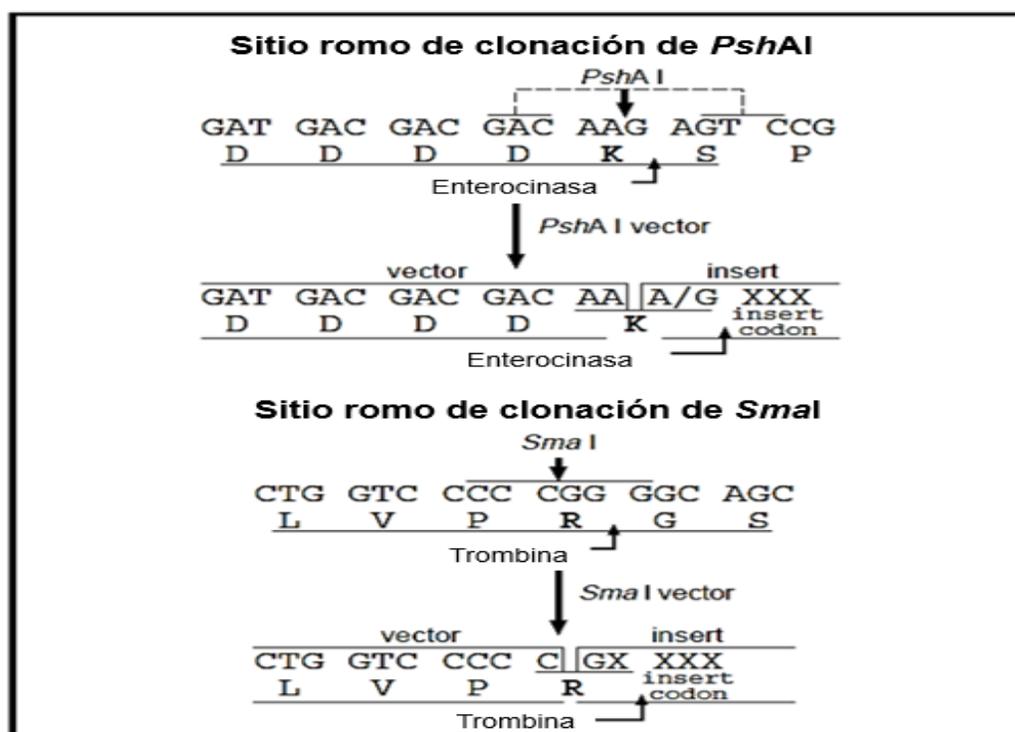
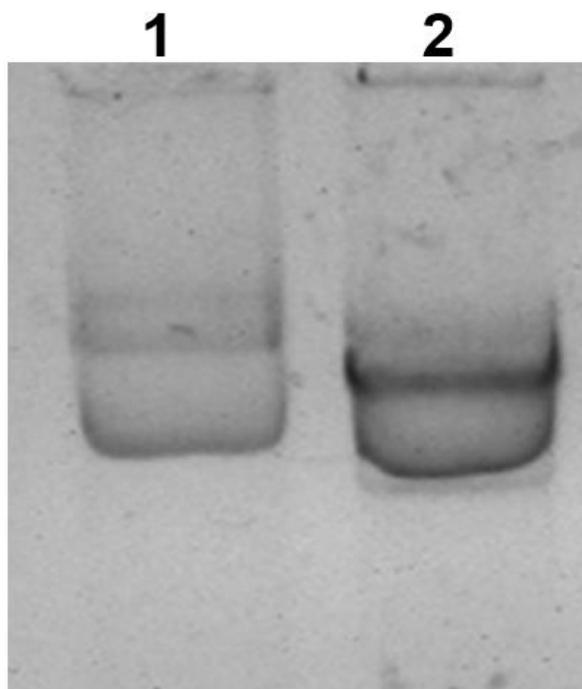


Figura 7: Estrategias de clonación para la eliminación del N-terminal adicional mediante las endoproteasas trombina y enterocinasa. Tomado del esquema pET44a(+) (Invitrogen).

### 6.1.1 Obtención y digestión del plásmido pET44a(+)

La extracción de plásmido a partir de un volumen de 40 ml de cultivo, utilizando el método de lisis alcalina, permitió tener el ADN plasmídico superenrollado esperado (Fig. 8). El plásmido obtenido fue cuantificado dando una concentración de 6.95  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y un rendimiento total de 208.5  $\mu\text{g}$ . Esta cantidad obtenida se consideró que era suficiente para llevar a cabo las reacciones de digestión.



**Figura 8: Extracción del plásmido pET44a(+). Carril 1: plásmido pET44a(+) (Invitrogen); carril 2: muestra de plásmido extraído a partir de pET44a(+) (invitrogen).**

La evaluación de la digestión del plásmido pET44a(+) con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PshAI*, mostró que para ambas enzimas a las 12 horas de incubación a 37°C hubo mayor digestión en comparación con 6 horas, de igual forma se observó que no se presentó actividad estrella por parte de las enzimas (Fig. 9), por lo que se optó llevar a cabo digestiones posteriores incubando durante 12 horas a 37°C.

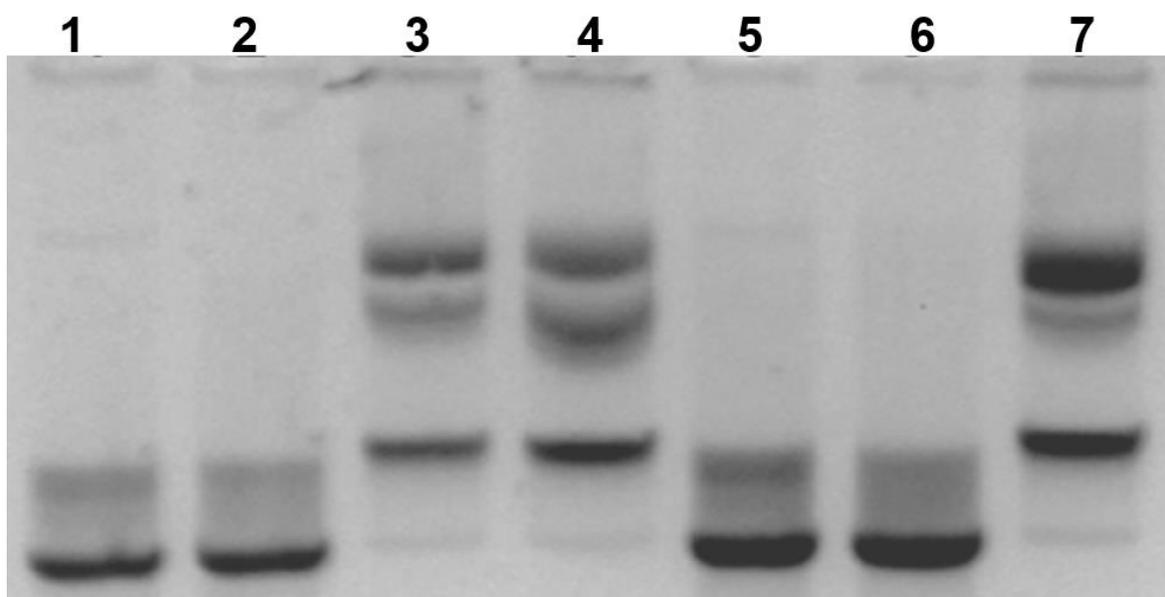
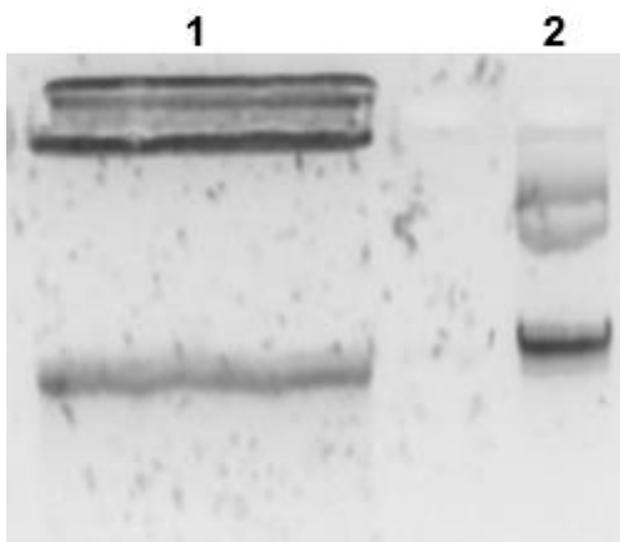


Figura 9: Digestión del plásmido pET44<sup>+</sup> con las enzimas *PshAI* y *EcoRI*. Carril 1: Reacción de digestión con *EcoRI* a 6 h; carril 2: reacción de digestión con *PshAI* a 6 h; carril 3: control negativo sin enzima a 6 h; carril 4: control negativo sin enzima a 12 h; carril 5: digestión con *EcoRI* 12 h; carril 6: digestión con *PshAI* 12 h; carril 7: muestra del plásmido pET44a(+).

Una vez evaluadas las enzimas, se aumentó el número de reacciones a 8, con el propósito de obtener una mayor cantidad de plásmido digerido con ambas enzimas. El producto de la doble digestión se purificó a partir de un gel preparativo (Fig. 10), recuperándose una cantidad total de 475 ng de ADN plasmídico digerido, el cual fue almacenado hasta su empleo posterior.



**Figura 10:** Doble digestión de plásmido pET44a(+). Carril 1: Plásmido digerido; carril 2: muestra de plásmido sin digerir.

### 6.1.2 Obtención del fragmento optimizado *chhA*

De acuerdo con lo descrito por la empresa GenScript, la optimización de la secuencia del gen *chhA* de *L. vannamei* (Fig. 11) se basó en que el gen nativo emplea codones poco frecuentes en tándem que pueden reducir la eficiencia de la traducción o incluso desensamblar la maquinaria de traducción. El resultado de la optimización para el uso de codones preferencial de *E. coli*, reportó que el cálculo de optimización mediante el algoritmo CAI aumentó de 0.90 a 0.92, siendo 1.0 considerado como perfecto en cuanto a frecuencia de uso de codones. Asimismo, se redujo el contenido de GC y la vida media del ARNm aumentó, las estructuras de tallo y asa fueron eliminadas, dado que estas últimas interfieren en la unión y estabilidad de ARNm con el ribosoma.

**AGT** CTC **TTT** GAC **CCG** TCC **TGT** ACC GGC **GTT** **TTT** GAC **CGC** **CAA** **CTG** **CTG** **CGT** **CGT** CTG CGT  
**TCG** CTC **TTC** **GAC** **CCT** TCC **TGC** ACC **GGC** GTC **TTC** **GAC** **CGG** **CAG** **CTC** **TTG** **CGG** **AGG** **CTG** **CGT**  
**CGT** GTG TGT **GAT** **GAT** **TGC** **TTT** **AAT** **GTT** **TTT** **CGT** GAA **CCG** AAC **GTG** **AGC** **ACC** GAA TGC **CGT**  
**CGA** **GTG** **TGT** **GAC** **GAC** **TGT** **TTC** **AAC** **GTA** **TTC** **AGG** **GAA** **CCC** **AAC** **GTA** **TCT** **ACT** **GAA** **TGC** **AGG**  
**TCT** AAC TGT TAC AAC **AAC** GAA **GTT** TTC CGC CAG **TGC** ATG GAA TAC **CTG** **CTG** CCG **CCG** CAC  
**AGT** AAC TGT TAC AAC **AAT** GAA **GTG** **TTC** **CGC** **CAG** **TGT** **ATG** **GAA** **TAC** **CTC** **CTC** **CCG** **CCT** **CAC**  
CTG CAC GAA **GAA** **CAT** **CGC** **CTG** GCT GTC **CAA** ATG GTC **GGT** **TAA**  
**CTT** **CAC** **GAA** **GAG** **CAC** **AGA** **CTA** **GCT** **GTC** **CAG** **ATG** **GTC** **GGG** **TAA**

Figura 11: Comparación de la secuencia del gen *chhA* (en negritas) con la secuencia optimizada del mismo para *E. coli*. Los codones que se modificaron se muestran resaltados.

El análisis correspondiente de la extracción de ADN plasmídico pUC57-CHHA<sub>H</sub>, a partir de la células transformadas y crecidas en 20 ml de cultivo (Fig. 12), mostró que el plásmido fue extraído exitosamente. El rendimiento obtenido total fue de 188.16 µg, el cual se consideró suficiente para utilizarlo en procesos posteriores.

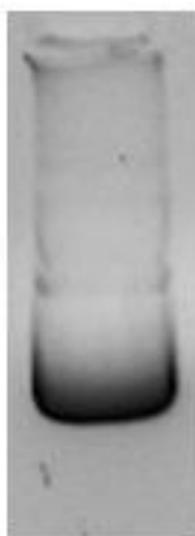
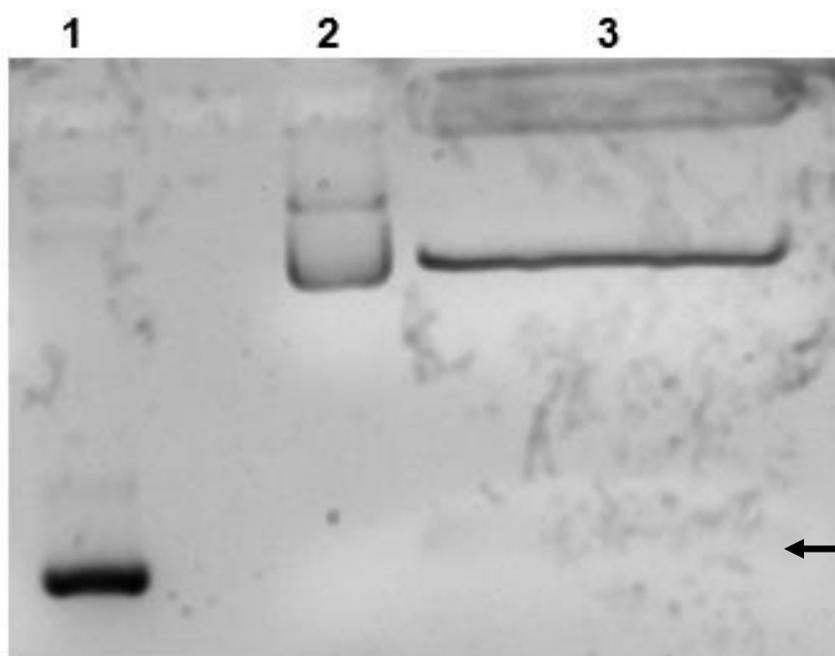


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación del plásmido extraído pUC57-CHHA.

Una vez evaluado el plásmido extraído, se procedió con las estrategias de obtención del fragmento mediante la digestión de pUC57-CHHA y su amplificación por PCR.

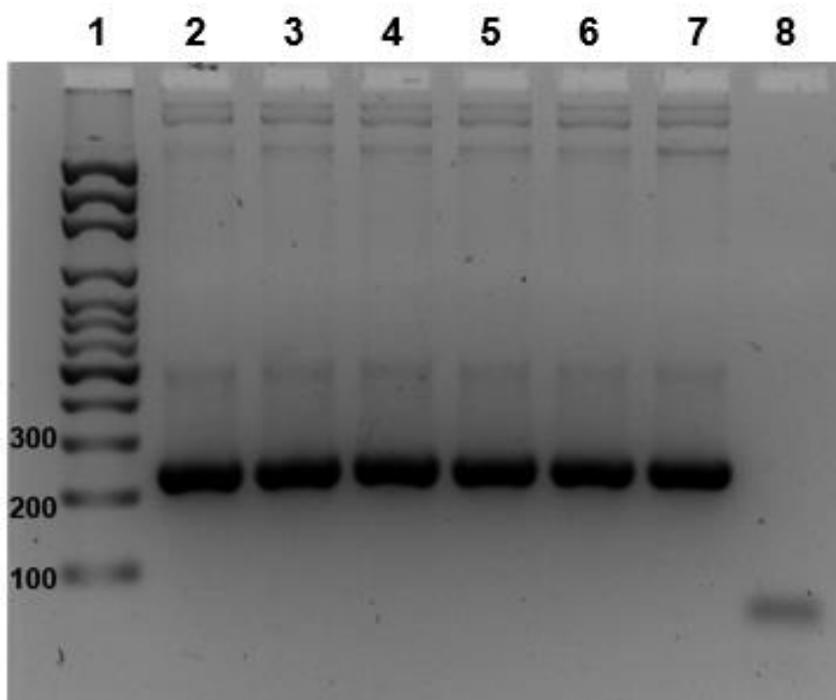
Para el caso de la primera estrategia mediante la digestión con las enzimas *EcoRI* y *PshAI*, se obtuvo el producto esperado de 234 pb. Sin embargo, como se observa en la Fig. 13, la digestión del plásmido pUC57-CHHA dio lugar a una cantidad muy pequeña del fragmento, para lo cual sería necesario digerir grandes cantidades de plásmido y enzimas para poder obtener la cantidad suficiente del fragmento y llevar a cabo su clonación en el vector pET44a(+). Por ello se consideró la opción de llevar a cabo la obtención del fragmento mediante su amplificación utilizando la técnica de PCR.



**Figura 13:** Obtención del fragmento *chhA* optimizado a partir de la digestión de pUC57-CHHA<sub>H</sub>. Carril 1: referencia de tamaño (234 pb); carril 2: muestra de CHH-ApUC57 sin digerir; carril 3: digestión de CHHA-pUC57.

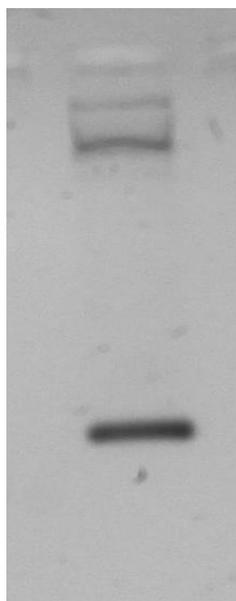
La segunda estrategia probada para la obtención del fragmento consistió en diseñar oligonucleótidos para su amplificación a partir de pUC57-CHHA, los cuales poseen sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *PshAI*. Con el empleo de estos oligonucleótidos, se procedió con la reacción de PCR probando un gradiente de temperatura que comprendió de 58 a 68°C (Fig. 14). En esta prueba se observó

amplificación en todas las temperaturas, excepto para el control negativo, el cual consistió en una reacción sin ADN templado. La temperatura seleccionada fue de 60°C para llevar a cabo amplificaciones posteriores.



**Figura 14:** Gradiente de amplificación de *chhA*. Carril 1: marcador de peso molecular (Axagen); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7: gradiente de temperatura de 58, 60, 62, 64, 66, 68°C respectivamente; carril 8: control negativo.

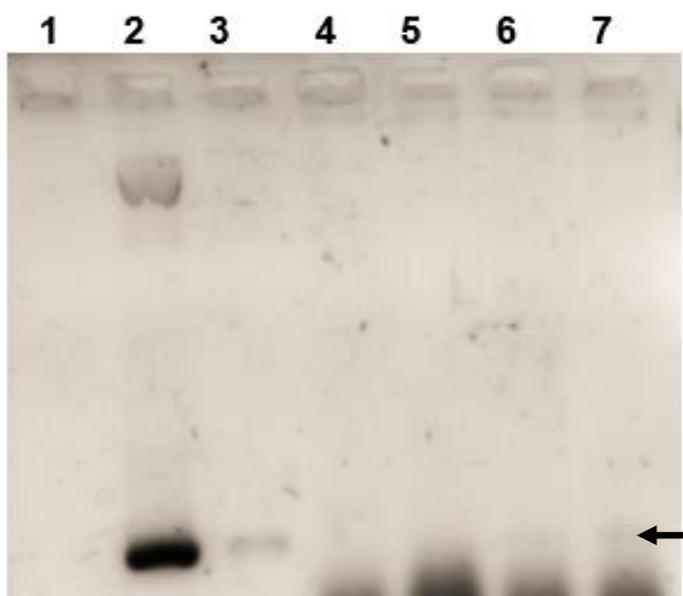
Ya establecidas las condiciones de amplificación, se elaboraron 9 reacciones de PCR, con el propósito de obtener la cantidad suficiente de inserto. El producto de esta amplificación fue recuperado a partir de un gel preparativo de agarosa para recuperar exclusivamente el fragmento de interés (Fig. 15), posteriormente fue digerido con *EcoRI* y *PshAI*, recuperado y cuantificado, obteniéndose una cantidad total de inserto de 252 ng.



**Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de amplificación de *chhA*.**

### **6.1.3 Ligación del vector pET44a(+) con el fragmento *chhA***

Con el vector pET44a(+) y el fragmento de *chhA* digeridos, se procedió con la reacción de ligación. El producto de las ligaciones se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli*. De las dos reacciones de ligación realizadas siguiendo los diferentes cálculos, se obtuvieron 2 clonas positivas en el experimento donde se empleó el cálculo de relación molecular. Estas fueron analizadas mediante PCR de colonia (Fig. 16) y mostraron los productos de PCR del tamaño esperado (234 pb). El plásmido fue extraído de la clona seleccionada (Fig. 16, carril 7) y fue secuenciado por la empresa SeqXcel. La secuenciación indicó que la construcción obtenida corresponde a pUC57-CHHA y no a pET44a(+)-CHHA, por lo que se sugiere que hubo contaminación en el manejo de las muestras en el proceso de clonación.



**Figura 16:** Análisis de colonias transformadas con el producto de ligación. Carril 1: control negativo; carril 2: amplificación de *chhA* como control positivo; carril 3, 4, 5, 6 y 7: colonias analizadas.

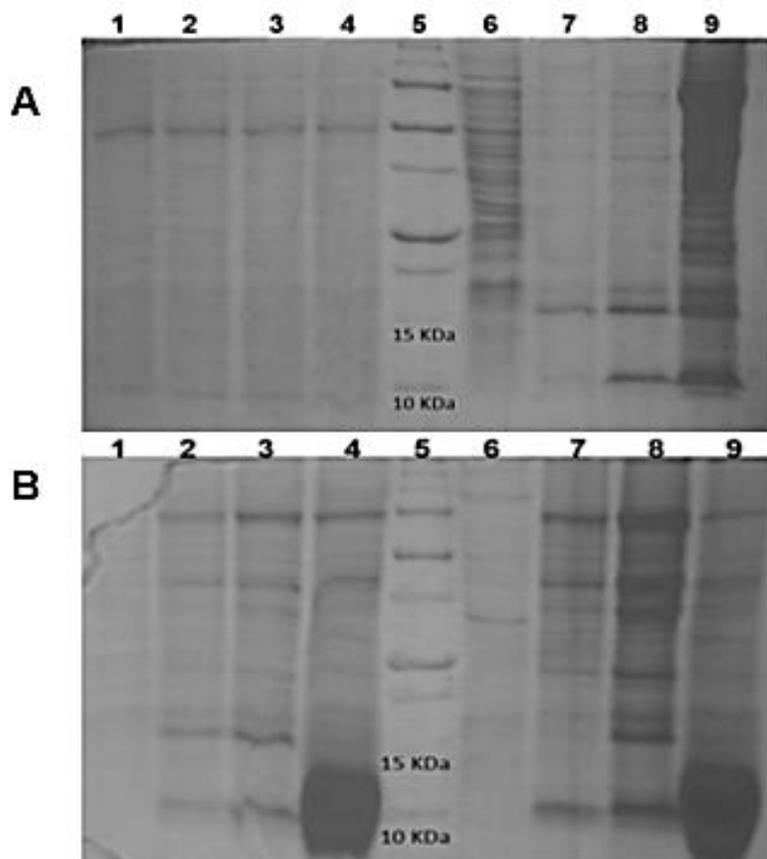
Es importante mencionar que de haberse obtenido la construcción se habría expresado una proteína de fusión en la que la etiqueta Nus-tag del N-terminal permitiría tener una proteína con mayor solubilidad a diferencia de otras proteínas producidas en *E. coli* con otros sistemas, ya que en ausencia de Nus-tag, estas son producidas como proteínas de inclusión y deben someterse a un tratamiento para poderlas solubilizar. Asimismo la presencia de la etiqueta His-tag le hubiera permitido ser purificada por cromatografía de afinidad y posteriormente podría haber sido digerida por la enzima enterocinasa, dejándola con un N-terminal libre, lo cual esperábamos permitiera analizar la actividad biológica de la hormona recombinante de una forma más cercana a la actividad real de la hormona nativa. Existen hormonas hiperglucémicas de crustáceos recombinantes que han sido producidas de esta forma tal como la CHH de *M. japonicus*, que mostró ser un forma soluble y tener actividad biológica (Nagai *et al*, 2009; Inoue *et al*, 2011).

Sin embargo, debido a que no se logró obtener la construcción esperada, se decidió continuar con el siguiente objetivo referente a la expresión de la hormona recombinante CHH-A<sub>His</sub> con un C-terminal adicional empleando la construcción SMD1168H-CHHA<sub>H</sub>.

## 6.2 Optimización de la expresión de CHH-A en *P. pastoris*

### 6.2.1. Inducción con medio complejo (BMMY) y medio mínimo (BMM)

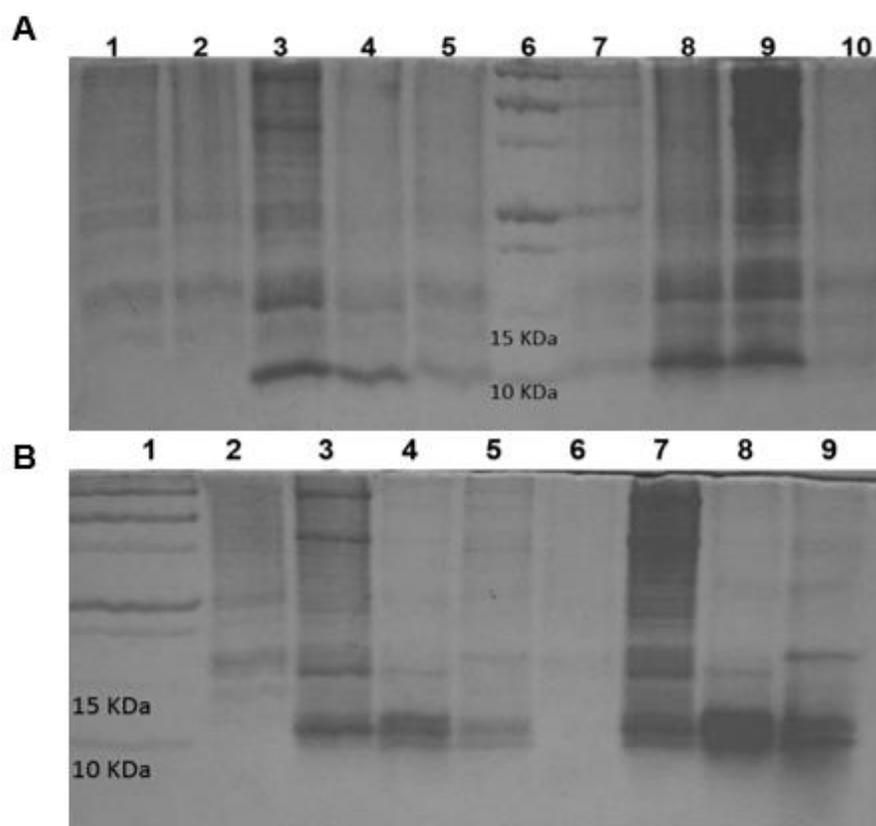
En la determinación de las condiciones óptimas de expresión de la neurohormona rCHH-A<sub>His</sub>, con un peso teórico de 12.1 KDa (Sánchez-Castrejón, 2007), se observaron diferencias al emplear dos medios de cultivo. Al realizar la inducción en el medio complejo se observó la banda del tamaño esperado alrededor de los 15 KDa (debido al C-terminal adicional). La expresión de rCHH-A<sub>His</sub> se presentó a partir de las 24 horas de inducción en las condiciones de 1, 2 y 4% de metanol (Fig. 17A), a las 48 horas con 1 y 2% y a las 72 h sólo se observó claramente al 2%. Al utilizar altas cantidades de metanol (4%) y largo tiempo de inducción (48 y 72 h) se observó una banda discreta del tamaño esperado (Fig. 17B).



**Figura 17. Inducción con medio rico correspondiente a la inducción en medio BMMY. A) Carril 1, 2, 3 y 4: corresponden a la muestra inicial de 0, 1, 2, 3 y 4% de metanol; carril 5: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards® (BIO RAD); carriles 6, 7, 8 y 9: inducción a 24 h con 0, 1, 2, 3 y 4 % de metanol respectivamente. B) Inducción con medio complejo correspondiente a la muestra de 48 h y a las 72 h de inducción. Carriles 1, 2, 3 y 4: muestras de inducción con 0, 1, 2 y 4% de metanol a 48 h; carril 5: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards® (BIO RAD); carriles 6, 7, 8 y 9: inducción con 0, 1, 2, 3 y 4% de metanol a 72 h.**

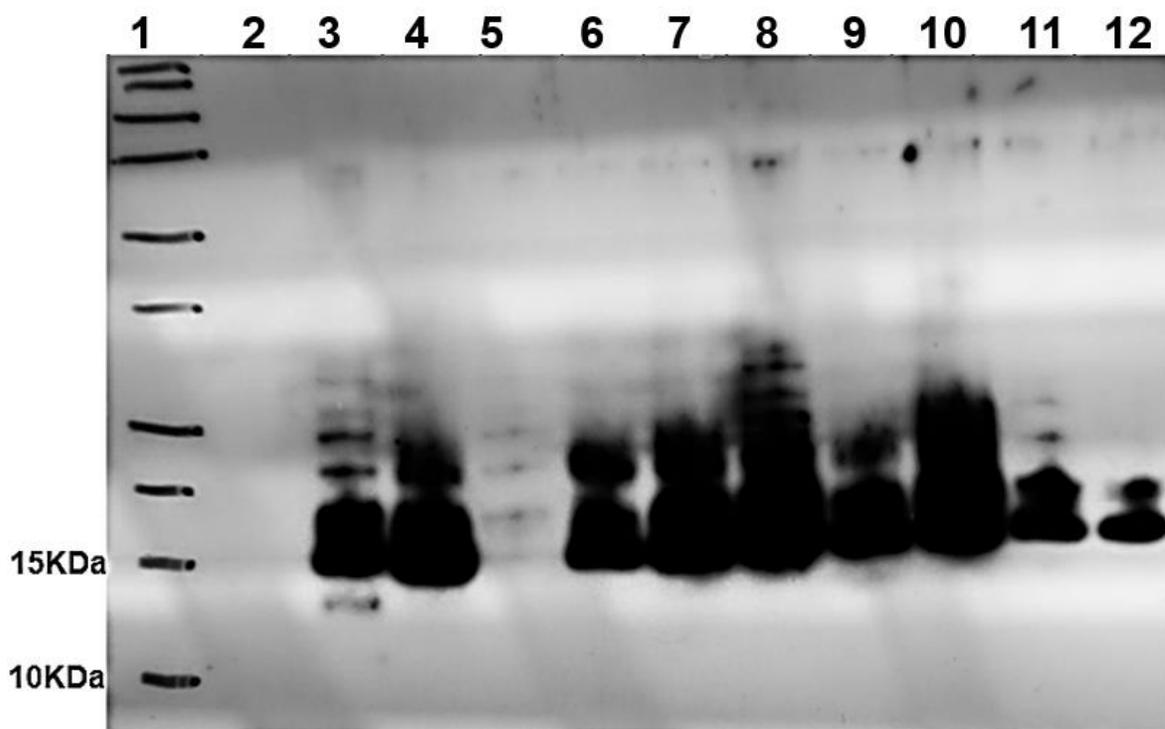
Con estos resultados, se estableció que la inducción BMMY durante 24 horas y 2% de metanol es la condición óptima para la expresión de CHH-A<sub>His</sub>, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Sánchez-Castrejón (2007) y Camacho-Jiménez (2011) para CHH-B1.

Por otra parte, en el caso de la inducción con medio mínimo, la expresión de la proteína del tamaño esperado de CHH-A<sub>His</sub> se comenzó a observar a partir de las 24 horas de inducción en las condiciones de 1% y 2% de metanol, a las 48 horas en 1 y 2% (Fig. 18A) y se mantuvo a hasta las 72 y 96 horas con 1% (Fig. 18B).



**Figura 18. Inducción con medio mínimo. A) Carril 1: muestra inicial de inducción; carril 2, 3, 4 y 5: inducción a 24 h con 0, 1, 2 y 4% de inducción; carril 6: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIO RAD); carril 7, 8, 9 y 10: inducción a 48 h con 0, 1, 2, 3 y 4% de metanol. B). Inducción con medio mínimo correspondiente a la muestra de 72 y 96 h de inducción. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIO RAD); carril 2, 3, 4 y 5: inducción a 72 h con 0, 1, 2 y 4% de inducción; carril 6, 7, 8 y 9: inducción a 96 h con 0, 1, 2, 3 y 4% de metanol.**

De las condiciones de expresión evaluadas y analizadas mediante electroforesis desnaturante tricina SDS-PAGE en geles de poliacrilamida, se seleccionaron condiciones de ambos medios donde se aprecia la expresión de rCHH-A<sub>His</sub> y se analizaron mediante inmunodetección (Fig. 19), con el propósito de corroborar la presencia de rCHH-A<sub>His</sub> y a su vez seleccionar la condición que proporcionará una mayor cantidad de proteína.



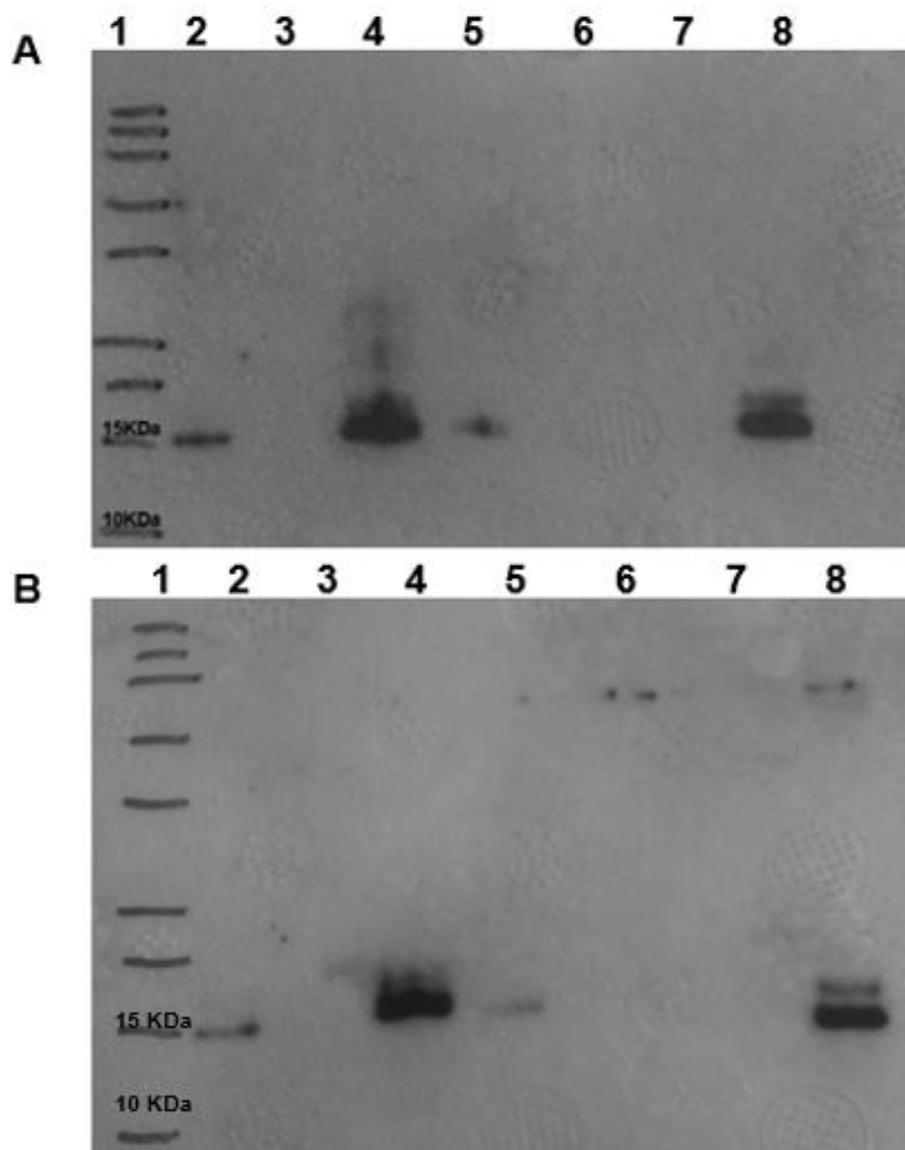
**Figura 19.** Análisis por Western Blot para la determinación de condiciones óptimas de expresión de CHH-A<sub>His</sub>. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (BIO RAD); carril 2: muestra inicial de inducción con BMMY; carriles 3 y 4: inducción con BMMY a 48 h con 4 y 2% de metanol; carriles 5, 6, 7 y 8: inducción con BMMY a 24 h con 0, 1, 2, 3 y 4% de metanol respectivamente; carriles 9 y 10: inducción con BMMY a 48 h con 1 y 2% de metanol; carril 11: inducción con BMM a 24 h con 1% de metanol; carril 12: inducción con BMM a 48 h con 2% de metanol.

El análisis mediante Western Blot confirmó la presencia de la neurohormona recombinante en varias condiciones. Sin embargo, al comparar estos resultados con los de Coomassie. Se seleccionó la condición de inducción en BMMY con 2% de metanol durante 24 horas, ya que en estas condiciones se logró una buena expresión de la hormona recombinante en el menor tiempo y con la menor cantidad de proteínas adicionales, por lo que se seleccionó para la purificación a un mayor volumen. Por otra parte, se observó otra banda de un tamaño por encima de los 15 kDa, la cual ya había sido observado anteriormente (Sánchez-Castrejón, 2007), lo que pudiera explicarse por la formación de diferentes conformaciones de la hormona o multímeros concatenados unidos covalentemente. Para dilucidar esto, sería necesario realizar una secuenciación del N-terminal de ambos péptidos.

### **6.2.2 Purificación y cuantificación de rCHH-A<sub>His</sub>**

Con las condiciones óptimas establecidas, se realizó la inducción a mayor volumen, el cual consistió de 2 lotes de 50 ml de MMY. El sobrenadante obtenido del lote 1 (Fig. 20A) y el del lote 2 (Fig. 20B) fueron purificados mediante cromatografía de afinidad y analizados por Western Blot, donde se evidenció la presencia de la neurohormona, principalmente en la segunda y tercer fracción eluída, de las cuales solo se mezclaron las segundas eluciones de cada lote para proceder con la diálisis y cuantificación.

Así mismo, dada la gran cantidad obtenida de rCHH-A<sub>His</sub>, se sugiere que el exceso de proteína recombinante saturó la capacidad de retención de la columna de purificación (Fig. 20), lo cual se observó al detectarse la banda correspondiente a CHH-A<sub>His</sub> en la muestra del lavado, el cual puede ser purificado para recuperar esa fracción de proteína recombinante.



**Figura 20.** Análisis de los resultados de la purificación de rCHH-A<sub>His</sub> mediante Western Blot. **A)** Purificación lote 1. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (BIO RAD); carril 2: muestra antes de purificar; carril 3, 4, 5, 6 y 7: Fracciones de elución; carril 8: muestra del lavado de la columna. **B)** Purificación lote 2. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (BIO RAD); carril 2: muestra antes de purificar; carril 3, 4, 5, 6 y 7: Fracciones de elución; carril 8: muestra del lavado de la columna.

Dado que para el bioensayo se requiere tener a rCHH-A<sub>His</sub> disuelta en PBS 1X, esta se dializó para eliminar la solución de elución, con el propósito de tener a rCHH-A<sub>His</sub> en una solución salina amortiguadora para los ensayos de actividad biológica.

La cuantificación de rCHH-A<sub>His</sub> purificada se realizó a través de una curva estándar de albúmina de suero bovino (Fig. 21). Lo resultados mostraron que se obtuvo una

concentración de 158.071  $\mu\text{g/ml}$  en un volumen de 1.2 ml. Esto indica que se obtuvo un rendimiento de 3.78 mg/L. La cantidad obtenida de rCHH-A<sub>His</sub> fue suficiente para proceder con ensayos *in vivo* y determinar su actividad hiperglucémica.

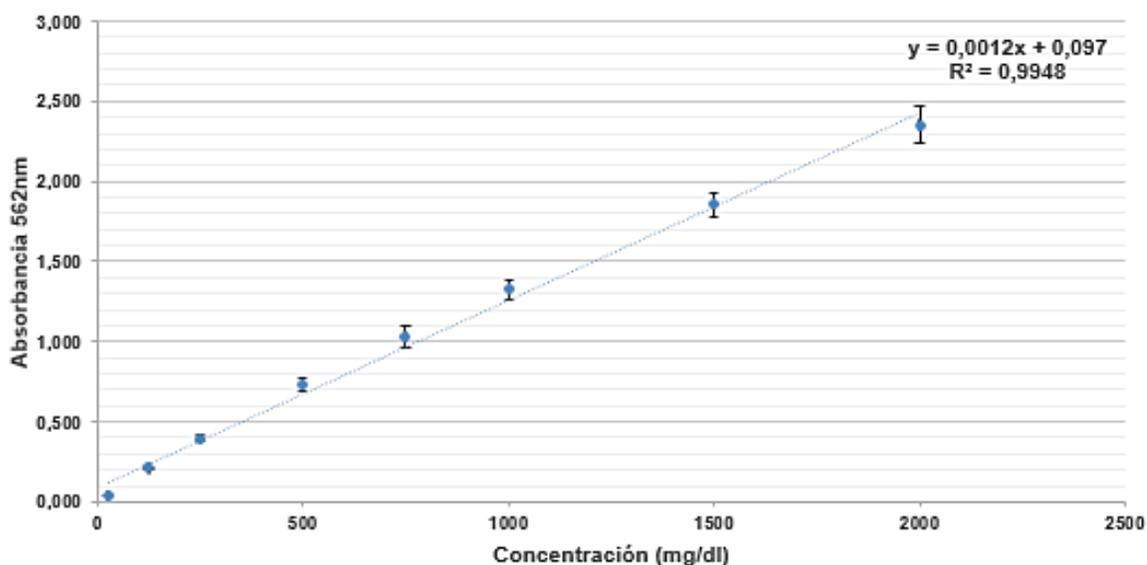


Figura 21. Curva estándar de albúmina de suero bovino.

La neurohormona (rCHH-A<sub>His</sub>) se intentó expresar anteriormente en la cepa KM71 (*arg4 aox1::ARG4*), sin embargo, la proteína no fue detectada en el medio de cultivo pero si como ARNm, lo cual sugiere que se expresó pero no se tradujo. Por otra parte en este trabajo rCHH-A<sub>His</sub> fue expresada y purificada exitosamente en la cepa SMD1168H, la cual es deficiente de la peptidasa A. Esto sugiere que la hormona rCHH-A<sub>His</sub> pudiera haber estado siendo degradada por proteasas en la cepa KM71. No obstante, si fue posible producir la hormona recombinante rCHH-B1<sub>His</sub> utilizando la KM71. Sin embargo, CHH-B1<sub>His</sub> presentó la mejor expresión al utilizar 4% de metanol durante 24 horas (Sánchez-Castrejón, 2007).

Por otra parte, el rendimiento obtenido en este trabajo en *P. pastoris* fue de 3.78 mg/L, lo cual fue menor al reportado por Camacho-Jiménez (2011) al expresar CHH-B1<sub>His</sub>, siendo 5.72 mg/L y también reportado por Sánchez-Castrejón (2007), ya que fue de 8.7

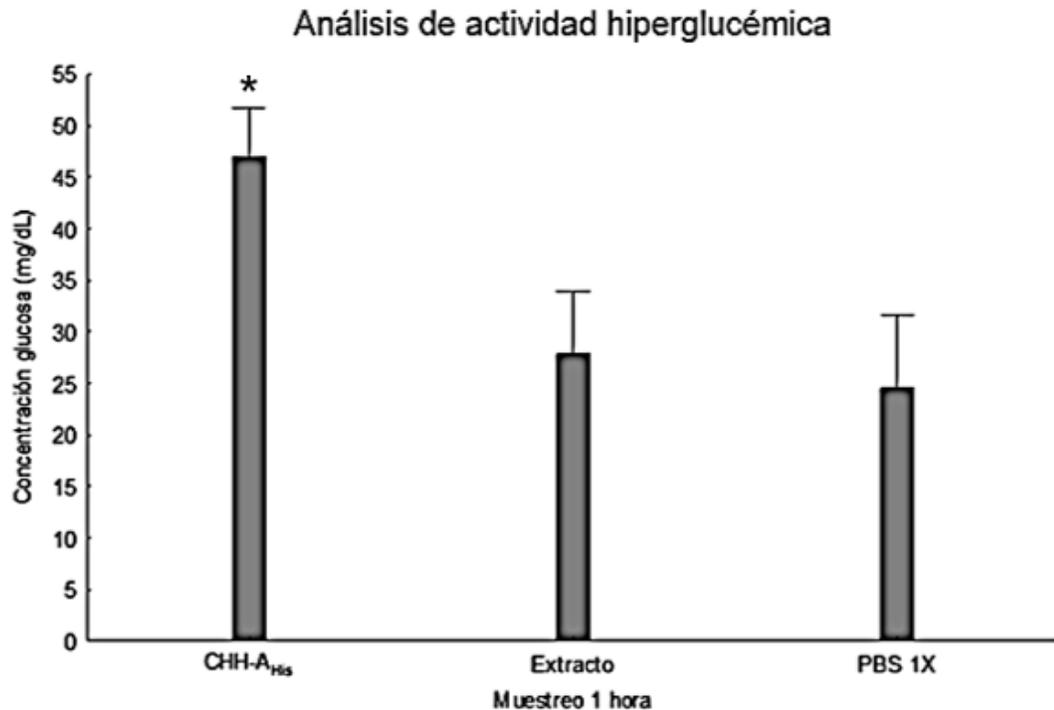
mg/L. Sin embargo, el rendimiento obtenido fue mayor al reportado por Ohira (2003), quien obtuvo 0.4 mg/L de Pej-SGP-III utilizando el vector pPIC9K.

Aunque esta neurohormona fue expresada con un C-terminal adicional que comprende de 28 aminoácidos, una vez purificada es posible remover 23 de los 28 aminoácidos adicionales mediante digestión con la proteasa enterocinasa. Trabajos previos han comprobado que este C-terminal adicional no interfiere con la actividad hiperglucémica de la neurohormona CHH-B1<sub>His</sub> (Sánchez-Castrejón, 2007; Camacho-Jiménez, 2011).

### **6.3 Ensayo de actividad biológica de la neurohormona recombinante CHH-A<sub>His</sub>**

La secuencia del péptido maduro de CHH-A presenta la señal de amidación (GK) en el extremo C-terminal. Tal modificación se ha asociado al aumento de la actividad hiperglucémica (Kim *et al*, 2001; Nagai *et al*, 2009; Ohira *et al*, 2003). Sin embargo, la proteína recombinante rCHH-A<sub>His</sub> producida con el C-terminal adicional no presenta dicha modificación, dado que el carboxilo terminal del péptido se encuentra unido a las etiquetas adicionales en esta región (sitio para enterocinasa, His-tag y *c-myc*).

Para la evaluación de la actividad hiperglucémica de rCHH-A<sub>His</sub> se analizaron los niveles de glucosa en la hemolinfa de los diferentes organismos inyectados con PBS 1X, extracto de glándulas y rCHH-A<sub>His</sub>. El análisis estadístico realizado entre los grupos de datos mostró que existe una diferencia significativa ( $P < 0.050$ ) al comparar los niveles de glucosa de rCHH-A<sub>His</sub> ( $46.963 \pm 16.071$  mg/dl) con respecto al control con PBS ( $24.528 \pm 2.107$ ) (Fig. 22) pero no así entre el extracto de glándulas ( $27.835 \pm 5.772$  mg/dl) y el PBS ( $P = 0.396$ ). Estos resultados indican que la neurohormona rCHH-A<sub>His</sub> fue activa en presencia de un C-terminal adicional.



**Figura 22.** Análisis de actividad hiperglucémica de rCHH-A<sub>His</sub>. La columna de PBS 1X (solución salina) representa el control negativo y el extracto como control positivo. El asterisco indica la diferencia significativa ( $P < 0.05$ , prueba de Tukey) respecto al control negativo. Los resultados son representados con su error estándar.

De hecho, la neurohormona recombinante CHH-B1<sub>His</sub> de *L. vannamei*, con el mismo C-terminal presente en rCHH-A<sub>His</sub> (Sánchez-Castrejón *et al*, 2008), también presentó actividad hiperglucémica (20 mg/dl) al inyectar 2  $\mu$ g de esta neurohormona a camarones ablacionados unilateralmente. En general, la ablación unilateral afecta los niveles de glucosa en hemolinfa (Sainz *et al*, 2008).

Wanlem y colaboradores (2011), evaluaron la actividad hiperglucémica de la hormona rLV-CHH de *L. vannamei* con un C-terminal adicional (His-tag y epítipo V5). La hormona rLV-CHH fue obtenida utilizando como referencia la secuencia de la CHH-A depositada al NCBI (AY434016) por nuestro grupo (Lago-Lestón *et al*, 2007). Al alinear ambas hormonas estas presentan una homología del 99%. La actividad obtenida por rLV-CHH fue el doble (95 mg/dl) de los niveles obtenidos para rCHH-A<sub>His</sub> a 1 hora post-inyección. Sin embargo, Wanlem y colaboradores (2011) inyectaron 25  $\mu$ g de hormona recombinante producida en *E. coli* a organismos sin ablacionar, lo que representa más de 10 veces la concentración utilizada en el presente trabajo. Estos resultados

muestran que la hormona CHH-A puede ser producida en forma activa como proteína de fusión tanto utilizando sistemas procariotas como eucariotas. Por otro lado, Ohira (2003), reportó actividad hiperglucémica al evaluar neurohormona Pej-SGP-III del organismo *Penaeus japonicus* ablacionados bilateralmente y producida en *P. pastoris*, obteniendo niveles de glucosa en hemolinfa de 8.23 mg/dl al inyectar 100 pmol (0.9 µg) de la neurohormona recombinante amidada, pero no observó diferencia significativa entre el control con PBS y la neurohormona rPej-SGP-III-Gly sin amidar (4.25 mg/dl).

De igual forma Nagai y colaboradores (2009) observaron el aumento de los niveles de glucosa ( $11.18 \pm 4.44$  mg/dl) al inyectar 100 pmol (0.9 µg) de rPej-SGP-VII amidada, producida en un sistema de expresión procariota e inyectada a organismos ablacionados bilateralmente dos días previos a la inyección, en cambio, la respuesta fue menor al inyectar la misma concentración con la no amidada (rPej-SGP-VII-Gly). Estos autores sugieren que la amidación es una modificación importante que repercute directamente en la actividad de la neurohormona. Sin embargo, la hormona rCHH-A<sub>His</sub> producida en este trabajo mostró ser activa aun sin amidar y en presencia de un C-terminal adicional.

## 7. Conclusiones

---

Se realizó el diseño de la secuencia optimizada del ADN que codifica para la hormona CHH-A de acuerdo al uso de codones preferencial de *E. coli*. La compañía que lo produjo reportó el análisis teórico que mostró una reducción en el contenido de GC y un aumento de la vida media del ARNm, así como la eliminación de las estructuras de tallo y asa.

Aun cuando no se logró la clonación de la neurohormona CHH-A en el sistema de expresión procariota *E. coli* BL21 pET44a(+), debido a problemas de contaminación por un mal manejo de muestras, no se descarta que pueda utilizarse para la expresión de este tipo de neurohormonas, permitiéndoles una mayor solubilidad y plegamiento en comparación con otros sistemas de *E. coli*.

Las condiciones óptimas de expresión de la neurohormona CHH-A con un extremo C-terminal adicional (His-tag, *c-myc* y sitio para enterocinasa) en *P. pastoris* fueron 2% de metanol por 24 horas y utilizando un medio complejo (BMMY), obteniéndose un rendimiento de 3.78 mg/l.

Los ensayos de actividad biológica realizados con la rCHH-A<sub>His</sub> producida en *Pichia*, mostraron que se obtuvo una forma activa aun con la presencia del C-terminal adicional. La hormona presentó actividad hiperglucémica significativa ( $46.963 \pm 16.071$  mg/dl) en comparación con el control de PBS ( $24.528 \pm 2.107$  mg/dl) ( $p=0.05$ ).

## 8. Perspectivas

---

Llevar a cabo la subclonación de la secuencia optimizada de CHH-A en el sistema pET *E. coli* BL21 (DE3).

Dado que CHH-A se expresa en diversos tejidos, sería de gran interés realizar bioensayos para evaluar la actividad hiperglucémica de esta neurohormona en diferentes condiciones ambientales y nutricionales, así como evaluar su participación en otros procesos fisiológicos asociados con las CHH's como metabolismo de lípidos, osmoregulación e inhibición de la muda.

## Lista de referencias

---

- 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 crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Presence of a d-amino acid. *Peptides*, 16(8), 1375-1383.
- Böcking, D., Dirksen, H., y Keller, R. (2002). The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. In *The crustacean nervous system* (pp. 84-97). Springer Berlin Heidelberg.
- Camacho Jiménez, Laura. (2011). Papel de la dopamina y de la neurohormona recombinante chh-b1 en la modulación de respuestas fisiológicas en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. CICESE. Tesis de Maestría. 103 p.
- Candiano G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. y Righetti, P. G. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. Vol. 25. 9:1327–1333.
- 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*. *Biochemical and biophysical research communications*, 171(2), 818-826.
- Chang, E. S., Keller, R., y Chang, S. A. (1998). Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*, Following Various Stresses. *General and comparative endocrinology*, 111(3), 359-366.
- Chang, C. C., Tsai, K. W., Hsiao, N. W., Chang, C. Y., Lin, C. L., Watson, R. D., y Lee, C. Y. (2010). Structural and functional comparisons and production of recombinant crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and CHH-like peptides from the mud crab *Scylla olivacea*. *General and comparative endocrinology*, 167(1), 68-76.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K. P. C., Aiken, D. E., y Van Herp, F. (1994). Involvement of Eystalk Factors in the Neuroendocrine Control of Osmoregulation in Adult American Lobster *Homarus americanus*. *General and comparative endocrinology*, 94(3), 281-293.
- Chen, S. H., Lin, C. Y., y Kuo, C. M. (2005). In silico analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Marine Biotechnology*, 7(3), 193-206.

- Chen, S. H., Lin, C. Y., y Kuo, C. M. (2004). Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Marine biotechnology*, 6(1), 83-94.
- Chung, J. S., Wilkinson, M. C., y Webster, S. G. (1998). Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. *Regulatory peptides*, 77(1), 17-24.
- Chung, J. S., y Webster, S. G. (2003). Moulting cycle-related changes in biological activity of moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 270(15), 3280-3288.
- Daly, R., y Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119-138.
- Davis, D. A., Samocha, T. M., y Boyd, C. E. (2004). Acclimating Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to inland, low-salinity waters. Stoneville, Mississippi: Southern Regional Aquaculture Center.
- De Kleijn, D. P., de Leeuw, E. P., van den Berg, M. C., Martens, G. J., y van Herp, F. (1995). Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1260(1), 62-66.
- Fanjul-Moles, M. L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3), 390-400.
- Fingerman, M. (1997). Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiological Zoology*, 257-269.
- Fingerman, M. (2009). Regulación endocrina de crustáceos. En J. J. Paniagua Michel. *Biología Marina*. México: AGT editor, S. A., 277-308.
- Frias-Espericueta, M. G., Harfush-Melendez, M., Osuna-López, J. I., y Paez-Osuna, F. (1999). Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 62(5), 646-652.
- Garcia, U., y Aréchiga, H. (1998). Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cellular and molecular neurobiology*, 18(1), 81-99.

- Hopkins, P. M. (2012). The eyes have it: a brief history of crustacean neuroendocrinology. *General and comparative endocrinology*, 175(3), 357-366.
- 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.
- Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191(1), 191-208.
- Inoue, H., Tsutsui, N., Nagai, C., Nagata, K., Tanokura, M., y Nagasawa, H. (2011). Crystallization and preliminary X-ray analysis of crustacean hyperglycaemic hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* in its weakly active precursor form. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(12), 1586-1589.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., y Nagasawa, H. (2002). Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*, 23(9), 1537-1546.
- Keller, R. (1992). Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia*, 48(5), 439-448.
- Keller, R., Haylett, B., y Cooke, I. (1994). Neurosecretion of crustacean hyperglycemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline K<sup>+</sup> concentration quantified by a sensitive immunoassay method. *Journal of experimental biology*, 188(1), 293-316.
- Kim, K. H., y Seong, B. L. (2001). Peptide amidation: Production of peptide hormones *in vivo* and *in vitro*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(4), 244-251.
- Lago-Lestón, A., Ponce, E., y Muñoz, M. E. (2007). Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture*, 270(1), 343-357.
- Laufer, H., Borst, D., Baker, F. C., Reuter, C. C., Tsai, L. W., Schooley, D. A., y Sinkus, M. (1987). Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science*, 235(4785), 202-205.
- Lee, K. J., Doran, R. M., y Mykles, D. L. (2007). Crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Cloning, isoforms, and tissue expression. *General and comparative endocrinology*, 154(1), 174-183.

- Liu M, Pan L, Li L, Zheng D. (2013). Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Peptides*. 28 p
- Mosco, A., Edomi, P., Guarnaccia, C., Lorenzon, S., Pongor, S., Ferrero, E. A., y Giulianini, P. G. (2008). Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. *Regulatory peptides*, 147(1), 88-95.
- Nagai, C., Asazuma, H., Nagata, S., Ohira, T., y Nagasawa, H. (2009). A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides*, 30(3), 507-517.
- Ohira, T., Katayama, H., Aida, K., y Nagasawa, H. (2003). Expression of a recombinant crustacean hyperglycemic hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fisheries Science*, 69(1), 95-100.
- Sainz-Hernández, J. C., Racotta, I. S., Dumas, S., y Hernández-López, J. (2008). Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*, 283(1), 188-193.
- Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, M. B., y Díaz, F. (2008). Molecular cloning and expression of a putative crustacean hyperglycemic hormone of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4), 9-10.
- Sánchez Castrejón Edna. (2007). Producción de la neurohormona recombinante hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. CICESE. Departamento de Biotecnología Marina. Tesis de Doctorado. 138 p.
- Sambrook, J., Russell, D. W., y Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set) (Vol. 999). Cold Spring Harbor, New York: *Cold spring harbor laboratory press*.
- Santos, E. A., Eduardo, L., Nery, M., Gonçalves, A. A., y Keller, R. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological and Biochemical Zoology*, 70(4), 415-420.
- Schägger, H., y Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soye, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., y Spanings-Pierrot, C. (2003). Putative involvement of crustacean hyperglycemic

hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of experimental biology*, 206(6), 979-988.

- Serrano, L., Grousset, E., Charmantier, G., y Spanings-Pierrot, C. (2004). Occurrence of L-and D-crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the eyestalk X-organ/sinus gland complex during the ontogeny of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(9), 1129-1140.
- Sigala-Andrade, H.M. 2010. Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. B.C. México. 100 p.
- Spaziani, E., Rees, H. H., Wang, W. L., y Watson, R. D. (1989). Evidence that Y-organs of the crab *Cancer antennarius* secrete 3-dehydroecdysone. *Molecular and cellular endocrinology*, 66(1), 17-25.
- Sun, P. S. (1995). Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Molecular marine biology and biotechnology*, 4(3), 262-268.
- Treerattrakool, S., Udomkit, A., y Panyim, S. (2006). Anti-CHH antibody causes impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 39(4), 371.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., y Ochoa, J. L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 299-303.
- Wanlem, S., Supamattaya, K., Tantikitti, C., Prasertsan, P., y Graidist, P. (2011). Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against bacterial infection. *Fish & shellfish immunology*, 30(3), 877-885.
- Webster, S.G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *The Journal of Experimental of Biology*. 199: 1579-1585 p.
- Wenk, M. R., y Fernandis, A. Z. (2007). Manuals in biomedical research. *A Manual for Biochemistry Protocols*, 3, 90.

## Anexos

---

### 1. Ligación

Primeramente se calculó la cantidad de inserto utilizando la fórmula sugerida por el proveedor de la enzima (Promega) que consiste en:

La cantidad de inserto es igual a:

$((100 \text{ ng vector}) (\text{tamaño en Kb inserto}) / \text{tamaño en Kb vector}) (\text{Relación 3:1})$

Por lo tanto:

$((100 \text{ ng pET}) (0.230 \text{ Kb}) / 7.3 \text{ Kb}) (3/1) = \underline{9.45 \text{ ng de inserto}}$

Por otra parte, se utilizó la fórmula calculada en función a la Relación Molecular (RM) entre el vector y el inserto. Tomando en cuenta que el peso molecular promedio de una base nitrogenada es de 330, se determinó que el peso molecular para pET44<sup>+</sup> es de 2, 409, 000 y del inserto *chhA* optimizada es de 75, 900. Por lo tanto, la RM entre el vector y el inserto es de 31.73. Se consideró también el uso de 50ng de pET44a(+), dado que es una cantidad considerada suficiente para una reacción de ligación.

Con estos datos, se procedió con la fórmula siguiente:

$\text{Inserto (ng)} = (\text{ng vector}) (\text{Tamaño en Kb inserto}) (\text{RM}) / \text{Tamaño en Kb vector}$

Entonces:

$\text{Inserto (ng)} = (50 \text{ ng pET44}^+) (0.230 \text{ Kb}) (31.73) / 7.3 \text{ Kb} = \underline{49.98 \text{ ng de inserto.}}$

Para la ligación calculada por RM: en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  se adicionaron 1  $\mu\text{l}$  de buffer de ligación 2X (Promega), 2  $\mu\text{l}$  de pET44a(+) (52.8  $\mu\text{g}$ ), 3.6  $\mu\text{l}$  de *chhA* optimizada (50.4  $\mu\text{g}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de enzima ligasa T4 (3 U/ $\mu\text{l}$ ) (Promega) y 2.4  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril. Para la reacción de ligación con la fórmula sugerida por el proveedor (Promega) se adicionaron en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  de buffer de ligación 2X (Promega), 3.8  $\mu\text{l}$  de pET44a(+) (100.32  $\mu\text{g}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de *chhA* optimizada (14  $\mu\text{g}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de enzima ligasa T4 (3 U/ $\mu\text{l}$ ) (Promega) y 3.2  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril.