

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



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

**Expresión y purificación de la hormona hiperglucémica de
crustáceos recombinante nativa (rCHH-A_N) y su participación
en osmorregulación en *Litopenaeus vannamei***

TESIS

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

Presenta:

Verónica Yesenia Balderas González

Ensenada, Baja California, México

2014

Tesis defendida por
Verónica Yesenia Balderas González

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
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 **Verónica Yesenia Balderas González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Expresión y purificación de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante nativa (rCHH-A_N) y su participación en osmorregulación en *Litopenaeus vannamei*.

Resumen elaborado por:

Verónica Yesenia Balderas González

La Hormona Hiperglucémica de Crustáceos (CHH) es la hormona más abundante producida en el órgano X-Glándula del seno, el principal centro neuroendócrino en crustáceos. La expresión de proteínas recombinantes en organismos como *Pichia pastoris* ha permitido obtener grandes cantidades de hormonas implicadas en los procesos endocrinos y fisiológicos. En el presente trabajo, se evaluó la expresión de la neurohormona CHH-A recombinante nativa (rCHH-A_N) de *Litopenaeus vannamei* a partir de dos cepas metilotróficas de *P. pastoris*, que contienen insertado en su genoma la secuencia que codifica para el péptido maduro de CHH-A (SMD1168H-CHHA_N y X-33-CHHA_N). Dos medios de cultivo (complejo y mínimo) fueron evaluados por 4 días, inducidos con diferentes concentraciones de metanol (0, 1, 2 y 4%). La mejor condición de expresión se obtuvo con la cepa X-33-CHHA_N, con el medio de cultivo complejo inducido con 2% de metanol por 24 horas. La hormona producida fue analizada en geles de Tricina SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie e identificada con un anticuerpo policlonal de conejo antiCHH-A. La proteína producida, en un mayor volumen, fue precipitada del medio de cultivo con sulfato de amonio al 50%, dializada y fraccionada por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase de reversa (RP-HPLC) y corroborada mediante el anticuerpo antiCHH-A. La rCHH-A_N purificada fue cuantificada por la técnica colorimétrica del ácido bicinconínico (BCA), obteniéndose un rendimiento final de 12.19 mg/l. La hormona fue utilizada para evaluar su efecto en osmorregulación mediante ensayos *in vivo* con camarones individuales subadultos de *L. vannamei* mantenidos a 26‰ inyectados en intermuda con 2 µg de rCHH-A_N o PBS 1X (control) y posteriormente expuestos a condiciones iso-osmótico (26‰) o hipo-osmótico (10‰). Se tomaron muestras de hemolinfa a los 0.5, 1, 2 y 24 horas postinyección. La presión osmótica fue medida con un osmómetro de vapor, y las proteínas totales y los iones Na⁺, Cl⁻ y K⁺ mediante kits comerciales colorimétricos. Los resultados mostraron un equilibrio osmótico en los camarones inyectados y expuestos a la salinidad de 26‰ y una respuesta hiper-osmótica en camarones inyectados y expuestos a una salinidad de 10‰. La hormona rCHH-A_N reestableció de manera significativa la capacidad osmorreguladora en la hemolinfa al cabo de 2 h posteriores a la exposición a condiciones de salinidad baja, a diferencia del tratamiento con PBS, sugiriendo la participación de CHH-A en los procesos de osmoregulación en condiciones hipo-osmóticas. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de iones (Na⁺, Cl⁻ y K⁺) entre los organismos inyectados con rCHH-A_N y los de PBS al ser expuestos tanto a 26‰ como a 10‰.

Palabras claves: *L. vannamei*, neurohormona recombinante, CHH-A, osmorregulación, *Pichia*.

Abstract of the thesis presented by **Verónica Yesenia Balderas González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Expression and purification of recombinant native Crustacean hyperglycemic hormone (rCHH-A_N) and its share in osmoregulation in *Litopenaeus vannamei*

Abstract by:

Verónica Yesenia Balderas González

The Crustacean Hyperglucemic Hormone (CHH) is the most abundant peptide produced in the X-Organ-sinus gland, the principal crustacean neurosecretory complex. The recombinant protein expression in organisms such as *Pichia pastoris* has yielded large amounts of hormones involved in endocrine and physiological processes. In this work, the expression of the native recombinant neurohormone CHH-A (rCHH-A_N) from *Litopenaeus vannamei* was evaluated from two methylotrophic *P. pastoris* strains containing inserted in the genome the sequence encoding the mature CHH-A peptide (SMD1168H-CHHA_N y X-33-CHHA_N). Two culture media (complex and minimum) were tested for 4 days, induced with different concentrations of methanol (0, 1, 2 and 4%). The best condition of expression was obtained with the strain X-33-CHHA_N, using the complex growth medium induced with 2% methanol for 24 hours. The hormone produced was analyzed on Tricine SDS-PAGE gels stained with Coomassie blue and identified with a polyclonal rabbit antibody antiCHH-A. The protein produced, in a larger volume, was precipitated from the culture medium with ammonium sulfate at 50%, dialyzed and fractionated by high performance liquid chromatography on reverse phase (RP-HPLC) and verified by antiCHH-A antibody. The purified rCHH-A_N was quantified by the bicinchoninic acid colorimetric assay (BCA) to give a final yield of 12.19 mg /l. The hormone was used to evaluate its effect on osmoregulation by *in vivo* assays with single subadult *L. vannamei* shrimps maintained at 26‰ individually injected at inter-moult with 2 µg of rCHH-A_N or 1X PBS (control) and subsequently exposed to a iso-osmotic (26‰) or hypo-osmotic (10‰) conditions. Haemolymph samples were drawn at 0.5, 1, 2 and 24 hours post injection. The osmotic pressure of haemolymph was measured in a vapor pressure osmometer, and total proteins and Na⁺, Cl⁻ and K⁺ ions were determined by colorimetric commercial kits. The results showed osmotic equilibrium of shrimps injected and exposed to 26‰ salinity, and a hyperosmotic response of shrimps injected and exposed to 10‰ salinity. rCHH-A_N injection was able to significantly restore the osmoregulatory capacity of the shrimps after 2 h of exposure to low salinity conditions, unlike the PBS treatment, suggesting the involvement of CHH-A in the control of osmoregulation in hypo-osmotic conditions. No significant differences were found in ion concentrations (Na⁺, Cl⁻ and K⁺) between organisms injected with rCHH-A_N and PBS after exposure to 26‰ or 10‰.

Key words: *L. vannamei*, recombinant neurohormone, CHH-A, osmoregulation, *Pichia*

Dedicatoria

*A mi madre, “**Martha**” **González Saavedra**, por todo el esfuerzo y dedicación que centró en el desarrollo de nosotros, sus hijos, para que fuéramos personas de bien. Gracias por todos los años en los que hemos sido siempre su primer lugar y por los que ha llegado a sacrificar incluso su propia felicidad. Su fortaleza me inspira. Este pequeño logro es también el suyo, y vamos por más.*

*A mis hermanos, **Martín (Hanuman)**, **Roberto (Wobet)** y **Lupita (manita)**, quienes de alguna u otra manera me han enseñado la importancia de la individualidad. A valorar las fortalezas que nos acompañan y a sacarles el mejor provecho. Cada uno por su rumbo, pero con la cabeza en alto y hacia adelante.*

*A mi apá, **Cesar A. Migoni**, quien ha sido una guía en los momentos más oportunos; ése empujoncito que a veces no sabemos que necesitamos. Gracias por ver en mi lo que yo misma no veía.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de su Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), por ayudarme con mis gastos de manutención durante el periodo 2012-2014 a través de la beca No. 345288.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme realizar mi maestría en sus instalaciones y por todas las facilidades que disfruté durante mi estancia.

Al personal, tanto administrativo como técnico, que facilitaron todos los trámites y procesos que implica el inicio, permanencia y terminación de un posgrado. Su esfuerzo se valora cada vez que aclaran con su experiencia todas nuestras dudas y facilitan los siguientes pasos.

A mi directora de tesis, Dra Elizabeth Ponce Rivas, por permitirme ser parte de su proyecto y darme todas las facilidades para llevar a cabo mi presente trabajo. Por confiar en mí en cada paso dado y escuchar con paciencia hasta las dudas más simples.

A los miembros de mi comité, Dr. Fernando Díaz y Dra. Bertha E. Lavaniegos por todos sus consejos y aportaciones a mi trabajo; así como las charlas extras que permitieron una mayor confianza.

Nuevamente a la Dra. Elizabeth Ponce; disfruté cada momento de mi estancia en su laboratorio. Su actitud y visión me animaron a dar mi máximo esfuerzo. Muchas gracias por la manera en la que estuvo siempre ahí para orientar con su vasta experiencia, tranquilizar o simplemente escuchar. Ha sido un verdadero honor trabajar con usted.

Nuevamente al Dr. Fernando Díaz quien siempre se vio animado para ayudarme y siempre con la mejor actitud. Por su donación de camarones a mitad de cuatrimestre que salvaron en gran medida el tiempo de mis bioensayos ¡Mil gracias!

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por toda la ayuda brindada durante mi inicio en el laboratorio (cuando más perdido está uno), todos los consejos, técnicas y trucos mostrados que me facilitaron en gran medida el trabajo. Gracias por compartir tu experiencia.

A mis “partners” Roberto C. Arredondo E. y Laura Camacho. Tan únicos e inigualables ¿Qué decir? Fui una persona con suerte de que coincidiéramos en el mismo laboratorio y proyecto. Roberto, gracias por siempre escucharme y darme mis cachetadas cuando la estaba regando; eres un gran amigo y científico (en general, una gran persona de esas de las que siempre puedes aprender nuevas cosas) y estoy realmente orgullosa de ti. Laura, gracias por toda la paciencia que me mostraste, creo que fuiste a la que más molesté con dudas :P y aun así, siempre me ayudaste y siempre pude contar con ello, espero pagártelo de alguna manera. A los dos, por todos los momentos de desestrés que compartimos (¡¡tan necesarios!!) Chicos... ¡son cosa seria!

A Jolian Alers, Adriana Cáceres, Daniela Durazo, Paola Ramírez y Melinda Cárdenas por formar conmigo un equipo de trabajo (en estadísticaaaa) y equipo de amigas. Nos distanciamos pero no olvido el gran apoyo que ha significado su amistad.

Al Ing. Ernesto Lerma, por ayudarme a armar gran parte de las instalaciones de mi bioensayo y, además, ser un amigo durante el proceso.

A Ariana Montiel, próxima Bioingeniera, por el gran trabajo que realizaste con los camarones de mi bioensayo durante tu servicio social. Te conocieron más a ti que a mí. Gracias por el tiempo brindado y la dedicación mostrada; eres una chica muy fuerte y decidida y la verdad que me sorprendió tu esfuerzo. Qué te puedo decir; llegarás lejos, “mushashita”.

A mi apá, Cesar Migoni, por todos sus consejos y apoyo, su confianza en mí y, en general, por ser mi padre. De igual manera, a Gisela Félix, por sus sonrisas y ánimo siempre vivo. Los quiero mucho a ambos.

A todos aquellos amigos que son parte de mi familia y que he tenido la fortuna de seguir frecuentando. Gracias porque siempre se vieron interesados en mis avances, así como yo lo estoy de los suyos, y por cuidarme en cada etapa y darme de los mejores momentos de mi vida. Han y seguirán marcado mi vida. Gracias Cindy Collins, Silvia Villegas, Kee Whun Dan, Silvia Calderón, Lluvia Dorantes, Berenice Silva, Javier Robles, Daniel (Paz), Cotte Zazueta, Roberto y Laura. También a todos aquellos a quienes estoy conociendo y siempre tienen esa pregunta “¿y qué sigue para Yesenia después de la maestría?”... ¿por qué lo hacen? ☺

Y a Alfonso Cervantes, a quien le debo mucho y con quien siempre estaré agradecida. Mi pequeño amigo ardilla :3

Tabla de contenido

Resumen en español	iii
Resumen en inglés	iv
Dedicatoria	v
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Principales estructuras endócrinas de los crustáceos.....	5
2.2 Isoformas de CHH en distintos crustáceos. Polimorfismo.....	8
2.3 Multifuncionalidad de CHH.....	9
2.4 Regulación neuroendocrina en la osmorregulación de crustáceos.	10
2.5 Expresión de CHH en <i>L. vannamei</i>	13
2.5.1 CHH-A en <i>L. vannamei</i>	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	18
5.1 Objetivos generales.	18
5.2 Objetivos específicos.	18
6. Material y métodos	19
6.1 Inducción de clonas.....	19
6.2 Análisis de las proteínas en geles de Tricina SDS-PAGE.....	20
6.2.1 Preparación de las muestras.	20
6.2.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Tricina SDS-PAGE) y tinción.	21
6.3 Inmunodetección de la proteína CHH-A recombinante nativa.....	21

Tabla de contenido (continuación)

6.3.1	Electrotransferencia semiseca.....	22
6.3.2	Inmunodetección por anticuerpo policlonal antiCHH-A.....	22
6.4	Expresión de CHH-A en un mayor volumen con base a las condiciones óptimas	23
6.5	Precipitación por sulfato de amonio (SA)	23
6.5.1	Gradiente de saturación con sulfato de amonio.....	24
6.5.2	Elección de punto de saturación para precipitación de CHH-A	24
6.6	Cuantificación por Ácido Bicinconínico (BCA) de proteínas totales	25
6.7	Purificación de CHH-A por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)	26
6.8	Cuantificación por BCA de CHH-A recombinante nativa (mg/L)	27
6.9	Secuenciación del N-terminal de la proteína purificada	27
6.10	Crecimiento y mantenimiento de organismos	28
6.11	Bioensayo	28
6.11.1	Condiciones experimentales.....	29
6.11.2	Tratamientos.....	30
6.11.3	Obtención y determinación de las respuestas fisiológicas en la hemolinfa.....	31
6.11.4	Análisis estadísticos.....	33
7.	Resultados y discusión.....	34
7.1	Inducción de las clonas	34
7.3	Selección de condiciones de expresión de CHH-A.....	39
7.4	Precipitación de CHH-A por sulfato de amonio	40
7.4.1	Gradiente de precipitación por sulfato de amonio (SA)	40
7.5	Diálisis.....	41
7.6	Purificación de CHH-A por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)	43
7.6.1	Análisis de las fracciones purificadas por RP-HPLC	44
7.7	Efecto de CHH-A recombinante nativa en la Capacidad Osmorreguladora (CO) de <i>L. vannamei</i> mantenido a 26 ‰	46
7.8	Efecto de CHH-A recombinante nativa en la Capacidad Osmorreguladora (CO) de <i>L. vannamei</i> mantenido a 10 ‰	49

Tabla de contenido (continuación)

7.9	Efecto de CHH-A sobre los niveles de Proteínas totales en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i>	54
7.9.1	Salinidades cercanas a las iso-osmóticas	54
7.9.2	Salinidades hipo-osmóticas (10‰)	57
7.10	Análisis de iones Cl ⁻ , Na ⁺ y K ⁺ y el efecto de CHH-A sobre su concentración en la hemolinfa a diferentes salinidades	61
7.10.1	Salinidades iso-osmóticas (26‰).....	61
7.10.2	Salinidad hipo-osmótica (10‰)	63
7.11	Concentración de iones Na ⁺ , Cl ⁻ y K ⁺ en las distintas salinidades tratadas.....	65
8.	Conclusión	70
9.	Perspectivas	72
	Lista de referencias	73
	Anexos	80
1.	Análisis de ion Sodio.....	80
2.	Análisis de Cloro	82
3.	Análisis de Potasio.....	84

Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución natural de <i>L. vannamei</i> FAO (2014).....	3
2	Estructura del pedúnculo ocular de crustáceos, donde se localiza el Órgano X- Glándula del seno.	5
3	Interacción de las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH/MOIH con sus órganos blancos.	6
4	Modelo de los mecanismos de intercambio iónico en epitelio branquial para cangrejos marinos	11
5	Esquema general de la metodología llevada a cabo para el bioensayo correspondiente.....	29
6	Inducción de las cepa A-X-33-CHHAN en medio BMMY en los días cero a cuatro (D0-D4) en las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%).....	35
7	Inducción de las cepa A-SMD1168 en medio BMMY en los días cero a cuatro (D0-D4) en las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%).....	35
8	Inducción de las cepa A-X-33-CHHAN en medio BMM en los días cero a cuatro (D0-D4) en las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%).....	36
9	Inducción de las cepa A-SMD1168 en medio BMM en los días cero a cuatro (D0-D4) en las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%).....	37
10	Detección de muestras inducidas por anticuerpo policlonal antiCHH-A mediante la técnica de Western Blot.....	38

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
11	Inducción de CHH-A a partir de la cepa X-33 en medio rico BMMY hasta el día 2 al 1% de metanol.....	39
12	Gradiente de saturación por sulfato de amonio.....	41
13	Análisis de la proteína precipitada por SA y posteriormente dializada.....	42
14	Perfil cromatográfico resultante de la purificación por RP-HPLC y fracciones purificadas y analizadas por Western blot revelado por el método quimioluminiscente.....	43
15	Fracciones purificadas que contienen a CHH-A. Izquierda Tricina SDS-PAGE con tinción de Coomassie.....	44
16	Capacidad osmorreguladora obtenida antes (basal) y después de la inyección con PBS 1X (control negativo) en los diferentes tiempos a 26‰.	46
17	Capacidad osmorreguladora obtenida antes (basal) y después de la inyección con CHH-A en los diferentes tiempos, a 26‰.....	47
18	Figura 18. Efecto de los tratamientos sobre la CO en las distintas horas a 26‰.....	49
19	Capacidad osmorreguladora basal en los distintos tiempos tratados a 10‰.....	50
20	Efecto del estrés por inyección de PBS 1X en la Capacidad osmorreguladora en los distintos tiempos tratados a 10‰.....	51

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
21	Efecto de CHH-A en la Capacidad osmorreguladora en los distintos tiempos tratados a 10‰.....	52
22	Efecto de los tratamientos sobre la capacidad osmorreguladora en los distintos tiempos a 10‰.Las líneas verticales representan la desviación estándar.....	53
23	Efecto de la inyección por PBS 1x como control negativo en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 26‰.....	55
24	Efecto de CHH-A en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 26‰.....	56
25	Efecto de los tratamientos sobre los niveles de proteínas totales en los distintos tiempos a salinidades cercanas a las iso-osmóticas.....	58
26	Niveles basales en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 10‰.....	59
27	Efecto de la inyección con PBS en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 10‰.....	60
28	Efecto de la inyección con PBS en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 10‰.....	60
29	Efecto de los tratamientos sobre los niveles de proteínas totales en los distintos tiempos a salinidades cercanas de 10‰.....	68

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Resultados obtenidos de los análisis de iones en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> tras la inyección de los tratamientos a 26‰.....	62
2	Resultados obtenidos de los análisis de iones en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> tras la inyección de los tratamientos a 10‰.....	64
3	Valores basales de Cl ⁻ , Na ⁺ y K ⁺ en las dos salinidades usadas.....	65

1. Introducción

El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, es un crustáceo decápodo de la familia penaeidae que se ha convertido en un recurso económico importante, llegando a representar en el 2008 hasta el 60% de la actividad acuícola a nivel nacional (FAO, 2010). Gran parte del interés para su cultivo se debe a su capacidad de adaptación a condiciones distintas a las naturales debido a su singular ciclo de vida, teniendo altas tasas de sobrevivencia tanto en larvas como en adultos. Sin embargo, la información sobre las respuestas y procesos que le permiten regular su fisiología para poder crecer y desarrollarse en ambientes diversos es reducida en comparación a otros grupos de organismos.

Por otro lado, se sabe que estas respuestas están reguladas por factores secretados, principalmente, en el pedúnculo ocular de todos los peneidos, confiriéndoles la capacidad de responder a condiciones estresantes a corto, mediano y largo plazo (Kleinholz y Keller, 1979; Keller, 1992; de Kleijn y Van Herp, 1995). Varios de estos factores se han identificado y caracterizado como neurohormonas de origen peptídico cuyas funciones varían según los receptores blancos a los cuales reconocen, activan o inhiben. Estas neurohormonas forman, principalmente, lo que se conoce como la superfamilia CHH/MIH/GIH/MOIH, conformada por la Hormona Hiperglucémica de Crustáceos, CHH; la Hormona Inhibidora de la Muda, MIH; la Hormona Inhibidora de las Gónadas, GIH; y la Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular, MOIH (Fingerman, 1997; Fanjul-Moles, 2006).

Sin embargo, también se ha encontrado que en muchos organismos la misma neurohormona es capaz de cumplir más de una función bajo influencia de los cambios del medio externo, o interno, y que inclusive un mismo transcrito es capaz de expresar dos isoformas distintas bajo condiciones específicas (Fanjul-Moles, 2006; Webster, *et al*, 2012; Lago-Lestón *et al.*, 2007). Todos estos estudios han sido posibles gracias a los avances en investigación del ADN recombinante, en donde a partir de la clonación y expresión de secuencias que codifican a la neurohormona de interés permite obtener

grandes cantidades de proteína recombinante, comparado a lo que se obtiene con la extracción de las neurohormonas a partir de la glándula que las produce.

En nuestro laboratorio, han sido identificadas tres neurohormonas CHH en el pedúnculo ocular de *L. vannamei*: las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 que se forman por corte y empalme alternativo a partir del gen *chhB*, y CHH-A que está codificado en el gen *chhA*. Dada la información que se tiene con respecto al pleiotropismo de las CHH de otros crustáceos, se pensó en la posibilidad de que estas neurohormonas pudieran tener la misma propiedad multifuncional. A la fecha se han realizado bioensayos para determinar la actividad hiperglucémica, la inhibición de la muda y su participación en procesos osmorreguladores con la isoforma CHH-B1 con un C-terminal adicional que permite su rápida purificación (6XHis) (Camacho-Jimenez, 2011), y actualmente se están llevando a cabo esfuerzos para estudiar la actividad de estas diferentes neurohormonas en su forma más parecida a la nativa, sin el C-terminal adicional.

La neurohormona CHH-A fue clonada por nuestro grupo en la levadura *Pichia pastoris* en su forma más parecida a la nativa. Sin embargo, hasta la fecha no se han llevado a cabo ensayos para determinar su papel funcional en *L. vannamei*. Otros autores han logrado clonarla, expresarla y purificarla en *Escherichia coli* como proteína de fusión para medir la expresión del gen en distintas condiciones de estrés (Wanlem, *et al.*, 2011). Así mismo, se ha analizado su influencia en la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ bajo condiciones iso-osmóticas e hiper-osmóticas (Liu *et al.*, 2014) teniendo resultados que indican una relación entre la expresión de *chhA* con procesos osmorreguladores. En este sentido, el presente trabajo tiene por objetivo llevar a cabo la expresión de la neurohormona de *L. vannamei* CHH-A a partir de *P. pastoris*, lo más parecida a la nativa (CHH-A recombinante nativa) y lograr su purificación con el fin de evaluar su papel en procesos de osmorregulación en condiciones hipo-osmóticas e iso-osmóticas.

2. Antecedentes

El camarón blanco, *L. vannamei* es considerado de gran importancia en la acuicultura debido a la facilidad para su manejo, reproducción y resistencia a patógenos, teniendo una tasa relativamente alta de crecimiento y supervivencia. Su distribución abarca las costas del Pacífico, desde las costas del Este del Estado de Sonora, México hasta el Noreste de Tumbes, Perú (FAO, 2006) (Figura 1).



Figura 1. Distribución natural de *L. vannamei*. FAO (2006)

Su cultivo en México con fines comerciales inició a mitad de los años 80 e incrementó su actividad hasta representar una producción nacional total de 60% en el 2008 (FAO, 2010; 2012).

Este organismo puede llegar a habitar en profundidades de hasta 70 m. Su desarrollo lo lleva a cabo en distintos hábitats; durante su maduración y durante el desove se encuentran en aguas costeras tropicales, mientras que las postlarvas planctónicas migran a los estuarios, donde permanecen hasta alcanzar una talla de 10 a 20 mm. Una

vez alcanzada la etapa juvenil, regresan a las aguas marinas en las que alcanzarán la maduración. Para poder contender con estos cambios, esta especie requiere tolerar amplios intervalos de temperatura y salinidad. Sin embargo, diversos estudios han determinado que las condiciones óptimas de temperatura para juveniles van de 28-30°C, que es donde presentan mayor tasa de crecimiento y sobrevivencia (Ponce-Palafox *et al.*, 1997; González *et al.*, 2010), mientras que para adultos la temperatura preferida es de 26°C (González *et al.*, 2010). *L. vannamei* presenta su punto iso-osmótico a una salinidad cercana a 26‰ (Díaz *et al.*, 2001) o 676.8–700.7 mmol kg⁻¹, pudiendo llegar a ser de 823 mmol/kg⁻¹ en temperaturas ligeramente mayores (Bückle, *et al.*, 2006). En diversos experimentos, se ha encontrado que, si bien prefieren las temperaturas y salinidades antes mencionadas, existe un intervalo amplio de tolerancia tanto para salinidad que van de 0.5 a 40‰ (Menz y Blake, 1980) como para temperatura (15-30 °C) en donde aumentan su tasa reproductiva o el aumento de talla dentro de las condiciones consideradas no óptimas. Es por eso que la migración es indispensable, así como y las fluctuaciones de las condiciones de su ambiente para completar su ciclo de manera apropiada.

Precisamente, debido a su condición eurihalina y euritérmica, es indispensable que puedan adaptarse a las variaciones salinas y su capacidad para regular la concentración de hemolinfa tanto en ambientes hipersalinos como en agua dulce, así como responder a cambios en las oscilaciones de la temperatura y otros factores externos, como el fotoperiodo, la nutrición y de manera relevante el estrés salino y térmico. Es por eso que muchos crustáceos han desarrollado mecanismos adaptativos que les ayudan a ajustar sus funciones vitales a las necesidades recurrentes ya sea a corto, mediano o largo plazo modificando su metabolismo energético para contrarrestar el estrés que estas condiciones les provocan (Kleinholz y Keller, 1979; Keller, 1992; de Kleijn *et al.*, 1995).

La mayoría de las respuestas fisiológicas a las condiciones desfavorables, así como las necesarias para completar su ciclo de vida (como la ecdisis y la reproducción) de los crustáceos está regulada por hormonas de naturaleza peptídica.

2.1 Principales estructuras endócrinas de los crustáceos.

El sistema endócrino de crustáceos está compuesto por glándulas epiteliales y nerviosas, siendo las segundas las más relevantes en la síntesis hormonal. La mayor parte de lo que se conoce sobre la endocrinología de crustáceos proviene de estudios realizados en decápodos. El órgano endócrino de origen neural más importante de crustáceos es la glándula del seno. Se ubica cerca del seno hemolinfático en el pedúnculo ocular facilitando la secreción de las hormonas que almacena (Figura 2). El 90% de estas hormonas, que en su mayoría pertenecen a la familia CHH/MIH/GIH/MOIH, son sintetizadas en células heterogéneas neurosecretoras pertenecientes al órgano X y transportadas a la glándula del seno por medio de sus terminaciones axónicas para poder ser utilizadas posteriormente ante condiciones de estrés o respuestas fisiológicas internas (Figura 3). Por este motivo, el complejo es llamado Órgano X-Glándula del Seno (GS-OX).

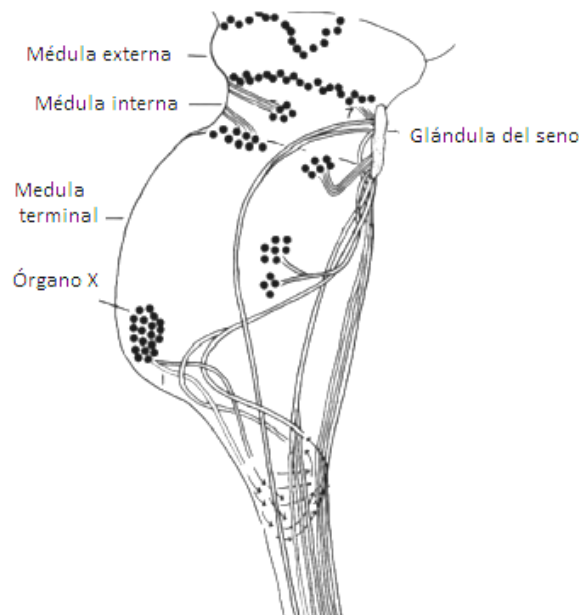
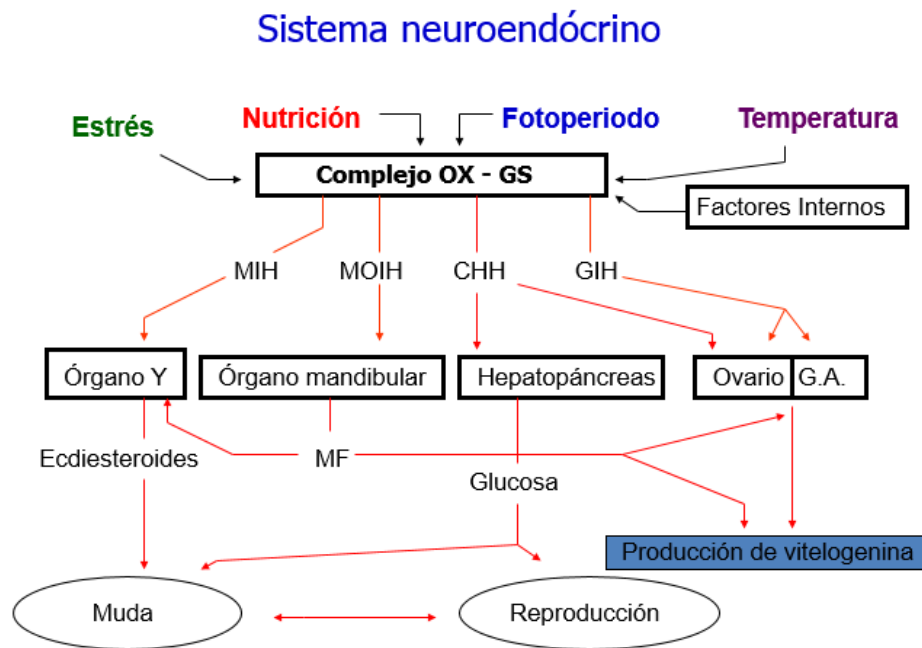


Figura 2. Estructura del pedúnculo ocular de crustáceos, donde se localiza el Órgano X-Glándula del seno. Modificado de Hopkins (2012).

La hormona inhibitoria de la muda (MIH) cumple la función de mantener al organismo en intermuda para un crecimiento y maduración apropiados. La acción inhibitoria de la MIH es sobre el órgano Y (situado en el segmento maxilar de la cabeza),

y de esta manera evita la secreción de los ecdiesteroides. La Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular (MOIH) tiene como función específica la de inhibir la síntesis de metilfarnesoato. En lo que respecta a la reproducción, la hormona directamente involucrada es la GIH presentes en machos y hembras, respectivamente. Por otro lado, la más abundante de las hormonas secretadas por el complejo OX-GS es la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) cuya función principal consiste en regular las concentraciones de glucosa y de lípidos en la hemolinfa por medio del metabolismo de carbohidratos, necesarios como fuente de energía para los distintos ajustes metabólicos y responder ante condiciones adversas (Kleinholz y Keller, 1979; Keller, 1992; de Kleijn y Van Herp, 1995). Sin embargo, se han asociado a otras funciones adicionales como la muda, osmorregulación y reproducción (Figura 3). Más detalles sobre su multifuncionalidad se abordan en la sección 2.3.



Modificado de Van Herp, 1992

Figura 3. Interacción de las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH/MOIH con sus órganos blancos. Modificada de de Kleijn y Van Herp, 1995.

La familia CHH/MIH/GIH/MOIH se agrupa de esta forma por todas las características estructurales que comparten las neurohormonas involucradas. Entre ellas se pueden mencionar la presencia conservada de 6 residuos de cisteínas, que forman tres enlaces disulfuro, 2 argininas, 1 aspartato y una fenilalanina. Las proteínas

secretadas están dentro de un rango de 7 a 9 kDa y el producto maduro tiene alrededor de 70 aminoácidos (Böcking, *et al.*, 2002).

La comparación de 21 secuencias de preprohormonas de decápodos sustentó la idea de que la familia se dividiera en dos subfamilias con base en la estructura de su precursor y la estructura primaria que poseen (de Kleijn y Van Herp, 1995; Bulau *et al.*, 2004): la subfamilia CHH (o subfamilia I) y la subfamilia MIH/GIH/MOIH (o subfamilia II).

La subfamilia CHH está compuesta únicamente por CHH y sus múltiples isoformas. Su secuencia peptídica ha sido descrita y caracterizada para langosta, cangrejo, langostinos, gambas isópodos y camarón. En esos estudios, se determinó que la estructura de la secuencia poseen genes formados por 3 o 4 exones en decápodos y dan lugar a un producto proteínico de 72 a 73 aminoácidos, siendo los primeros 40 altamente conservados en todas los miembros de ésta subfamilia (Chan, *et al.*, 2003; Chen, *et al.*, 2005; Dircksen, *et al.*, 2001). Estos péptidos tienen un peso molecular aproximado de 8, 400 Da (Kegel, *et al.*, 1991). Sin embargo, en aquellos que expresan variantes por corte y empalme alternativo tienen un cuarto exón, y otro intrón (Chen *et al.*, 2005; Dircken, *et al.*, 2001; Lago-Lestón, *et al.*, 2007). Otra característica son las modificaciones postraduccionales como es la amidación en el C-terminal, peculiaridad que se ha asociado a la función hiperglucémica (Ohira *et al.*, 2003) y un grupo pyroGlu bloqueando al N-terminal. Además poseen una secuencia relacionada con el precursor de CHH (CPRP, por sus siglas en inglés) localizado entre el péptido señal y la hormona.

La subfamilia MIH/GIH la componen las neurohormonas MIH, GIH, VIH y MOIH, de las cuales se conoce más sobre la MIH. En camarones, langostinos y cangrejos se sabe que la MIH y MOIH tienen genes formados por 3 exones. De GIH no se tiene una estructura específica aún. Las características más destacables para esta subfamilia son que sus productos proteicos corresponden a un intervalo de 73 a 81 residuos de aminoácidos, así como la presencia de residuos adicionales en el extremo amino y carboxilo. Además, todas las MIHs contienen un residuo adicional de glicina entre las primeras 2 cisteínas en la posición 12 del péptido maduro, el cual está ausente en todas las CHHs. Se ha demostrado que esta característica de las MIHs debilita los efectos hiperglucémicos de CHHs recombinantes en *Marsupenaeus japonicus*, con respecto a

los controles (Katayama, *et al.*, 2002), lo que sugiere que ésta estructura marca una divergencia funcional de la familia peptídica CHH.

2.2 Isoformas de CHH en distintos crustáceos. Polimorfismo

Muchos grupos de investigación han realizado estudios bioquímicos y moleculares de la familia CHH en numerosos especies de crustáceos, y han coincidido en la noción de que los péptidos pertenecientes a esta familia son polimórficos, debido a cambios en la secuencia de aminoácidos, y a la isomerización de un solo residuo de aminoácido dando lugar a la configuración L a D. En peneidos, se encontró que dos grupos de péptidos comprenden más de una isoforma; CHH-A y CHH-B. En astacidos y panulirudos, se encontraron al menos dos formas; CHH-I y CHH-II (Chan, *et al.*, 2003). Sin embargo, las características estructurales de cada familia peptídica prevalecen en todas las isoformas encontradas. Los enlaces disulfuro que se forman entre las 6 cisteínas y entre los residuos individuales de cisteínas, se mantienen en todos los péptidos (Böking *et al.*, 2002).

Algunas isoformas de tipo CHH-1 han demostrado tener un alto porcentaje de homología, aun siendo los organismos de diferentes géneros. El análisis por RP-HPLC de dos isoformas, CHH-I y CHH-II mostraron que ambas variantes tenían la misma cantidad de aminoácidos (72 aminoácidos) y tres enlaces disulfuro en la misma posición, pero que diferían entre ellas por la epimerización D/L de una fenilalanina en la posición 3 de la secuencia de aminoácidos. Esta diferencia mostró una variación de la actividad hiperglucémica interespecífica en los ensayos realizados; es decir, diferentes isoformas resultaron en diferentes efectos hiperglucémicos en el cangrejo de río *Orconectes limosus* (Ollivaux y Soyes, 2000) y *Astacus leptodactylus* (Serrano *et al.*, 2003; 2004).

Así mismo se han encontrado en *Homarus americanus* dos isoformas de CHH (Tensen *et al.*, 1991) y en *Cancer pagurus* existen también dos isoformas de CHH y de un péptido relacionado a CHH (Chung *et al.*, 1998).

Por otro lado, también se han observado la formación de isómeros de CHH por corte y empalme alternativo de transcritos del mismo gen como ha sido reportado en

gambas (Chen, *et al*, 2004). *Macrobrachium rosenbergii* también presenta una isoforma en el pedúnculo ocular y otra en branquia (Chen, *et al.*, 2004) y *Carcinus maenas*, produce una isoforma en el órgano pericárdico y otra en la glándula del seno. Así mismo, *Procambarus clarkii* produce una variante en el ganglio torácico y otra en el pedúnculo ocular. *L. vannamei* produce dos isoformas diferentes por corte y empalme alternativo y ambas son producidas en la glándula del seno (Lago-Lestón, *et al*, 2007).

Se han encontrado variantes genéticas de las CHH en el pedúnculo ocular de la langosta australiana *Cherax destructor* (Bulau *et al.*, 2004). Estas variantes CHH-A (de 830 KDa) y de CHH-B (8.3 KDa) tienen la misma cantidad de aminoácidos en el péptido maduro, presentan un piroGlu en el N- terminal, y el C-terminal está amidado, pero difieren en 14 aminoácidos. Éstos péptidos son significativamente diferentes a los encontrados en el hemisferio norte. Mettullo *et al.*, (2004) encontraron que las CHH-A y CHH-B de *Nephrops norvegicus* diferían en la secuencia de la preprohormona, pero no en el péptido maduro, y que la actividad hiperglucémica era similar a la CHH nativa del péptido maduro. Diversas deleciones progresivas en los motivos conservados de la CHH, revelaron que la actividad hiperglucémica se encontraba en el C-terminal y que los motivos eran los que daban la especificidad funcional. Este polimorfismo resultaba en una variación en la interespecificidad de la actividad hiperglucémica, por ejemplo, la CHH de un camarón no era funcional en un cangrejo (Keller, 1992).

2.3 Multifuncionalidad de CHH

De la superfamilia CHH, la CHH es la más estudiada y por tanto de la que se tiene mayor información. La producción de CHH por el OX-GS está controlada negativamente por la concentración de D-glucosa hemolinfática, la cual causa una hiperpolarización que inhibe la secreción de CHH. Un descenso en los niveles de glucosa, por lo tanto, revierte la hiperpolarización resultando en la secreción de CHH y la correspondiente hiperglucemia (Fanjul-Moles, 2006). Diversos estudios han demostrado que la regulación de CHH se manifiesta como una respuesta ante los diferentes ambientes desfavorables que terminan estresando al animal. En este punto, los niveles de CHH en la hemolinfa, aumentan provocando hiperglucemia (Webster, 1996; Chang, *et al.*, 1998).

Se ha confirmado que las isoformas de CHH tiene una función pleiotrópica en diversos organismos (Fanjul-Moles, 2006; De Kleijn *et al.*, 1998; Chung y Webster, 2006). A demás de la acción hiperglucémica, se ha relacionado a las CHH's con la liberación de enzimas digestivas y ácidos grasos libres y fosfolípidos, por el hepatopáncreas (Sedlmeier, 1988; Santos *et al.*, 1997). En algunos organismos, como en *C. maenas*, puede suprimir la síntesis de ecdisteroides (Webster, 1986) y se han encontrado también isoformas de CHH que inhiben estas hormonas en especies de cangrejo de río (Yasuda *et al.*, 1994). También en *H. americanus* (Chang *et al.*, 1990) y en un extracto obtenido de *Penaeus vannamei* (Sefiani *et al.*, 1996) se demostró que tenían tanto función de MIH como de CHH. Además, CHH participa en la captación de agua con el fin de causar un hinchamiento, necesario para la ecdisis, y un incremento de tamaño tras la muda (Chung *et al.*, 1999). En cuestión reproductiva, algunas isoformas de CHH tienen un efecto estimulador en el crecimiento y actividad endocítica de ovocitos en cangrejos y langostas (De Kleijn, *et al.*, 1998) lo que lleva a la vitelogénesis y a la maduración. Conjuntamente esta hormona tiene un efecto en el control del metabolismo de los lípidos en crustáceos (Santos *et al.*, 1997). Se ha demostrado que también regulan el balance de iones y la entrada de agua (Chung y Webster, 2006; Spanning-Pierrot C., *et al.*, 2000; Mantel y Farmer, 1983; Pequeux, 1995).

Hasta el momento no se tiene mucha información sobre la posible multifuncionalidad del resto de las neurohormonas pertenecientes a la familia CHH, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otras hormonas tengas más de una función.

2.4 Regulación neuroendocrina en la osmorregulación de crustáceos.

Los crustáceos que viven en ambientes costeros, estuarios, lagunas, o bien migran de diferentes hábitats, pueden enfrentarse a cambios en los rangos de salinidad, teniendo que realizar modificaciones de manera interna para enfrentar estos cambios. Entre las modificaciones que realizan se pueden mencionar el balance iónico y osmótico, el metabolismo respiratorio, el crecimiento y la excreción de amonio.

El estudio de varias respuestas fisiológicas permite conocer las repercusiones de los cambios del ambiente sobre los organismos, como por ejemplo, los efectos directos de los cambios salinos. Uno de ellos es la capacidad osmorreguladora (CO), que se refiere a la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y el medio externo. Esta diferencia se da por el efecto de la salinidad sobre los mecanismos de osmorregulación de los crustáceos.

Para limitar el intercambio pasivo de agua y iones entre la hemolinfa y el medio externo, los crustáceos eurihalinos son capaces de regular, al menos parcialmente, la composición de sus fluidos corporales con respecto a su medio ambiente, modificando la permeabilidad de su superficie, principalmente a nivel branquial, donde ocurre de forma activa el transporte iónico principalmente de Na^+ y Cl^- (Figura 4).

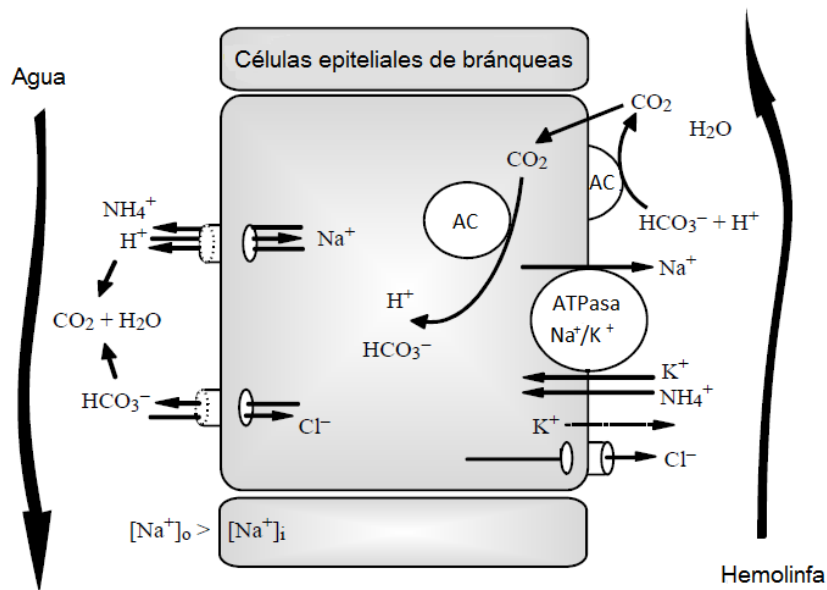


Figura 4. Modelo de los mecanismos de intercambio iónico en epitelio branquial para crustáceos marinos, mostrando el intercambio apical de HCO_3^- por Cl^- y H^+ por NH_4^+ . Modificado de Morris (2001)

En bioensayos realizados con combinaciones de temperatura y salinidad sobre peneidos como *L. stylirostris* y *L. vannamei*, se ha visto que aquellos animales mantenidos a las condiciones óptimas de temperatura tuvieron una tasa metabólica

constante, aún con distintas concentraciones salinas. La respiración no puede ser considerada como un buen índice de la tolerancia a la salinidad, salvo en casos en donde la temperatura usada sea parecida al hábitat natural (Venkataramiah *et al.*, 1975).

Los decápodos han demostrado tener una regulación osmótica y iónica controlada por mecanismos neuroendocrinos (Mantel, 1985; Kamemoto, 1991). Esto se ha comprobado gracias a diversos trabajos en los que se midieron las variaciones de diversos metabolitos durante el estado de intermuda tras ablacionar el pedúnculo ocular, tal como el potencial de osmorregulación y la maduración de los órganos sexuales, entre otros. Se ha observado que la pérdida inicial tras la extirpación del órgano se ve recuperada parcialmente una vez que se reinserta el pedúnculo ocular, o se inyectan extractos del mismo (Charmantier-Duares *et al.*, 1994; Chung y Webster, 2006; Spaning-Pierrot C., *et al.*, 2000).

En *H. americanus*, la remoción del pedúnculo ocular provocó un marcado descenso de la concentración iónica de Na^+ y Cl^- de la hemolinfa cuando fueron expuestos en medios diluidos, causando un descenso de la osmolaridad total, así como de la presión osmótica, mientras que se vio un incremento en los niveles de captación de agua. En aguas salobres, los animales ablacionados incrementan su contenido de agua (Chung, 2006). Estos efectos se vieron revertidos, aún en medio diluido, cuando se les inyectaron distintos fragmentos del extracto de la glándula del seno purificada del pedúnculo ocular. Uno de los fragmentos que revirtieron los efectos de la ablación, fue identificada como una isoforma de CHH (Charmantier-Duares *et al.*, 1994). Esta también ha sido identificada en otras especies de langosta y en ensayos homólogos se confirmó su actividad hiperglucémica. Esta misma respuesta ha sido observada en distintos crustáceos decápodos, como en el cangrejo *Pachygrapsus marmoratus*, donde se demostró además que la inyección pura de un fragmento aislado de GS sobre crustáceos ablacionados era capaz de restaurar los niveles glucémicos de la hemolinfa, mientras que en crustáceos intactos induce a un efecto hiperglucémico. Este fragmento puro se identificó como una CHH (Spaning-Pierrot., *et al.*, 2000). En este mismo trabajo, se confirmó que el péptido con efectos osmorreguladores aislados de las branquias era una CHH, lo que sugiere que tiene una acción directa de ella (ubicado en GS) sobre el transporte iónico de las branquias. Una explicación sobre esto es que la CHH ejerce un

efecto en el metabolismo hidromineral indirecto a través de un incremento de la concentración de glucosa en la sangre, con un resultado final del aumento de la osmolaridad (Charmantier- Duares *et al*, 1994).

2.5 Expresión de CHH en *L. vannamei*

En nuestro laboratorio se han clonado y expresado en la levadura *Pichia pastoris* tres neurohormonas de *L. vannamei* que tienen las características estructurales de las CHHs: CHH-B1, CHH-B2 y CHH-A (Lago-Lestón, *et al.*, 2007; Sánchez-Castrejón, 2007; Sigala-Andrade, 2010; Camacho-Jiménez, 2011). CHH-B1 y CHH-B2 son isoformas producidas en la glándula del seno por del corte y empalme alternativo de un mismo gen (*chhB*), mientras que CHH-A es codificada por el gen *chhA*.

Para la expresión en *P. pastoris*, se integraron al genoma los genes *chh* de CHH-A y CHH-B1 (antes llamadas CHH y MIH, Lago-Lestón, *et al.*, 2007; Sánchez-Castrejón, 2007) en vectores de expresión pPICz α -A con un C-terminal adicional (que incluye un epítopo *c-myc* para su identificación, y una etiqueta de histidinas para su purificación) (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008) y sin el C-terminal, con el fin obtener un producto lo más parecido a la proteína nativa. Estudios de expresión han encontrado que CHH-B1 con un C-terminal adicional tiene actividad hiperglucémica y no se descarta la posibilidad de que pudiera tener actividad inhibidora de la muda en ausencia del C-terminal adicional (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; Camacho-Jiménez, 2011). La isoforma CHH-B2 ha sido recientemente clonada en su forma nativa y se ha reportado que se expresa solo en ciertas condiciones de estrés (Lago-Lestón, *et al.*, 2007) sugiriendo la posible multifuncionalidad de las neurohormonas (Sigala-Andrade, 2010). En CHH-A y CHH-B2, el C-terminal de forma natural tiene un sitio de procesamiento para la amidación, GK, la cual en CHH's de otros crustáceos se ha asociado a una alta actividad hiperglucémica (Katayama *et al.*, 2002; Mosco *et al.*, 2008). En nuestro laboratorio, tanto CHH-A como CHH-B2 han sido clonados eliminando el aminoácido K para posteriores ensayos de amidación *in vitro*, y en el caso de las tres neurohormonas, se ha modificado el sitio de clonación múltiple (con el fin de evitar procesamientos incorrectos), y se incluyó un sitio de reconocimiento para la proteasa enteroquinasa previo a las regiones *c-myc* y 6XHis

para poder eliminar estas regiones adicionales una vez que la proteína haya sido identificada y purificada (Sánchez-Castrejón, 2007). Actualmente, se están haciendo estudios para dilucidar la actividad biológica tanto de CHH-B1 como de CHH-B2 en su forma nativa en distintos procesos fisiológicos.

2.5.1 CHH-A en *L. vannamei*

Con lo que respecta a CHH-A, la secuenciación del gen muestra que está compuesto de 3 exones y dos intrones, dando lugar a la neurohormona de 74 aminoácidos y con un tamaño teórico de 9.1 kDa (Lago-Lestón, *et al.*, 2007; Wanlem, *et al.*, 2011 Liu, *et al.*, 2014). Se ha observado su expresión a nivel genético en nervio abdominal, corazón, músculo (Liu, *et al.*, 2014), pedúnculo ocular (Sigala-Andrade, 2010) estando ausente en branquias (Sigala-Andrade, 2010; Liu, *et al.*, 2014). Con respecto a su posible actividad, se ha medido la expresión a nivel genético en diferentes condiciones de temperatura y salinidad, presentándose con más intensidad en las temperaturas más altas (32°C) y en aquellas salinidades correspondientes a las más extremas (10 y 40 ‰) y en un patrón similar a CHH-B1, pero siempre en menor expresión relativa. Sin embargo, en las condiciones óptimas de salinidad y temperatura (26‰ y 28°C), la expresión fue muy baja. Estos resultados sugirieron un papel regulatorio importante de CHH-A producida en el pedúnculo ocular, en la adaptación a condiciones de estrés extremas; salinidades por arriba y por debajo del punto isosmótico de *L. vannamei* (26 ‰) y a temperaturas altas (Lago-Lestón, *et al.*, 2007).

La expresión de proteínas recombinantes utilizando sistemas de expresión bacterianos como *E. coli* o sistemas de levaduras como *P. pastoris*, resultan de gran importancia ya que se requiere contar con un gran cantidad de la hormona para realizar ensayos de actividad biológica. Aun cuando *E. coli* presenta la desventaja de carecer de un sistema de plegamiento de proteínas y baja solubilidad, se han desarrollado sistemas para contender con estos problemas (Nagai *et al.*, 2009). *P. pastoris* por su parte presenta la ventaja de secretar los péptidos al medio de cultivo, poseer mecanismos para el plegamiento de proteínas y la posibilidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales. Los estudios en actividad biológica que se han realizado a la fecha con CHH-A han sido a partir de proteínas expresadas en sistemas procariotas con

etiquetas 6XHis para su purificación y en condiciones hipo-osmóticas (Wanlem, *et al.*, 2011) e hiper-osmóticas (Liu, *et al.*, 2014). Si bien CHH-A no se expresa en branquia, Liu, *et al.*, (2014) encontraron que la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ en condiciones hiper-osmóticas aumentó significativamente al inyectarse la hormona CHH-A recombinante purificada, lo que sugiere un papel en procesos osmorreguladores. Por otro lado en su trabajo, Wanlem., *et al* (2011) probó que la hormona tiene actividad hiperglucémica en subadultos de *L. vannamei* aclimatados a 28°C y a 15‰.

En este sentido, el presente trabajo pretende llevar a cabo el estudio de la neurohormona CHH-A recombinante de *L. vanamei* en su forma nativa en diferentes salinidades.

3. Justificación

El conocer cómo ocurren los mecanismos de adaptación y regulación endócrina en condiciones de estrés salino en crustáceos de importancia económica, como *L. vannamei*, resulta de gran importancia para controlar los procesos de crecimiento, muda y reproducción durante su cultivo. Aunque la endocrinología de crustáceos está regulada principalmente por neurohormonas de origen peptídico, su función no ha sido bien estudiada, principalmente debido a la complejidad para obtener la hormona en cantidades suficientes para realizar estudios y ensayos biológicos. Por lo tanto, la producción de péptidos recombinantes con estructura lo más similar a las formas nativas facilitará el estudio de su función. Con base a esto, en el presente se planteó llevar a cabo la expresión CHH-A recombinante en su forma nativa en *P. pastoris* y evaluar su papel en los procesos osmorregulatorios en subadultos de *L. vannamei* sometidos a condiciones iso-osmóticas e hipo-osmóticas.

4. Hipótesis

Si la hormona CHH-A recombinante nativa participa en la regulación de la presión osmótica y la concentración de iones en la hemolinfa en *L. vannamei* bajo condiciones de estrés salino, al ser inyectada a camarones expuestos a diferentes condiciones de salinidad, la presión osmótica de la hemolinfa se verá modificada de manera satisfactoria.

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales.

Llevar a cabo la expresión y purificación de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante nativa (CHH-A) y evaluar su participación en la modulación de procesos de osmorregulación en *L. vannamei*.

5.2 Objetivos específicos.

- I. Determinar las condiciones óptimas de expresión de la neurohormona recombinante nativa CHH-A en la levadura *Pichia pastoris*.
- II. Purificar la neurohormona recombinante nativa CHH-A mediante cromatografía de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC).
- III. Evaluar el efecto de la hormona recombinante nativa CHH-A en la osmolaridad de la hemolinfa de camarones expuestos a diferentes salinidades.

6. Material y métodos

6.1 Inducción de clonas

Para este trabajo se partió de cepas de levadura que expresan la proteína CHH-A nativa. Su construcción se llevó a cabo anteriormente en nuestro laboratorio, lo que incluyó la clonación del gen *chhA* en el vector pPicz α -A y su integración en el cromosoma de distintas cepas de la levadura *P. pastoris*, por recombinación homóloga. De esta manera, en presencia de metanol como inductor, *P. pastoris* expresa la proteína CHH-A en lugar de la enzima AOX.

Para determinar la expresión más eficiente de CHH-A, se utilizaron dos cepas recombinantes de fenotipo Mut⁺ con el gen *chhA* insertado en su genoma: X-33-CHHA_N, derivada de la cepa X-33 de genotipo silvestre y SMD1168H-CHHA_N derivada de la cepa SMD1168H de genotipo *pep4* Δ que es deficiente en proteasas. Así mismo, se utilizaron dos medios de cultivo con el fin de promover el aumento de masa celular, uno complejo y otro mínimo, cuya fuente principal de carbono fuera el glicerol. Uno de ellos es el medio BMGY (extracto de levadura 1%; peptona 2%; fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina 4 X 10⁻⁵ %; glicerol 1%) como medio complejo, mientras que el segundo corresponde al medio BMG (fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina 4x10⁻⁵%; glicerol 1%) como medio mínimo. La fase de inducción, a la que se procedió una vez lograda la biomasa apropiada, es a partir de los mismos medios que en lugar de glicerol, contienen metanol, BMMY (extracto de levadura 1%; peptona 2%; fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina 4 X 10⁻⁵ %; metanol 0-4%) y BMM (fosfato de potasio 100 μ M, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina 4x10⁻⁵%; metanol 0-4%).

Se trabajó con diferentes concentraciones finales de metanol de 0, 1, 2 y 4%, durante 4 días de inducción, ya que tiempo después no parece tener diferencia en la cantidad de proteína recombinante expresada.

Para comenzar con esta fase, se inició con colonias frescas de las cepas X-33-CHHA_N y SMD1168H-CHHA_N crecidas en medio YPD agar (extracto de levadura 1%, peptona

2%, glucosa 2%, agar 2%) con zeocina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se inoculó una asada de colonia fresca en 7.5 ml de medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) y se incubó por 18 horas a 30°C con agitación constante (200 rpm). Concluido el tiempo, se inocularon 3 ml de este medio en 400 ml de medio generador de biomasa, tanto el BMGY como el BMG respectivamente, en matraces Fernbach y se incubaron a 30°C con agitación constante (200 rpm) hasta que alcanzaron una $\text{DO}_{600} = 4$. Logrado esto, se distribuyeron 50 ml de cada medio en 4 tubos cónicos y se centrifugaron para concentrar las células en un pellet. Se repitió el procedimiento anterior hasta obtener 4 tubos con 100 ml de células concentradas en un pellet, por cada medio y cepa. Los pellets fueron lavados con 50 ml de agua destilada estéril y centrifugados, con el fin de eliminar todo el glicerol y proteínas accesorias extracelulares. Las células fueron resuspendidas en 25 ml de medio inductor, BMMY y BMM, respectivamente, y se transfirieron a 5 matraces de 250 ml para que cada cepa tuviera 4 matraces por medio de cultivo con el fin de poner en cada uno de los matraces una de las 4 diferentes concentraciones finales de metanol: 0, 1, 2 y 4%. Los matraces fueron incubados a 30°C con agitación constante (200 rpm). El metanol se adicionó cada 12 horas para mantener la concentración requerida hasta cumplir con los 5 días de inducción, incluyendo el día cero (0, 1, 2, 3 y 4).

Cada día se recolectó 1 ml del medio homogéneo (células y sobrenadante) por duplicado con el fin de llevar a cabo los posteriores análisis.

6.2 Análisis de las proteínas en geles de Tricina SDS-PAGE.

6.2.1 Preparación de las muestras.

Las muestras fueron precipitadas con 150 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 100% e incubadas por 12 horas (overnight) a 4°C. Posteriormente fueron centrifugadas a 11,000 rpm a 4°C por 20 minutos y los sobrenadantes fueron desechados, mientras que los precipitados fueron secados a temperatura ambiente. Se les agregó 1 ml de acetona fría y se centrifugaron nuevamente y se desechó el sobrenadante. Los precipitados fueron secados a temperatura ambiente para ser suspendidos en 20 μl de buffer de carga

2x (Tris-HCl 125 mM pH6.8, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

6.2.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Tricina SDS-PAGE) y tinción.

Las proteínas contenidas en los sobrenadantes de las muestras recolectadas fueron analizadas en geles de poliacrilamida (14%) en un amperaje constante de 50 mA y a 150 V durante 1.5-3 horas, hasta que el azul de bromofenol de las muestras alcanzó la base. Para hacer el análisis se utilizaron 10 μl de muestra y fueron desnaturalizadas a 95°C por 5 minutos. Se usó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad) según las instrucciones del proveedor. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron incubados en solución de azul de Coomassie R-250 (azul Coomassie R-250 0.1%, etanol 40% y ácido acético 10%) por 12 horas (overnight) y a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de colorante, se incubó en solución de destinción (etanol 40% y ácido acético 10%) el tiempo suficiente para lograr el contraste deseado entre las bandas correspondientes a proteínas y el fondo.

6.3 Inmunodetección de la proteína CHH-A recombinante nativa.

Para la detección de CHH-A, se elaboraron anticuerpos policlonales de conejo antiCHH-A en la compañía GenScript USA Inc., utilizando como antígeno un péptido sintético de 14 aminoácidos diseñado a partir de la región N-terminal del péptido maduro de CHH-A.

La inmunodetección se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot. Se eligieron aquellas muestras de ambos medios y cepas que presentaron una mayor expresión en la fase de inducción. Se realizó una electroforesis de Tricina SDS-PAGE (14%) con sus respectivos controles; control negativo corresponde a una muestra de inducción en el día cero, en el cual no debe existir ninguna proteína; control positivo corresponde al péptido sintético otorgado por la compañía GenScript. El proceso para la elaboración de los geles fue el mismo que el seguido en el apartado 6.2, salvo que el

péptido sintético no fue desnaturalizado como con el resto de las muestras. El marcador molecular usado fue *Precision Plus Protein Western C standards*.

6.3.1 Electrotransferencia semiseca

Las proteínas presentes en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ l por el método de electrotransferencia semiseca, utilizando 6 piezas de papel filtro Whatman 3MM previamente incubadas en buffer de transferencia (Towbin 1x: Tris Base 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3), al igual que el gel y la membrana de nitrocelulosa. El orden de la transferencia fue: 3 piezas de papel filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida correctamente colocado sobre la membrana y 3 piezas de papel filtro. La transferencia se llevó a cabo por una hora a 200 mA constantes y un máximo de 20 V.

6.3.2 Inmunodetección por anticuerpo policlonal antiCHH-A.

Se montaron las condiciones con el fin de reducir las uniones inespecíficas del anticuerpo primario a la membrana. Una vez llevada a cabo la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó por 2 horas en solución de bloqueo (5% Svelty/amortiguador salino de fosfatos 1X con Tween 20 al 0.5%, o PBST) a temperatura ambiente y con agitación moderada. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBST 0.05% para eliminar excesos y se procedió a poner en contacto la membrana con el anticuerpo antiCHH (dilución 1:50, 1% Svelty/PBST) por 4 horas a temperatura ambiente y con agitación moderada. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBST 0.05% y se puso en contacto con el anticuerpo secundario anticonejo producido en cabra (Anti-rabbit IgG-Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich, en una dilución 1:2000, Svelty/PBST 1%) por 4 horas a temperatura ambiente y con agitación moderada. El revelado de la membrana se realizó con la solución de substrato para peroxidasa 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), utilizando una película reveladora KODAK según las recomendaciones del proveedor.

6.4 Expresión de CHH-A en un mayor volumen con base a las condiciones óptimas

Se llevó a cabo la expresión de la hormona recombinante CHH-A en un mayor volumen de cultivo utilizando el medio, la cepa y tiempo de inducción que promovieron la mayor expresión de la hormona en los ensayos anteriores.

Para la inducción se trabajó con 1 L del medio seleccionado con glicerol, dividido en 2 matraces Fernbach. Una vez alcanzada la densidad óptica (DO), se procedió a concentrar, lavar y posteriormente resuspender en 25 ml de medio con la concentración de metanol elegida (inductor) por cada 100 ml de medio con glicerol. La inducción se llevó a cabo en matraces de 250 ml y se siguió hasta el día seleccionado en el ensayo previo para obtener la mayor expresión de CHH-A y la menor cantidad de proteínas accesorias.

Los matraces con medio inductor fueron centrifugados a 2500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos con el fin de separar las células del medio de cultivo en donde se encuentran las proteínas secretadas. Se mantuvieron las mismas condiciones de incubación. El medio de cultivo fue recuperado y centrifugado a 15000 rpm a 4°C por 30 minutos para eliminar el exceso de células y otros residuos de alto peso molecular. Se cuantificó su volumen total en una probeta graduada y se tomó 1 ml de muestra para análisis por SDS-PAGE para proceder con la precipitación de las proteínas.

6.5 Precipitación por sulfato de amonio (SA)

La precipitación se llevó a cabo saturando con sales de amonio el medio de inducción para disminuir la solubilidad de las proteínas presentes en él. Cada proteína tiene características definidas acorde a su composición de aminoácidos y a su estructura terciaria que le permiten precipitar en puntos de saturación específicas, por lo que inicialmente se requirió llevar a cabo un gradiente de saturación.

6.5.1 Gradiente de saturación con sulfato de amonio.

Para determinar el punto de saturación de SA que permitiera que la CHH-A precipitara excluyendo en la mayor medida posible a cualquier otra proteína que se encontrara en el medio de cultivo, se inició con un punto de saturación de 30% de SA en el medio de cultivo, aumentando 10% en cada punto hasta llegar a 60%. En cada punto de saturación, se fue agregando SA al medio manteniendo agitación moderada a 4°C hasta que se disolvió por completo y se dejó transcurrir 1 hora para asegurar la precipitación total de las proteínas presentes. Se tomó un ml de muestra de la solución para los siguientes análisis. Posteriormente el medio se centrifugó en tubos cónicos de 50 ml a 15000 rpm a 4°C por 30 minutos y se tomó 1 ml de muestra del sobrenadante y el resto del volumen se midió nuevamente para someterlo a precipitación en el siguiente punto de saturación. El pellet resultante en cada punto se resuspendió en 100 µl de amortiguador salino de fosfatos 1X (PBS 1X) y fue almacenado para análisis en SDS-PAGE. Este proceso se repitió agregando SA al medio hasta completar la concentración del punto de saturación correspondiente, terminando en 60%.

Las muestras recolectadas tanto del medio de cultivo sin someter a precipitación (apartado 6.4) como las de los sobrenadantes en cada punto de saturación fueron procesadas y analizadas como se menciona en el apartado 6.2. Se tomaron 15 µl de los pellets recolectados por cada punto de saturación y se les agregó el buffer de carga 2x para analizarlas directamente en SDS-PAGE.

6.5.2 Elección de punto de saturación para precipitación de CHH-A

La elección del punto de saturación se basó en la ausencia de bandas accesorias en el gel y de aquella muestra que permitiera ver la presencia de CHH-A con mayor intensidad.

Una vez elegida la concentración final de SA, se repitió la inducción conforme al apartado 6.4, tomando una muestra de 1 ml para análisis, y se realizó la precipitación agregando el SA según el punto elegido. La precipitación se llevó a cabo en las mismas condiciones de agitación, tiempo y temperatura que se usaron para el gradiente de

saturación y se recolectaron muestras de 1 ml del pellet precipitado y del sobrenadante resultante tras la precipitación, para verificar que ésta fue completa.

El pellet resultante tras la precipitación se resuspendió en 1 ml de PBS 1X por cada 50 ml de medio inductor precipitado y una muestra de 250 μ l fue tomada para análisis por SDS-PAGE y completada a 1 ml con PBS 1X. La muestra fue dializada para eliminar el SA presente, y poder utilizarla sin que existiera intervención de sales para los análisis siguientes.

La diálisis se llevó a cabo en cassette de diálisis Slide-a-lyzer 10k dialysis cassette g2 7000 MWCO (Pierce, Thermo Scientific, USA) de 3 ml según las instrucciones del proveedor, utilizando PBS 1X.

Tras la diálisis, se recuperó la proteína dializada. Se tomaron 250 μ l de esta solución y se completó a 1 ml con PBS 1X. Las muestras colectadas fueron precipitadas como se menciona el apartado 5.2 para proceder a analizar las proteínas por tinción de Coomassie, junto con las muestras recolectadas durante la inducción, con el fin de corroborar la integridad de la proteína durante el proceso de precipitación y diálisis. El resto fue dividido en viales y almacenado a -80°C en tubos de 1.5 ml hasta su uso para su cuantificación y purificación.

6.6 Cuantificación por Ácido Bicinconínico (BCA) de proteínas totales

Para realizar la cuantificación se utilizó el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) por medio del kit BCA Protein Assay Reagent (The Thermo Scientific Pierce). Para esto, se realizó una curva estándar a partir de suero de albúmina de bovino (BSA) de la marca LAFON en distintas concentraciones (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$), por triplicado, conforme a las recomendaciones del proveedor del kit de BCA. Se usaron 25 μ l de muestra las muestras problemas de proteínas dializadas, por triplicado, en placas de 96 pozos de fondo plano y se midió en el espectrofotómetro (Multiskan Go, Thermo Scientific), a 562 nm.

Con base a los datos arrojados en la curva estándar, se procedió a calcular la concentración de las proteínas totales presentes en la muestra dializada en mg/ml. La información de la concentración de la muestra ayudó a establecer las cantidades a inyectar durante la purificación por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC).

6.7 Purificación de CHH-A por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)

Para proceder con la purificación, fue necesario realizar un perfil cromatográfico inicial en donde se observaron los picos correspondientes a las proteínas presentes en la muestra total. Para la purificación se utilizó un gradiente lineal de 0-65% de acetonitrilo (al 100%) y ácido trifluoroacético (TFA al 0.1%) con una tasa de flujo de 0.8 ml/min, con un incremento de TFA (TFA 0.12%) de 1%/min, durante 70 minutos. La columna utilizada fue C18 TSK-Gel Octadecyl-4 PW (15 cm X 4.6 mm, 7 μ m) con una precolumna Eclipse XDB- C18 (12.5 mm x 4.6 mm, 5 μ m).

Las muestras recolectadas cada 5 minutos, fueron etiquetadas conforme a este tiempo y nombradas como fracciones del número 1 al 13, las cuales fueron almacenadas por 24 horas a -80°C. Se eligieron las fracciones en donde presumiblemente se encontraba CHH-A conforme al perfil cromatográfico y se liofilizaron (LABCONCO, Freezone 2.5) por 24 horas. Posteriormente cada fracción liofilizada se resuspendió en un volumen de 40 μ l de PBS 1x.

Se realizaron análisis por tinción de Coomassie y Western blot siguiendo los procedimientos descritos los apartados 5.2 y 5.3, para confirmar la presencia de la banda cercanas al peso molecular de la proteína de interés y la ausencia de proteínas adicionales, y su correspondiente detección por anticuerpo. Con base a los resultados obtenidos se seleccionó la fracción en la que se encontró CHH-A con mayor intensidad y pureza.

6.8 Cuantificación por BCA de CHH-A recombinante nativa (mg/l)

Como paso final, se realizó una última cuantificación por BCA del producto purificado, tal como se mencionó en el paso 5.7, para obtener el rendimiento final (mg/l) de la hormona recombinante nativa CHH-A que se obtuvo tras el procedimiento de expresión, precipitación y purificación.

Con esta información, se prepararon las dosis del tratamiento de CHH-A recombinante nativa que serían inyectadas durante los bioensayos correspondientes para esclarecer los efectos de dicha hormona en los procesos osmorreguladores.

Adicionalmente, se secuenció el N-terminal de la muestra purificada con el fin de corroborar de manera más fina que la proteína obtenida fuera realmente rCHH-A_N y determinar la presencia o ausencia de otras proteínas.

6.9 Secuenciación del N-terminal de la proteína purificada

La secuenciación del N-terminal de la CHH-A producida fue llevada a cabo corriendo una muestra de la proteína recombinante purificada (~ 200 µg) mediante una electroforesis desnaturizante de Tricina SDS PAGE de la misma manera como se describió en el apartado 6.2.2. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF BioTrace de 0.45 µm (Pall, Ann Arbor, MI, USA), teñidas con azul de Coomassie (0.025%, 50% metanol) por 5 minutos y desteñidas con metanol al 50% por 15 minutos. Las bandas de interés fueron cortadas de la membrana y enviadas al Instituto de Neurobiología de la UNAM para secuenciar en el N-terminal, donde emplearon el método de degradación de Edman (Procise 491 Protein Sequencing Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias generadas de los corrimientos fueron comparadas con el N-terminal de CHH-A y las secuencias adicionales encontradas fueron analizadas mediante blast (NCBI) para buscar homología con secuencias conocidas.

6.10 Crecimiento y mantenimiento de organismos

Se obtuvieron 20,000 postlarvas de *L. vannamei* (PL₁₈) de la granja Acualcultura Mahr (La Paz, Baja California Sur) que fueron mantenidas en un invernadero en estanques de 2000 litros en condiciones constantes de temperatura ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, mediante controladores con resistencias de 1000 W), salinidad (35‰), aireación (5.8 ± 0.5 mg/l) y recambio de agua (100%). La alimentación se basó en una dieta comercial (Aquaprofile, Purina) administrando el 5% de su peso en tres raciones diarias. Diariamente se removieron sobrantes de comida, heces y mudas a través de sifoneo.

6.11 Bioensayo

En la Figura 5 se puede observar el diseño experimental planteado para evaluar el efecto de la hormona rCHH-A_N en los proceso de osmorregulación de *L. vannamei*.

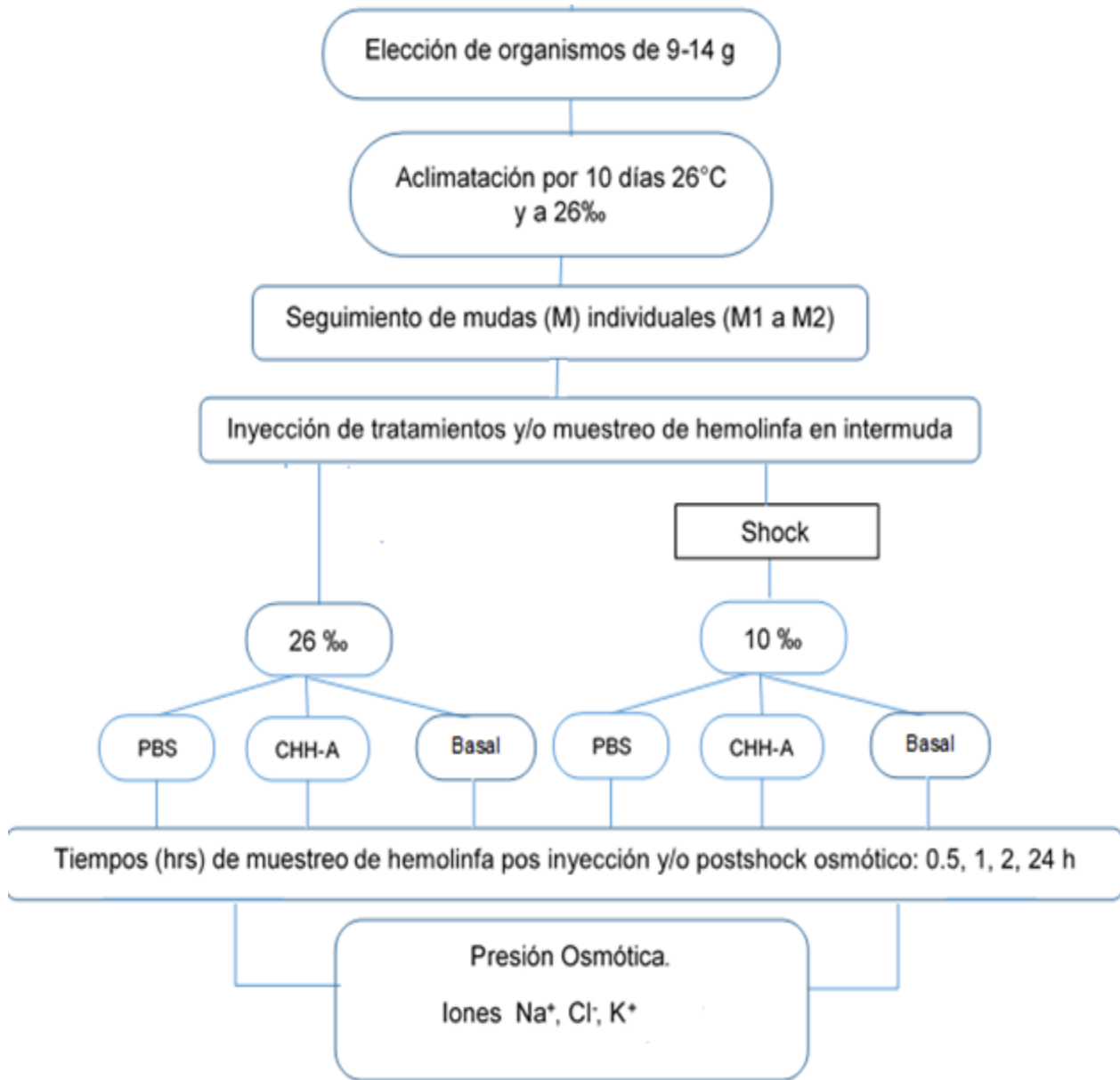


Figura 5. Esquema general de la metodología llevada a cabo para el bioensayo correspondiente.

6.11.1 Condiciones experimentales

Una vez que los organismos alcanzaron la talla requerida (9-14 g) se eligieron al azar un total de 280 organismos, los cuales fueron separados individualmente en cubetas de 3.5 L para llevar un control de sus ciclos de muda, y mantenidos en estanques

circulares de 200 L en el laboratorio húmedo de Biotecnología Marina. Los organismos fueron alimentados diariamente con alimento comercial de Aquaprofile 35 (Purina) en dos raciones que correspondieron al 5% de su peso corporal. Las condiciones experimentales fueron seleccionadas para que los organismos estuvieran en su punto iso-osmótico, a $26 \pm 1\%$. La temperatura fue de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, fotoperiodo natural y con aireación y recambio de agua constante. El recambio se diseñó combinando la entrada de agua dulce y agua de mar, ambas suministradas por sistemas de agua de CICESE, por medio de mangueras, con la finalidad de que la salida de agua a través de éstas mantuviera la salinidad deseada. Se mantuvo una limpieza diaria eliminando los excesos de comida, heces y restos de muda por medio de sifoneo. En estas condiciones permanecieron por 10 días (aclimatación), después de los cuales se inició la observación individual del ciclo de muda a través de la anotación del desprendimiento total del exoesqueleto (muda) en dos ocasiones consecutivas. La fase de intermuda fue considerada como la mitad del tiempo que llevó mudar dos veces al organismo y es en este periodo en donde se inyectaron los tratamientos correspondientes a los organismos con ayuno previo de 24 horas.

Con la finalidad de observar el efecto causado por la neurohormona recombinante nativa CHH-A en los procesos de osmorregulación, los organismos en condiciones iso-osmóticas fueron sometidos a shock hipo-osmótico (10‰) manteniendo la misma temperatura de aclimatación. Como control se utilizó la condición iso-osmótica (26‰). Dado que la salinidad del agua de mar de la Bahía de Todos los Santos, provista por el sistema de agua de mar del CICESE, es de 35‰ fue necesario diluir el agua de mar con agua dulce para alcanzar la salinidad de 10‰.

Una vez realizada la inyección de la hormona rCHH-A_N purificada, los organismos fueron expuestos a la salinidad correspondiente por 0.5, 1, 2 y 24 horas postinyección.

6.11.2 Tratamientos

Los tratamientos en organismos (en intermuda y con 24 horas de ayuno) fueron suministrados por medio de inyección con una jeringa hipodérmica estéril 31G (BD Plastipak) a través de la membrana artrodial del quinto par de pereiópodos (en donde se encuentra un seno hemolinfático).

Para determinar la condición basal del medio interno (tiempo cero) se utilizó un control experimental, el cual consistió en someter directamente a los organismos en intermuda (sin inyectar) al shock osmótico y tiempo de exposición correspondiente. En el caso de la condición salina iso-osmótica, dado que no existió un shock osmótico, se muestrearon 10 organismos directamente del estanque a 26‰.

Para el tratamiento correspondiente a la evaluación del efecto de la hormona en *L. vannamei* se prepararon dosis con una concentración de 2 μg de rCHH-AN resuspendida (ver apartado 6.8) en PBS 1X estéril para un volumen final de 50 μl .

Para diferenciar los efectos causados por la manipulación e inyección al organismo, de los efectos resultantes de la actividad de rCHH-AN se llevó a cabo la inyección del control negativo. Este tratamiento consistió en la inyección de 50 μl de solución de PBS 1X estéril (Figura 5).

6.11. 3. Obtención y determinación de las respuestas fisiológicas en la hemolinfa

Los muestreos se realizaron sustrayendo 100 μl de hemolinfa a través de la parte dorsal del primer segmento abdominal con una jeringa hipodérmica estéril 27G (BD Ultra-Fine). Para conservar la hemolinfa intacta, se depositó en una superficie plana fría (a 4°C) de donde se obtuvieron las muestras para los distintos análisis.

6.11.3.1 Capacidad Osmorreguladora (CO)

Se extrajeron 10 μl de hemolinfa fresca y se colocaron en un osmómetro de vapor (Wescor 5200) para obtener la presión osmótica (PO) de la hemolinfa (PO interna). Así mismo, se analizó la PO del agua del estanque en donde se mantuvo al organismo hasta el momento de su muestreo (PO externa). La CO se obtuvo con la diferencia de la PO interna de la PO externa y el resultado fue representado como mOsmol/kg. El osmómetro fue previamente calibrado con estándares de 100, 290 y 1000 mOsmol/kg (OPTI-MOLE, Wescor).

6.11.3.2 Proteínas totales

Para analizar la concentración de proteínas totales en las diferentes condiciones, se realizó una dilución de la muestra de hemolinfa con anticoagulante SIC-EDTA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA.Na₂ 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/kg) en una proporción 2:1, utilizando 40 µl de hemolinfa fresca. Para separar el plasma sanguíneo del componente celular, la muestra se centrifugó a 4°C a 3000 rpm por 5 minutos. El pellet fue eliminado y el plasma sanguíneo se almacenó a -80°C. Una vez que el lote de muestras se completó, éstas se analizaron por triplicado, utilizando placas de plástico en fondo de “v” de 96 pozos (COSTAR) junto con una curva estándar con BSA en las concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.5 mg/ml en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiscan Go) a 595 nm.

La cuantificación se llevó con el kit Protein assay (BIO-RAD) cuyo principio está basado en el método de Bradford (1976). En este método, el colorante azul de Coomassie cambia de color en respuesta a la concentración de proteínas en la muestra, teniendo un complejo de absorbanza máxima de 595 nm. El colorante se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos de la proteína, especialmente a la arginina.

6.11.3.3 Almacenamiento de hemolinfa en heparina para análisis de iones

Las muestras de hemolinfa fresca fueron diluidas 1:3 de con heparina estéril (sal de amonio de la mucosa de intestino porcino, SIGMA) (80 mg/100 ml) como anticoagulante no quelante. Esto con el objetivo de poder analizar la concentración de iones en la hemolinfa en cada una de las condiciones experimentales. El plasma se separó del componente celular como se mencionó en el apartado 6.11.3.2 y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Para el análisis de iones sodio, potasio y cloro se usaron kits comerciales (STANBIO) y se siguieron las indicaciones del proveedor. Se modificaron las cantidades sugeridas para llevar a cabo el proceso en placas plásticas de 96 pozos (COSTAR). Los

procedimientos realizados se pueden ver en los anexos 1 a 3 para sodio, potasio y cloro, respectivamente.

6.11.4 Análisis estadísticos

La estadística descriptiva, pruebas paramétricas y no paramétricas, según corresponda, se efectuaron con los estadísticos SigmaStat 11.0 mientras que las gráficas fueron hechas con el programa SigmaPlot 10.0.

Con el fin de evidenciar el efecto de CHH-A sobre los diferentes parámetros a medir, se contrastaron los valores obtenidos contra el control basal y el control negativo de PBS 1X en gráficas de barras. En función de la normalidad de los datos, se usó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para los valores que resultaron ser paramétricos y la prueba de Kruskal-Wallis para aquellos no paramétricos con el fin de hacer la comparación entre los tratamientos y determinar si las diferencias fueron significativas o no ($P < 0.05$). En los análisis paramétricos se usó la media y desviación estándar, mientras que en los no paramétricos la mediana y los valores de intervalos de confianza al 95%. Para evidenciar los grupos con diferencias significativas se usó la prueba de Tukey o de Dunn, según la normalidad de los datos.

7. Resultados y discusión

7.1 Inducción de las clonas

Comparando ambos medios de cultivos, el medio complejo (BMMY) promovió una mayor expresión de proteínas en relación al medio mínimo (BMM), incluyendo la correspondiente a la proteína recombinante nativa que se espera que migre cerca de los 10 kDa ya que la proteína recombinante CHH-A tiene un peso de 8.9 kDa.

En el medio complejo, la cepa X-33-CHHA_N presentó la banda de interés a partir de la concentración de metanol al 1%, siendo en el día 2 de esta concentración (1%) cuando la banda se ve más intensa, no habiendo diferencias notables en concentraciones mayores (Figura 6). Por otro lado, en la cepa SMD1168H-CHHA_N la proteína comenzó a detectarse al utilizar 2% de metanol y al día 3 (Figura 7), lo que concuerda con lo reportado por Camacho-Jimenez (2011) para la proteína nativa CHH-B1 en este mismo medio, utilizando la cepa de fenotipo Mut^s KM71. Sin embargo, las bandas en ambos casos fueron tenues y no parece haber una diferencia clara en la intensidad de las mismas en las diferentes concentraciones de metanol (Figura 6 y 7). A su vez, la acumulación de proteínas accesorias fue evidente conforme aumentaron los días, y en general, la cantidad de éstas superó lo esperado para el medio complejo, según lo reportado por Camacho-Jiménez, (2011) aunque contrasta el hecho de que las cepas utilizadas en este trabajo son de fenotipos distintos a la utilizada por Camacho-Jiménez, (2011).

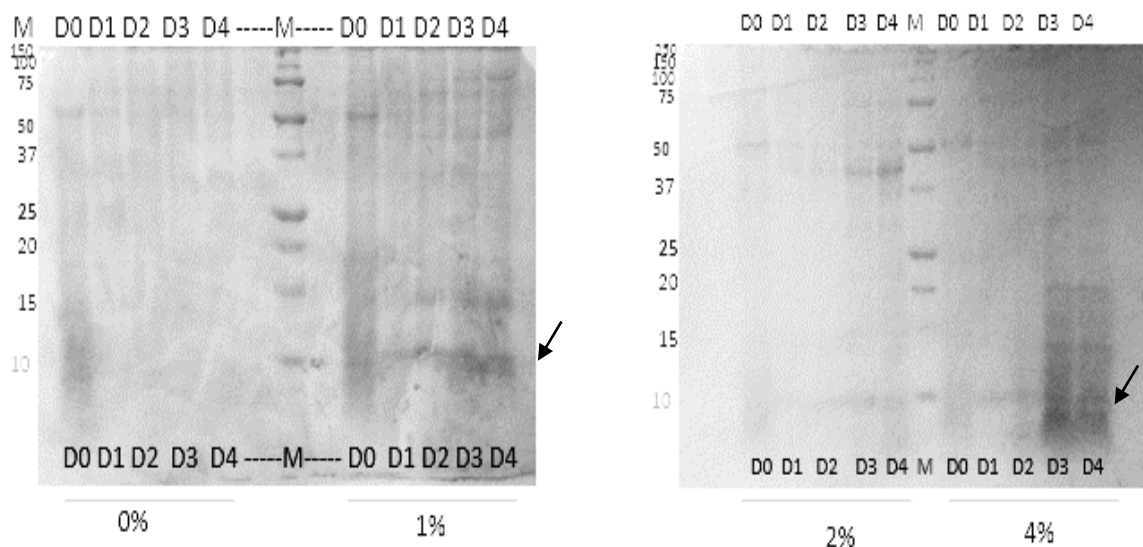


Figura 6. Inducción de la cepa X-33-CHHA_N en medio BMMY en los días cero a cuatro (D0-D4) con las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%). Geles de Tricina SDS-PAGE al 14% teñidos con azul de Coomassie. Los números a la izquierda de cada gel corresponden al tamaño de las bandas del marcador molecular Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad).

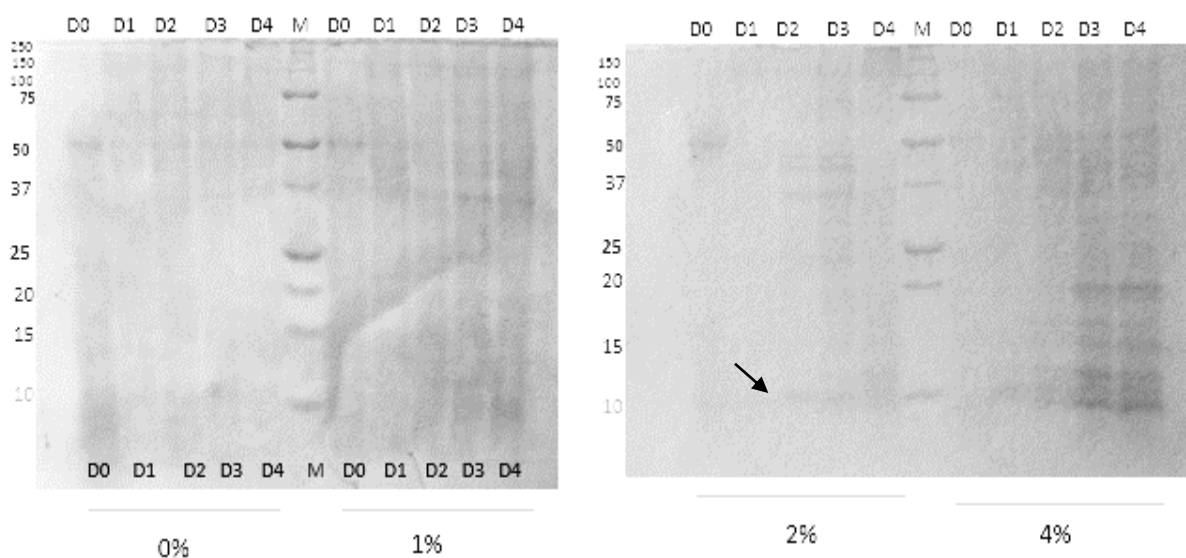


Figura 7. Inducción de la cepa SMD1168H-CHHA_N en medio BMMY en los días cero a cuatro (D0-D4) con las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%). Geles de Tricina SDS-PAGE al 14% teñidos con azul de Coomassie. Los números a la izquierda de cada gel corresponden al tamaño de las bandas del marcador molecular Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad).

En el caso del medio mínimo, las bandas del tamaño esperado (10 kDa) fueron observadas hasta los días 3 y 4 utilizando 2% de metanol, en el caso de la cepa SMD1168H-CHHA_N, y 4% tanto en SMD1168H-CHHA_N como en A-X-33-CHHA_N (Figura 8 y 9). Estos resultados se pueden explicar por la deficiencia en nutrientes en el medio mínimo en comparación con el complejo, lo que haría más lentos los procesos metabólicos de *P. pastoris*. La presencia de las bandas en estas concentraciones, a su vez, es comparable con las condiciones óptimas reportadas por Sánchez-Castrejón (2007) para CHH-B1_{His} en X-33 (día 2 con 2% de metanol), y para otras proteínas recombinantes de *P. monodon*, que incluyen concentraciones de 3% y 4% en los días 2 y 3 en la cepa KM71. Sin embargo, la banda que se visualiza se encuentra claramente por debajo de los 10 kDa (Figura 8 y 9) en contraste con las bandas del medio complejo, que se encuentran justo a los 10 kDa. Cabe hacer notar que la cantidad de proteínas accesorias fue mínima en cualquiera de las concentraciones, siendo SMD1168H-CHHA_N la cepa con mayor producción al día 3 y 4 con 4% metanol (Figura 9). Sin embargo, la intensidad de la banda es menor a la que se observa en medio complejo.

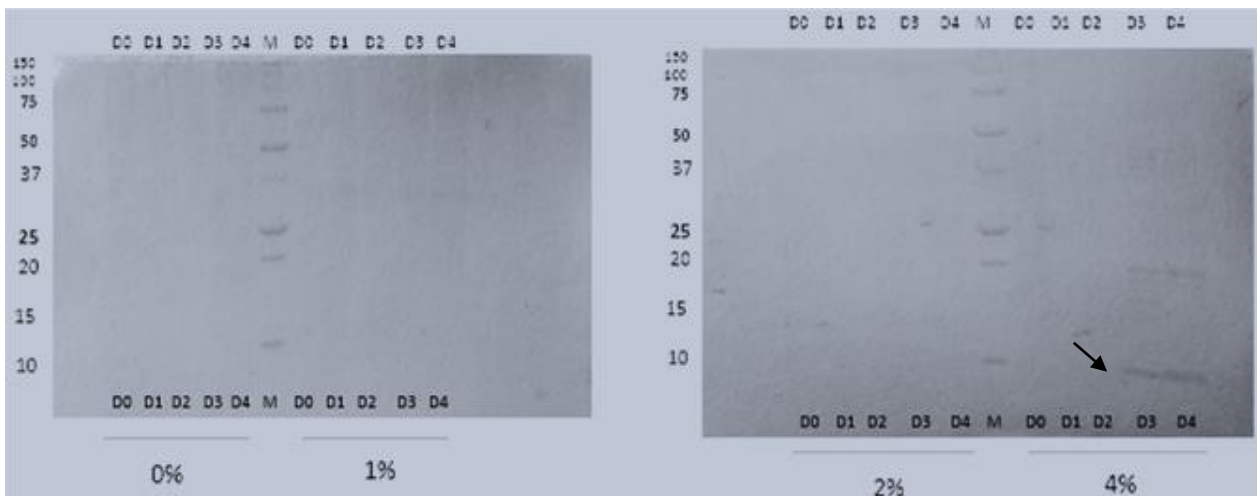


Figura 8. Inducción de la cepa X-33-CHHA_N en medio BMM en los días cero a cuatro (D0-D4) en las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%). Geles de Tricina SDS-PAGE al 14% teñidos con azul de Coomassie. Los números a la izquierda de cada gel corresponden al tamaño de las bandas del marcador molecular *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad).

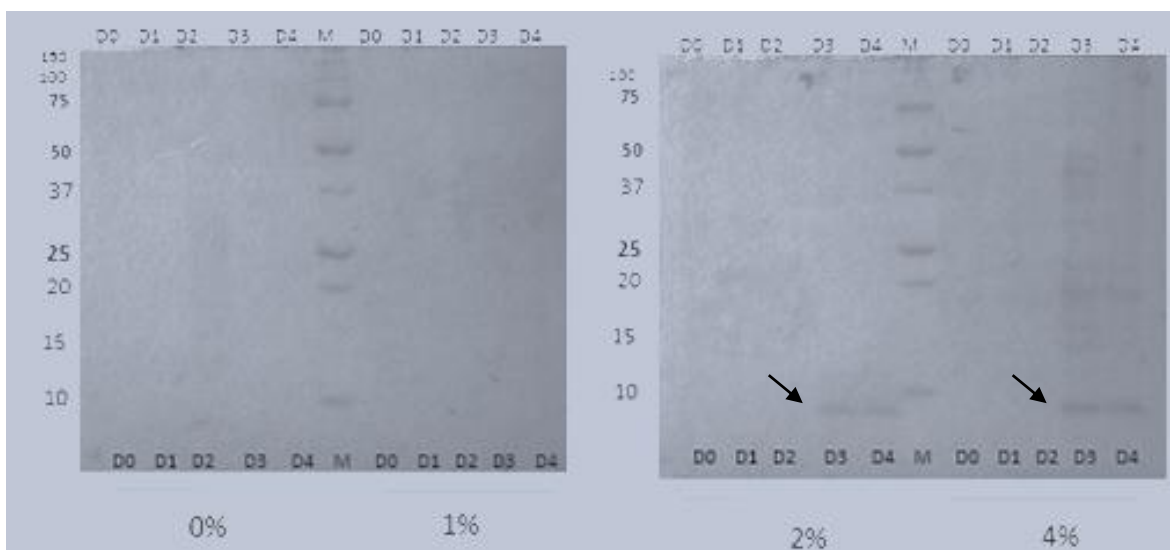


Figura 9. Inducción de la cepa SMD1168H-CHHA_N en medio BMM en los días cero a cuatro (D0-D4) en las 4 concentraciones finales de metanol (0, 1%, 2% y 4%). Geles de Tricina SDS-PAGE al 14% teñidos con azul de Coomassie. Los números a la izquierda de cada gel corresponden al tamaño de las bandas del marcador molecular *Precision Plus Protein Standard Unstained* (Bio-Rad).

7.2 Inmunodetección de la proteína CHH-A recombinante nativa

El anticuerpo antiCHH-A detectó una banda a la altura de 10 kDa en algunas de las muestras utilizadas en medio complejo y en medio mínimo (Figura 10). Las bandas que se distinguen en Coomassie en X-33-CHHA_N en el medio complejo (BMMY) fueron detectadas en el Western Blot con mayor intensidad que las de A-SMD1168, salvo aquella muestra de X-33-CHHA_N que fue inducida a la concentración de 4% y al día 4, disminución que podría explicarse por degradación de la proteína recombinante por el aumento de proteasas en el medio de cultivo debido al tiempo de inducción (D4), así como la concentración misma de metanol (4%).

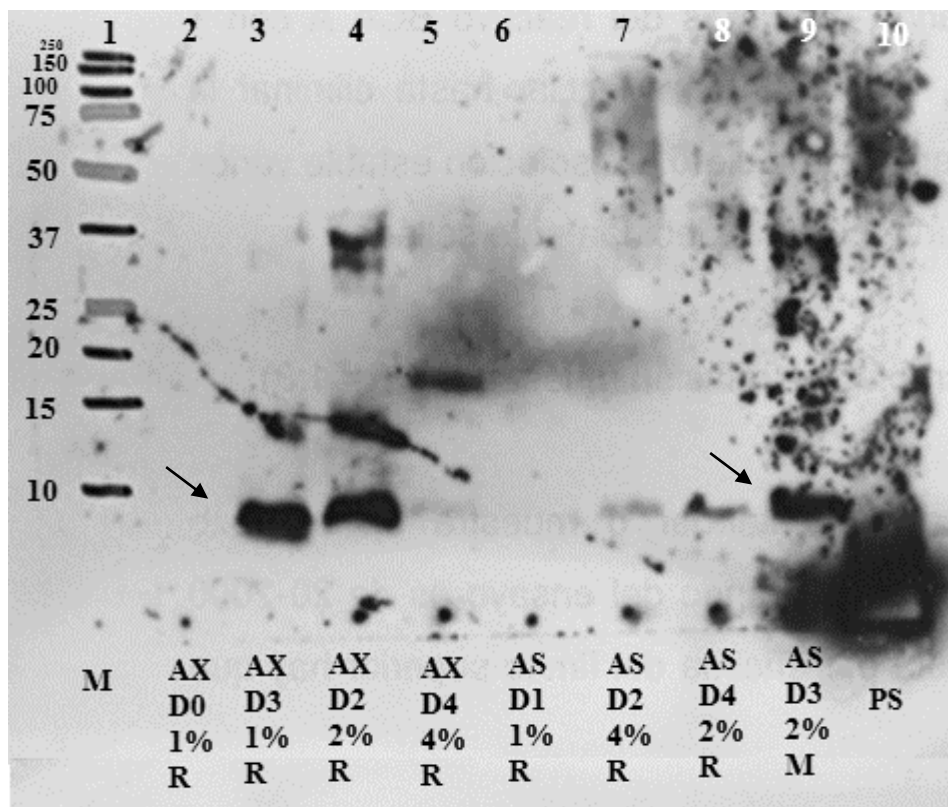


Figura 10. Detección de muestras inducidas por anticuerpo policlonal antiCHH-A mediante la técnica de Western Blot. Número de carriles arriba (1-10), muestras abajo, tamaños de banda a la izquierda. M= líneas marcadas para señalar sitio de corrimiento del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standard unstained* (Bio-Rad). Los carriles 3-9 contienen las muestras problemas, carril 1 como control negativo; en orden hacia abajo, las muestras problemas y control negativo se identifican como cepa (AX= X-33-CHHA_N, AS= SMD1168H-CHHA_N), día de inducción (D0-D4), concentración de metanol final (1, 2 y 4%) y medio de cultivo (R=complejo, M= mínimo). Carril 10 como control positivo, PS= péptido sintético (12 µg). Las flechas señalan un ejemplo de la detección de CHH-A recombinante nativa a los 10 kDa en ambas cepas.

Con esta información, la cepa X-33-CHHA_N fue la mejor opción para expresar la proteína recombinante nativa CHH-A en medio complejo, mientras que las condiciones óptimas de inducción con la cepa SMD1168H-CHHA_N en este mismo medio fueron a la concentración de entre 1 y 2% de metanol al día uno y dos, respectivamente, que fue cuando la síntesis de proteínas accesorias es mínima (Figura 5). Por otro lado, la muestra correspondiente a la cepa SMD1168H-CHHA_N en el día 3 de inducción y al 2% de metanol también fue detectada por el anticuerpo a la altura de los 10 kDa y con una intensidad comparable a la de X-33-CHHA_N en el medio complejo (Figura 10). Sin embargo, la migración de las proteínas visualizada en Coomassie no corresponde a la

migración de la banda detectada por Western blot, lo que indicaría que la expresión de la proteína de interés es baja y por ello no puede ser visualizada sólo por tinción de Coomassie.

7.3 Selección de condiciones de expresión de CHH-A

Con esta información, se seleccionó el medio complejo como medio inductor para obtener la proteína recombinante CHH-A, y a la cepa X-33-CHHA_N para expresarla. Para elegir el día de inducción más conveniente, se compararon las muestras tanto en tinción de Coomassie como en Western blot de los días seleccionados por su baja expresión de proteínas accesorias y la intensidad de la banda; en este caso, el día 1 y día 2 de la concentración final de metanol al 1% (Figura 11).

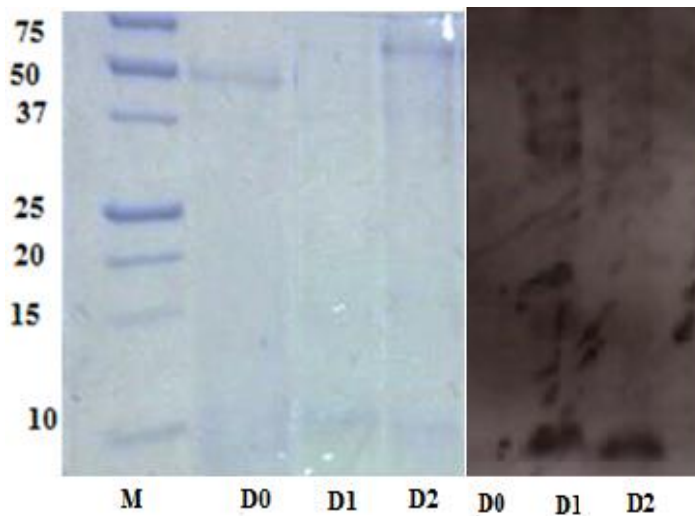


Figura 11. Inducción de CHH-A a partir de la cepa X-33-CHHA_N en medio complejo BMMY hasta el día 2 al 1% de metanol. Izquierda: Tricina SDS-PAGE teñido con Coomassie. M: Marcador de peso molecular *Precision protein Standard unstained* (Bio-rad). D0: día cero de inducción. D1: día uno de inducción. D2: día dos de inducción. Derecha: Western blot por el método de quimioluminiscencia. D0: día cero de inducción. D1: día uno de inducción. D2: día dos de inducción.

Los resultados demostraron que no hubo diferencia notable en la intensidad de las bandas de los días analizados; la tinción de Coomassie mostró una banda a los 10 kDa en ambos días (ausente en el día cero) así como en la inmunodetección, donde el grosor de la banda que representa la detección de CHH-A es similar. Sin embargo, el día dos presenta mayor cantidad de bandas accesorias visibles en Coomassie, por lo que se

decidió que las inducciones se llevarían hasta el día uno, ya que no hubo un aumento visible en la expresión con más tiempo de inducción.

7.4 Precipitación de CHH-A por sulfato de amonio

7.4.1 Gradiente de precipitación por sulfato de amonio (SA)

Como se observa en la Figura 12, la muestra inicial (A) que representa el día de inducción elegido sin SA mostró la banda de 10 kDa. Durante el punto de saturación del 30% de sulfato de amonio (P30) no hubo precipitación de ninguna proteína, mientras que el sobrenadante correspondiente a ese punto de saturación (S30) contenía todas las proteínas, incluyendo a la de 10 kDa. En el punto de saturación del 40% se pudo observar que hay precipitación de proteínas de alto peso molecular y también a los 10 kDa (muestra P40), sin embargo, la presencia de la misma banda se encontró también en el sobrenadante (S40) lo que indicó que la precipitación había sido parcial. En contraste, el pellet del punto de saturación al 50% (P50) presentó la banda de 10 kDa (flecha) y una mínima cantidad de proteínas accesorias, mientras que su sobrenadante no mostró dicha banda (S50), por lo que la precipitación en este punto fue completa. Por último, el punto de saturación al 60% (P60 y S60) ya no presentó la banda a 10 kDa, lo que confirma que es en el punto de saturación al 50% en donde la banda de 10 kDa, que corresponde a rCHH-A_N, precipita por completo.

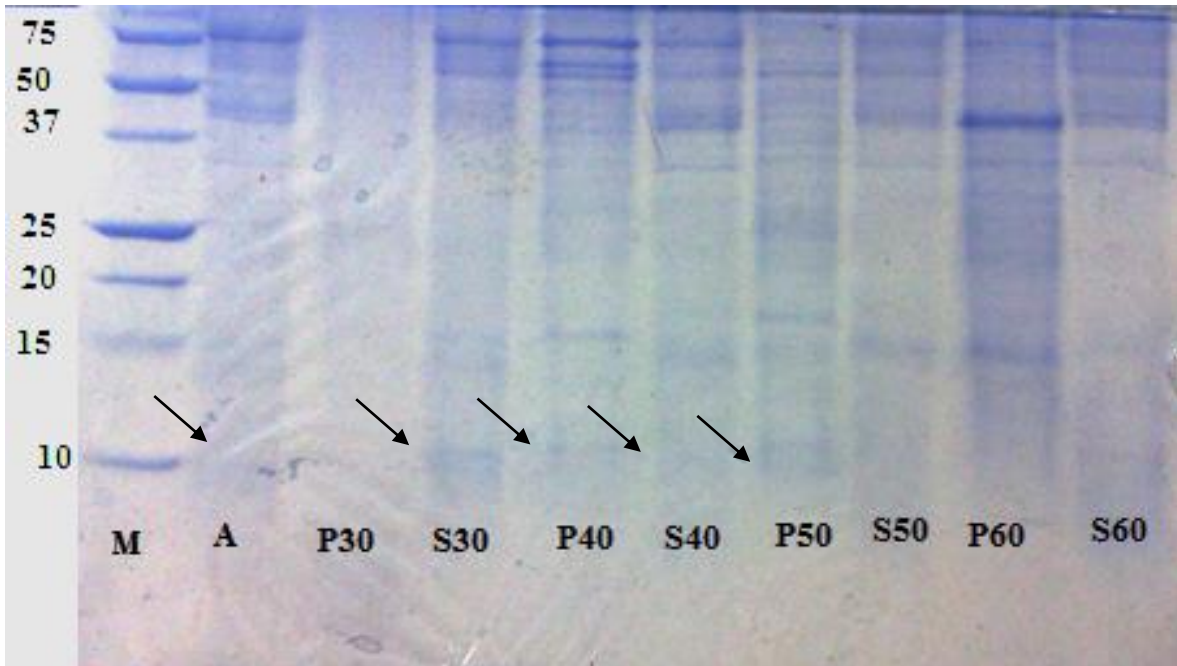


Figura 12. Gradiente de saturación por sulfato de amonio. Tricina SDS-PAGE (14%) teñido con azul de Coomassie. M=marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standard unstained*. A=muestra antes de comenzar la precipitación (medio inductor con las condiciones establecidas como óptimas). P=Pellets obtenidos tras la precipitación. S=Sobrenadantes de los puntos de saturación tras la separación del pellet. 30, 40, 50, 60=Porcentajes de saturación con SA. Las flechas señalan la presencia de la banda de 10 kDa en las muestras.

Dado esta información, se eligió el punto de saturación al 50% de SA para precipitar CHH-A en las posteriores inducciones.

7.5 Diálisis

Tanto la tinción de Coomassie como el Western blot reveló que la banda de 10 kDa fue precipitada y dializada correctamente. Como se observa en la Figura 13, la banda inicial (A) a la altura de los 10 kDa, se concentró por la precipitación con SA (Pc/SA) y se mantuvo así, pero más definida gracias a la ausencia de sales en la muestra una vez dializada (PD). También se distingue una segunda banda a la altura de los 15 kDa en ambas muestras sin dializar y dializado. El sobrenadante recolectado tras la precipitación no muestra banda alguna a la altura de los 10 kDa (S) por lo que se corrobora que la precipitación fue completa (Figura 13).

Lo anterior fue corroborado por la técnica de Western blot, en donde A es detectada por el anticuerpo como una banda débil, sin embargo la muestra precipitada y dializada (PD) fue detectada fuertemente. Por otro lado, en el sobrenadante no se detectó nada, lo que confirma que la precipitación fue total. Además de la banda de 10 kDa, también se detectó débilmente una banda a la altura de los 15 kDa (flecha) que corresponde a aquella visualizada en la precipitación por SA, lo que sugiere que CHH-A tiene una conformación estructural alterna a la esperada como ha sido observado anteriormente en otras proteínas purificadas como la CHH-B1_{His} (Sanchez-Castejón, 2007) o pudiera existir un procesamiento incorrecto de la proteína en el N-terminal.

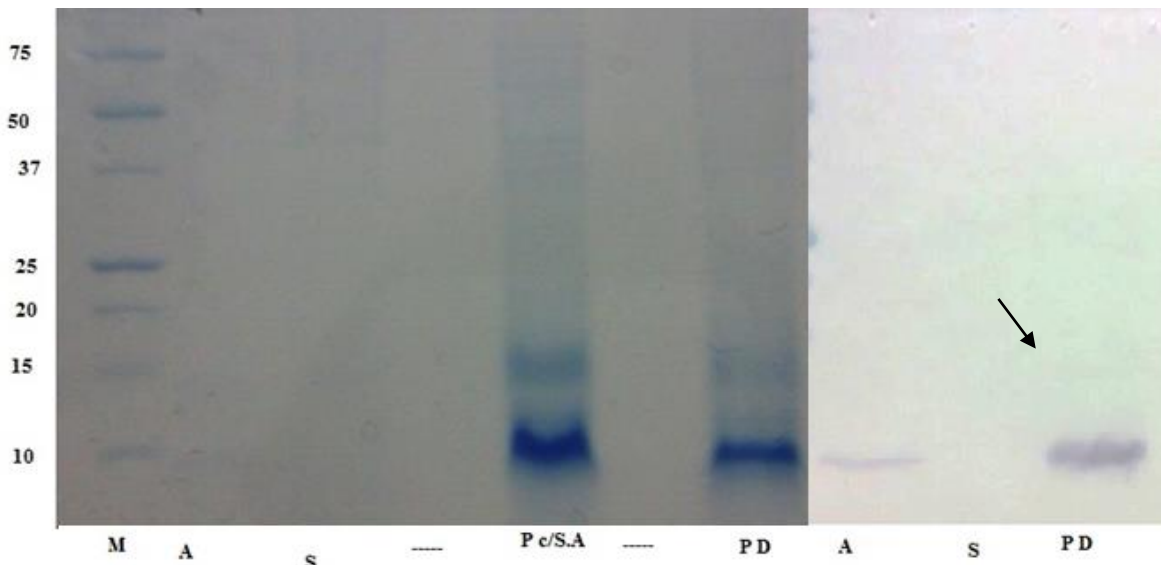
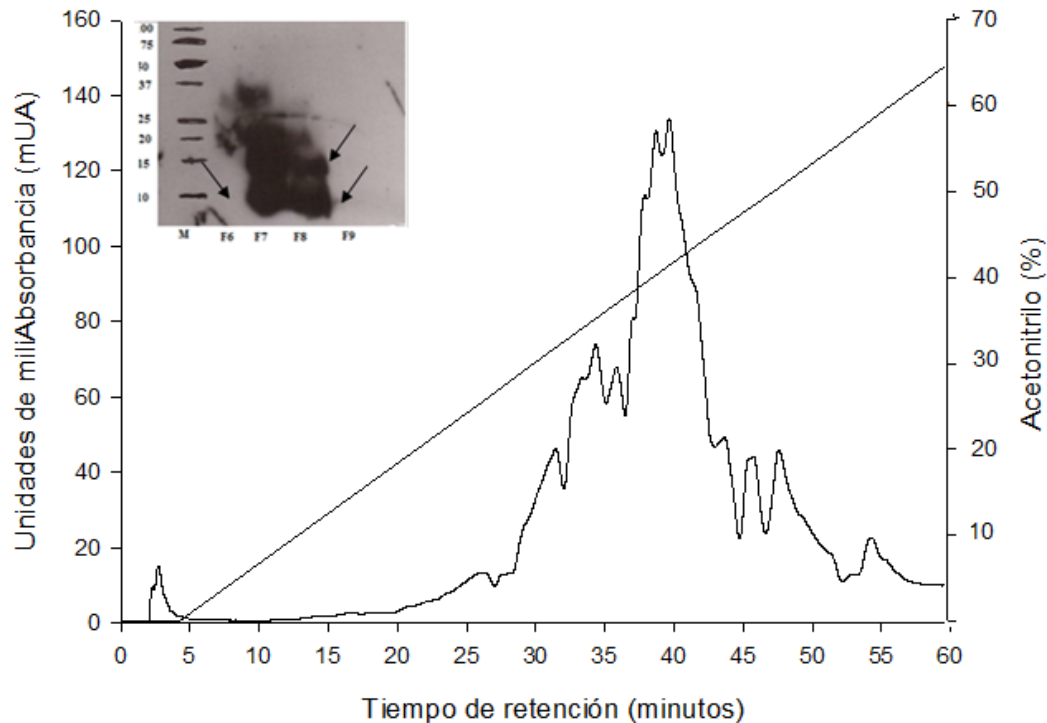


Figura 13. Análisis de la proteína precipitada por SA y posteriormente dializada. Izquierda: Tricina SDS-PAGE (14%) con tinción de Coomassie. M=Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standard unstained* (Bio-Rad). A=muestra antes de comenzar la precipitación (medio inductor con las condiciones establecidas como óptimas). S=sobrenadante recolectado tras la precipitación por SA. --- = Ausencia de muestra en el carril. Pc/SA= Pellet resultante tras la precipitación, con SA. PD=Pellet resultante tras la precipitación, dializado. Derecha: Western blot TMB-Blotting 1-step solution (PIERCE). Las siglas significan lo mismo que las marcadas en Tricina SDS-PAGE. Flecha señala banda detectada tenuemente a los 15 kDa

7.6 Purificación de CHH-A por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)

El perfil cromatográfico inicial mostró que en los tiempos de 30-50 minutos, correspondientes a las fracciones 6, 7, 8 y 9 y a una concentración aproximada de 35, 40, 45 y 50% de acetonitrilo, respectivamente, hay un patrón de picos, siendo el más alto aquél correspondiente a la fracción 7 y 8 (Figura 14). Las fracciones analizadas por la técnica de Western blot, revelaron la presencia de CHH-A sólo en las dos fracciones que componen al pico más alto (F7 y F8, con 45 y 50% de acetonitrilo, respectivamente), mientras que no fue detectada en las otras dos (F6 y F9). Así mismo, a pesar de que la detección es muy intensa, se vislumbra que hay dos bandas presentes: la de 10 kDa y la de 15 kDa.



7.6.1 Análisis de las fracciones purificadas por RP-HPLC

Para corroborar la presencia de esas dos bandas, se realizó un segundo Western blot sólo con las fracciones detectadas por el anticuerpo y se comparó con tinción de Coomassie (Figura 15). De esta manera, se confirmó la presencia de rCHH-A_N (de 8.9 kDa) cercana a los fragmentos del marcador de peso molecular de 10 y 15 KDa, siendo detectada la de 15 KDa con mayor intensidad en la fracción 7. Así mismo, debido a que en la F8 se observó una banda adicional por debajo de los 10 KDa se decidió utilizar únicamente la F7, que eluye en una concentración de 45% de acetonitrilo, para los bioensayos.

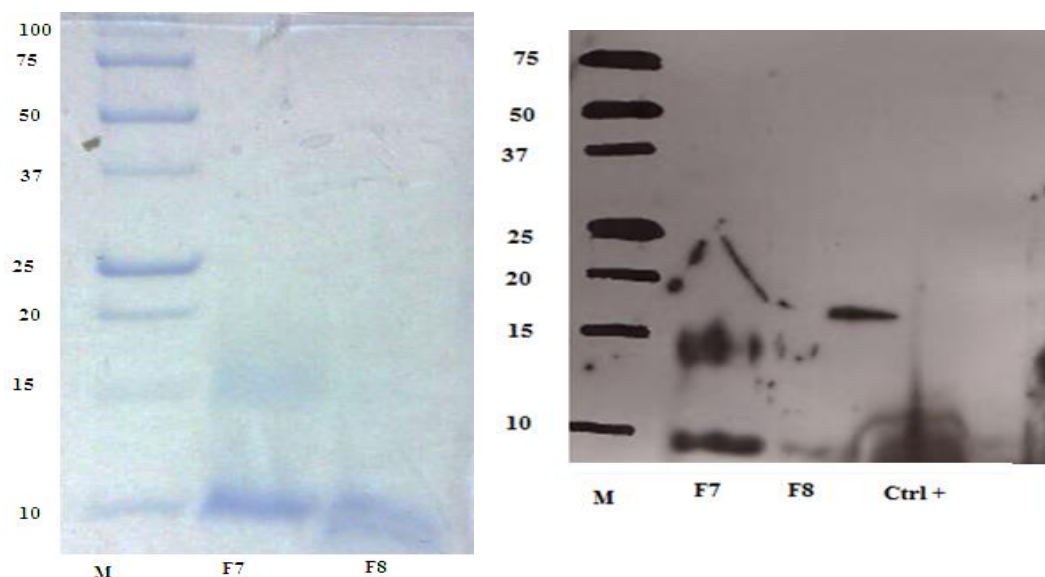


Figura 15. Fracciones purificadas que contienen a CHH-A. Izquierda Tricina SDS-PAGE con tinción de Coomassie. M= líneas marcadas para señalar sitio de corrimiento de marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standard unstained* (Bio-Rad). F7=fracción 7. F8=fracción 8. Derecha; Western blot revelado por el método quimioluminiscente. F7=fracción 7. F8=fracción 8. Ctrl+=Control positivo (antígeno).

El análisis por BCA mostró un rendimiento final de 12.19 mg/l de la muestra liofilizada y resuspendida en PBS 1X de las fracciones correspondientes a F7. Estas muestras son las que se utilizaron para el bioensayo.

La secuenciación del N-terminal de la muestra purificada, realizada por 15 ciclos mostró la secuencia SLFDPSCTGVFDRQL, tanto en la banda de 10 kDa como en la de 15 kDa. Esta secuencia coincide completamente con el N-terminal de la proteína de interés rCHHA_N. El hecho de tener estas diferencias de peso a pesar de haber utilizado condiciones desnaturalizantes y reductoras pudiera explicarse por el hecho de que podría tratarse de agregados covalentes por la formación de puentes disulfuro entre moléculas de la hormona, después de la reducción de algunos puentes o en su caso uniones no covalentes muy resistentes a la desnaturalización por SDS y/o a la reducción por β-mercaptoetanol, utilizadas en el corrimiento electroforético.

Sin embargo, a pesar de que en su mayoría está presente rCHH-A_N, se detectaron otras bandas minoritarias que probablemente fueron precipitadas y purificadas junto con la neurohormona de interés. El análisis de aminoácidos minoritarios detectó principalmente la secuencia GLPGTAGLPGM. Cabe mencionar que las dos P en la secuencia en realidad parecieran estar hidroxiladas. El blast realizado con esta secuencia adicional (utilizando el programa blast del NCBI) sugiere que pudiera tratarse de, al menos, un fragmento de colágena que no logra separarse de las rCHH-A_N y que tiene un comportamiento electroforético en SDS-PAGE en condiciones reductoras muy similar a las hormonas. La colágena contiene hidroxiprolinas lo que coincide con el análisis realizado. Esta colágena pudiera provenir de la peptona utilizada en el medio de cultivo. Sin embargo, no se descarta que se pudiera tratar de proteína propias de *Pichia*.

No obstante tener proteínas adicionales en nuestra muestra, la proteína de interés se encontró en forma mayoritaria por lo que se decidió utilizarla para los bioensayos en una concentración similar a la utilizada anteriormente con otras CHHs (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; Camacho-Jiménez, 2011).

7.7 Efecto de CHH-A recombinante nativa en la Capacidad Osmorreguladora (CO) de *L. vannamei* mantenido a 26 ‰

La prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov mostró que los datos cumplían con este supuesto, por lo que se usó la media y desviación estándar para realizar las gráficas de barras. Los grupos fueron comparados entre sí con la prueba de Tukey.

La Presión Osmótica (PO) basal fue de 694 mOsm/kg, lo que concuerda con lo reportado en condiciones iso-osmóticas para *L. vannamei* (25-26.7‰) que llega a estar en un rango de 676.8–700.7 mOsm/kg (Díaz *et al.*, 2001) en temperaturas constantes, como las que se mantuvieron en este experimento.

Sin embargo, a lo largo de la mayor parte experimento en esta salinidad, hubo fluctuaciones en la salinidad del agua (medio externo) debido a los cambios de flujos en el agua de mar y agua dulce del sistema, por lo que no se mantuvo una presión osmótica externa constante, donde el promedio llegó a ser de 659.2 ± 29.4 mOsm/kg ($21.2 \pm 1‰$).

Como era de esperarse para condiciones cercanas a las iso-osmóticas, en las primeras 2 horas postinyección no se encontraron diferencias significativas en la osmolaridad de la hemolinfa entre tratamiento con PBS (718 mOsm/kg) y los niveles basales (694 mOsm/kg). Sin embargo, a las 24 horas postinyección hubo una disminución significativa de la osmolaridad (670 mOsm/kg) con respecto al basal. De igual manera, la capacidad osmorreguladora del organismo en condiciones iso-osmóticas se mantuvo sin cambios significativos por la inyección de PBS en las primeras dos horas (Figura 16).

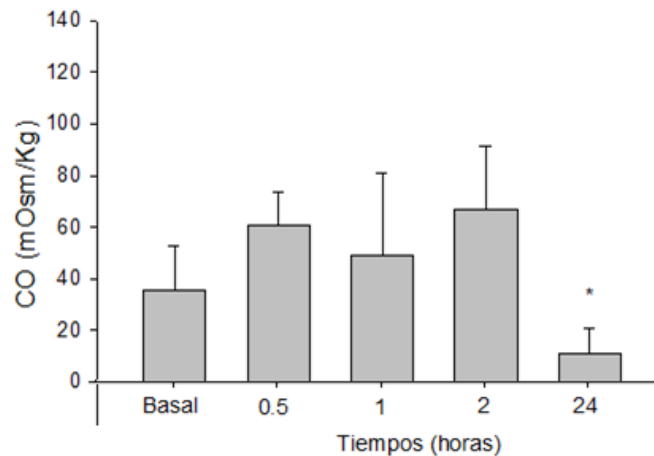


Figura 16. Capacidad osmorreguladora obtenida antes (basal) y después de la inyección con PBS 1X (control negativo) en los diferentes tiempos, a 26‰. Las líneas verticales representan la desviación estándar. (*) Diferencias significativas con respecto al basal ($P < 0.05$)

Estos resultados sugieren que no hubo un efecto significativo de la manipulación e inyección de los camarones no ablacionados, bajo condiciones iso-osmóticas sobre la capacidad osmorreguladora en las primeras dos horas del tratamiento. Esto concuerda con la literatura en donde se menciona que en estas salinidades y en la ausencia de estrés por temperatura, no hay un esfuerzo fisiológico por mantener el medio interno (Panikkar, 1968; Castille and Lawrance, 1981 a; Diaz, *et al.*, 2001; Bückle, *et al.*, 2006). La aclimatación previa en el punto iso-osmótico permitió mantener la estabilidad del medio interno aún en presencia de un estrés, como es la manipulación por sí misma.

De igual manera, la inyección de rCHH-A, en condiciones iso-osmóticas, no tuvo un efecto significativo en la osmolaridad de la hemolinfa y capacidad osmorreguladora con respecto control basal en las primeras dos horas (Figura 17).

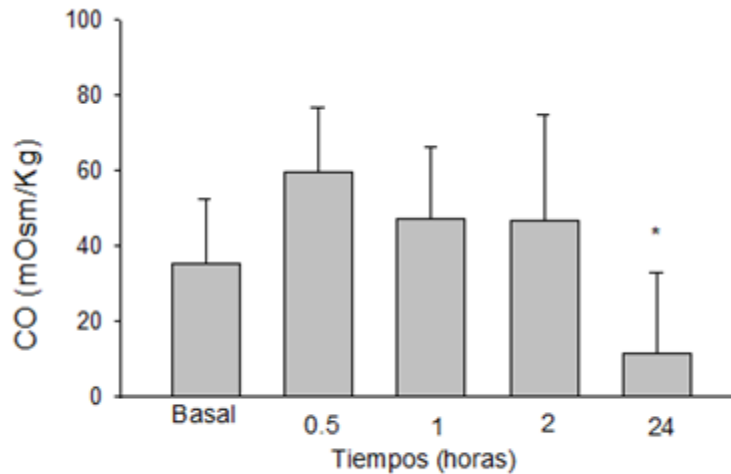


Figura 17. Capacidad osmorreguladora obtenida antes (basal) y después de la inyección con CHH-A en los diferentes tiempos, a 26‰. Las líneas verticales representan la desviación estándar. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$)

En la Figura 18 se pueden observar los tratamientos comparados entre sí y contra el basal, en donde no hay una diferencia significativa en los efectos mostrados por inyección de PBS y por CHH-A en las primeras dos horas postinyección. Por otro lado, se hace evidente la diferencia significativa transcurrida las 24 horas de ambos tratamientos con respecto al basal; la disminución de la osmolaridad en la hemolinfa a las 24 horas da como resultado la disminución de la CO hasta llegar incluso más bajo que el basal. A este tiempo se esperaba la CO se reestableciera a niveles cercanos al basal, sin embargo, la disminución en la PO del medio interno (670 mOsm/kg) en los organismos inyectados con PBS y con la hormona recombinante provocaron la disminución de la CO a este tiempo (Figura 18) y probablemente el aumento observado en los niveles de proteínas a estos tiempos que se describe en la sección 7.9.1 (Figuras 23 y 24). El hecho de que ambos tratamientos a 24 h hayan sido realizados al mismo tiempo sugiere que la diferencia entre la CO basal y la CO transcurridas las 24 horas podría deberse a las diversas fluctuaciones de los flujos de agua dulce y agua de mar

durante el experimento, y dado que no hay un efecto por estrés, éstas diferencias en las fluctuaciones se hicieron evidentes.

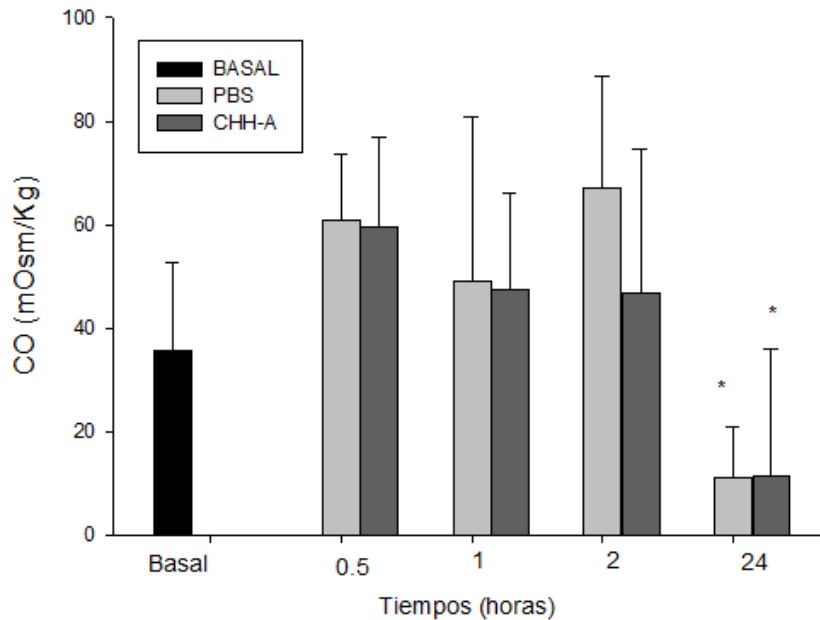


Figura 18. Efecto de los tratamientos sobre la capacidad osmorreguladora en las distintas horas a 26‰. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$)

7.8 Efecto de CHH-A recombinante nativa en la Capacidad Osmorreguladora (CO) de *L. vannamei* mantenido a 10 ‰

La prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov mostró que los datos cumplían con este supuesto, por lo que se usó la media y desviación estándar para realizar las gráficas de barras. Los grupos fueron comparados entre sí con la prueba de Tukey.

En condiciones hipo-osmóticas (10‰), la concentración osmótica basal de *L. vannamei* disminuyó ligeramente en comparación con el valor basal obtenido a 26‰, ya que fue de 678 mOsm/kg. Al exponer a *L. vannamei* a un shock hipo-osmótico, éste exhibió una respuesta hiper-osmótica similar en los distintos puntos de muestreos. *L. vannamei* ha comprobado ser un fuerte organismo osmorregulador y en este experimento

se vio claramente al ser capaz de hiper-regular su concentración osmótica interna (678 mOsm/kg) por arriba de la concentración del medio externo (330 mOsm/kg), mostrando una capacidad osmorreguladora de alrededor de 350 mOsm/kg en los diferentes tiempos de muestreo (Figura 19).

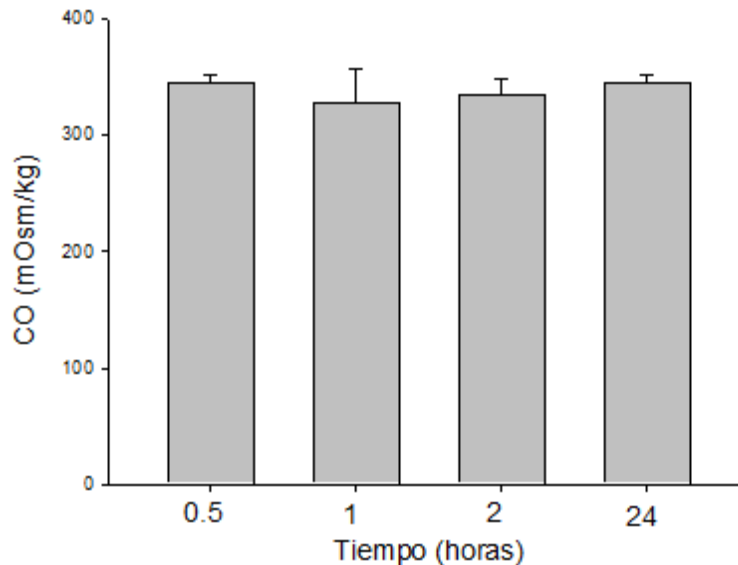


Figura 19. Capacidad osmorreguladora basal en los distintos tiempos tratados a 10 ‰

El valor de capacidad osmorreguladora obtenida bajo estas salinidades coinciden con las reportadas anteriormente para este organismo (Díaz., *et al*, 2001; Re *et al.*, 2004; Bückle *et al.*, 2006) bajo condiciones constantes de temperaturas (26-28°C) en rangos de salinidad similares a las usadas en este estudio. En el caso de la inyección de PBS y posterior shock hipo-osmótico, durante la primera media hora se observó un aumento en la capacidad osmótica de 345 mOsm/kg basales a 382 mOsm/kg por PBS, manteniéndose así hasta la hora post-inyección y disminuyendo significativamente a las 24 horas hasta los niveles basales observados (Figura 20).

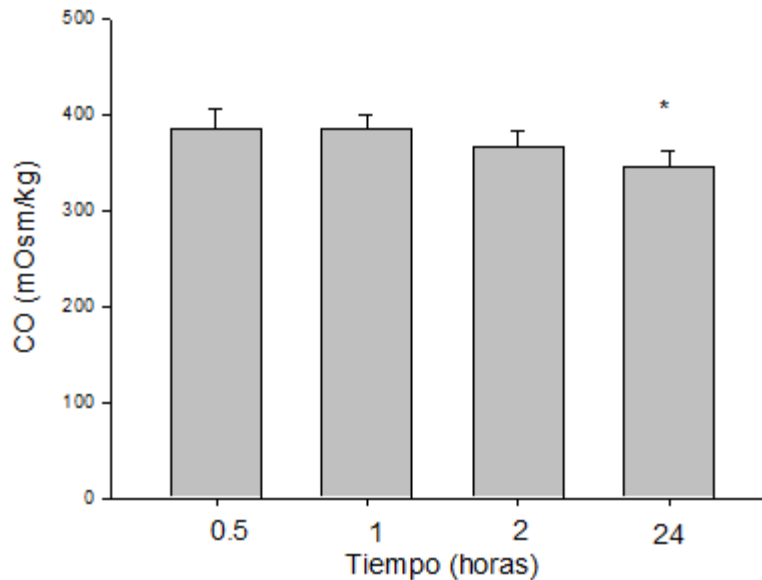


Figura 20. Efecto del estrés por inyección de PBS 1X en la Capacidad osmorreguladora en los distintos tiempos tratados a 10 ‰. (*) Diferencias significativas entre los grupos

Estos resultados se podrían explicar por un aumento de osmolitos en el medio interno causados por el estrés de la manipulación y el shock hipo-osmótico, así como por el hecho de que los camarones no fueron ablacionados por lo que se encuentra presente el principal centro endócrino (el complejo OX-GS). Por lo tanto, es posible que la presencia de CHHs en la hemolinfa provocara un aumento glucémico inicial ante el estrés y por lo tanto aumentara la cantidad de osmolitos presentes en la hemolinfa, mientras que la disminución consecutiva de la concentración osmótica podría explicarse por el restablecimiento del medio interno gracias a la capacidad de hipo-regular de *L. vannamei* (Diaz *et al.*, 2001).

Por otro lado, la inyección de rCHH-A y posterior shock hipo-osmótico provocó cambios significativos en la capacidad osmorreguladora en algunos tiempos de muestreo con respecto al control con PBS (Figura 21).

Durante la primera hora se observó un incremento en la capacidad osmorreguladora (374 mOsm/kg) similar al observado en el control con PBS (Figura 20). Sin embargo, a las 2 horas se observó una disminución altamente significativa en los valores de capacidad osmorreguladora ($P=0.004$) en comparación a la primera hora,

llegando hasta 337 mOsm/kg a las dos horas y hasta 320 mOsm/kg a las 24 horas, que en valores de PO corresponden a 674 y 650 mOsm/kg sin diferencias significativas entre ellos ($P=0.658$), valores similares a los observados en el basal de 678 (Figura 21).

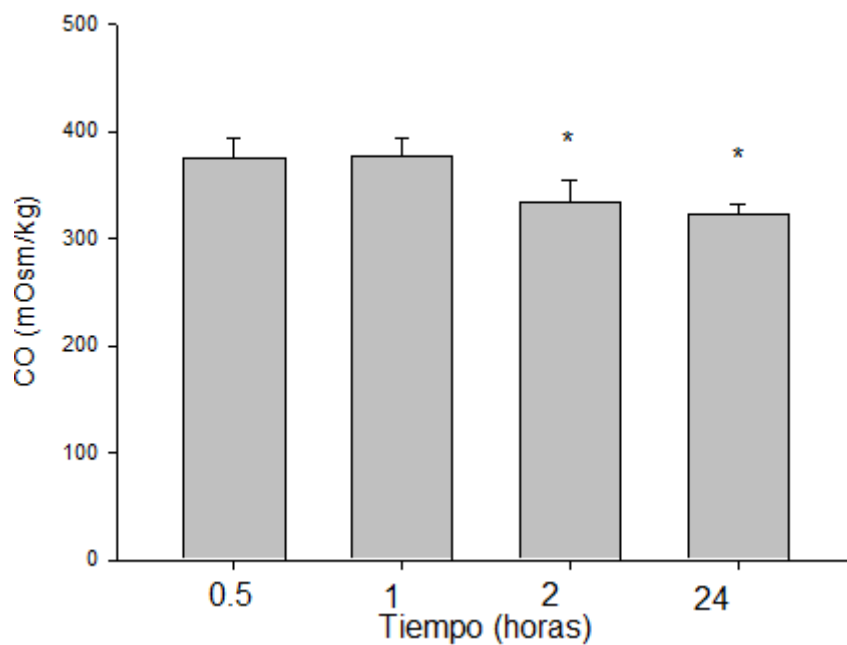


Figura 21. Efecto de rCHH-A_N en la capacidad ósmorreguladora en los distintos tiempos tratados a 10 ‰. (*) Diferencias significativas entre los grupos.

En la Figura 22 se pueden observar los tratamientos juntos, evidenciando así las diferencias entre las condiciones iniciales o basales y el estrés post-inyección con PBS, así como el efecto causado por CHH-A en la CO para hiper-regular en medios hiposmóticos.

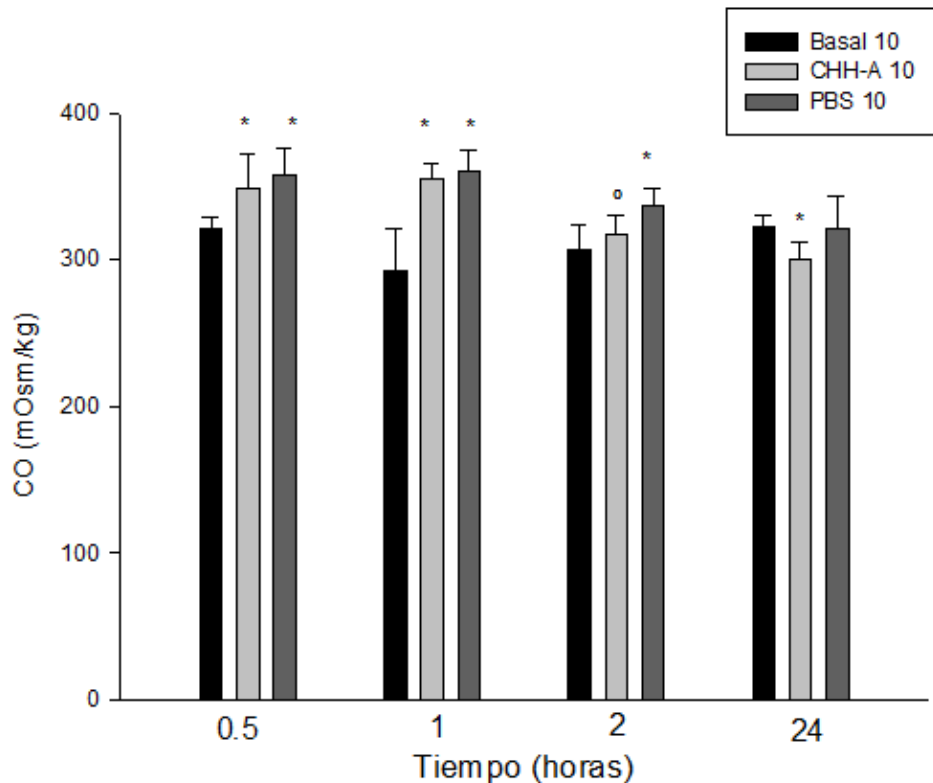


Figura 22. Efecto de los tratamientos sobre la CO en los distintos tiempos a 10‰. Las líneas verticales representan la desviación estándar. (*) Diferencias significativas con respecto al basal ($P<0.05$) y (°) diferencias significativas con respecto al control de PBS 1X

En los primeros dos tiempos de muestreos (0.5 y 1 hora) se observó una diferencia significativa de los tratamientos con respecto al basal, siendo para CHH-A de $P=0.016$ y 0.010 , respectivamente y en el caso del PBS, ésta diferencia se mantuvo hasta las dos horas ($P=0.016$, 0.001 y 0.023 , respectivamente) y se reestableció hasta las 24 horas ($P=0.9$). Como se mencionó anteriormente, la disminución de la capacidad osmorreguladora en estos primeros tiempos pudo deberse al estrés causado por la inyección tanto de PBS como de CHH-A. Sin embargo, a las 2 horas post inyección de CHH-A la capacidad osmorreguladora se reestableció a los niveles basales ($P=0.955$),

siendo significativamente diferente al PBS ($P=0.030$). De esta manera, CHH-A ayudó a mantener el medio interno hiper-osmótico al medio externo de manera aditiva a los procesos endócrinos naturales mostrados en el tratamiento basal.

Este resultado sugiere que la hormona rCHH-A en su forma nativa fue capaz de restablecer los niveles de osmolitos a las 2 horas manteniendo una PO constante a pesar del medio diluido externo, lo que sugiere que además de tener un papel en hiperglucemia (Wanlem *et al*, 2011), pudiera tener una función en la modulación de la respuesta de osmorregulación en *L. vannamei*.

Los resultados obtenidos muestran que la capacidad osmorreguladora en camarones peneidos puede ser usada para monitorear sus condiciones fisiológicas y analizar los efectos de estresores ambientales (Minh Sang y Fotedar, 2004), tal es el caso de exposición a salinidades por abajo del punto iso-osmótico de *L. vannamei*.

7.9 Efecto de CHH-A sobre los niveles de Proteínas totales en la hemolinfa de *L. vannamei*

7.9.1 Salinidades cercanas a las iso-osmóticas

En el caso de proteínas totales, los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, por lo que se utilizaron la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para ver las diferencias entre los grupos y la prueba de Dunn para determinar en dónde estaban estas diferencias. Adicionalmente, se usaron las medianas de los valores junto con sus intervalos de confianza al 95%.

En general, bajo condiciones de salinidad cercanas a las iso-osmóticas, los niveles de proteínas totales en los camarones fueron de 81.64 mg/ml. Se ha reportado para *P. duorarum* concentraciones que oscilan de los 74 a 78 mg/ml (Burse y Lane, 1971), para *P. marginatus* de 94 mg/ml (Balazs *et al.*, 1974), para *P. chinensis* de 103 mg/ml (Chen *et al.*, 1994) y *P. monodon* de 112 mg/ml a salinidades de 20‰ en camarones de 22 g.

En PBS, hubo un aumento significativo de proteínas ($P<0.001$) con respecto al basal en los niveles de proteínas totales llegando a ser de 155.2 mg/ml durante la primera

media hora postinyección, descendiendo a niveles basales durante los siguientes dos puntos de muestreos para luego aumentar nuevamente de manera significativa a las 24 horas ($P<0.001$) hasta 164.88 mg/ml (Figura 23). El aumento de proteínas a la media hora postinyección con PBS coincide con un evento específico que se dio a este tiempo, en el que los organismos estuvieron sin aireación unos minutos. Sin embargo, dado que estas condiciones no causaron cambios en el valor de CO a este tiempo, esto sugiere que la contingencia no afectó el ensayo. De hecho, existen reportes que sugieren que se requiere de condiciones estresoras severas de hipoxia durante días para modificar el metabolismo y tener un efecto en los niveles de proteínas (Racotta *et al.*, 2002).

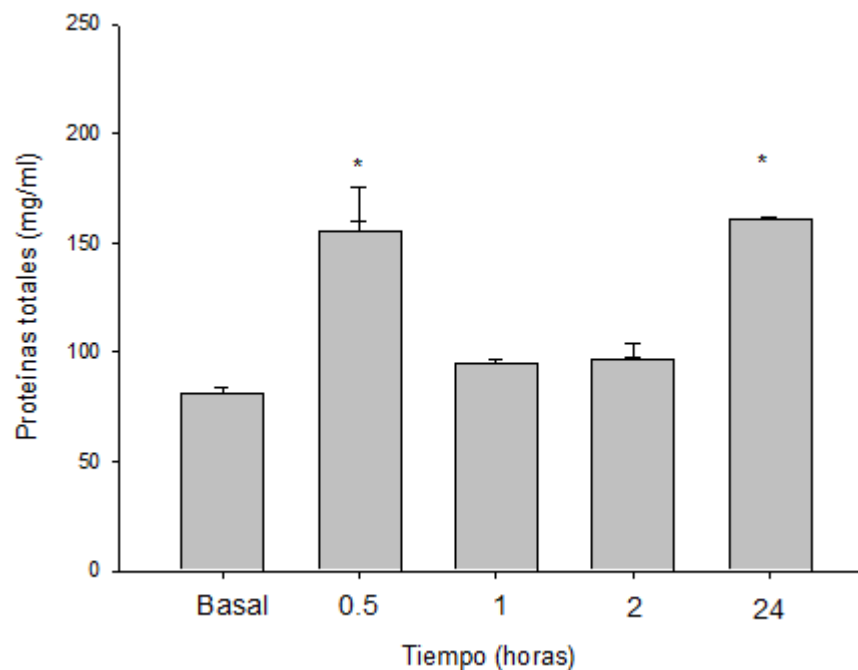


Figura 23. Efecto de la inyección por PBS 1x como control negativo en la concentración de proteínas totales en la hemolifa bajo los distintos tiempos a 26‰. Las líneas verticales representan los valores de intervalo de confianza al 95%. (*) Diferencias significativas con respecto al basal ($P<0.05$)

En el caso de los niveles de proteínas totales obtenidos al inyectar la hormona recombinante, éstos se mantuvieron cercanos al basal durante los primeros tres puntos

de muestreo, siendo significativamente más altos ($P<0.001$) a las 24 horas llegando a aumentar hasta 178 mg/ml (Figura 24). Si bien, durante la primera hora postinyección presentó un ligero aumento de 81 a 102 mg/ml, éste no fue significativo, mientras que en el resto de los tiempos se mantuvo en niveles basales de 88 mg/ml a la 1 y 2 horas postinyección. El incremento significativo ($P<0.05$) en el nivel de proteínas observado a las 24 h por la inyección de PBS y rCHH- A_N , en comparación con los niveles basales coincide con la disminución de la CO en estas mismas condiciones (sección 7.7).

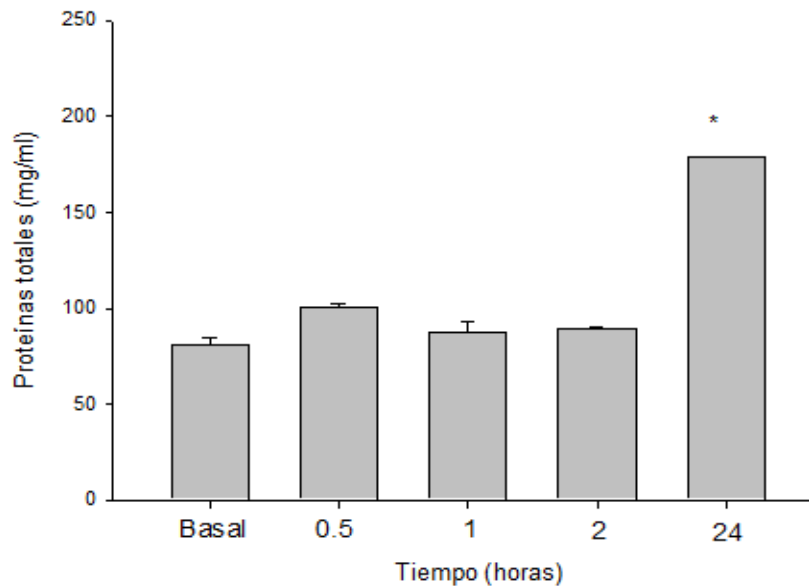


Figura 24. Efecto de rCHH- A_N en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 26‰. Las líneas verticales representan el valor de intervalo de confianza. (*) Diferencias significativas con respecto al basal ($P<0.05$)

De esta manera, durante las primeras 2 horas de muestreo no hubo un cambio significativo en la concentración de proteínas totales en comparación con los niveles basales tanto con la inyección de CHH-A como la de PBS.

Salinidades hipo-osmóticas (10‰)

Los niveles basales de proteínas totales obtenidos en condiciones hipo-osmóticas fueron de 139.17 y 130.7 mg/ml respectivamente durante los primeros puntos de muestreos sin presentar diferencias significativas, mientras que en los últimos dos puntos de muestreos hubo una disminución significativa ($P=0.012$ y $P>0.001$, respectivamente), con respecto a la primer media hora, llegando hasta 114.8 y 112.3 mg/ml respectivamente, y no habiendo diferencias entre éstos últimos puntos (Figura 25). La concentración basal final concuerda con lo obtenido por Chen, *et al.*, (1994) de 112 mg/ml para *Penaeus monodon* aclimatado a la misma salinidad. Los niveles iniciales de proteínas son significativamente más altos que los finales, lo que sugiere un patrón hiporegulator por medio del aumento de proteínas en la hemolinfa para evitar la dilución del medio interno, hasta lograr un equilibrio.

Tras el shock osmótico, se aprecia un aumento en las concentraciones de proteínas totales de 139.17-112.3 mg/ml comparado con de 81.64 mg/ml obtenidos en concentraciones iso-osmóticas. Un patrón similar se observó en el cangrejo *Carcinus maenas* al ser trasferido de salinidades de aclimatación hiper-osmóticas (31‰) a hipo-osmóticas (16‰), donde en el segundo caso hubo un aumento en la síntesis de hemocianina en la hemolinfa tras 24 horas de exposición (Boone y Schoffeniels, 1979). La hemocianina representa entre el 60-95% de las proteínas presentes en la hemolinfa y es considerada como una proteína respiratoria en la sangre de los crustáceos y por lo tanto un incremento en los niveles de esta proteína durante un shock hipo-osmótico, cuando los tejidos demandan oxígeno, podría ser razonable.

Tras las 2 horas, las proteínas comienzan a disminuir significativamente, lo que sugiere un esfuerzo energético para normalizar los niveles de proteínas totales y mantener la presión osmótica a nivel constante.

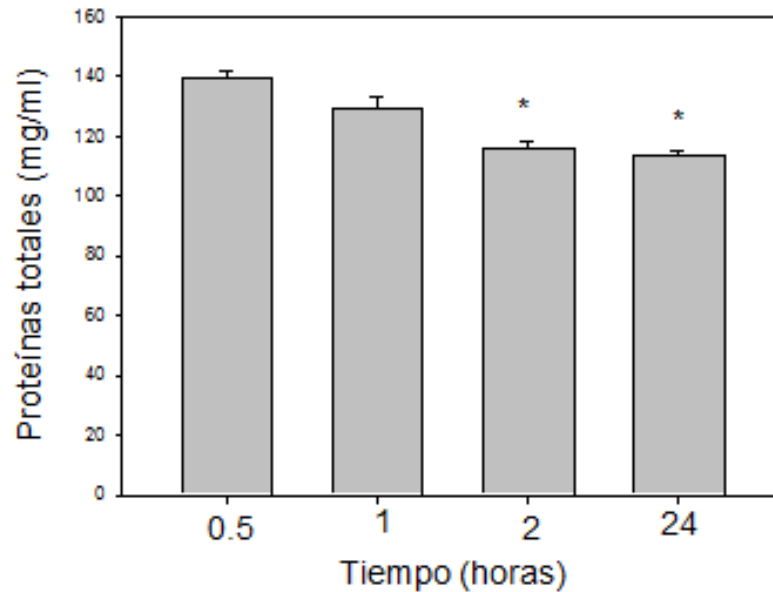


Figura 25. Niveles basales en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 10‰. Las líneas verticales representan el valor del intervalo de confianza al 95%. (*) Diferencias significativas con el primer tiempo de muestreo ($P < 0.05$)

Un patrón similar se observó en el tratamiento con PBS, pues inicia en 130, 138 mg/ml en los primeros puntos de muestreo, para luego descender a 115 y 121 mg/ml. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto a los tiempos del basal (Figura 26). Esto se puede deber a que el shock osmótico en sí tuvo el mismo efecto estresante en ambos casos, y que el estrés generado por la manipulación e inyección del organismo no generó una respuesta más drástica. En el caso de la CO, sí hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos por lo que se puede inferir que fue otro tipo de osmolito el que modificó la capacidad osmorreguladora, ya sea por cambios en la concentración de osmolitos no orgánicos en la hemolinfa, como iones, o el aumento en las concentraciones de glucosa debido a la presencia del OX-GS.

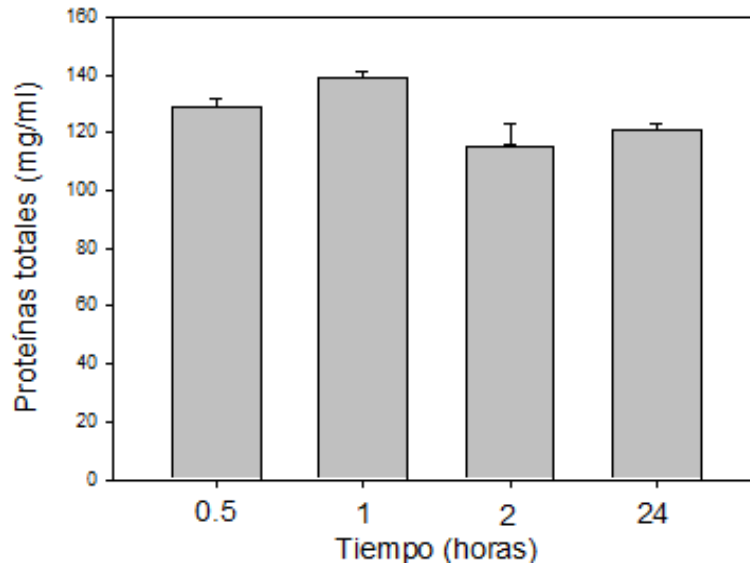


Figura 26. Efecto de la inyección con PBS en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 10‰. Las líneas verticales representan el valor del intervalo de confianza al 95%. (*) Diferencias significativas con el primer tiempo de muestreo ($P < 0.05$)

La inyección de rCHH-AN mostró niveles de proteína total de 140 mg/ml en la primera media hora postinyección y shock hipo-osmótico, lo cual coincide con los datos basales obtenidos y con los de la inyección con PBS. Sin embargo, a diferencia de los demás tratamientos, durante la primera hora los niveles de proteínas disminuyeron significativamente ($P > 0.001$) hasta alcanzar los niveles registrados para los tratamientos de basal y PBS de 116 mg/ml. Sin embargo, a las 2 horas, nuevamente hubo un incremento para luego descender a las 24 horas (Figura 27 y 28). La disminución significativa en los niveles de proteína observados en la hemolinfa a 1 h postinyección sugeriría la generación de aminoácidos libres por la hidrólisis de proteínas, los cuales podrían actuar como efectores osmóticos no iónicos en la hemolinfa (Haberfield *et al.*, 1975; Dalla Via, 1986), lo que ocurre comúnmente a bajas salinidades (Díaz *et al.*, 2001). Sin embargo, no se observó un aumento significativo en la presión osmótica de la hemolinfa a 1 h postinyección de rCHH-AN en comparación con el tratamiento con PBS.

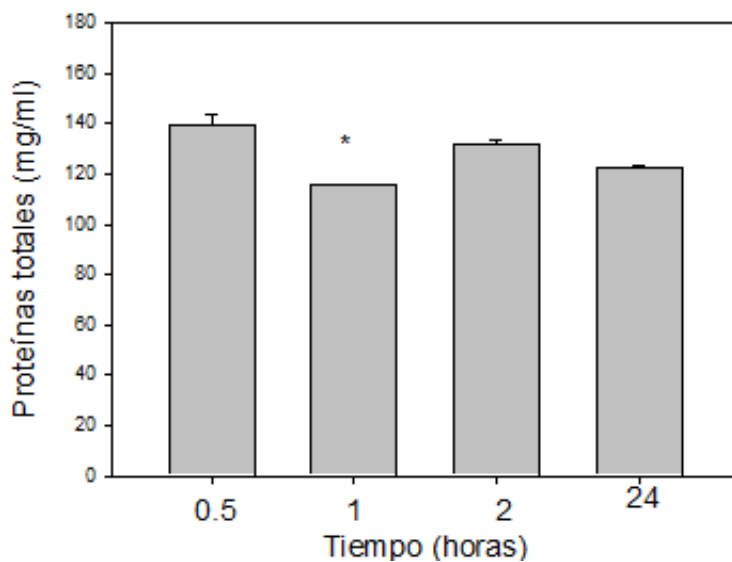


Figura 27. Efecto de la inyección con PBS en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa bajo los distintos tiempos a 10‰. Las líneas verticales representan el valor del intervalo de confianza al 95%. (*) Diferencias significativas con el primer tiempo de muestreo ($P < 0.05$)

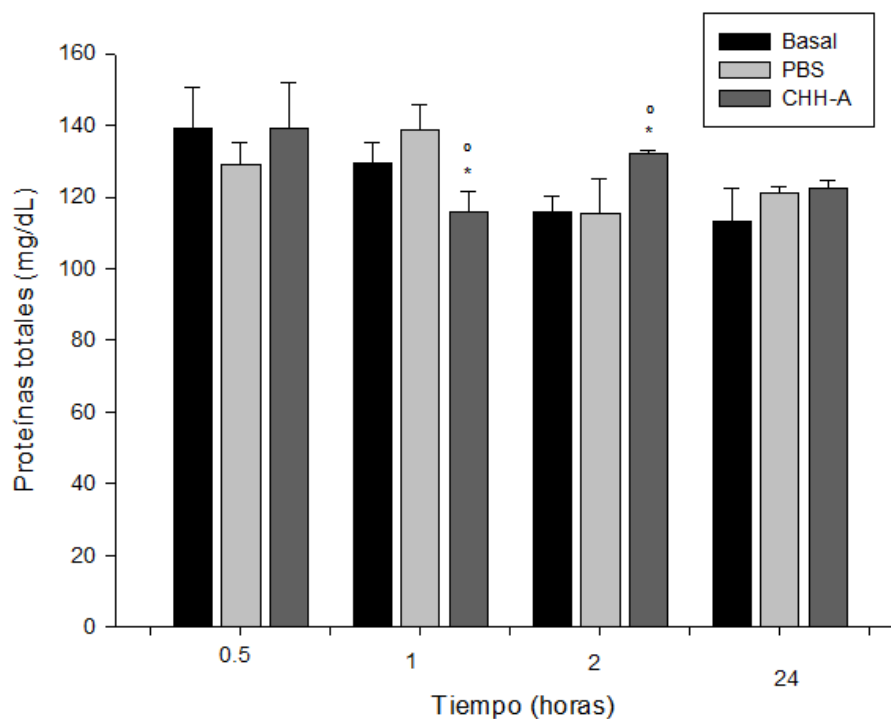


Figura 28. Efecto de los tratamientos sobre los niveles de proteínas totales en los distintos tiempos a salinidades cercanas de 10‰. Las líneas verticales representan el valor del intervalo de confianza al 95%. (*) Diferencias significativas con respecto al basal ($P < 0.05$) y (°) diferencias significativas con respecto al control de PBS 1X.

El incremento de proteínas a las 2 horas postinyección de rCHH-AN coincidió con la disminución en la CO en la salinidad de 10‰ observados en el presente trabajo. El aumento de proteínas observado a este tiempo podría sugerir una movilización transitoria de proteínas totales que difunden a la hemolinfa para reestablecer su nivel inicial observado al inyectar la hormona.

7.10 Análisis de iones Cl^- , Na^+ y K^+ y el efecto de CHH-A sobre su concentración en la hemolinfa a diferentes salinidades

7.10.1 Salinidades iso-osmóticas (26‰)

Todos los tratamientos se manejaron como datos no paramétricos para mantener homogeneidad. Se utilizó entonces la mediana y su valor de intervalo de confianza al 95% para representar los resultados, y se analizaron los tratamientos con ANOVA de una vía. Las diferencias significativas fueron analizadas con la prueba de Tukey o de Dunn según la normalidad de los datos.

Los resultados de todos los análisis se resumen en la Tabla 1 para la salinidad de 26‰.

Los niveles de los iones Cl^- y Na^+ fueron significativamente mayores a los obtenidos en los iones K^+ . Esto coincide con la literatura en el sentido de que los principales osmolitos iónicos en la hemolinfa de crustáceos marinos son el Na^+ y el Cl^- (88%) (Castille y Lawrence, 1981 a).

El nivel basal de Cl^- fue de 338 mmol/L, el cual es similar a los 350 mmol/L reportados por Castille y Lawrence (1981 a) para juveniles de esta especie bajo las mismas salinidades, y fue ligeramente mayor a los 328 y 303 mmol/L reportadas para subadultos y juveniles de *P. setiferus* (Castille y Lawrence, 1981 b), un organismo que presenta una capacidad osmorreguladora similar a *L. vannamei*. En las salinidades usadas en el presente trabajo se encontró que hubo un efecto significativo de rCHH-AN a la media hora postinyección provocando el aumento de los niveles de Cl^- en la hemolinfa hasta 386 mmol/L, difiriendo de los niveles basales observados con la inyección de PBS.

En estas salinidades, no se espera un efecto del influjo de iones ya que no hay necesidad de un equilibrio con el medio externo.

Por otro lado, la concentración basal de sodio en la hemolinfa de *L. vannamei* (258.87 mmol/L) fue menor a los niveles basales reportados para juveniles y adultos de *P. setiferus* a la salinidad de 23.5‰ (303 y 328 mmol/L, respectivamente) y al reportado para *L. vannamei* de 320 mmol/l (Castille y Lawrence, 1981a; 1981b). Los resultados mostraron que no hubo un efecto significativo entre los tratamientos por inyección de PBS ni de la neurohormona rCHH-A_N durante la primera hora. A las 2 horas, sin embargo, la inyección por PBS provocó un aumento en la concentración de Na⁺, mientras que con CHH-A las diferencias no fueron significativas con respecto a los niveles basales.

Tabla 1. Resultados obtenidos de los análisis de iones en la hemolinfa de *L. vannamei* tras la inyección de los tratamientos a salinidad de 26‰. (a) Diferencias significativas con respecto al CHH-A o a PBS 1X ($P<0.05$) (b) Diferencias significativas con respecto al basal ($P<0.05$). Valor de medianas y con su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC). Los niveles basales (tiempo cero) están resaltados en negritas

TRATAMIENTO	CLORO MMOL/L		SODIO (MMOL/L)		POTASIO (MMOL/L)	
	Mediana	IC	Mediana	IC	Mediana	IC
BASAL	338.85	14.15	258.87	34.75	9.94 ^b	0.19
CHH-A 0.5	386.45 ^a	30.06	252.46	57.08	11.94 ^b	0.06
PBS 0.5	333.80	21.07	226.56	80.59	12.18 ^b	0.05
CHH-A 1	339.09	8.07	226.02	45.83	12.22 ^b	0.167
PBS 1	370.62	18.13	272.50	35.64	12.42 ^b	0.13
CHH-A 2	374.65	9.58	286.82	20.35	12.34 ^b	0.28
PBS 2	399.69	29.93	392.2 ^b	31.02	11.85 ^b	0.48
CHH-A 24	376.77 ^b	17.99	334.8 ^{ab}	29.27	12.99 ^b	0.21
PBS 24	377.50 ^b	11.31	317.90	26.70	13.12 ^b	0.38

Con respecto a iones potasio, el efecto de manipulación e inyección provocó un aumento en los niveles de este ion, no habiendo un cambio significativo entre el efecto de rCHH-A_N con respecto al PBS. Los niveles de los tratamientos se mantuvieron significativamente más altos con respecto al basal en todos los tiempos analizados.

7.10.2 Salinidad hipo-osmótica (10‰)

La concentración de Cl⁻ a salinidades hipo-osmóticas se muestran en la tabla 2, donde se observa cómo los niveles basales en los diferentes tiempos se mantiene constantes gracias a la capacidad para hiper-regular de *L. vannamei*. Estas concentraciones fueron superiores a las reportadas por Castille y Lawrence (1981a; 1981b) de 290 mmol/kg para *L. vannamei* y 275 mmol/kg para *P. setiferus* expuesto a salinidades de 9.8‰. Estas diferencias se pueden atribuir a las condiciones de exposición a bajas salinidades; mientras que en su trabajo los organismos fueron aclimatados gradualmente a la salinidad de 9.8‰, en el presente estudio los análisis de las respuestas fueron bajo un shock osmótico.

El control de PBS no mostró diferencias significativas con respecto a los basales en los diferentes tiempos, lo que indica que el estrés causado por la inyección no modificó el flujo de estos iones. De la misma manera, no hay una diferencia significativa en las concentraciones de Cl⁻ tras la inyección con rCHH-A_N con respecto al PBS ni al basal, salvo a las 2 horas comparada con el basal ($P=0.03$), sin embargo, no presenta diferencia significativa contra el PBS ($P=0.0503$) por lo que el efecto observado pudo deberse al estrés por inyección, aun cuando la similitud entre los tratamientos es baja. Freire *et al.* (1995) encontraron una relación entre el aumento de ciertos aminoácidos libres (valina y prolina) y la concentración de Cl⁻ al inyectar extractos de pedúnculo ocular de *Macrobrachium olfersi*, un crustáceo osmorregulador, así como una relación entre el aumento de la glucosa y Cl⁻, efecto visible principalmente en salinidades hipo-osmóticas. Si bien no se obtuvo una respuesta significativa de rCHH-A_N en los niveles de Cl⁻ contra el PBS, la alta diferencia que existe contra el basal y la baja similitud contra el PBS podría indicar que hay un cierto efecto de rCHH-A_N sobre la concentración de Cl⁻, pero que la concentración de neurohormona usado no fue suficiente para hacerlo evidente.

Tabla 2. Resultados obtenidos de los análisis de iones en la hemolinfa de *L. vannamei* tras la inyección de los tratamientos a salinidad de 10‰. ^(a) Diferencias de significativas con respecto al CHH-A o a PBS 1X ($P<0.05$) ^(b) Diferencias significativas con respecto al basal ($P<0.05$). Valor de medianas y con su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC). Los niveles basales (sin estrés por inyección) están resaltados en negritas.

TRATAMIENTOS		CLORO (MMOL/L)		SODIO (MMOL/L)		POTASIO (MMOL/L)	
		Mediana	IC	Mediana	IC	Mediana	IC
BASAL	0.5	360.34	24.5	369.56	44.80	12.58	0.25
CHH-A	0.5	410.52 ^b	19.1	328.80	33.39	11.85	0.50
PBS	0.5	360.49	51.6	266.10 ^b	0.00	13.37 ^{ab}	0.00
BASAL	1	399.32	45.2	318.17	65.66	11.96	0.43
CHH-A	1	287.31	17.6	326.08	41.42	11.61	0.30
PBS	1	408.01	55.0	349.25	8.39	12.14	0.36
BASAL	2	321.04	11.6	346.80	109.4	11.89	0.76
CHH-A	2	375.04 ^b	22.0	346.80	25.19	12.30	0.32
PBS	2	349.4	16.2	331.12	36.94	12.27	0.19
BASAL	24	363.63	7.07	357.70	41.42	11.45	0.10
CHH-A	24	379.96	13.9	331.94	21.86	11.59	0.19
PBS	24	371.14	33.7	337.53	40.10	11.48	0.24

Por otro lado, las concentraciones basales de Na^+ y Cl^- en esta salinidad, no presentaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos. Así mismo, en los tratamientos con PBS y rCHH-A_N, se mantuvieron en valores similares a los basales. No obstante encontrarse una diferencia significativa entre el PBS y los valores basales a la media hora (Tabla 2), éste dato está basado en 1 sólo organismo. Así, en condiciones de salinidad de 10‰ rCHH-A_N no parece presentar ningún efecto sobre las concentraciones de iones Na^+ .

En cuestión de iones de potasio, las concentraciones basales fluctuaron entre 12.58 y 11.45 mmol/L, no habiendo un cambio significativo en ninguno de los tiempos postinyección. Sowers *et al.*, (2006) reporta una concentración de 10.3 mmol/L en salinidades de 2‰ en organismos adultos de esta especie. El presente resultado muestra valores basales mayores, probablemente debidos a las condiciones de aclimatación. No

se observaron diferencias significativas en la concentración de este ion en ninguno de los tiempos. Algunas investigaciones sugieren que la carencia de este ion en el medio salino afecta directamente la supervivencia del organismos (Davis *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2007), aun cuando otros iones que comprenden bajos porcentajes en la osmolaridad interna, como el Mg^{2+} y el Ca^{+} , se encuentren limitados.

7.11 Concentración de iones Na^{+} , Cl^{-} y K^{+} en las distintas salinidades tratadas

En el presente estudio fueron analizados algunos de los osmolitos más representativos en la hemolinfa de *L. vannamei* bajo dos diferentes condiciones salinas. Se ha visto en distintos crustáceos osmorreguladores que la concentración de osmolitos depende varios factores como son el estado de muda, estado de ciclo de vida, sexo, salinidad, temperatura, tamaño y tiempo de aclimatación en estos diferentes factores (Castille y Lawrence, 1981a; 1981b; Cheng *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1994; Li y Cheng, 2012; McNamara *et al.*, 2004; Mena-Herrera *et al.*, 2011). Distintos crustáceos osmorreguladores, como lo es *L. vannamei*, han demostrado que exhibe un patrón hiper-osmótico en bajas salinidades e hipo-osmótico en altas, manteniendo así su concentración osmótica interna sin importar la salinidad del medio externo, esta regulación es dada también por la capacidad ionorreguladora, que presenta el mismo patrón (Castille y Lawrence, 1981b; Diaz *et al.*, 2001).

Los resultados de este estudio mostraron un incremento en los niveles de iones basales en la hemolinfa al someterlos al shock hipo-osmótico en todos los casos (Tabla 3).

Tabla 3. Valores basales de Cl^{-} , Na^{+} y K^{+} en las dos salinidades utilizadas. Se tomó en cuenta los niveles basales de 24 horas para el caso de la salinidad 10‰, ya que en este tiempo omite el estrés por shock osmótico inicial, el cual eleva aún más los niveles en cada uno de los iones. IC=Intervalo de confianza al 95%

SALINIDAD	CLORO (MMOL/L)		SODIO (MMOL/L)		POTASIO (MMOL/L)	
	Mediana	IC	Mediana	IC	Mediana	IC
26‰	338.85	14.15	258.87	34.75	9.94	0.19
10 ‰	363.63	7.07	357.70	41.42	11.45	0.10

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Mena-Herrera *et al.*, (2011) en donde compararon la concentración de los mismos iones en organismos adultos de la misma especie (hembras de 40 g y machos de 30 g) sometiéndolos por 3 horas a salinidades de 0, 10, 20, 30 y 40‰ y a una temperatura de 28°C. Ellos encontraron que las concentraciones de iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻ disminuyeron en la hemolinfa con el descenso en la salinidad, siendo esta respuesta diferente entre machos y hembras. Esta discrepancia podría asociarse a las tallas usadas, ya que la capacidad de osmorregular de éstos peneidos se reduce con el aumento de tamaño (Castille y Lawrence, 1981a). En nuestro caso, se usaron organismos juveniles de 9-14 g, por lo que la capacidad de osmorregular fue mayor que los usados por Mena-Herrera *et al.*, (2011) permitiendo que su medio interno se mantenga hiper-osmótico con el externo, tal como se vio en este trabajo.

El haber trabajado con organismos no ablacionados, el principal órgano neurosecretor (OX-GS) se encuentra presente por lo que la respuesta observada es aditiva a la respuesta neuroendócrina natural de *L. vannamei*. Este hecho, sumado a la baja concentración utilizada de rCHH-AN, podría dificultar la detección de los efectos promovidos por la neurohormona recombinante en los mismos metabolitos estudiados, así como en otros no vistos en este trabajo. El exponer a los animales aclimatados en su punto iso-osmótico a salinidades diluidas provocó un aumento significativo tanto en la concentración de iones desde los niveles basales (tabla 3), así como de proteínas totales, mientras que la PO no se vio modificada de manera significativa. Este resultado muestra la capacidad natural que tienen organismos osmorreguladores de utilizar mecanismos inmediatos para evitar la pérdida de iones (aumentando su retención en hemolinfa posiblemente a través de la modificación de la permeabilidad de la membrana branquial) u otros solutos no iónicos.

Otros factores fisiológicos que participan en los procesos osmorreguladores, además de los estudiados en este trabajo, es la concentración de amonio y proteínas totales. El amonio es continuamente liberado a través del epitelio de las branquias. Una disminución en la concentración osmótica del medio resulta en una disminución de aminoácidos en tejidos, así como un incremento en la excreción de amonio del organismo. Existe una interacción significativa en los factores de excreción de amonio y

osmolaridad de la hemolinfa. Esta relación puede deberse a un incremento en el catabolismo de aminoácidos libres en salinidades hipo-osmóticas y cuando el organismo se encuentra hiper-regulando. El incremento en la actividad de la captación de Na^+ seguida por la transferencia de los organismos a un medio diluido está relacionado a un incremento en la excreción de amonio. La absorción de Na^+ es requerida para compensar la pérdida debido al intercambio de la bomba $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, mecanismo usado para organismos expuesto en medios (Díaz et al., 2001; Re et al., 2003).

La hormona recombinante nativa CHH-A de *L. vannamei* expresada y purificada en este trabajo reestableció de manera significativa la capacidad osmorreguladora a las 2 h postinyección, con respecto al control, ante el estrés hipo-osmótico al que se sometió. Asimismo, los resultados sugieren que la inyección de rCHH-A_N en baja salinidad también promovió la disminución de proteínas totales en hemolinfa a la 1 hora postinyección y su posterior restablecimiento a las 2 h, que es cuando se da el aumento de la CO. Por otro lado, no se presentó una diferencia significativa en la concentración de los iones analizados, con respecto al PBS, aún en condiciones hipo-osmóticas.

Un ensayo previo realizado por nuestro grupo utilizando la misma hormona (rCHH-A_N) y a la misma concentración (2 μg), pero en salinidades hiper-osmóticas (35‰) mostró una respuesta hiperglucémica altamente significativa ($P < 0.001$) a la 1 hora postinyección (50 mg/dl), y un máximo a las 2 horas (72 mg/dl), comparados con un control de PBS (20 mg/dl) (Figura 29). Los organismos utilizados para este experimento fueron ablacionados unilateralmente en intermuda dos días antes de su muestreo y mantenidos en ayuno. Los mismos organismos que fueron muestreados a la 1 hora, se muestrearon por segunda ocasión a las 2 h postinyección.

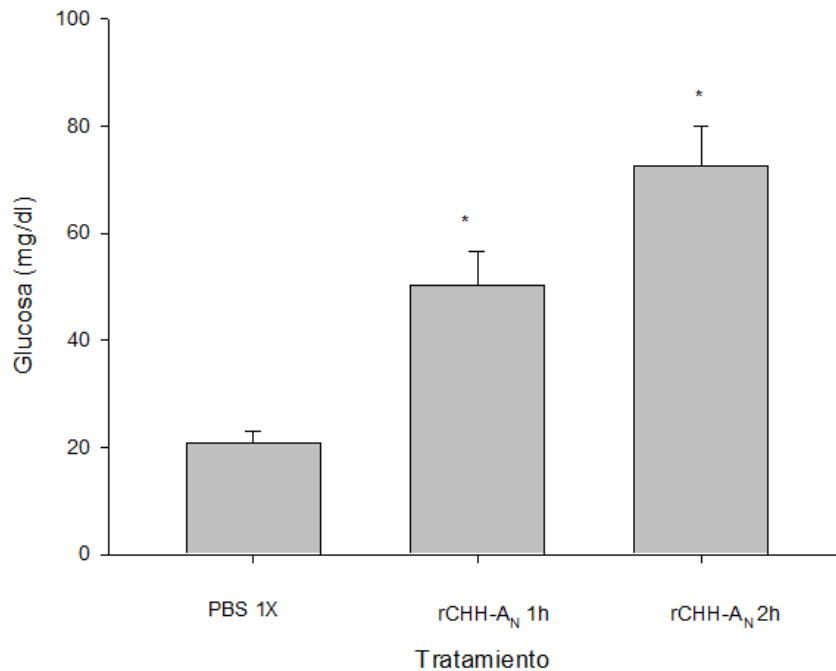


Figura 29. Efecto hiperglucémico de rCHH-A_N. PBS n=6, rCHH-A_N 1h n=5 y rCHH-A_N n=4 (*) Diferencias significativas ($P < 0.05$)

El ensayo realizado por nuestro grupo corroboró el fuerte efecto hiperglucémico de la neurohormona observado previamente por Wanlem *et al* (2011) (90 mg/dl), quienes al analizar la hormona rLV-CHH, que en secuencia corresponde con la CHH-A, y producirla en *E. coli* con un C- terminal adicional encontraron una respuesta hiperglucémica más alta a 1 h después de inyectar organismos, no ablacionados y aclimatados a 15‰ inyectando una alta concentración de la de la hormona recombinante (25 µg).

Estos resultados resaltan la importancia de CHH-A recombinante producida en *Pichia* en su forma más parecida a la nativa, la cual estando sin amidar y siendo inyectada a bajas concentraciones mostró actividad hiperglucémica en altas salinidades y por otro lado evidencio su participación en el equilibrio osmótico de organismos de *L. vannamei* sometidos a bajas salinidades. La multifuncionalidad de la hormona resulta de gran importancia ya que aunque el modo de acción de las CHHs sobre la función de osmorregulación no se conoce bien. Estudios recientes en branquias han mostrado que

las CHHs son capaces de regular el balance de agua y iones, incrementando la diferencia de potencial transmembranal y el influjo de Na^+ de las branquias en organismos como *Pachygrapsus marmoratus* (Spaning-Pierrot *et al.*, 2000) y *Astacus leptodactylus* (Serrano *et al.*, 2003). Liu *et al.*, (2014) mostraron el incremento en la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en branquia de organismos de *L. vannamei* a 1 hora postinyección de 30 μg de rLvCHH en condiciones hiper-osmóticas. Sin embargo, no encontraron cambios significativos en condiciones hipo-osmóticas. Esto resulta de interés dado que en presente trabajo no se encontraron diferencias en la concentración de iones en hemolinfa bajo condiciones hipo-osmóticas.

Se ha propuesto que la regulación de CHHs podría involucrar el uso de cGMP como segundo mensajero para la liberación de productos de la glándula del seno. Otra posibilidad es que la CHH incremente la disponibilidad de energía metabolizable para el funcionamiento de las bombas de intercambio de iones, a través de la glucogenólisis (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000).

8. Conclusión

Se logró la correcta de expresión de la hormona CHH-A recombinante nativa de *L. vannamei* (8.9 kDa) a partir de la cepa *P. pastoris* X-33-CHH_N, la cual presentó la mayor expresión de la proteína nativa en el medio complejo (BMMY), al día 1 de inducción con 1% de metanol.

El gradiente de sulfato de amonio realizado permitió seleccionar el punto de saturación óptimo para precipitar a la hormona CHH-A recombinante nativa, el cual fue al 50%.

La hormona CHH-A recombinante fue purificada en su forma nativa (con un C-terminal libre) por medio de RP-HPLC usando acetonitrilo como fase móvil, obteniéndose un rendimiento de 12.19 mg/ml.

Las dos bandas de rCHH-A_N purificadas y observadas en los geles de Tricina SDS-PAGE (~10 y 15 kDa), fueron inmunodetectadas por el anticuerpo policlonal de conejo diseñado contra el N-terminal de CHH-A.

La secuenciación del N-terminal por el método de degradación de Edman y posterior análisis de secuencias corroboró la presencia mayoritaria de la hormona CHH-A en las dos bandas inmunodetectadas, sugiriendo la existencia de uniones covalentes o no covalentes muy fuertes entre las hormonas dando lugar a formas de mayor de peso molecular del esperado (15 kDa). El análisis mostró asimismo la presencia de proteínas adicionales minoritarias que pudieran ser contaminantes del medio de cultivo utilizado que no pudieron ser separados por los métodos utilizados.

A pesar de la baja concentración de la hormona rCHH-A_N utilizada en los bioensayos (2 µg), la inyección de ésta fue capaz de restablecer la capacidad osmorreguladora de la hemolinfa a las 2 h posteriores a la exposición a condiciones de salinidad baja sugiriendo la participación de CHH-A en la modulación de la respuesta de osmorregulación en *L. vannamei*.

Las proteínas totales presentes en hemolinfa disminuyeron de forma significativa a 1 hora postinyección de rCHH-A_N en condiciones hipo-osmóticas a baja salinidad, recuperando los niveles iniciales a las 2 h postinyección.

Na⁺ y Cl⁻ fueron los iones predominantes en la hemolinfa de los camarones juveniles de *L. vannamei* utilizados en el bioensayo, obteniéndose las mayores concentraciones en condiciones hipo-osmóticas (10‰) que en iso-osmóticas (26‰), permitiendo que su medio interno se mantuviera hiper-osmótico con el externo.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de iones Na⁺, Cl⁻ y K⁺ entre los organismos inyectados con rCHH-A_N y los de PBS al ser expuestos a 26‰ o 10‰.

9. Perspectivas

Es necesario mejorar las condiciones de purificación de rCHH-A_N para eliminar las proteínas adicionales, probablemente afinando las condiciones de corrida de RT-HPLC utilizando un gradiente de acetonitrilo discontinuo en los tiempos de retención donde se vio que eluye rCHH-A_N y disminuyendo los tiempos de recolección. Otra estrategia es cambiar el medio de cultivo de complejo al mínimo, donde también se vio expresión de rCHH-A_N con el fin de evitar la posible contaminación de proteínas, ausentes en el medio mínimo, durante la inducción.

Otro aspecto importante sería evaluar la participación de rCHH-A_N en ambientes hiper-osmóticos, así como poder medir la actividad de la ATPasa de Na⁺/K para evaluar el transporte de iones a través de branquias.

Es importante contar con determinaciones de glucosa en los bioensayos para entender mejor el papel de CHH-A en osmorregulación ya que la actividad hiperglucémica parece está ligada al aporte de energía requerido para el funcionamiento de las bombas de intercambio de iones.

Lista de referencias

- Balazs, G. H., Olbrich, S. E., and Tumbleson, M. E. (1974). *Serum constituents of the Malaysian prawn (Macrobrachium rosenbergii) and pink shrimp (Penaeus marginatus)*. *Aquaculture*, 3(2), 147-157.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Böcking, D., Dircksen, H., and 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.
- Boone, W. R., and Schoffeniels, E. (1979). *Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab Carcinus maenas (L.)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 63(2), 207-214.
- Bückle, L. F., Barón, B., and Hernández, M. (2006). *Osmoregulatory capacity of the shrimp Litopenaeus vannamei at different temperatures and salinities, and optimal culture environment*. *Revista de biología tropical*, 54(3), 745-753.
- Bulau, P., Meisen, I., Schmitz, T., Keller, R., and Peter-Katalinić, J. (2004). *Identification of neuropeptides from the sinus gland of the crayfish Orconectes limosus using nanoscale on-line liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(6), 558-564.
- Burse, C. R., and Lane, C. E. (1971). *Ionic and protein concentration changes during the molt cycle of Penaeus duorarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 40(1), 155-162.
- Camacho-Jimenez, L., (2011). *Papel de la dopamina y de la neurohormona recombinante chh-B1 en la modulación de respuestas fisiológicas en el camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y de educación Superior de Ensenada. B. C. 53 p.
- Castille Jr, F. L., and Lawrence, A. L. (1981a). *A comparison of the capabilities of juvenile and adult Penaeus setiferus and Penaeus stylirostris to regulate the osmotic, sodium, and chloride concentrations in the hemolymph*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 68(4), 677-680.
- Castille Jr, F. L. (1981b). *A comparison of the osmotic, sodium, and chloride concentrations between the urine and hemolymph of Penaeus setiferus (L.) and Penaeus stylirostris stimpson*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 70(4), 525-528.

- Chan, S. M., Gu, P. L., Chu, K. H., and Tobe, S. S. (2003). *Crustacean neuropeptide genes of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies*. *General and comparative endocrinology*, 134(3), 214-219.
- Chang, E. S., Keller, R., and Chang, S. A. (1998). *Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, Homarus americanus*. Following Various Stresses. *General and comparative endocrinology*, 111(3), 359-366.
- Chang, E. S., Prestwich, G. D., and 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.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K. P. C., Aiken, D. E., and Van Herp, F. (1994). *Involvement of Eyestalk Factors in the Neuroendocrine Control of Osmoregulation in Adult American Lobster Homarus americanus*. *General and comparative endocrinology*, 94(3), 281-293.
- Cheng, W., Liu, C. H., Yan, D. F., and Chen, J. C. (2002). *Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei in relation to size and molt stage*. *Aquaculture*, 211(1), 325-339.
- Chen, J. C., Chen, C. T., and Cheng, S. Y. (1994). *Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of Penaeus monodon exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels*. *MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES*, 110, 85-85.
- Chen, S. H., Lin, C. Y., and Kuo, C. M. (2005). *In silico analysis of crustacean hyperglycemic hormone family*. *Marine Biotechnology*, 7(3), 193-206.
- Chen, S. H., Lin, C. Y., and Kuo, C. M. (2004). *Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (Macrobrachium rosenbergii): evidence of alternative splicing*. *Marine biotechnology*, 6(1), 83-94.
- Chung, J. S., Dircksen, H., and Webster, S. G. (1999). *A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab Carcinus maenas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13103-13107.
- Chung, J. S., Wilkinson, M. C., and 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., and Webster, S. G. (2006). *Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its second messengers on gills and hindgut of the green shore crab, Carcinus maenas: A possible osmoregulatory role*. *General and comparative endocrinology*, 147(2), 206-213.

- Dalla Via, G. J. (1986). *Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp Penaeus japonicus: II. Free amino acids*. *Aquaculture*, 55(4), 307-316.
- Davis, D. A., Samocha, T. M., and 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., and 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.
- De Kleijn, D. P., and Van Herp, F. (1995). *Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(4), 573-579.
- De Kleijn, D. P., Janssen, K. P., Waddy, S. L., Hegeman, R., Lai, W. Y., Martens, G. J., and Van Herp, F. (1998). *Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster Homarus americanus*. *Journal of endocrinology*, 156(2), 291-298.
- Diaz, F., Farfan, C., Sierra, E., and Re, A. D. (2001). *Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behaviour and Phy*, 34(2), 93-104.
- Dirksen, H., Bocking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J., Baggerman, G., and Webster, S. (2001). *Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, Carcinus maenas, are putatively spliced and modified products of multiple genes*. *Biochem. J*, 356, 159-170.
- 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 and Pharmacology*, 142(3), 390-400.
- FAO. (2006). *FAO species catalogue, Vol.1- shrimps and prawns of the world*. *FAO Fisheries Synopsis*. 125(1): 253 p. Recuperado de: <http://www.fao.org/fishery/species/3404/en>
- FAO. (2010) *Producción mundial de acuicultura de peces, crustáceos, moluscos, etc., por especies principales en 2008*. *Anuarios de estadísticas de Pesca*. A-6 p 28. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/013/i1890t/i1890t.pdf>
- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>
- Freire, C. A., McNamara, J. C., Rosa, J. C., and Greene, L. J. (1995). *Neuroendocrine Control of Osmotic Regulation in the Freshwater Shrimp Macrobrachium olfersii*

(Wiegmann) (*Crustacea, Decapoda*): *Free Amino Acid Concentrations in the Hemolymph*. *General and comparative endocrinology*, 100(1), 83-91.

- Fingerman, M. (1997). *Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis*. *Physiological Zoology*, 257-269.
- González, R. A., Díaz, F., Licea, A., Denisse Re, A., Noemí Sánchez, L., and García-Esquivel, Z. (2010). *Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone) exposed to different acclimation temperatures*. *Journal of Thermal Biology*, 35(5), 218-224.
- Haberfield, E. C., Haas, L. W., and Hammen, C. S. (1975). *Early ammonia release by a polychaete Nereis virens and a crab Carcinus maenas in diluted sea water*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 52(3), 501-503.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., and Nagasawa, H. (2002). *Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone*. *Peptides*, 23(9), 1537-1546.
- Kamemoto, F. I. (1991). *Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs*. *Zoological science*, 8(5), 827-833.
- Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C. P., and Keller, R. (1991). *Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, Orconectes limosus: Emergence of a novel neuropeptide family*. *Peptides*, 12(5), 909-913.
- Keller, R. (1992). *Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects*. *Experientia*, 48(5), 439-448.
- Kleinholz, L. H., and Keller, R. (1979). *Endocrine regulation in Crustacea*. *Hormones and evolution*, 1, 159-213.
- Lago-Lestón, A., Ponce, E., and Muñoz, M. E. (2007). *Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of Litopenaeus vannamei grown in different temperature and salinity conditions*. *Aquaculture*, 270(1), 343-357.
- Li, C. H., and Cheng, S. Y. (2012). *Variation of Calcium Levels in the Tissues and Hemolymph of Litopenaeus vannamei at Various Molting Stages and Salinities*. *Journal of Crustacean Biology*, 32(1), 101-108.
- Liu M., Pan L., Li L. and Zheng D., (2014). *Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in White shrimp Litopenaeus vannamei*. *Peptides*, 53(1), 115-124.
- Mantel, L. H. (1985). *Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation*. *American zoologist*, 25(1), 253-263.
- Mantel, L. H., and Farmer, L. L. (1983). *Osmotic and ionic regulation*. *The biology of Crustacea*, 5, 53-161.

- McNamara, J. C., Rosa, J. C., Greene, L. J., and Augusto, A. (2004). *Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp Macrobrachium olfersii (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 37(3), 193-208.
- Mena-Herrera A., Liñán-Cabello A. M. y Díaz-Herrera F., (2011). *Effects of salinity on electrolyte levels (Na⁺, K⁺ and Cl⁻) in the hemolymph of the pacific white shrimp Litopenaeus vannamei*. Dyn. Bio. Pro., biotech. And Mol. Biol. 5 (special Issue 1), 56-59
- Menz, A., and Blake, B. F. (1980). *Experiments on the growth of Penaeus vannamei* Boone. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 48(2), 99-111.
- Mettulio, R., Edomi, P., Ferrero, E. A., Lorenzon, S., and Giulianini, P. G. (2004). *The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the prohormone but not in the mature peptide*. Peptides, 25(11), 1899-1907.
- Minh Sang, H., and Fotedar, R. (2004). *Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (Penaeus latisulcatus, Kishinouye, 1896) reared at different salinities*. Aquaculture, 234(1), 601-614.
- Mosco, A., Edomi, P., Guarnaccia, C., Lorenzon, S., Pongor, S., Ferrero, E. A., and Giulianini, P. G. (2008). *Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species*. Regulatory peptides, 147(1), 88-95.
- Morris, S. (2001). *Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans*. Journal of Experimental Biology, 204(5), 979-989.
- Nagai, C., Asazuma, H., Nagata, S., Ohira, T., and Nagasawa, H. (2009). *A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, Marsupenaeus japonicus, using the bacterial expression system*. Peptides, 30(3), 507-517.
- Ohira, T., Katayama, H., Aida, K., and Nagasawa, H. (2003). *Expression of a recombinant crustacean hyperglycemic hormone of the kuruma prawn Penaeus japonicus in methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Fisheries Science, 69(1), 95-100.
- Ollivaux, C., and Soyeux, D. (2000). *Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish Orconectes limosus*. European Journal of Biochemistry, 267(16), 5106-5114.
- Panikkar, N. K. (1968). *Osmotic behaviour of shrimps and prawns in relation to their biology and culture*. FAO Fisheries Report, 2(57), 527-538.
- Pequeux, A. (1995). *Osmotic regulation in crustaceans*. Journal of Crustacean Biology, 1-60.

- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C. A., and Ross, L. G. (1997). *The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1), 107-115.
- Racotta, I. S., and Palacios, E. (1998). *Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3), 351-356.
- Racotta, I. S., Palacios, E., & Méndez, L. (2002). *Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (Penaeus vannamei)*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35(4), 269-275.
- Re, D. A., Díaz, F., Sierra, E., and Gómez-Jiménez, S. (2004). *Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of Litopenaeus stylirostris (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity*. *Ciencias Marinas*, 30(3), 443-453.
- Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., and Henry, R. P. (2007). *Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei, reared in low salinity waters*. *Aquaculture*, 262(2), 461-469.
- Sánchez-Castrejón E., (2007). *Producción de la hormona recombinante hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) del camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación científica y de Educación Superior de Ensenada. B. C., México.
- 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.
- Santos, E. A., Eduardo, L., Nery, M., Gonçalves, A. A., and 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.
- Sedlmeier, D. (1988). *The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland*. *Regulatory peptides*, 20(2), 91-98.
- Sefiani, M., Le Caer, J. P., and Soyeux, D. (1996). *Characterization of Hyperglycemic and Molt-Inhibiting Activity from Sinus Glands of the Penaeid Shrimp Penaeus vannamei*. *General and comparative endocrinology*, 103(1), 41-53.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyeux, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., and Spanings-Pierrot, C. (2003). *Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish Astacus leptodactylus*. *Journal of experimental biology*, 206(6), 979-988.
- Serrano, L., Grousset, E., Charmantier, G., and Spanings-Pierrot, C. (2004). *Occurrence of L- and D-crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the eyestalk X-*

organ/sinus gland complex during the ontogeny of the crayfish Astacus leptodactylus. Journal of Histochemistry and 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 en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. B.C. México. 100 p.
- Sowers, A. D., Young, S. P., Grosell, M., Browdy, C. L., and Tomasso, J. R. (2006). Hemolymph osmolality and cation concentrations in *Litopenaeus vannamei* during exposure to artificial sea salt or a mixed-ion solution: Relationship to potassium flux. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(2), 176-180.
- Spanings-Pierrot, C., Soyeux, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E., and Charmantier, G. (2000). *Involvement of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Control of Gill Ion Transport in the Crab Pachygrapsus marmoratus*. General and comparative endocrinology, 119(3), 340-350.
- Tensen, C. P., Kleun, D. P., and Herp F. (1991). *Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster Homarus americanus*. European journal of biochemistry, 200(1), 103-106.
- Venkataramiah, A., Lakshmi, G. J., & Gunter, G. (1975). *Effect of protein level and vegetable matter on growth and food conversion efficiency of brown shrimp*. Aquaculture, 6(2), 115-125.
- Wanlem, S., Supamattaya, K., Tantikitti, C., Prasertsan, P., and Graidist, P. (2011). *Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (Litopenaeus vannamei) against bacterial infection*. Fish and shellfish immunology, 30(3), 877-885.
- Webster, S. (1996). *Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab Cancer pagurus during emersion stress*. Journal of Experimental Biology, 199(7), 1579-1585.
- Webster, S. G., and Keller, R. (1986). *Purification, characterization and amino acid composition of the putative molt-inhibiting hormone (MIH) of Carcinus maenas (Crustacea, Decapoda)*. Journal of Comparative Physiology B, 156(5), 617-624.
- Webster, S. G., Keller, R., and Dircksen, H. (2012). *The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction*. General and comparative endocrinology, 175(2), 217-233.
- Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T., and Naya, Y. (1994). *Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone from the Crayfish (Procambarus clarkii): Multiplicity of Molecular Forms by Stereo-inversion and Diverse Functions*. General and comparative endocrinology, 95(3), 387-398.

Anexos

1. Análisis de ion Sodio

Principio.

El sodio se precipita del sobrenadante libre de proteínas como triple sal. La disminución resultante de la absorbancia de la mezcla de reactivo de color-sobrenadante es proporcional al contenido de sodio de la muestra.

Los reactivos del kit son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad. Para la recolección de las muestras de plasma, usar heparina de litio, de amonio u oxalato de litio. Los niveles de sodio permanecen estables por lo menos 14 días a temperatura ambiente.

Procedimiento (celdillas).

-Preparación del sobrenadante libre de proteínas

1. Añadir 0.5 ml de plasma diluida en tubos.
2. Añadir 0.5 ml de reactivo precipitante (TCA 10g/dL) gota a gota cada tubo. Agitar con vortex
3. Reposar por 5 minutos y centrifugar a alta velocidad por 5-10 minutos.
4. Pipetear los siguientes volúmenes y agitar rápidamente tras la adición del reactivo color;

Reactivo blanco: 0.5 ml de agua destilada+ 2.5 ml de reactivo color (acetato de uranilo 5.3 g/dL y acetato de zinc 15.4 g/dL en solución acuosa de acético-etanol)

Estándar (140 mmol/L): 0.5 ml de estándar+ 2.5 ml de reactivo color

Muestra: 0.5 ml de sobrenadante+ 2.5 ml de reactivo color

5. Incubar por 10 minutos y centrifugar a alta velocidad los tubos por 5-10 minutos.
6. Separar sobrenadante y realizar la lectura.

7. Leer a 420 nm

Procedimiento (placa de 96 pozos).

-Preparación del sobrenadante libre de proteínas

1. Añadir 10 µl de plasma diluida en tubos.
2. Añadir 0.5 ml de reactivo precipitante gota a gota cada tubo. Agitar con vortex
3. Reposar por 5 minutos y centrifugar a alta velocidad (6400 rpm) por 5-10 minutos. Extraer sobrenadante.

-Lectura

4. Pipetear los siguientes volúmenes y agitar rápidamente tras la adición del reactivo color;

Reactivo blanco: 20 µl de agua destilada+ 200 µl de reactivo color.

Estándar: 20 µl de estándar+ 200 µl de reactivo color

Muestra: 20 µl de sobrenadante+ 200 µl de reactivo color

5. Incubar por 10 minutos y centrifugar a alta velocidad los tubos por 5-10 minutos.
6. Separar sobrenadante
7. Leer a 420 nm

Resultados.

Los valores se derivan de la siguiente ecuación:

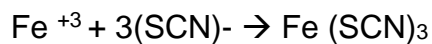
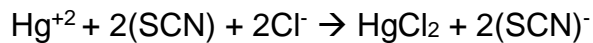
Sodio en plasma (mmol/L)= [(Abs reactivo blanco- abs muestra)/ (Abs reac. Blanco- Abs estándar)] x140

La linearidad se mantiene de 0-160 mmol/L

2. Análisis de Cloro

Principio.

El cloro reacciona directamente con el tiocinato mercúrico para liberar iones tiociniato. Estos se combinan inmediatamente con iones férricos para formar tiocinato férrico rojizo. La absorbancia de este compuesto coloreado estable es medida a 500 nm y comparada con la de un estándar de cloro con la de un estándar de cloro similarmente tratado.



El plasma debe ser separado lo más rápido posible del paquete celular para evitar la difusión del cloro dentro de las células rojas. El cloro en el plasma es estable por lo menos una semana en refrigeración o temperatura ambiente.

Procedimiento (celdilla)

1. En celdillas o tubos, mezclar de la siguiente manera:

Reactivo blanco: 1 ml de reactivo de color (tiocinato de mercurio 1 mmol/L, nitrato férrico 37.5 mmol/L, nitrato mercúrico en metanol y agua 0.155 mmol/L)

Estándar (100 meq/L): 1 ml de reactivo de color+ 0.01 ml de estándar de color

Muestra: 1 ml de reactivo de color + 0.01 ml de muestra.

Procedimiento (placas de 96 pozos)

Reactivo blanco: 200 ml de reactivo de color

Estándar: 200 ml de reactivo de color+ 2 ml de estándar de color

Muestra: 100 de reactivo de color + 2 ml de muestra.

2. Mezclar bien e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

3. Leer la absorbancia de las muestras y el estándar y compararlo contra el reactivo blanco a 500 nm. Las lecturas se deben hacer antes de 5 minutos transcurridos.

Cálculos

Cloro en suero (meq/L) = $(A_m/A_s) \times 100$

A_m = valores de absorbancia de la muestra

A_s = valores de absorbancia del estándar

100 = concentración del estándar (meq/L).

La linealidad se mantiene entre 70-140 meq/L. De ser necesario, diluir la muestra si rebaza el rango establecido y multiplicarlo por el factor de dilución.

3. Análisis de Potasio

Principio

Los iones de potasio en un medio alcalino libre de proteínas reaccionan con el tetrafenilborato de sodio para producir una suspensión turbia finamente dispersa de tetrafenilborato de potasio. La turbidez producida es proporcional a las concentraciones de potasio.

Preparación del reactivo de trabajo.

Mezclar un volumen de borato de potasio (tetrafenilborato de sodio 0.2 mol/L) con un volumen de hidróxido de sodio (2.0 mol/L). Dejarlo reposar por tiempo de 15-30 minutos mínimo antes de utilizarse. El reactivo es estable por 30 días a 20-25°C o por 60 días a 4°C.

Recolección y preparación de la muestra.

En el caso de plasma sanguíneo, se debe utilizar heparina de litio u oxalato de litio.

Los niveles de potasio en el suero permanecen estables por lo menos 14 días de 20-25°C. La hemólisis puede elevar de forma falsa los niveles de potasio en el suero debido a al alto contenido de potasio en los eritrocitos.

Procedimiento (celdas);

1. Añadir 50 µl de plasma diluida en tubos etiquetas.
2. Anadir 500 µl de Reactivo TCA precipitante (0.3 mol/L) gota a gota a cada tubo mezclando vigorosamente con vortex.
3. Dejarlo por 5 min., después centrifugar a alta velocidad por 5-10 min.
4. Añadir el estándar (4 mmol/L. solución de clorato de potasio en TCA acuoso 0.3 mol/L) o el sobrenadante claro en la mitad de la superficie del reactivo de trabajo, asegurarse que cada celdilla sea mezclada con cuidado antes de proseguir con la siguiente muestra.

Reactivo blanco: 1 ml de reactivo de trabajo + 0.1ml de agua destilada

Estándar: 1ml de reactivo de trabajo+ 0.1 ml del estándar

Muestra: 1 ml de reactivo de trabajo + 0.1 ml del sobrenadante de plasma.

Procedimiento (placas de 96 pozos)

-Precipitación de proteínas

1. Añadir 10 µl de a muestra a tubos de 2000 µl
2. Añadir a los tubos 500 µl de solución de TCA 0.3 mmol/L. Mezclar vigorosamente por vortex
3. Dejar reposar 5 minutos y centrifugar a 6400 rpm durante 5 minutos. Separar sobrenadante.
4. Añadir el estándar o el sobrenadante claro en la mitad de la superficie del reactivo de trabajo:

Reactivo blanco: 200 µl de reactivo de trabajo + 20 µl de agua destilada

Estándar: 200 µl de reactivo de trabajo+ 20 µl del estándar

Muestra: 200 µl de reactivo de trabajo + 20 µl del sobrenadante de plasma.

Lectura de las muestras

5. Incubar todas las celdillas a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Leer las muestras a 580. No debe pasar más de 60 minutos entre las lecturas de las muestras, el reactivo blanco y el estándar.

-Resultados

Los valores se pueden derivar por la siguiente ecuación

$$(\text{mmol/L}) = \frac{A_u}{A_s} \times 4$$

Donde A_u = valor de absorbancia de la muestra

A_s = valor de absorbancia del estándar.

C_s = concentración del estándar.

El resultado obtenido se debe convertir de mmol/L a meq/L.

La linealidad se mantiene de 0 a 10 mmol/L.