

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



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

**PRODUCCIÓN DE LA HORMONA RECOMBINANTE HIPERGLUCÉMICA DE
CRUSTÁCEOS (CHH) E INHIBIDORA DE LA MUDA (MIH) DEL CAMARÓN BLANCO
*Litopenaeus vannamei***

TESIS

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

Presenta:

EDNA SÁNCHEZ CASTREJÓN

Ensenada, Baja California, México, Enero 2007.

RESUMEN de la tesis de **Edna Sánchez Castrejón**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México. Enero 2008.

PRODUCCIÓN DE LA HORMONA RECOMBINANTE HIPERGLUCÉMICA DE CRUSTÁCEOS (CHH) E INHIBIDORA DE LA MUDA (MIH) DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

El complejo OX-GS es considerado el principal órgano endócrino en crustáceos ya que sintetiza una serie de hormonas que intervienen en numerosos e importantes procesos fisiológicos. Entre las hormonas sintetizadas por este complejo, destaca la familia CHH/MIH/GIH la cual está relacionada con el desarrollo, crecimiento y reproducción del camarón. A pesar de la importancia de estas hormonas sus mecanismos de acción endócrina son poco conocidos, ya que estos estudios requieren de cantidades suficientes de hormonas las cuales son difíciles de obtener directamente de los animales. Es por ello que la tecnología del ADN recombinante representa una alternativa para la producción de estas hormonas las cuales puedan ser utilizadas en diferentes estudios fisiológicos así como de estructura-función.

En este trabajo se presenta la clonación y expresión de los genes *chh* y *mih* de *Litopenaeus vannamei* para la producción de la hormona recombinante hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) a partir de un vector de expresión para *Pichia pastoris* el cual es inducible por metanol (pPICZ α A) y presenta una señal de secreción (α -factor). Con el propósito de obtener proteínas recombinantes lo más parecidas a sus formas nativas, los genes fueron clonados con sus respectivos condones de término lo que interrumpió la traducción de las secuencias presentes en el vector de expresión que permiten el reconocimiento y purificación de las proteínas producidas. Una vez que se comprobó la correcta inserción de los genes en las clonas transformadas de *P. pastoris* (X-33) por secuenciación, se procedió con el ensayo de inducción donde se determinaron las condiciones óptimas para la producción de las respectivas proteínas. El análisis de secuenciación del N-terminal de MIH_n purificada por exclusión molecular y RP-HPLC

evidenció la presencia de aminoácidos extras debido a un procesamiento incorrecto de las repeticiones Glu-Ala por la proteasa Kex2. Dado lo anterior se procedió con una nueva construcción en la que se incluyó un sitio de reconocimiento para la proteasa Enteroquinasa y la eliminación de las secuencias correspondientes a las repeticiones Glu-Ala. Como en el caso anterior, se verificó la correcta inserción de los genes y las condiciones óptimas para la producción de las proteínas en *P. pastoris* (KM71). El análisis de Western blot comprobó la síntesis de la hormona recombinante MIH_{His}. El rendimiento obtenido para esta proteína recombinante fue de 8.7 mg·l⁻¹, el cual es superior al de otras hormonas recombinantes de camarón producidas en *Pichia*. El análisis de secuenciación de MIH_{His} indicó que la eliminación de las repeticiones Glu-Ala no afectó el procesamiento de la señal α -factor. Por otro lado, el sitio de reconocimiento para la enzima Enteroquinasa fue reconocido e hidrolizado exitosamente por la enzima. La actividad hiperglucémica de MIH_{His} fue corroborada mediante un ensayo *in vivo*, sin embargo no se descarta que también presente un efecto inhibitorio en la muda. Asimismo se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo contra un péptido sintético de MIH, obteniéndose un título alto de anticuerpos. Estos reconocieron a la hormona recombinante MIH_{His} por Western blot y mediante ensayos de ELISA se demostró que tienen un nivel de sensibilidad de 6.3 ng de proteína por lo que no fue posible utilizarlos para determinar los niveles de MIH a partir del extracto de glándula y hemolinfa por un ensayo de ELISA.

Con lo que respecta a CHH_{His} esta no fue observada en los análisis en Western blot. Los ensayos de RT-PCR realizados evidenciaron la transcripción de *chh*, lo que se sugirió que el problema fue a nivel traduccional o postraduccional. Los anticuerpos anti-CHH obtenidos con un péptido sintético mostraron un alto título y los ensayos de Western blot mostraron dos bandas (15 y 30 kDa) en las muestras de extracto de glándulas que aunque no corresponden al tamaño esperado de CHH no se descarta la posibilidad de que sean multímeros de CHH ya que la proteína nativa es de 8-9 kDa.

Palabras clave: *L. vannamei*, MIH, CHH, proteínas recombinantes

ABSTRACT of the thesis presented by **Edna Sánchez Castrejón** as partial requirement to obtain the DOCTOR IN SCIENCE degree, with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. January 2008.

PRODUCTION OF RECOMBINANT CRUSTACEAN HIPERGLYCEMIC HORMONE (CHH) AND MOLT-INHIBITING HORMONE (MIH) OF THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*

The OX-GS complex is considered the main endocrine organ in crustacean and the hormones produced play a central role in numerous and important physiological processes. Among these hormones, the CHH/MIH/GIH peptide family plays important roles in controlling the development, growth and reproduction of shrimp. Despite the importance of the peptide family the studies about endocrine mechanism are scarce since they request large quantities of peptides that are not easy to obtain directly from the animal. Recombinant DNA technology is a good alternative to obtain large quantities of hormones that can be used for different physiological and structure-function studies.

In this study the cloning and expression of *chh* and *mih* genes of *Litopenaeus vannamei* for the production of recombinant hyperglycemic crustacean hormone (CHH) and inhibiting molt hormone (MIH) are presented. A methanol inducible expression vector (pPICZ α A) with a secretion signal sequence (α -factor) for *Pichia pastoris* yeast was used. To obtain recombinant proteins similar to the natives, *chh* and *mih* genes were cloned with their native stop codons. This caused that the sequences used for the purification and antibody recognition of the expression vector were not translated in the recombinant proteins. The strain *P. pastoris* X-33 was transformed and the correct insertion of genes analyzed by sequencing. *Pichia* transformants were induced and the optimal conditions for expression of recombinant proteins determined. The N-terminal sequencing analysis of MIH_n protein purified by size exclusion chromatography and RP-HPLC revealed the presence of extra amino acid residues due to the incorrect processing of the Glu-Ala repeats by Kex2 protease in the yeast secretory pathway. Because of the results obtained a new vector was constructed to include an Enterokinase site and eliminate the Glu-Ala repeats. The new insertion was verified from the *P. pastoris* KM71 transformants and the optimal conditions for the protein expression were determined. The recombinant MIH_{His} protein was detected by a Western blot analysis. The final yield obtained for MIH_{His} (8.7 mg·l⁻¹) was higher than the yields obtained for other shrimp recombinant hormones expressed in *Pichia*. The N-terminal sequence analysis confirmed that the Glu-Ala repeats elimination did not affect the correct processing of α -factor. The Enterokinase site was successfully recognized and cleaved by the Enterokinase enzyme. MIH_{His} hyperglycemic activity was suggested by an *in vivo* assay. However, the possibility of an additional molt inhibiting activity by the protein was not discarded. Polyclonal antibodies were produced by immunizing rabbits with synthetic peptides of CHH and MIH and high titers of antiserum were obtained. MIH antiserum recognized MIH_{His} by Western blot and the ELISA assay showed a sensibility of

detection of 6.3 ng, making impossible its detection from the sinus gland extracts or hemolymph samples by an ELISA assay.

With respect to CHH_{His}, it was not detected by Western blot analysis. Since the transcription of the *chh* gene was demonstrated by the RT-PCR analysis, translational or posttranslational problems are suggested. Western blot analysis of the sinus gland extracts obtained using the CHH antiserum showed two bands (15 and 30 kDa), which not correspond to the expected size of the native CHH protein (8-9 kDa). However, it is possible that they correspond to CHH multimers.

Keywords: *L. vannamei*, MIH, CHH, recombinant protein.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo involucra una gran cantidad de personas cada una de las cuales, participando directa o indirectamente en diferente medida, hicieron posible la culminación del mismo. Independientemente de cuan involucradas hayan estado, su ayuda fue y será igualmente importante para mí, por ello mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, directora de la tesis, por la confianza depositada en mí para desarrollar este proyecto, por su constante apoyo y asesoría. Sobre todo le agradezco su amistad y su paciencia la cual, estoy convencida, es enorme.

A los demás miembros del comité de tesis, los doctores Eugenio Carpizo, Fernando Díaz y Ernesto García por su interés, su invaluable apoyo y todas sus sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jorge de la Rosa (q.e.p.d.) por contagiarme con su entusiasmo y ser un ejemplo de dedicación y profesionalismo.

Al Dr. Alexei Licea por sus siempre atinados consejos, tanto en lo académico como en lo personal.

Al Dr. José Luis Stephano y la Dra. Meredith Gould (q.e.p.d), al igual que a todo su grupo de trabajo, por recibirme en su laboratorio y brindarme su ayuda incondicional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado a través del programa de becas.

Al Dr. Manuel Aguilar por su siempre buena disposición para llevar a cabo el análisis de las secuencias de proteínas.

A la Dra. Pilar Sánchez y a la Dra. Rosa Mouriño por el interés y confianza que mostraron en todo momento, así como por las facilidades brindadas para el uso de sus equipos de laboratorio.

Al M.C. Eduardo Morales por su participación en los análisis de HPLC y a la M.C. Rosalía Conteras por su asesoría en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Biología Molecular, Yessica Matas, Angélica Jiménez, Humberto Organes e Isabel Garduño, quienes siempre estuvieron dispuestos a dedicarme parte de su tiempo, ayudándome y compartiendo conmigo su experiencia en el laboratorio.

A mis compañeros del resto de los laboratorios, Karla Juárez, Ivonne Santiago, Tania Camacho, Michelle Quezada, Omar Mendoza, Haydee Lara, Pavel Lugo, por su amistad.

A Dolores Carvajal, por su invaluable ayuda para resolver todos los contratiempos administrativos.

A Oscar, Héctor, Guillermo, Adriana y Ariel, por su apoyo durante los diferentes bioensayos realizados dentro de este trabajo.

A mi familia por siempre creer en mí y por apoyar todas y cada una de mis decisiones.

A Luis Enríquez, Jorge López, Guillermo Fernández, Ernesto Vázquez, Felipe Becerril, Armando Jaramillo y Andrés López, la banda paceña, algunas veces cerca otras no tanto, pero siempre presentes.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
Sistema neuroendócrino	3
Neurohormonas del complejo OX-GS	6
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
CAPÍTULO I	19
V. Producción de las hormonas recombinantes hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) de <i>Litopenaeus vannamei</i>	20
V.1. Introducción	20
V.2. Objetivos	28
V.3. Materiales y métodos	28
V.3.1. Vector de expresión pPICZ α A	28
V.3.2. Producción de proteínas recombinantes CHH y MIH	29
V.3.2.1. Proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	31
V.3.2.1.1. Clonación de los fragmentos en el vector de expresión	31
V.3.2.1.2. Transformación en <i>E. coli</i>	33

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.3.2.1.3. Transformación en <i>P. pastoris</i> (X-33)	35
V.3.2.1.4. Síntesis de las proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	37
V.3.2.1.4.1. Análisis de la síntesis de las proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	38
V.3.2.1.4.1.1. Preparación de la muestras	38
V.3.2.1.4.1.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE)	38
V.3.2.1.5. Escalamiento del cultivo	39
V.3.2.1.6. Purificación de las proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	40
V.3.2.1.6.1. Separación por cromatografía de exclusión molecular	40
V.3.2.1.6.2. Separación por cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (RP-HPLC)	40
V.3.2.1.7. Secuenciación del amino terminal	41
V.3.2.2. Proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	42
V.3.2.2.1. Clonación de los fragmentos en el vector de expresión	42
V.3.2.2.2. Transformación en <i>E. coli</i>	43
V.3.2.2.3. Transformación en <i>P. pastoris</i> (KM71)	43
V.3.2.2.4. Síntesis de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	44
V.3.2.2.4.1. Análisis de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	44
V.3.2.2.4.1.1. Preparación de la muestras	44
V.3.2.2.4.1.2. Electroforesis desnaturizante en tricina (Tricina-SDS-PAGE) de proteínas recombinantes	44

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.3.2.2.4.1.3. Inmunodetección de proteínas recombinantes (Western blot)	45
V.3.2.2.5. Escalamiento del cultivo	46
V.3.2.2.6. Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	46
V.3.2.2.7. Secuenciación del amino terminal	47
V.3.2.2.8. Hidrólisis del extremo C-terminal	48
V.3.2.2.9. Análisis de expresión de <i>chh</i> y <i>mih</i> mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	48
V.3.2.2.9.1. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	48
V.3.2.2.9.2. PCR a partir de ADNc	49
V.4. Resultados y discusión	50
V.4.1. Proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	50
V.4.1.1. Clonación de las proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	50
V.4.1.2. Análisis de la síntesis de las proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	55
V.4.1.3. Purificación de las proteínas recombinantes CHH _n y MIH _n	58
V.4.1.4. Secuenciación de la proteína recombinante MIH _n	62
V.4.2. Proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	65
V.4.2.1. Clonación de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	65
V.4.2.2. Análisis de la síntesis de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His}	70
V.4.2.3. Producción y purificación de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His} por afinidad	78

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.4.2.4. Secuenciación de la proteína recombinante MIH _{His}	80
V.4.2.5. Hidrólisis del extremo C-terminal	81
V.5. Conclusiones	85
CAPÍTULO II	87
VI. Ensayo de actividad de la hormona recombinante inhibidora de la muda (MIH_{His})	88
VI.1. Introducción	88
VI.2. Objetivos	89
VI.3. Materiales y métodos	89
VI.3.1. Efecto hiperglucémico de MIH _{His}	90
VI.4. Resultados y Discusión	90
VI.5. Conclusiones	97
CAPÍTULO III	98
VII. Anticuerpos anti-CHH y anti-MIH	99
VII.1. Introducción	99
VII.2. Objetivos	103
VII.3. Materiales y métodos	103
VII.3.1. Diseño y síntesis de péptidos CHH y MIH	103
VII.3.2. Inmunización con antígenos CHH y MIH	104
VII.3.3. Obtención de sueros preinmunes e inmunes de conejo	105

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII.3.4. Titulación de los sueros inmunes antiCHH y antiMIH	105
VII.3.5. Inmunodetección de la proteína recombinante MIH _{His} y MIH nativa usando suero antiMIH	106
VII.4. Resultados y discusión	108
VII.4.1. Diseño y síntesis de péptidos CHH y MIH	108
VII.4.2. Titulación de los sueros inmunes antiCHH y antiMIH	112
VII.4.3. Inmunodetección de la proteína recombinante MIH _{His} , MIH y CHH nativas empleando sueros policlonales	114
VII.5. Conclusiones	119
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	120
IX. LITERATURA CITADA	127

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema del pedúnculo ocular de crustáceos decápodos.	4
2. Representación esquemática del gen, transcrito y estructura peptídica de las neurohormonas CHH y MIH.	8
3. Modelo de la regulación de la familia peptídica CHH/MIH/GIH en la muda y reproducción de crustáceos.	9
4. Modelo tridimensional de listón de la estructura terciaria de las neurohormonas CHH y MIH de <i>P. japonicus</i> .	12
5. Mapa del vector de expresión pPICZ α A (Invitrogen)	29
6. Amplificación de los fragmentos CHH _n y MIH _n utilizando como templado los vectores pBAD-CHH y pBAD-MIH, respectivamente.	50
7. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de CHH _n .	52
8. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de MIH _n .	53
9. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR de las clonas transformadas de <i>P. pastoris</i> (X-33) con el vector pPICZ α A-CHH _n y pPICZ α A-MIH _n .	54
10. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR de las clonas transformadas de <i>P. pastoris</i> (X-33) con el vector pPICZ α A sin inserto.	55
11. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de síntesis de la proteína recombinante CHH _n en <i>P. pastoris</i> (X-33) con diferentes concentraciones de metanol durante 0-5 días.	56
12. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de síntesis de la proteína recombinante MIH _n en <i>P. pastoris</i> (X-33) con diferentes concentraciones de metanol durante 0-5 días.	57

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de síntesis con diferentes concentraciones de metanol durante 0-5 días de <i>P. pastoris</i> (X-33) transformada con el vector pPICZ α A sin inserto.	57
14.	Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular del concentrado proteico secretado por <i>P. pastoris</i> (X-33) transformada con el vector pPICZ α A-CHH _n .	59
15.	Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular del concentrado proteico secretado por <i>P. pastoris</i> (X-33) transformada con el vector pPICZ α A-MIH _n .	60
16.	Cromatograma de la fracción II de MIH _n purificada por RP-HPLC.	62
17.	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de CHH _{His} .	67
18.	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de MIH _{His} .	67
19.	Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR de las clonas transformadas de <i>P. pastoris</i> (KM71) con el vector pPICZ α A-CHH _{His} y pPICZ α A-MIH _{His} .	70
20.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de expresión con diferentes concentraciones de metanol de <i>P. pastoris</i> (KM71) transformada con el vector pPICZ α A-CHH _{His} .	72
21.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de expresión con diferentes concentraciones de metanol de <i>P. pastoris</i> (KM71) transformada con el vector pPICZ α A-MIH _{His} .	72
22.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de expresión con diferentes concentraciones de metanol de <i>P. pastoris</i> (KM71) transformada con el vector pPICZ α A sin inserto.	73

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
23.	Inmunodetección de la proteína recombinante CHH _{His} a partir de los sobrenadantes obtenidos durante el ensayo de expresión de <i>P. pastoris</i> (KM71) transformada con el vector pPICZαA-CHH _{His}	74
24.	Inmunodetección de la proteína recombinante MIH _{His} a partir de los sobrenadantes obtenidos durante el ensayo de expresión de <i>P. pastoris</i> (KM71) transformada con el vector pPICZαA-MIH _{His} .	74
25.	Electroforesis de los fragmentos amplificados por RT-PCR de las clonas transformadas de <i>P. pastoris</i> (KM71) con los vectores pPICZαA-CHH _{His} y pPICZαA-MIH _{His} así como de la cepa <i>P. pastoris</i> (KM71) sin transformar inducidas con metanol 4% durante 2 días	76
26.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% teñidos con azul de coomassie de la purificación de las proteínas recombinantes CHH _{His} y MIH _{His} por cromatografía de afinidad a níquel (Probond, Invitrogen).	80
27.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de MIH _{His} con Enteroquinasa M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen).	82
28.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de MIH _{His} con Enteroquinasa incubada a 4°C.	83
29.	Nivel de glucosa en hemolinfa de camarones <i>L. vannamei</i> ablacionados unilateralmente e inyectados con 100 µl de solución salina (control negativo), extracto crudo de un pedúnculo (control positivo) y 2 µg de proteína recombinante MIH _{His} .	92
30.	Resultados del análisis teórico de antigenicidad de la neurohormona CHH de <i>P. vannamei</i> utilizando el programa EpiShot™.	109
31.	Resultados del análisis teórico de antigenicidad de la neurohormona MIH de <i>P. vannamei</i> utilizando el programa EpiShot™.	110
32.	Titulación del suero antiCHH contra el péptido sintético CHH mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).	113

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
33.	Titulación del suero antiMIH contra el péptido sintético MIH mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).	114
34.	Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) de MIH _{His} recombinante y extractos de glándula sinusal y hemolinfa.	116
35.	Inmunodetección de MIH _{His} recombinante, sobrenadante de la inducción de CHH _{His} así como de CHH y MIH nativas en extractos de glándula sinusal y hemolinfa empleando sueros policlonales antiCHH y antiMIH.	116
36.	Inmunodetección de MIH recombinante (MIH _{His}) y MIH nativa en extractos de glándula sinusal y hemolinfa mediante ELISA utilizando suero anti-MIH.	117
37.	Inmunodetección de MIH recombinante (MIH _{His}) a diferentes concentraciones mediante ELISA utilizando suero anti-MIH. Control negativo BSA.	118

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Secuencia de los cebadores utilizados	32
II.	Esquema de inmunización de los péptidos sintéticos CHH y MIH	104

I. INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de productos marinos y la aparente sobreexplotación de las poblaciones naturales ha provocado que las técnicas de cultivo acuícolas sean consideradas como la opción más viable para solventar este problema. De acuerdo con reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) de 1984 a 1994 el porcentaje de camarón cultivado se incrementó de un 9% a un 29.9%, de tal forma que para 1998 de los 3.8 millones de toneladas métricas generadas, 800,000 toneladas métricas fueron producidas por la acuicultura del camarón lo que corresponde al 21% de total (FAO, 2000). Estos datos muestran a la camaronicultura como una actividad de gran importancia económica a nivel nacional e internacional.

El desarrollo de la camaronicultura se ha visto favorecida con el desarrollo de tecnologías que proveen un suministro predecible de poslarvas, alimentos balanceados de calidad, así como un conocimiento amplio de la biología de las especies que se van a cultivar. En este sentido la investigación en áreas como fisiología, bioquímica, endocrinología, nutrición, patología y genética ha resultado en nuevos avances tecnológicos que han incrementado la ganancia económica en la acuicultura del camarón (Huberman, 2000). Aun cuando varias especies de camarón se cultivan comercialmente en el mundo, en México la especie más cultivada en los últimos años es *Litopenaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda), ya que es más resistente a enfermedades, presenta una mayor tasa de crecimiento en cultivo y una tolerancia amplia a diferentes condiciones en cultivo.

Los estudios endocrinológicos y fisiológicos sobre los mecanismos que controlan la reproducción, desove y crecimiento cobran gran importancia ya que permiten la optimización de la tecnología de producción de camarón. Actualmente existen numerosos trabajos que han identificado estructuras, genes y hormonas que intervienen en dichos procesos, sin embargo los mecanismos que los desencadenan así como su regulación no son completamente entendidos.

El presente trabajo tiene como objetivo contribuir al conocimiento de la endocrinología de *L. vannamei* mediante la producción y análisis de neurohormonas recombinantes que intervienen en la regulación de glucosa y la muda, así como la producción de anticuerpos contra estas neurohormonas. Estas herramientas serán de gran ayuda ya que pueden ser empleadas en estudios donde se evalúen procesos fisiológicos en los que intervienen estas neurohormonas así como los factores que desencadenan su respuesta.

II. ANTECEDENTES

Sistema neuroendócrino

Los seres vivos han desarrollado diferentes sistemas para mantenerse en contacto con el medio ambiente que les rodea y responder a los cambios que puedan ocurrir. Las señales, ya sean de naturaleza física o química, se perciben a través de diferentes tipos de receptores y se traducen por medio de un amplio grupo de moléculas de distinta naturaleza química. Del éxito de la transducción de una señal depende que cada uno de los procesos que se necesitan para sobrevivir se lleve a cabo de forma óptima.

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

El primer órgano neurohormonal identificado en crustáceos fue la glándula de seno (GS) que se ubica en la base del pedúnculo ocular y está próxima al seno hemolinfático donde libera sus productos. Los axones terminales que constituyen la GS se originan de los cuerpos celulares de las neuronas localizadas en el órgano X (OX), el cual se ubica en la *medula terminalis* del pedúnculo ocular (Figura 1). Dado que los productos secretados por la GS se sintetizan en los somas de las neuronas del OX este complejo se conoce órgano X-glándula del seno (OX-GS). El complejo OX-GS es un conglomerado formado por 150-

200 células neurosecretoras y es considerado como el principal centro neurosecretor en crustáceos. En los somas que constituyen el órgano X se sintetizan los neuropéptidos los cuales son empaquetados en pequeñas vesículas que se desplazan a través de las proyecciones axonales hasta almacenarse en las terminales nerviosas que constituyen la glándula del seno. La importancia del complejo OX-GS se debe al gran número de neuropéptidos que sintetizan y a la importancia de las funciones en las que estos intervienen (García y Aréchiga, 1998).

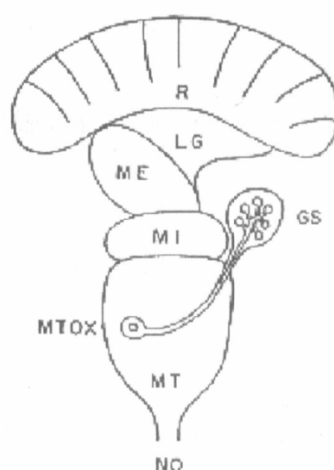


Figura 1. Esquema del pedúnculo ocular de crustáceos decápodos. Nervio óptico (NO), *medulla terminalis* (MT), *medulla terminalis*-órgano X (MTOX), *medulla interna* (MI), *medulla externa* (ME), glándula del seno (GS), *lamina ganglionaris* (LG), retina (R). Tomado de Huberman y Aguilar (1988).

Además del complejo OX-GS existen otras estructuras neurohemales tales como los órganos postcomisurales y pericárdicos. Los órganos postcomisurales son terminales axonales ubicadas en la comisura postesofágica mientras que los pericárdicos se localizan

en el seno venoso que rodea al corazón donde se liberan neurohormonas que controlan la frecuencia y amplitud cardíaca (Fingerman, 1997).

Entre las estructuras no neuronales con función endócrina se incluyen: el órgano Y, la glándula androgénica, los ovarios, el órgano mandibular y los efectores pigmentarios (Fingerman, 1997). El órgano Y es la principal fuente de secreción de ecdiesteroides, los cuales son hormonas de naturaleza lipídica que intervienen en la muda (Kleinholz y Keller, 1979; Chang y O'Connor, 1988; Lachaise *et al.*, 1993). La glándula androgénica, presente sólo en machos, interviene en la diferenciación del sistema reproductor y de sus estructuras sexuales secundarias. Los ovarios se encargan de producir las hormonas que inducen el desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias de las hembras (Kleinholz y Keller, 1979, Charniaux-Cotton y Payen, 1988). El órgano mandibular (OM) secreta, entre otras sustancias, el metil farnesoato (MF), el cual regula procesos relacionados con la reproducción y estimula la síntesis de ecdiesteroides en el órgano Y (Laufer y Borst, 1997). Los efectores pigmentarios son de dos tipos: cromatóforos y pigmentos retinales. Los primeros se localizan en el integumento y son los responsables del cambio de color del organismo. Los segundos, situados en el pedúnculo ocular y controlados tanto de forma hormonal como neural, contienen los pigmentos necesarios para responder a las diferentes intensidades de luz (Fingerman, 1997; Huberman, 2000).

Neurohormonas del complejo OX-GS

El reconocimiento de la GS como órgano responsable de almacenar y secretar factores data de 1930, cuando se demostró que en ella se ubicaba un factor capaz de inducir cambios en la coloración del cangrejo *Crangon crango*. A la fecha en crustáceos se han identificado diversos péptidos sintetizados y almacenados por el complejo OX-GS con actividad neuroendocrina, los cuales son conocidos como cromatoforotropinas y hormonas de la familia CHH/MIH/GIH. Dentro de esta familia, también conocida como familia CHH por algunos autores, se incluye la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la gónada (GIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH), las cuales intervienen en procesos relacionados con reproducción, desarrollo y crecimiento (Fingerman, 1997).

La familia peptídica CHH/MIH/GIH incluye alrededor de 50 péptidos los cuales comparten características bioquímicas muy conservadas. Estas neurohormonas son péptidos de 6 a 11 kDa constituidos por 72 a 83 aminoácidos que presentan 6 residuos de cisteína, 2 de arginina, uno de ácido aspártico y uno de fenilalanina en posiciones idénticas. Los residuos de cisteína forman 3 enlaces disulfuro lo que sugiere que esta familia muestra un mismo patrón de plegamiento. Con base a su estructura primaria los péptidos de esta familia se agrupan en dos subfamilias o grupos. La subfamilia CHH o I, en la que se ubica CHH, incluye péptidos de 72 aminoácidos con el extremo C-terminal amidado, por otro lado la subfamilia MIH/GIH o II incluye péptidos de 72 a 83 aminoácidos los cuales presentan los extremos N y C-terminal en forma libre, así como un residuo de glicina adicional entre las

dos primeras cisteínas. En la subfamilia MIH/GIH se ubican las neurohormonas MIH, GIH y MOIH (Keller, 1992; Böcking *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2005).

Estudios recientes donde se han caracterizado los genes que codifican para la neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH tanto en camarones peneidos (Sun, 1994; Gu y Chan, 1998a, b; Gu *et al.*, 2000, Udomkit *et al.*, 2000, Lago-Lestón *et al.*, 2007) como en otros crustáceos decápodos (Klein *et al.*, 1993, de Kleijn *et al.*, 1994a, b; de Kleijn *et al.*, 1995, Umphrey *et al.*, 1998) han evidenciado cierta homología con respecto al arreglo de estos genes. En este sentido se ha encontrado que las prehormonas de crustáceos están codificadas por 3 exones (Fig. 2). El exón 1 que codifica para un segmento pequeño del extremo N-terminal del péptido señal (PS). El resto de la secuencia del PS está codificada en el exón 2. En el caso de la subfamilia CHH este exón también codifica para el péptido relacionado al precursor de la CHH (CPRP) el cual no está presente en las prehormonas de la subfamilia MIH/GIH. La presencia o ausencia del CPRP es una característica estructural que permite diferenciar las dos subfamilias. Finalmente los primeros aminoácidos del péptido maduro son codificados también por el exón 2, mientras que su extremo terminal por el exón 3 (Böcking *et al.*, 2002).

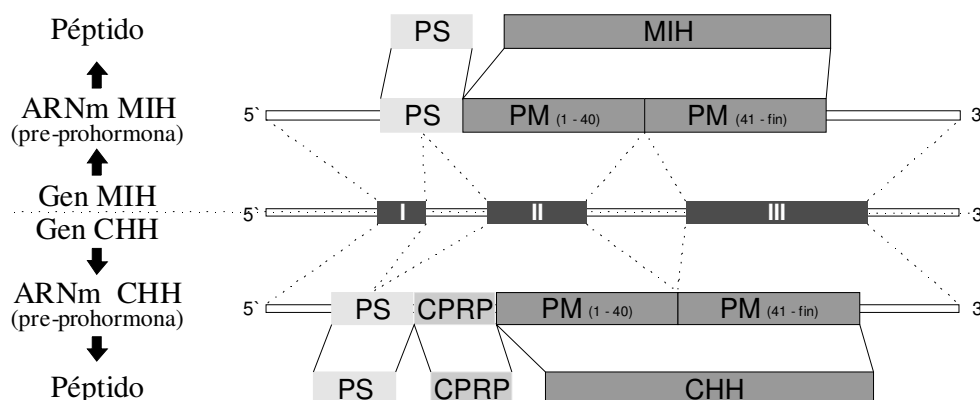


Figura 2. Representación esquemática del gen, transcrito y estructura peptídica de las neurohormonas CHH y MIH. PS, péptido señal; CPRP, péptido relacionado al precursor de la CHH; PM, péptido maduro. Tomado de Böcking y colaboradores (2002).

Las neurohormonas de la familia peptídica CHH/MIH/GIH intervienen en diferentes procesos fisiológicos los cuales muchas veces se sobrelapan y varían dependiendo del sexo y la etapa del ciclo de vida en que se encuentre el organismo. Esta familia peptídica en conjunto juega un papel integral al regular procesos antagónicos como son la muda y la reproducción en crustáceos mediante una compleja interrelación (Fig. 3). Factores externos como son la temperatura, estrés, fotoperiodo, nutrición y estrés, entre otros, desencadenan la respuesta de estas neurohormonas. El modelo general aceptado sugiere que MIH inhibe la síntesis de ecdisteroides durante la mayor parte del ciclo de muda, y que la muda se lleva a cabo cuando la secreción de MIH disminuye. A partir de un estudio en *P. clarkii* donde se evaluó los niveles de MIH en hemolinfa durante un ciclo de muda, se comprobó que esta hormona se incrementó en la intermuda y disminuyó dramáticamente durante la premuda temprana, lo cual es consistente con el modelo anteriormente planteado (Nakatsuji y Sonobe 2003). Sin embargo, existen indicios que sugieren que el cambio en la secreción

de ecdiesteroides también está influenciada por un cambio en el nivel de respuesta del órgano Y. Aun cuando se desconoce el mecanismo que genera este cambio, es probable que estén involucrados receptores y cambios en la ruta de señalización intracelular. Aun cuando no existe un consenso general, se ha propuesto una segunda ruta de señalización que involucra adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y guanidín monofosfato cíclico (cGMP) en la regulación de la síntesis de ecdiesteroides (Nakatsuji *et al.*, 2006). Adicionalmente a la muda, se ha observado que MIH interviene en el metabolismo de la glucosa (Chang *et al.*, 1990; Sonobe *et al.*, 2001) y en la maduración de hembras (Gu *et al.*, 2002).

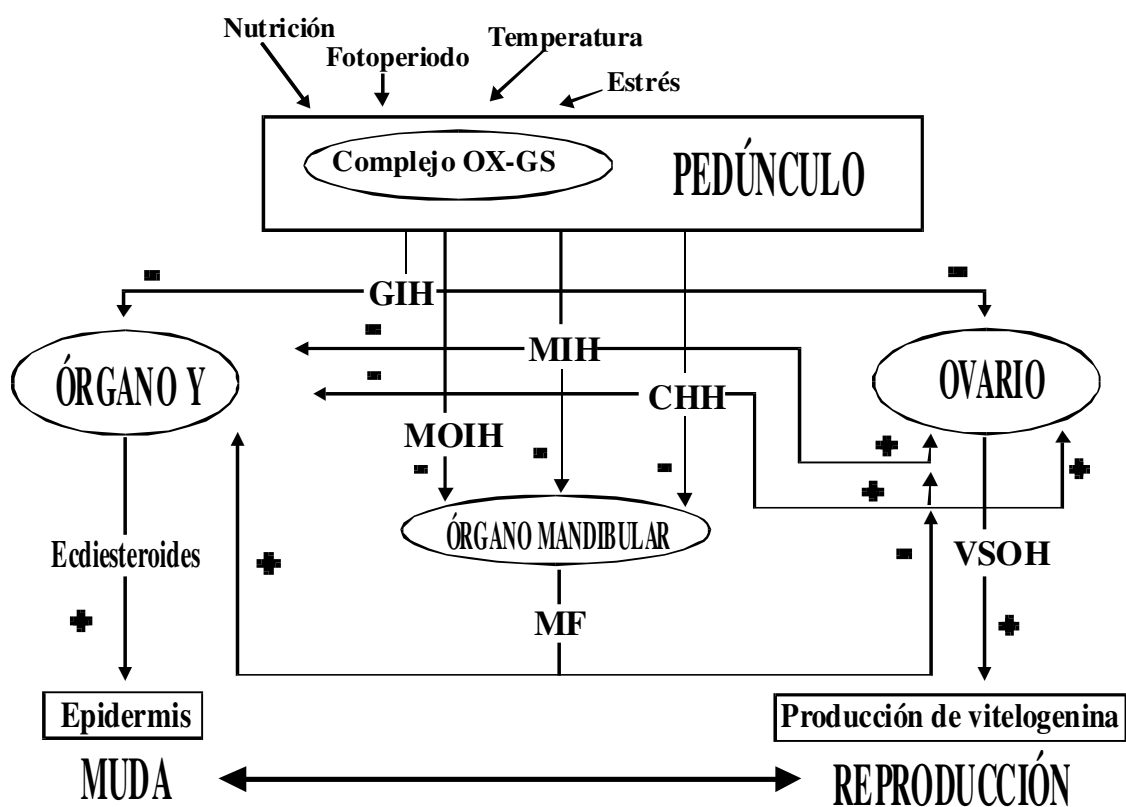


Figura. 3 Modelo de la regulación de la familia peptídica CHH/MIH/GIH en la muda y reproducción de crustáceos. (Tomado de de Kleijn y van Herp (1998) y modificado por Lago-Lestón (2001)).

CHH no sólo es importante durante el desarrollo del organismo, sino durante todo su ciclo de vida. CHH tiene una función central en el metabolismo de los carbohidratos, sin embargo su participación en otros procesos como son el metabolismo de lípidos (Santos *et al.*, 1997), muda (Yasuda *et al.*, 1994; de Kleijn y van Herp, 1995), reproducción (Khayat *et al.*, 1998; de Kleijn y van Herp, 1998), osmorregulación (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000) y síntesis de MF evidencian su multifuncionalidad, atribuida principalmente a sus diferentes isoformas (Böcking *et al.*, 2002) (Fig. 3). Se ha observado que la isoforma D-Fen3 CHH interviene tanto en procesos de osmorregulación como la muda mientras que CHH-A y CHH-B intervienen en el la vitelogénesis y maduración de algunos crustáceos (Chung *et al.*, 1999). Por otro lado, se sugiere que algunas isoformas de CHH regulan el metil farnesoato (MF) del órgano mandibular, la cual también interviene en procesos relacionados con la muda y reproducción (Liu *et al.*, 1997; Laufer y Borst, 1998).

Con respecto a la regulación de carbohidratos, esta hormona induce hiperglucemia en hemolinfa, proveyendo de glucosa a los tejidos y órganos que requieren de una fuente de energía para mantener la homeostasis del organismo. Estudios en organismos decápodos, indican que la actividad de CHH varía a lo largo de su ciclo de vida y que esta participa como un mecanismo adaptativo ante condiciones de estrés (Fanjul-Moles, 2006).

Análisis *in vitro* indican que CHH se encuentra bajo control de la glucosa en hemolinfa y responden a la D-glucosa con una hiperpolarización de las células secretoras de CHH inhibiendo su liberación y como consecuencia la glucólisis a partir del glucógeno almacenado. En condiciones de hipoglucemia, las células secretoras de CHH se

despolarizan induciendo la liberación de CHH y por ende la movilización de glucosa a partir del glucógeno (glucogenólisis). Adicionalmente se ha observado que el lactato que resulta del flujo glicolítico puede estimular la liberación de CHH y por lo tanto la glucogenólisis. Durante su transporte a través de la hemolinfa, CHH se une a una hemocianina e induce la movilización de glucosa de las reservas de glucógeno de los diferentes tejidos, en particular del intestino medio y músculo. Asimismo regula los ácidos grasos y fosfolípidos en hemolinfa por catabolismo de los lípidos almacenados en el intestino medio. A nivel de membrana, CHH se une a un receptor de las células del intestino medio y activa la síntesis de GMP cíclico, pero a nivel de tejido, estimula la glucogenólisis inhibiendo la glucógeno sintetasa y activando la glucógeno fosforilasa (Fanjul-Moles, 2006).

Mediante estudios con resonancia magnética nuclear (NMR) se elucidó la estructura de la hormona recombinante MIH de *P. japonicus*, confirmándose que se trata de un péptido con abundantes estructuras α -hélice como se había sugerido para varias hormonas de la familia CHH/MIH/GIH por dicroísmo circular (Huberman *et al.*, 1989, Katayama *et al.*, 2001). La estructura de MIH de *P. japonicus* está compuesta por una región N-terminal, cinco α -hélices (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 y α_5), separadas por cuatro asas (L1-2, L2-3, L3-4 y L4-5), y una región carboxilo terminal (Fig. 4). Los tres enlaces disulfuro unen los segmentos N-terminal y L3-4; α_2 y α_3 ; α_2 y α_4 . La conformación de la estructura se estabiliza por los tres enlaces disulfuro y por interacciones hidrofóbicas de algunos de sus residuos. La conformación de cinco α -hélices y la ausencia de hojas plegadas- β constituye un motivo

estructural novedoso no reportado en ninguna otra proteína (Katayama *et al.*, 2003). En este mismo trabajo se modeló la estructura de CHH, la cual presenta una gran similitud con la de MIH. Sin embargo, los motivos estructurales del C y N-terminal de CHH y MIH difieren, lo cual podría dar indicios del papel relevante de estas regiones en su especificidad funcional.

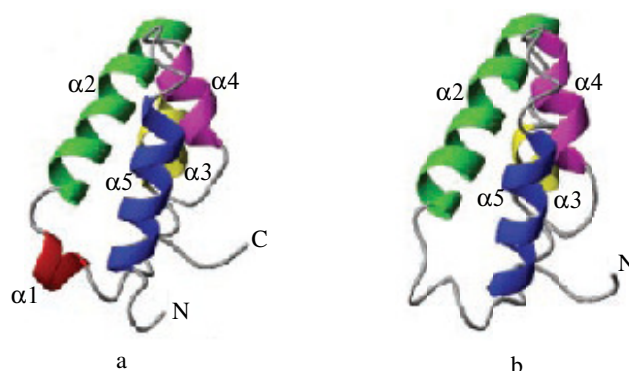


Figura 4. Modelo tridimensional de listón de la estructura terciaria de las neurohormonas CHH y MIH de *P. japonicus*. a) Estructura de MIH caracterizada por resonancia magnética nuclear a partir de la proteína recombinante. b) Modelo de la estructura tridimensional de CHH a partir de la proteína Pej-SGP. Se indican las α -hélices y los extremos N y C-terminal. Tomado de Katayama y colaboradores (2003).

La hormona inhibidora de la muda (GIH), también conocida como hormona inhibidora de la vitelogénesis, es la responsable de impedir la maduración del ovario y la vitelogénesis en hembras y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en machos. En las hembras, GIH actúa directamente sobre el ovario y en los machos sobre la glándula androgénica (Kleinholz y Keller, 1979; Charniaux-Cotton y Payen, 1988). A la fecha, esta hormona sólo ha sido descrita para *Crangon crangon* (Bomiriski *et al.*, 1980), *Homarus americanus* (Soyez *et al.*, 1987), *Procambarus bouvieri* (Aguilar *et al.*, 1992) y *Armadillidium vulgare*

(Grevé *et al.*, 1999). En el caso concreto de *H. americanus* se han identificado dos isoformas del péptido (Soyez *et al.*, 1991).

Como su nombre lo dice, la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) es la responsable de inhibir al órgano mandibular (OM). Este órgano secreta el MF, una hormona químicamente muy relacionada con la hormona juvenil de insectos, la cual interviene en varios procesos entre los que se incluyen morfogénesis, metamorfosis, vitelogénesis, desarrollo del ovario y la síntesis de ecdiesteroides en el órgano Y (Laufer y Borst, 1988). La MOIH además de regular negativamente la MF interviene en el metabolismo de la glucosa, crecimiento y reproducción (Liu *et al.*, 1997, Tang *et al.*, 1999). Actualmente se conoce la estructura primaria de dos MOIH para el cangrejo *Cancer pagurus* las cuales difieren en un residuo en la posición 33 y una de *Libinia emarginata* (Wainwright *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997).

Si bien se considera que la principal función de CHH es la de regular los niveles de glucosa y en el caso de MIH el inhibir la muda, se ha observado que estas hormonas son multifuncionales, ya que se les puede encontrar regulando procesos adicionales y sobrelapando sus actividades con las de otras hormonas de la misma familia CHH/MIH/GIH (Yasuda *et al.*, 1994; Khayat *et al.*, 1998; de Kleijn y van Herp, 1995; de Kleijn *et al.*, 1998). Tal es el caso de las hormonas hiperglucémicas CHH-I y CHH-II de *P. clarkii*, las cuales difieren por la presencia de D (CHH-II) / L (CHH-I) fenilalanina en la posición 3 del péptido. El análisis *in vivo* e *in vitro* de estas proteínas evidenció su papel

hiperglucémico e inhibitorio en la síntesis de ecdiesteroides (Yasuda *et al.*, 1994). Esta diferencia en el efecto fisiológico presentado por la isomerización de la hormona CHH de L-CHH y D-Fen³ CHH, ya ha sido previamente reportada para otras especies como *H. americanus* (Soyez *et al.*, 1994; Ollivaux y Soyez, 2000). De la misma forma, las hormona L-CHH y D-Fen³ CHH) de *Astacus leptodactylus* presentaron un efecto hiperglucémico y una elevación en la concentración de Na⁺ y osmolaridad de la hemolinfa. Asimismo, un péptido aislado de la langosta *H. americanus* presentó actividad hiperglucémica así como inhibidora de la muda (Chang *et al.*, 1990).

Hasta hace algunos años, los estudios para observar el comportamiento de dichas hormonas estaban basados en el empleo de técnicas tales como la ablación del pedúnculo ocular, extirpación o reimplantación de un órgano, inyección de extractos de glándula, y ensayos de inmunocitoquímica, por mencionar algunos. Con la introducción de las técnicas de biología molecular a esta área, se ha logrado conocer la estructura y secuencia de algunos genes que codifican estas hormonas lo que ha facilitado el estudio de su regulación (Fingerman, 1997; Huberman, 2000). Además, estas técnicas nos ofrecen la posibilidad de manipular los organismos de tal forma que resulta menos complejo deducir con precisión las rutas de acción de dichas hormonas.

La expresión de los genes que codifican para las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH en *L. vannamei* ha sido evaluada en algunos trabajos (Sun, 1994; Lago-Lestón, 2001, Lago-Lestón *et al.*, 2007), sin embargo al momento es relativamente poco lo

que se ha estudiado sobre dichas hormonas. Si bien se cuentan con algunas secuencias tanto de ADN genómico como de ADN complementario (ADNc) disponibles en la base de datos del NCBI, en la mayoría de los casos no se ha demostrado la actividad biológica de los péptidos traducidos. Mediante el empleo de vectores de expresión procariota y eucariota se han sintetizado de manera exitosa péptidos recombinantes de CHH y MIH en varias especies de peneidos, entre las que se incluyen *M. ensis* (Gu *et al.*, 2000 y 2001), *P. monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2002 y 2003; Udomki *et al.*, 2004; Yodmuang, 2004) y *P. japonicus* (Ohira *et al.*, 2003). A partir de las neurohormonas recombinantes se han realizado ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar su actividad, los cuales han evidenciado el papel multifuncional de algunas de ellas. Asimismo, se han producido sueros policlonales a partir de estas hormonas recombinantes los cuales han sido utilizados en estudios inmunocitoquímicos (Gu *et al.*, 2001, Giulianini *et al.*, 2002).

En el caso particular de *Litopenaeus vannamei* se han clonado los genes *chh* y *mih* en un vector de expresión procariota, sin embargo el nivel de síntesis de las proteínas fue muy bajo lo que dificultó su purificación para evaluar su actividad (Organes, 2004). Por otro lado Sun (1997) clonó el gen de *mih* en un vector de expresión eucariota para *P. pastoris*. Aún cuando la proteína esperada (8 kDa) no pudo ser observada en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, esta fue detectada mediante un ensayo de inmunodetección (Western blot). Este ensayo evidenció la presencia de dos bandas de distinto tamaño, la esperada de 8 kDa y una adicional de 14 kDa, sin embargo, no se realizaron análisis de actividad con estas hormonas recombinantes.

III. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo forma parte de un proyecto global en el que se tiene como objetivo el estudiar la expresión de los genes de la familia peptídica CHH/MIH/GIH, así como la determinación de los niveles hormonales de estos péptidos en diferentes condiciones ambientales. Esto con el fin de contribuir al entendimiento de la endocrinología de *L. vannamei*, así como para buscar alternativas de control de crecimiento, maduración y muda en reproductores de esta especie (terapia hormonal), afectando lo menos posible otros procesos fisiológicos, así como mejorar la calidad y sobrevivencia de las larvas. Esto es de gran importancia dado que el cultivo del camarón constituye el sector económico de mayor crecimiento a nivel mundial, siendo *L. vannamei* la especie que más se cultiva en nuestro país.

Considerando que la purificación de CHH y MIH a partir de extractos de glándulas del seno disectadas de pedúnculos oculares, sólo permite obtener cantidades pequeñas y que su similitud en tamaño y estructura dificulta su aislamiento (Huberman, 2000), la tecnología del ADN recombinante representa una alternativa para la producción de estas hormonas, las cuales pueden ser empleadas en estudios que permitan conocer su papel fisiológico así como de estructura-función (Keller, 1992). No obstante la importancia de estas hormonas en el crecimiento, reproducción y muda en *L. vannamei*, hasta el momento sólo se ha clonado el gen *mih* en un vector de expresión eucariota para la producción de la proteína recombinante, sin embargo su actividad biológica no fue evaluada (Sun, 1997). Por otro lado, Organes (2004) clonó los genes *chh* y *mih* en un vector de expresión procariota, sin

embargo el nivel de síntesis de las proteínas fue muy bajo lo que dificultó su purificación para evaluar su actividad. Dado lo anterior, en este trabajo se pretende clonar las secuencias de los genes *chh* y *mih* en un vector de expresión eucariota con el propósito de controlar su expresión y de esta forma obtener cantidades suficientes de estas hormonas recombinantes para el estudio de su actividad biológica en ensayos *in vivo* o *in vitro*, así como la obtención de anticuerpos que permitan cuantificar los niveles de las hormonas en el organismo expuestos a diferentes condiciones ambientales y/o nutricionales que afecten la fisiología del camarón. Esto con el propósito de conocer con detalles los procesos endocrinológicos en los que participan así como su regulación, lo cual podría ser directamente aplicado en la acuicultura de estos organismos donde el control y manejo de estos procesos podría reflejarse en mejores resultados de producción mediante estrategias endocrinológicas alternativas. Lo anterior es importante, ya que la ablación es una de las técnicas mayormente empleadas para estimular la maduración y desove de las hembras reproductoras de camarón. Sin embargo, esta estrategia no sólo afecta el balance de las hormonas producidas por la GS sino también la calidad de los huevos en los ciclos reproductivos siguientes.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Llevar a cabo la producción y purificación de las neurohormonas recombinantes de CHH y MIH de *L. vannamei* utilizando un sistema de expresión eucariota.

Objetivos específicos

1. Clonar, producir y purificar las neurohormonas recombinantes de CHH y MIH de *L. vannamei* en *P. pastoris*.
2. Evaluar la actividad biológica de las neurohormonas recombinantes producidas mediante un ensayo *in vivo*.
3. Producir anticuerpos policlonales contra las neurohormonas CHH y MIH de *L. vannamei*.

CAPÍTULO I

V. Producción de las hormonas recombinantes CHH y MIH

V.1. Introducción

Entre las neurohormonas secretadas por este complejo OX-GS se encuentra la familia peptídica CHH/MIH/GIH que incluye a la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH) y la hormona inhibidora de la gónada (GIH). Aunque la principal función de CHH es la regulación del metabolismo de la glucosa, estudios recientes indican que tiene un papel multifuncional ya que interviene en procesos regulados por otras hormonas de la familia CHH/MIH/GIH. Por otro lado, MIH mantiene al organismo en un periodo de intermuda al inhibir la síntesis de ecdiesteroides. Dada la similitud en la secuencias de los aminoácidos de CHH y MIH no es extraño que CHH tenga actividad de MIH o viceversa (Quackenbush, 1986; Keller, 1992; Fingerman, 1997; Huberman, 2000; Böcking *et al.*, 2002)

En el caso de camarones peneidos, sólo se han purificado cantidades pequeñas de CHH y MIH a partir de extractos de glándulas del seno disectadas de pedúnculos oculares, por otro lado, su similitud en tamaño y estructura dificulta su aislamiento (Huberman, 2000). Es por ello que la tecnología del ADN recombinante representa una alternativa para la producción de estas hormonas, las cuales pueden ser empleadas en estudios que permitan conocer su papel fisiológico así como de estructura-función (Keller, 1992).

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha jugado un papel determinante en la síntesis de proteínas recombinantes o heterólogas. Mediante la manipulación de genes ha sido posible la producción de proteínas que se encuentran en cantidades bajas de manera

natural y ha permitido la modificación de proteínas confiriéndoles nuevas propiedades. Hoy en día existe en el mercado una gran variedad de proteínas recombinantes con aplicaciones diversas lo que ha generado una revolución en el mercado biotecnológico y por lo tanto un interés en las investigaciones en esta área.

La producción de proteínas heterólogas implica el uso de un sistema de expresión el cual está constituido por un organismo huésped y un vector de expresión el cual además de presentar el gen que se desea expresar incluye los elementos necesarios para realizar su transcripción y traducción dentro del organismo huésped. Entre los sistemas de expresión más ampliamente utilizados se encuentra el procariota, siendo *Escherichia coli* el organismo huésped preferido. Entre las ventajas de utilizar *E. coli* para la expresión de proteínas recombinantes, destacan el nivel de conocimiento que se tiene de su genética y fisiología, su fácil manipulación, el empleo de medios de cultivos baratos y con altas densidades celulares, así como la disponibilidad de una gran variedad de vectores de expresión y cepas modificadas. Sin embargo, este sistema de expresión también presenta desventajas, como son su ineficiencia para secretar proteínas al medio de cultivo y la precipitación de las mismas en cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma. Adicionalmente, *E. coli* cuenta con un sistema ineficiente para realizar modificaciones postraduccionales y genera endotoxinas dañinas para la salud humana y animal. Por otro lado, la producción de proteínas heterólogas en *E. coli* induce un incremento de la proteólisis celular (Rai y Padh, 2001).

Aun cuando se han utilizado sistemas de expresión procariota para la producción de proteínas eucariotas, en algunos casos estas son inestables y carecen de actividad biológica por lo que un sistema eucariota resulta una alternativa más eficiente y adecuada. Existen varios sistemas de expresión eucariotas que incluyen hongos, líneas celulares de mamíferos, insectos o plantas, entre otros, sin embargo se ha demostrado que los basados en levaduras son una fuente eficiente y económica para la producción de proteínas eucariotas. Las levaduras realizan procesos de expresión y maduración característicos de células vegetales y animales, lo que les da una ventaja para la producción de proteínas eucariotas. Por lo tanto, las levaduras ofrecen un ambiente adecuado para el plegamiento de proteínas recombinantes, llevan a cabo algunas modificaciones postraduccionales y pueden secretarlas al medio de cultivo (Buckholz y Gleeson, 1991, Vedvick, 1991).

La levadura mayormente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes es *P. pastoris*. Entre las ventajas de utilizar esta levadura se incluyen su crecimiento a altas densidades en medios de cultivos simples, promotores fuertemente inducibles así como la disponibilidad de métodos, cepas y vectores de expresión para su manipulación genética (Cregg y Madden, 1988; Digan *et al.*, 1988; Romanos *et al.*, 1992).

P. pastoris es una levadura metilotrófica es decir, es capaz de utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía a través de una ruta metabólica que incluye un conjunto único de enzimas. El primer paso en esta ruta metabólica es la oxidación del metanol a formaldehído generando peróxido de hidrógeno mediante la enzima alcohol oxidasa (AOX). Para evitar la toxicidad del peróxido de hidrógeno este proceso se lleva dentro de

los peroxisomas, aislándolo del resto de la célula. La AOX tiene poca afinidad por el oxígeno, sin embargo se sugiere que las levaduras metilotróficas compensan esta deficiencia sintetizando grandes cantidades de esta enzima (Veenhuis *et al.*, 1983; Gleeson y Sudbery, 1988; Sibirny *et al.*, 1988).

La levadura *P. pastoris* presenta dos genes, *AOX1* y *AOX2*, que codifican para la enzima alcohol oxidasa, de los cuales, *AOX1* es el principal responsable de la actividad de esta enzima en la célula. La expresión de *AOX1* está altamente regulada e inducida a nivel transcripcional por metanol. En cultivos con metanol, el ARNm del gene *AOX1* representa aproximadamente el 5%, mientras que cuando se utiliza otra fuente de carbono, este no es detectable. La regulación del *AOX1* involucra dos mecanismos, represión/derepresión e inducción, dado que la derepresión no da como resultado la transcripción del gen, la presencia de metanol es esencial para la inducir niveles altos de transcripción (Ellis *et al.*, 1985; Tschopp *et al.*, 1987; Cregg *et al.*, 1989).

Las proteínas recombinantes a partir de *P. pastoris* pueden ser expresadas intracelularmente o secretadas al medio de cultivo. Debido a que *P. pastoris* secreta bajos niveles de proteínas endógenas y que los medios de cultivo no incluyen suplementos proteicos, una proteína heteróloga secretada representa el mayor porcentaje de las proteínas totales presentes en el medio de cultivo. En este sentido, la secreción de proteínas heterólogas se considera el primer paso en su proceso de purificación (Cereghino y Cregg, 2000). El proceso de secreción requiere de la presencia de una secuencia señal en la proteína heteróloga para que esta sea dirigida a la ruta metabólica para su secreción a través del retículo endoplásmico

(RE) y el complejo de golgi, antes de su ubicación en las vesículas de secreción (Caplan *et al.*, 1991). Existen varias señales de secreción, incluyendo las que presentan las proteínas nativas, sin embargo, la señal de secreción de *S. cerevisiae*, α -factor, es la utilizada con mayor frecuencia (Vedvick *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1992; Scorer *et al.*, 1993, Laroche *et al.*, 1994). La secuencia completa del α -factor consta de 85 aminoácidos, los primeros 19 residuos corresponden al péptido señal y los siguientes 66 a la región denominada pro-secuencia, que contiene tres sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos 4, 38 y 48 (Kurjan y Herskowitz, 1982).

Las cepas de *P. pastoris* empleadas en la expresión de proteínas son derivadas de la cepa silvestre Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories) y en la mayoría de ellas se ha mutado el gen histidol deshidrogenasa (HIS4) para su selección una vez que han sido transformadas con un vector de expresión que contenga este gen. Respecto a su capacidad para utilizar el metanol se distinguen tres fenotipos. Las cepas que conservan los genes *AOX1* y *AOX2*, se les denominan Mut⁺ (por su siglas en inglés, Metanol utilization plus) por su capacidad para crecer en presencia de metanol a una tasa similar a la de las cepas silvestres. En otras, como es el caso de KM71, el gen *AOX1* ha ido remplazado por el gen *ARG4* de *S. cerevisiae*, dando como resultado una cepa que solo depende del gen *AOX2* para la expresión de AOX y por ende presenta una tasa de crecimiento baja en presencia de metanol. Este fenotipo se designa como Mut^s (por su siglas en inglés, Methanol utilization slow). Finalmente, están aquellas cepas en los que los dos genes *AOX* han sido eliminados y por lo tanto son incapaces de crecer en presencia de metanol, las cuales se denominan

Mut[□] (por sus siglas en inglés, Methanol utilization minus) (Cregg *et al.*, 1985; Cregg y Maden 1987; Cereghino y Cregg, 2000).

Los vectores plasmídicos diseñados para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* presentan varias características en común. Una de estas características es la región que incluye el promotor AOX1, un sitio de clonación múltiple (polylinker) donde se inserta el gen heterólogo, y una secuencia de terminación transcripcional del gen *AOX1* que favorece el procesamiento de los extremos 3' y la poliadenilación de los ARNm. Muchos de estos vectores también presentan un marcador de selección de la transformación, como pueden ser el gen *HIS*, o genes que les confieren resistencia a antibióticos (Cregg y Madden, 1989). Algunos vectores presentan elementos utilizados como herramienta para funciones específicas. Para la secreción de proteínas se han construido vectores que presentan una secuencia que codifica para una señal de secreción la cual se localiza río arriba del promotor AOX1. Si bien la señal de secreción α -factor de *S. cerevisiae* es la más utilizada, existen vectores con otras señales. La presencia de secuencias que codifican para el epítipo *c-myc* y la región 6xHis presentes en algunos vectores facilita la detección y purificación de las proteínas heterólogas (Cregg *et al.*, 1985; Cregg y Madden, 1988; Romanos *et al.*, 1992).

La integración del vector de expresión en el genoma de *P. pastoris* se lleva a cabo por recombinación homóloga entre las secuencias comunes del vector y del genoma del hospedero. La mayoría de los vectores presentan un sitio de restricción único que permite

linearizarlo para su eficiente integración en el genoma de *Pichia* mediante un evento de inserción. Sin embargo, aquellos vectores que presentan secuencias 3´AOX1 pueden ser integrados por inserción en el genoma de *Pichia* en los loci AOX1 o HIS4 o por un doble entrecruzamiento que reemplaza el gen *AOX1*. Este último evento se da por el entrecruzamiento del promotor AOX1 y la región 3´AOX1 del vector y el genoma, dando como resultado la delección de la región AOX1. Las células transformadas que resultan de un evento de reemplazamiento de AOX1, son fenotípicamente Mut^s (Cregg *et al.*, 1987; Cregg y Madden, 1988).

Una de las ventajas de utilizar *P. pastoris* como sistema de expresión, es su potencial para llevar a cabo muchas de las modificaciones postraduccionales características de organismos eucariotas superiores. Entre estas se encuentra el procesamiento de la secuencia señal, plegamiento, formación de enlaces disulfuro y N- y O-glicosilaciones sin generar hiperglicosilación a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae* (Cregg *et al.*, 1993; Romanos, 1995; Fisher *et al.*, 1999; Cereghino *et al.*, 2000; Cereghino *et al.*, 2002).

El empleo de proteínas recombinantes en la acuicultura se ha enfocado principalmente a incrementar la eficiencia y productividad de la práctica acuícola. Si bien este esfuerzo se ha dirigido al desarrollo de hormonas y estimuladores de crecimiento para promover el crecimiento de diversas especies de importancia comercial, existe un interés creciente por estudiar la expresión de genes y sus elementos reguladores así como la producción de proteínas que permitan tener un entendimiento más claro sobre varios aspectos de su fisiología (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004).

Aún cuando en el banco de genes del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) se cuenta con varias secuencias de ADN complementario (ADNc) que codifican para la familia peptídica CHH/MIH/GIH, la actividad biológica de los péptidos traducidos no ha sido demostrada en la mayoría de los casos. A la fecha se han sintetizado de manera exitosa péptidos recombinantes de esta familia empleando sistemas de expresión tanto procariotas (Gu *et al.*, 2000 y 2001; Ohira *et al.*, 1999; Udomki *et al.*, 2000) como eucariotas (Sun, 1997; Treerattrakool *et al.*, 2002 y 2003; Ohira *et al.*, 2003; Udomki *et al.*, 2004; Yodmuang, 2004). A partir de sistemas de expresión eucariotas, en los que se utilizó *P. pastoris* como hospedero, se han producido las neurohormonas recombinantes Pem-CHH1, Pem-CHH2, Pem-CHH3 y Pem-MIH1 de *P. monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2002 y 2003; Udomki *et al.*, 2004; Yodmuang *et al.*, 2004). Para *Penaeus japonicus* sólo se ha producido la neurohormona Pej-SGP-III la cual presenta actividad hiperglucémica (Ohira *et al.*, 2003). En el caso particular de *Litopenaeus vannamei* sólo se ha clonado el gene *mih* en un vector de expresión eucariota sin embargo la actividad biológica de la hormona recombinante no fue evaluada (Sun, 1997). Por otro lado, Organes (2004) clonó los genes *chh* y *mih* en un vector de expresión procariota, sin embargo el nivel de síntesis de las proteínas fue muy bajo lo que dificultó su purificación para evaluar su actividad.

V.2. Objetivos

1. Producir las hormonas recombinantes CHH y MIH de *Litopenaeus vannamei* a partir de un vector de expresión eucariota.
2. Purificar mediante técnicas cromatográficas las hormonas recombinantes CHH y MIH.

V.3. Materiales y métodos

V.3.1. Vector de expresión pPICZ α A

Para la expresión de las neurohormonas CHH y MIH se utilizó el vector eucariota pPICZ α A (Invitrogen), el cual se caracteriza por presentar un promotor inducible por metanol, una péptido señal (α -factor) para la secreción de proteínas, un gen de resistencia a zeocina y secuencias específicas para inmunodetección (epítipo *c-myc*) y purificación (6xHis) (Fig. 5).

El vector pPICZ α A utilizado en este trabajo fue purificado a partir de una clona de *E. coli* TOP10F' donada por el Dr. José Luis Stephano Hornedo (Facultad de Ciencias, UABC). La clona fue sembrada en 3.0 ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido con una concentración baja de NaCl (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.5% (p/v), pH 7.5) y con 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de zeocina e incubada a 37 °C y 300 rpm por 12 hrs. Posteriormente se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina a baja escala (Sambrook y Russell, 2001). El ADN plasmídico fue

resuspendido en 50 μ l agua destilada estéril, cuantificado por espectrofotometría [μ g·ml⁻¹ ADN = Abs λ_{260} * factor de dilución * 50 μ g·ml⁻¹ ADN] y almacenado a -20 °C hasta su empleo posterior.

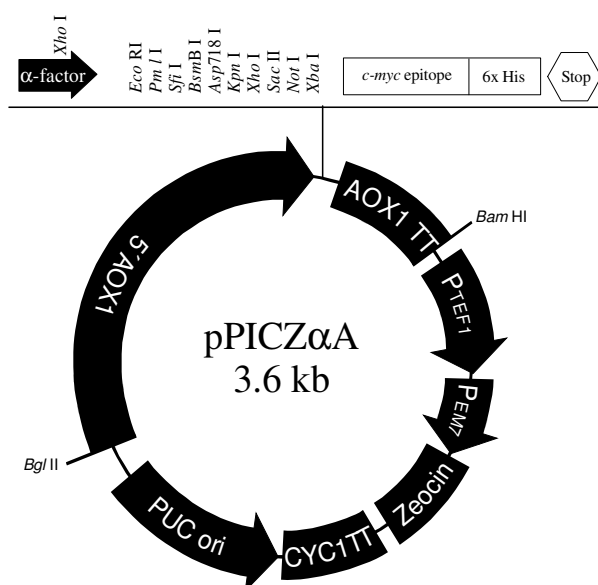


Figura 5. Mapa del vector de expresión pPICZ α A. La características distintivas de este vector incluyen el promotor inducible por metanol (5'AOX1), la señal de secreción (α -factor) y el sitio de clonación múltiple (Invitrogen).

V.3.2. Producción de proteínas recombinantes CHH y MIH

Los fragmentos que codifican para los péptidos maduros CHH y MIH utilizados como templado para la construcción del vector de expresión pPICZ α A (Invitrogen) en *P. pastoris* fueron amplificados a partir de los vectores de expresión procariota pPAB-CHH y pPAB-MIH, respectivamente (Organes, 2004).

Para la producción de los péptidos maduros de CHH y MIH se siguieron dos estrategias. La primera de ellas fue clonar los fragmentos de los péptidos maduros con sus respectivos codones de término, de esta manera se expresarían únicamente las proteínas de interés y no así los fragmentos posteriores al C-terminal de las neurohormonas y que codifican para el epítipo *c-myc* y la región 6xHis utilizados para la detección y purificación de las proteínas recombinantes. Esto tuvo como propósito obtener péptidos recombinantes lo más parecidos a los nativos y eliminar las secuencias adicionales del extremo C-terminal que pudieran afectar su actividad biológica. En lo subsiguiente las proteínas clonadas de esta manera serán nombradas CHH_n y MIH_n (Ver apartado V.3.2.1)

La otra estrategia fue clonar los fragmentos sin sus codones de término, por lo tanto los fragmentos que codifican para el epítipo *c-myc* y la región 6xHis serían expresados y facilitaría tanto su detección como su purificación. Sin embargo considerando que estos residuos de aminoácidos pudieran afectar su actividad, se decidió hacer una construcción que incluyera un sitio de hidrólisis para la enzima Enteroquinasa, el cual estaría ubicado en extremo C-terminal del péptido maduro, precediendo a los sitios de *c-myc* y 6xHis. De esta manera una vez que las proteínas recombinantes fueran purificadas los residuos de aminoácidos que incluyen los sitios *c-myc* y 6xHis del extremo C-terminal serían hidrolizados mediante la enzima Enteroquinasa. Esta estrategia también incluyó la síntesis de las proteínas heterólogas con el N-terminal nativo respectivo, así como la eliminación del gen que codifica para la enzima *Ste13* aminopeptidasa. En lo subsiguiente las proteínas clonadas de esta manera serán nombradas CHH_{His} y MIH_{His} (Ver apartado V.3.2.2).

V.3.2.1. Proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n.

V.3.2.1.1. Clonación de los fragmentos en el vector de expresión

Para la construcción de los vectores de expresión, los fragmentos que codifican para los péptidos CHH y MIH fueron amplificados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores que incluyen sitios de restricción para las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*. Los cebadores para CHH fueron: CHHEcoF y CHHXbaR, mientras que para MIH fueron: MIHEcoF y MIHXbaR (Tabla I). Como templado se utilizó ADN plasmídico obtenido de los vectores pBAD-CHH y pBAD-MIH (Organes, 2004). El volumen de cada reacción de PCR fue de 50 µl la cual contenía KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), 200 µM de cada nucleótido, MgCl₂ 3.0 mM, 0.4 µM de cada cebador, 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 500 ng ADN plasmídico. Las condiciones del PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 45 s a 51 °C, 45 s a 72 °C, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 10 min.

Tabla I. Secuencia de los cebadores utilizados

Nombre	Secuencia (5'→3')
CHHEcoF:	GGAATTCTCGCTCTTCGACCCT
CHHXbaR:	GCTCTAGACTATTTCCCGACCATCTG
MIHEcoF:	GGAATTCGACACCTTCGACCAC
MIHXbaR:	GCTCTAGATTAGGGATAGCGCAGAAA
CHHXhoF:	GGAATTCTCGCTCTTCGACCCT
CHHHisR	GCTCTAGACTATTTCCCGACCATCTG
MIHXhoF	GGAATTCGACACCTTCGACCAC
MIHHisR	GCTCTAGATTAGGGATAGCGCAGAAA
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
α-Factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC
3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR estos fueron purificados utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche) y cuantificados por espectrofotometría (SmartSpec Plus, BioRad). Posteriormente fueron digeridos con las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI* (Fermentas) en una doble digestión con buffer Tango 2x. La reacción de 60 µl contenía 1.5 µg de producto de PCR purificado, Tris-acetato 66 mM (pH 7.9 a 37 °C), acetato de magnesio 20 mM, acetato de potasio 132 mM, BSA 0.2 mg·ml⁻¹, 15 U de *EcoRI* y 30 U de *XbaI*. La reacción fue incubada durante 16 hrs a 37 °C y posteriormente desactivada a 65 °C por 20 min. En el caso de la digestión del vector pPICZαA se procedió de forma similar, excepto por la cantidad de ADN digerido. En este caso la reacción de 120 µl contenía 6.0 µg de vector pPICZαA, Tris-acetato 66 mM (pH 7.9 a 37 °C), acetato de

magnesio 20 mM, acetato de potasio 132 mM, BSA 0.2 mg·ml⁻¹, 30 U de *EcoRI* y 60 U de *XbaI*.

Posterior a la digestión, tanto los productos de PCR como el vector fueron purificados con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Mientras que los productos de PCR fueron purificados directamente de la mezcla de PCR, el vector pPICZ α A fue corrido en un gel de agarosa (0.8 %) y la banda correspondiente al vector digerido, recuperada y purificada. En ambos casos el ADN fue eluído con agua destilada. Los productos purificados fueron cuantificados por espectrofotometría y almacenados a -20 °C hasta su empleo posterior.

A partir de los fragmentos de PCR y el vector pPICZ α A digeridos y purificados se procedió a su ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Roche). El volumen de reacción fue de 15 μ l y contenía Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 5.0 mM, DTT 5.0 mM, ATP 1.0 mM, 1.0 U ligasa, 130 ng de vector y 60 ng de inserto. La reacción fue incubada a 16 °C por 18 hrs y posteriormente desactivada a 60 °C por 20 min. Los vectores resultantes fueron nombrados pPICZ α A-CHH_n y pPICZ α A-MIH_n.

V.3.2.1.2. Transformación en *E. coli*

Células competentes de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) fueron transformadas por electroporación con los productos de la ligación pPICZ α A-CHH_n y pPICZ α A-MIH_n. Se mezclaron 50 μ l de células electrocompetentes y 7.0 μ l de la reacción de ligación en una celda (0.1 cm) previamente enfriada y se electroporó bajo las siguientes condiciones: 2.0

kv, 25 μ F, 200 Ω , 5 ms. Las células transformadas fueron recuperadas en 3 ml de medio de cultivo SOC (triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 8.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM) e incubadas a 37 °C, 300 rpm por 1 hr. De la mezcla anterior se tomaron 2 μ l, se diluyó en 200 μ l de medio de cultivo SOC y se sembraron 1, 10 y 100 μ l en placas de medio de cultivo LB con una concentración baja de NaCl (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0.5% (p/v), agar 1.5% (p/v), pH 7.5) y 25 μ g·ml⁻¹ de zeocina.

Las clonas resistentes fueron resembradas bajo las mismas condiciones, de estas se eligieron 10 para su evaluación mediante PCR de colonia e identificar aquellas que presentaban el fragmento de interés. Para la reacción de PCR se emplearon los cebadores α -Factor y 3'AOX1 de Invitrogen (Tabla I). El volumen de cada reacción de PCR fue de 50 μ l y contenía KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), 200 μ M de cada nucleótido, MgCl₂ 3.0 mM, 0.4 μ M de cada cebador, 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y una porción de la colonia como templado. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 7 min. De las clonas que presentaron el fragmento del tamaño esperado, se eligieron dos de cada construcción para su secuenciación (SeqxCel, San Diego, CA, USA). Una vez que se corroboró la correcta clonación de los fragmentos que codifican para los péptidos de interés, las clonas con los respectivos vectores fueron cultivadas en 3.0 ml de medio de cultivo LB con un bajo contenido de NaCl y 25 μ g·ml⁻¹ de zeocina (37 °C, 300 rpm, 12 hrs) para la obtención del

ADN plasmídico. El ADN plasmídico fue purificado mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001), resuspendido en agua destilada estéril y cuantificado por espectrofotometría. Finalmente fue almacenado a -20 °C para su empleo posterior.

V.3.2.1.3. Transformación en *P. pastoris* (X-33)

Como vehículo de CHH_n y MIH_n se utilizó *P. pastoris* (X-33), una cepa silvestre que presenta el promotor AOX1 el cual le permite un crecimiento rápido cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono. Para su transformación se requirió de 10 µg de vector digerido (linearizado) y purificado. En el caso del vector pPICZαA-CHH_n se utilizó la endonucleasa *SacI* (Fermentas) mientras que para pPICZαA-MIH_n fue *BstXI* (BioLabs).

La reacción de digestión para pPICZαA-CHH_n fue de 300 µl la cual contenía 15 µg de plásmido purificado, Bis-Tris-Propano-HCl 10 mM (pH 6.5), MgCl₂ 10 mM, BSA 0.1 mg·ml⁻¹ y 150 U de *SacI*. La reacción se incubó a 37 °C por 12 hrs. En el caso de pPICZαA-MIH_n, la reacción de 300 µl contenía 15 µg de plásmido purificado, NaCl 100 mM, Tris- HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y 150 U de *BstXI*. La incubación se llevó a cabo a 55 °C por 12 horas. Ambas reacciones fueron desactivadas a 65 °C por 20 min.

Una vez que se concluyó la digestión de los respectivos vectores, estos fueron purificados con fenol-cloroformo, precipitados utilizando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100% (v/v), lavados con etanol 80% (v/v) y resuspendidos en 12

μl de agua destilada. Los plásmidos digeridos y purificados fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su empleo posterior.

La transformación en *P. pastoris* (X-33) se llevó a cabo mediante electroporación, para lo cual se prepararon células electrocompetentes de acuerdo a lo descrito en el manual EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Para la electroporación, $80\text{ }\mu\text{l}$ de células electrocompetentes y $10\text{ }\mu\text{g}$ de vector linearizado fueron transferidos a una celda de electroporación (0.2 cm) previamente enfriada en hielo. La celda se incubó en hielo por 5 min adicionales y se procedió con la electroporación (2.0 kv , $25\text{ }\mu\text{F}$, $200\text{ }\Omega$, 5 ms). Una vez que las células fueron recuperadas con 1 ml de sorbitol (1M), estas fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin agitación por 1 hr . Posterior a ese tiempo se adicionó 1 ml de medio de cultivo YPD (extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)) y se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 200 rpm por 2 hrs más. Finalmente, se tomaron alícuotas de 25 , 50 y $100\text{ }\mu\text{l}$ y se sembraron en placas con medio de cultivo YPDS (extracto de levadura 1% (p/v), 2% peptona (p/v), 2% glucosa (p/v), sorbitol 1 M , agar 2% (p/v)) con $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de zeocina las cuales fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 4 - 10 días.

Las clonas resistentes fueron resembradas en placas con medio de cultivos YPD (extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v) agar 2% (p/v)) con $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de zeocina e incubadas en las mismas condiciones. Una vez que crecieron se verificó la presencia del inserto mediante PCR de colonia (Linder *et al.*, 1996). Previo a la reacción de PCR, una porción de colonia fue transferida a un tubo con $10\text{ }\mu\text{l}$ de agua destilada, se adicionó $5\text{ }\mu\text{l}$ de una solución de $5\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de Liticasa (Sigma), se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min

y finalmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto III.3.2.1.2, excepto por el templado que en esta ocasión fue de $5\text{ }\mu\text{l}$ de células lisadas con Liticasa. De las clonas que presentaron el fragmento del tamaño esperado, se eligieron dos de cada construcción para su secuenciación (SeqxCel, San Diego, CA, USA). Una vez que se corroboró la correcta clonación de los fragmentos que codifican para los péptidos de interés se procedió con el ensayo de síntesis.

De manera adicional y siguiendo el procedimiento descrito previamente, se llevó a cabo la transformación de *P. pastoris* (X-33) con el vector pPICZ α A sin inserto, esto con el propósito de utilizarlo como control en el ensayo de síntesis.

V.3.2.1.4. Síntesis de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

De las clonas en las que se verificó la correcta inserción de los fragmentos de interés se eligieron una de cada construcción y se cultivaron en 3 ml medio de cultivo YPD con $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de zeocina por 24 hrs ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 rpm). Posteriormente el cultivo fue transferido a 100 ml de medio de cultivo BMGY (extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), YNB 0.67% (p/v), D-biotina $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, glicerol 1% (v/v)) e incubadas en las mismas condiciones. Cuando el cultivo alcanzó un densidad de $\text{DO}_{600} = 5$ este fue centrifugado ($2000 \times g$, 5 min) y las células resuspendidas en 20 ml de medio de cultivo BMMY (extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), YNB 0.67% (p/v), D-biotina $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0) a una densidad óptica de $\text{DO}_{600} = 1$ para su posterior inducción con varias concentraciones de metanol (0,

1, 2 y 4% (v/v)) con el propósito de determinar las condiciones óptimas de síntesis de CHH_n y MIH_n. Los cultivos fueron incubados a 30 °C y 300 rpm durante 5 días. Durante este periodo diariamente se adicionó metanol para mantener su concentración inicial (1, 2 y 4% (v/v)) y se tomaron muestras del cultivo (1.0 ml). Las muestras colectadas fueron centrifugadas (2000 x g, 5 min) y el sobrenadante recuperado y almacenado a -20 °C para su análisis posterior.

V.3.2.1.4.1. Análisis de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

V.3.2.1.4.1.1. Preparación de la muestras

Las muestras obtenidas en el ensayo de expresión fueron concentradas mediante la precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Para ello, a cada muestra se adicionó 150 µl de TCA 100% (p/v), se incubó por 12 hrs a 4 °C y se centrifugó (16000 x g, 20 min, 4 °C). El sobrenadante fue decantado, el precipitado secado a temperatura ambiente y resuspendido en 20 µl de buffer de carga 2x (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.004 % (p/v)). Previo a su electroforesis las muestras fueron incubadas por 10 min a 100 °C.

V.3.2.1.4.1.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE)

La síntesis de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n fue analizada en geles de poliacrilamida (16.5%) de acuerdo a lo descrito por Schägger y von Jagow (1987) para proteínas de tamaño molecular pequeño (1-100 kDa). La electroforesis se realizó con un

amperaje constante de 50 mA durante 4-5 hrs, que es el tiempo aproximado en que el frente del azul de bromofenol alcanzó la base.

Al finalizar la electroforesis las proteínas se tiñeron con azul coomassie R-250, para lo cual los geles se incubaron en la solución de tinción (azul coomassie R-250 0.1 % (p/v), etanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) por 5 horas y lavadas con la solución para desteñir (etanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) hasta que el gel quedara lo suficientemente transparente y las bandas presentaran suficiente contraste. Finalmente los geles fueron incubados por 1 hr con agitación moderada en una solución de etanol 25% (v/v) y glicerol 10% (v/v) y colocados entre papel celofán para su documentación y conservación.

V.3.2.1.5. Escalamiento del cultivo

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de inducción para la expresión de las proteínas recombinantes se procedió con el escalamiento del cultivo. El procedimiento y las condiciones de expresión son los que se describen en el apartado V.3.2.1.4, excepto que en esta ocasión la inducción se realizó en 100 ml de medio de cultivo BMMY. Una vez que se concluyó la inducción, el cultivo fue centrifugado (2000 x g, 5 min) y el sobrenadante recuperado y precipitado con sulfato de amonio 55% (p/v). El precipitado fue dializado con buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4), centrifugado (16000 x g, 15 min, 4 °C) y liofilizado. El liofilizado fue resuspendido en 2 ml de PBS y almacenado a -70 °C hasta su purificación posterior.

V.3.2.1.6. Purificación de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

V.3.3.1.6.1. Separación por cromatografía de exclusión molecular

Para la cromatografía de exclusión molecular se utilizó una columna Econo-Column de 50 x 1.5 cm (BioRad) y una matriz Bio-Gel[®] P-30 (BioRad) estabilizada con buffer PBS. La columna fue conectada a una bomba peristáltica (Modelo 7518-00 Cole Parmer Instrument Co.) y a un sistema colector de fracciones (2112 Redirac Fraction Collector, LKB Bromma). La muestra con las proteínas (2 ml) fue colocada en la columna y eluída con un flujo de 0.5 ml·min⁻¹. Se colectaron alícuotas de 2 ml aproximadamente las cuales fueron analizadas en un espectrofotómetro Smart Spec 3000 (BioRad) a 280 nm. Los valores de absorbancia de cada alícuota fueron graficados. A partir de los cromatogramas obtenidos se mezclaron alícuotas formando nuevas fracciones, las cuales fueron liofilizadas, resuspendidas en PBS y analizadas en geles de poliacrilamida 16.5% (Tricina-SDS-PAGE) teñidos con nitrato de plata (Goldberg y Warner, 1997). Una vez que la proteína de interés fue ubicada en unas de las fracciones, estas fueron repurificadas por cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC).

V.3.3.1.6.2. Separación por cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC)

Una vez que se determinó en cual de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular se encontraba la proteína de interés, se procedió con su repurificación por RP-HPLC. El análisis de las fracciones se realizó con un equipo marca Agilent Technologies modelo 10100 el cual consta de un sistema cuaternario para solventes, inyector manual y un detector espectrofotométrico con cinco canales. Se empleó una

columna C18 de fase reversa Grace Vydac 218TP54 (4.6 x 2500 mm, 5 μ m, 300Å) y una precolumna Zorbax-Agilent C18 (4.6 x 12.5 mm, 5 μ m, 300Å). Los solventes utilizados fueron: A = TFA 0.12% (v/v) en agua, B = TFA 0.1% (v/v) en acetonitrilo. La separación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: (min, % B) 0, 0; 5, 0; 65, 60; 67, 0 con 5 min de equilibrio. Para la detección se empleó una longitud de onda de 280 nm. El volumen de inyección fue de 200 μ l. Se colectaron fracciones cada 10 min las cuales fueron congeladas inmediatamente a -70 °C, liofilizadas y resuspendidas en agua para su posterior análisis electroforético en geles de poliacrilamida 16.5% (Tricina-SDS-PAGE) y teñidos con nitrato de plata.

III.2.1.7. Secuenciación del amino terminal

Las fracciones con la proteína recombinante purificada por RP-HPLC fueron enviadas para la secuenciación del amino terminal al Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM en Juriquilla, Querétaro, México, con el Dr. Manuel Aguilar. Previo a su secuenciación las fracciones fueron nuevamente purificadas por RP-HPLC, para lo cual se empleó una columna C18 de fase reversa para proteínas y péptidos marca Vydac (218TP54, 4.6 x 2500 mm, 5 μ m, 300Å). Los solventes utilizados fueron: A = TFA 0.11% (v/v) en agua, B = TFA 0.085% (v/v) en acetonitrilo 90% (v/v). La separación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: (min, % B) 0, 0; 5, 0; 65, 65; 70, 67; 72, 0; con 18 min de equilibrio. Para la detección se empleó una longitud de onda de 206 nm. Finalmente las fracciones fueron analizadas mediante la degradación de Edman (Procise 491 Protein Sequencing System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para determinar la secuencia de su N-terminal.

V.3.2.2. Proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}

V.3.2.2.1. Clonación de los fragmentos en el vector de expresión

Para la construcción de los vectores de expresión sin codón de término, los fragmentos que codifican para péptidos CHH_{His} y MIH_{His} fueron amplificados por PCR con cebadores que incluían sitios de restricción para las endonucleasas *XhoI* y *XbaI*. Los cebadores utilizados para CHH fueron: CHHXhoF y CHHHisR y para MIH: MIHXhoF y MIHHisR (Tabla I). La concentración de la reacción de PCR así como el templado utilizado son iguales a lo descrito en el punto V.3.2.1.1. Las condiciones del PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 72 °C, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 10 min.

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR estos fueron purificados utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche) y cuantificados por espectrofotometría. Posteriormente fueron digeridos con *XhoI* y *XbaI* (Fermentas) en una doble digestión con buffer Tango 2x. La reacción de 60 µl contenía 1.5 µg de producto de PCR limpio, Tris-acetato 66 mM (pH 7.9 a 37 °C), acetato de magnesio 20 mM, acetato de potasio 132 mM, BSA 0.2 mg·ml⁻¹, 15 U de *XhoI* y 30 U de *XbaI*. La reacción fue incubada durante 17 hrs a 37 °C y posteriormente desactivada a 65 °C por 20 min. En el caso de la digestión del vector pPICZαA se procedió de forma similar, excepto por la cantidad de ADN digerida. La reacción de 120 µl contenía 6.0 µg de vector pPICZαA, Tris-acetato 66 mM (pH 7.9 a 37 °C), acetato de magnesio 20 mM, acetato de potasio 132 mM, BSA 0.2 mg·ml⁻¹, 30 U de

*Xho*I y 60 U de *Xba*I. Posterior a la digestión, tanto los productos de PCR como el vector fueron purificados como se describe en el apartado V.3.2.1.1.

A partir de los fragmentos de PCR y el vector pPICZ α A digeridos y purificados se procedió con su ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Roche) de acuerdo a lo descrito en el apartado V.3.2.1.1. Los vectores resultantes fueron nombrados pPICZ α A-CHH_{His} y pPICZ α A-MIH_{His}.

V.3.2.2.2. Transformación en *E. coli*

La transformación de *E. coli* con los productos de la ligación (pPICZ α A-CHH_{His} y pPICZ α A-MIH_{His}) así como la extracción de DNA plasmídico se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado V.3.2.1.2. La única diferencia estriba en la reacción de PCR para evaluar la correcta clonación de los fragmentos ya que en esta ocasión se utilizaron los cebadores 5' AOX1 y 3' AOX1 de Invitrogen (Tabla I).

V.3.2.2.3. Transformación en *P. pastoris* (KM71)

Para la transformación de *P. pastoris* (KM71) se procedió como se describe en el apartado V.3.2.1.3. De igual manera se realizó la transformación con el vector pPICZ α A sin inserto para su empleo como control en el ensayo de síntesis.

V.3.2.2.4. Síntesis de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}

De las clonas en las que se verificó la correcta clonación de los fragmentos de interés se eligió una de cada construcción y se cultivaron en 3 ml medio de cultivo YPD con 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de zeocina por 24 hrs (30 °C, 300 rpm). Posteriormente el cultivo fue transferido a 100 ml de medio de cultivo BMGY e incubadas en las mismas condiciones. Cuando el cultivo alcanzó un densidad de $\text{DO}_{600} = 5$ este fue centrifugado (2000 x g, 5 min) y para su inducción las células fueron resuspendidas en 20 ml de medio de cultivo BMMY con varias concentraciones de metanol (0, 1, 2 y 4% (v/v)), con el propósito de determinar las condiciones óptimas de síntesis de CHH_{His} y MIH_{His}. Los cultivos fueron incubados a 30 °C y 300 rpm durante 5 días, durante este periodo diariamente se adicionó metanol para mantener la inducción y se tomaron muestras del cultivo (1.0 ml). Las muestras colectadas fueron centrifugadas (2000 x g, 5 min) y el sobrenadante recuperado y almacenado a -20 °C para su análisis posterior.

V.3.2.2.4.1. Análisis de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}

V.3.2.2.4.1.1. Preparación de la muestras

Las muestras en el ensayo de expresión fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en el apartado V.3.2.1.4.1.1.

V.3.2.2.4.1.2. Electroforesis desnaturalizante en tricina (Tricina-SDS-PAGE) de proteínas recombinantes.

La expresión de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} fue analizada en geles de poliacrilamida (16.5%) tal y como se describe en el apartado V.3.2.1.4.1.2.

V.3.2.2.4.1.3. Inmunodetección de proteínas recombinantes (Western blot)

La presencia de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} fue confirmada por el método de Western blot. La transferencia de proteínas se realizó mediante la técnica de transferencia semiseca (Harlow y Lane, 1988) en la que se utilizó una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 μm (BioRad), buffer Towbin 1x (250 mM Tris Base, 192 mM Glicina, 20% metanol (v/v), pH 8.3) y un sistema de transferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP). La transferencia se llevó a cabo por 1 hr a 200 mA constante manteniendo el voltaje por debajo de los 20 V.

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa, se procedió con su inmunodetección empleando el anticuerpo anti-*myc*-HRP (Invitrogen). Para ello, la membrana fue incubada por 3 hrs a temperatura ambiente con agitación moderada en PBST (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, Tween-20 0.05% (v/v), pH 7.4) con leche descremada 5% (p/v) (Svelty), seguida de 2 hrs de incubación a temperatura ambiente y agitación moderada en PBST con leche descremada 1% (p/v) y el anticuerpo anti-*myc*-HRP con una dilución 1:3500. Posteriormente la membrana fue lavada cuatro veces por 15 min con agitación moderada en PBST. Finalmente las proteínas recombinantes fueron detectadas por quimioluminiscencia con el reactivo Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersaham Biosciences) en una placa fotográfica (Kodak) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

V.3.2.2.5 Escalamiento del cultivo

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de inducción para la síntesis de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} se procedió con el escalamiento del cultivo. El cual consistió en duplicar el volumen de cultivo, es decir, 200 ml biomasa cultivada en medio de cultivo BMGY fue resuspendida e inducida en 40 ml de medio de cultivo BMMY. Una vez que se concluyó la inducción, el cultivo fue centrifugado (2000 x g, 5 min) y el sobrenadante recuperado y almacenado a -70 °C hasta su purificación posterior.

V.3.2.2.6 Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}

Las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} fueron purificadas por cromatografía de afinidad en condiciones nativas de acuerdo a lo descrito en el protocolo de ProBond Purification System (Invitrogen). Previo a la purificación, el pH de la muestra se ajustó a pH 8.0 y se clarificó mediante centrifugación (3000 x g, 10 min, 4 °C). El sobrenadante se cargó a una columna de plástico de 10 ml de capacidad, la cual contenía 1 ml de resina ProBond Nickel-Chelating previamente equilibrada con buffer de unión (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). Una vez que el total de muestra pasó a través de la resina, esta fue lavada seis veces con 8 ml de buffer de lavado (Imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). Posteriormente la proteína fue eluída en buffer de elución (Imidazol 250 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), para lo cual se utilizaron 500 µl de buffer, se incubó por 15 minutos y se eluyó, este proceso se repitió tres veces. Las fracciones obtenidas fueron analizadas en un gel desnaturizante de tricina (Tricina-SDS-PAGE). Una vez que se comprobó la presencia de la proteína esperada en las fracciones analizadas,

estas fueron concentradas utilizando concentradores (Orbital Biosciences) que retienen proteínas mayores a 10 kDa, y resuspendida en 300 µl de buffer PBS. Se determinó su concentración mediante el método del ácido bicinónico utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce). Finalmente la proteína fue almacenada a -20 °C.

V.3.2.2.7 Secuenciación del amino terminal

La secuenciación del N-terminal se llevó a cabo utilizando la proteína recombinante purificada, la cual fue corrida en un gel desnaturante de tricina (Tricina-SDS-PAGE) y transferida mediante la técnica semiseca a una membrana de PVDF BioTrace de 0.45 µm (Pall) como se describió anteriormente (V.3.2.2.4.1.3). La membrana fue teñida con azul coomassie R-250 (azul coomassie R-250 0.025% (p/v), metanol 40% (v/v)), desteñida (metanol 50% (v/v)) y enviada para su secuenciación al Instituto de Neurobiología (Juriquilla, Qro., México), la cual se realizó mediante la degradación de Edman en un secuenciador Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems).

V.3.2.2.8 Hidrólisis del extremo C-terminal

La proteína recombinante MIH_{His} purificada fue incubada durante 16 hrs utilizando 0.1, 0.5 y 1.0 U de Enteroquinasa así como diferentes temperaturas (4°, 24° y 37 °C). Los resultados de este ensayo fueron evaluados en geles desnaturantes de tricina (Tricina-SDS-PAGE) (V.3.2.1.4.1.2).

V.3.2.2.9 Análisis de expresión de *chh* y *mih* mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La expresión de los genes *chh* y *mih* a nivel transcripcional fue evaluada a partir de las clonas empleadas en la producción a gran escala de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}, respectivamente. Para ello, se procedió con la inducción de las clonas como se describe en el punto V.3.2.2.4 utilizando metanol 4% (v/v) durante 2 días. Se tomaron muestras del cultivo diariamente (1 ml) las cuales fueron centrifugadas (2000 x g, 5 min), se recuperó el botón celular y se almacenó a -70 °C hasta su análisis posterior. Como control negativo se utilizó la cepa KM71 sin transformar sometida a las condiciones de inducción con metanol descritas previamente.

V.3.2.2.9.1 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la extracción del ácido ribonucleico (ARN), las células de la inducción fueron resuspendidas en 1 ml del reactivo Tri Reagen (Sigma) y homogenizadas mecánicamente mediante un homogenizador Mini-Beadbeater-1 (BioSpec Products) y esferas de zirconia de 0.5 mm de diámetro (~300 μ l). Las condiciones empleadas fueron cuatro repeticiones de 20s a 50 x 100 rpm, incubando en hielo entre cada repetición. Finalmente la mezcla fue recuperada y se procedió con la extracción del ARN como describe el fabricante. El ARN fue resuspendido en 20 μ l de agua destilada libre de ARNasas, cuantificado por espectrofotometría [μ g·ml⁻¹ ARN = Abs λ_{260} * factor de dilución * 40 μ g·ml⁻¹ ARN] y almacenado a -70 °C.

Con el propósito de eliminar ADN genómico que pudiera estar presente en la muestra de ARN total, este fue tratado con ADNasa (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade Invitrogen). Para cada muestra se procesó 1 µg de ARN de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Una vez concluido el tratamiento se procedió inmediatamente con la síntesis de ADNc.

El total de ARN tratado con ADNasa fue utilizado para la síntesis de ADNc mediante el oligonucleótido dT₂₀ y el kit First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript III for RT-PCR, ambos de Invitrogen. Se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante incubando la reacción a 50 °C por 60 min y desactivando la enzima 70 °C por 15 min. Una vez concluida la síntesis las muestras fueron almacenadas a -20 °C

V.3.2.2.9.2 PCR a partir de ADNc

Una vez obtenido el ADNc se procedió con la amplificación de los genes *chh* y *mih* mediante PCR con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. Las condiciones y la concentración de la reacción de PCR son las descritas en el punto V.3.2.1.2, excepto por la cantidad de templado que en este caso fue 1 µl de la reacción de síntesis de ADNc. Finalmente los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

V.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.4.1 Proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

V.4.1.1 Clonación de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

Los fragmentos que codifican para los péptidos maduros CHH_n y MIH_n fueron amplificados a partir de los vectores de expresión procariota pBAD-CHH y pBAD-MIH, respectivamente, utilizando cebadores que incluyeron sitios de restricción para las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*. El tamaño del fragmento esperado para CHH_n fue de 237 pb de los cuales 222 pb corresponden al péptido maduro, 3 pb al codón de término y 12 pb a los sitios de restricción adicionales en los extremos (Fig. 6). Para el caso de MIH_n, el tamaño del fragmento esperado fue de 234 pb, de los cuales 219 pb corresponden al péptido maduro y el resto (15 pb) al codón de término y a los sitios de restricción (Fig. 6).

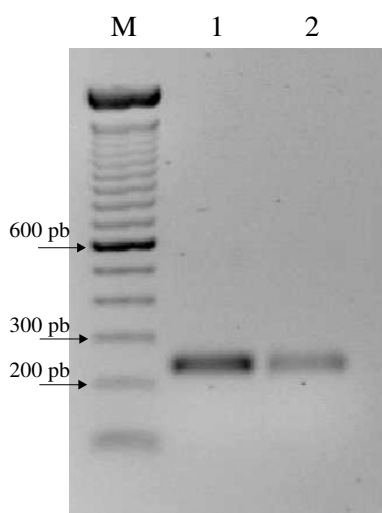


Figura 6. Amplificación de los fragmentos CHH_n y MIH_n utilizando como templado los vectores pBAD-CHH y pBAD-MIH, respectivamente M: Marcador TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), Carril 1: CHH_n, Carril 2: MIH_n.

Una vez que los fragmentos CHH_n y MIH_n fueron clonados río abajo del promotor AOX1, entre los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* del vectores pPICZαA, se obtuvieron los vectores pPICZαA-CHH_n y pPICZαA-MIH_n, con los cuales se transformaron células de *E. coli* TOP10F'. La correcta inserción de los fragmentos en el vector fue verificada por secuenciación en ambas direcciones de las clonas transformadas obtenidas. Los resultados a este respecto indican que no se produjo ninguna mutación en las secuencias y que los fragmentos estaban en fase con el marco de lectura de la señal de secreción de proteínas (α-factor). La secuencia nucleotídica del fragmento que codifica para la proteína CHH_n obtenida de la secuenciación así como la secuencia de aminoácidos deducida se presentan en la Figura 7. A partir de esta se observa que el péptido CHH_n que originalmente era de 74 aminoácidos incluía 2 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (EF) que corresponden al sitio de restricción de *EcoRI*. El peso teórico esperado para este péptido de 76 aminoácidos fue de 9.1 kDa.

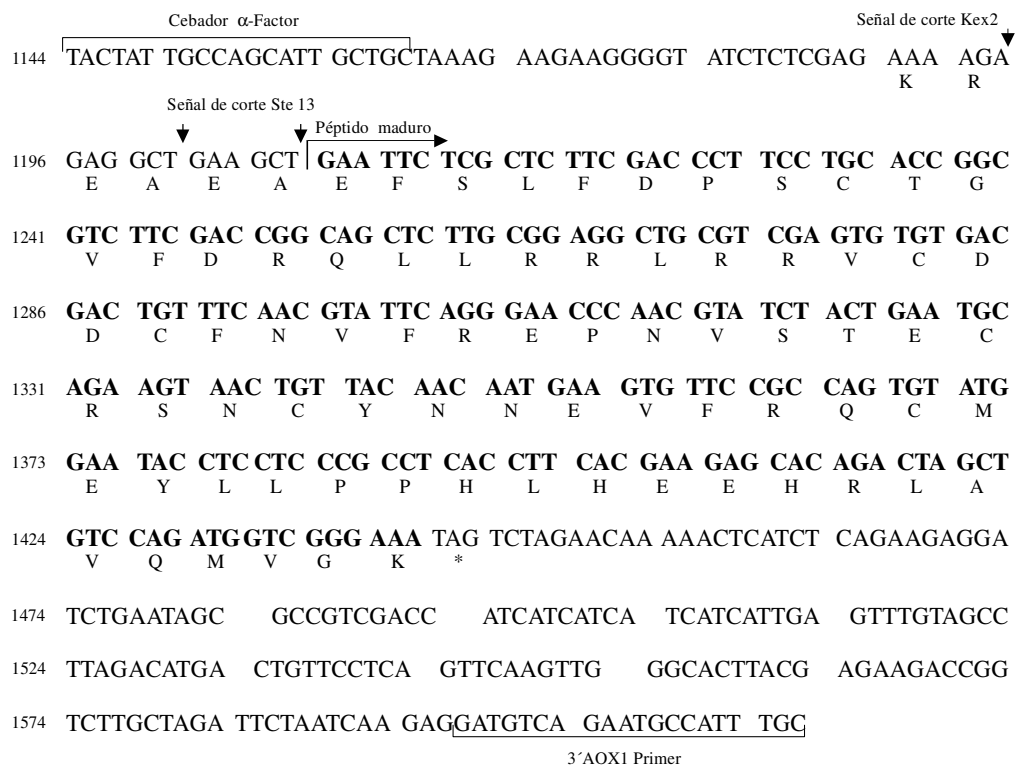


Figura 7. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de CHH_n. El asterisco indica el codón de terminación.

La secuencia de nucleótidos obtenida del análisis de secuenciación para MIH_n se presenta en la Figura 8. Como en el caso anterior se aprecia que el péptido producido era de 75 aminoácidos ya que presentó 2 aminoácidos extras (EA) correspondientes al sitio de restricción *EcoRI*. El peso teórico esperado para este péptido fue de 9.1 kDa.

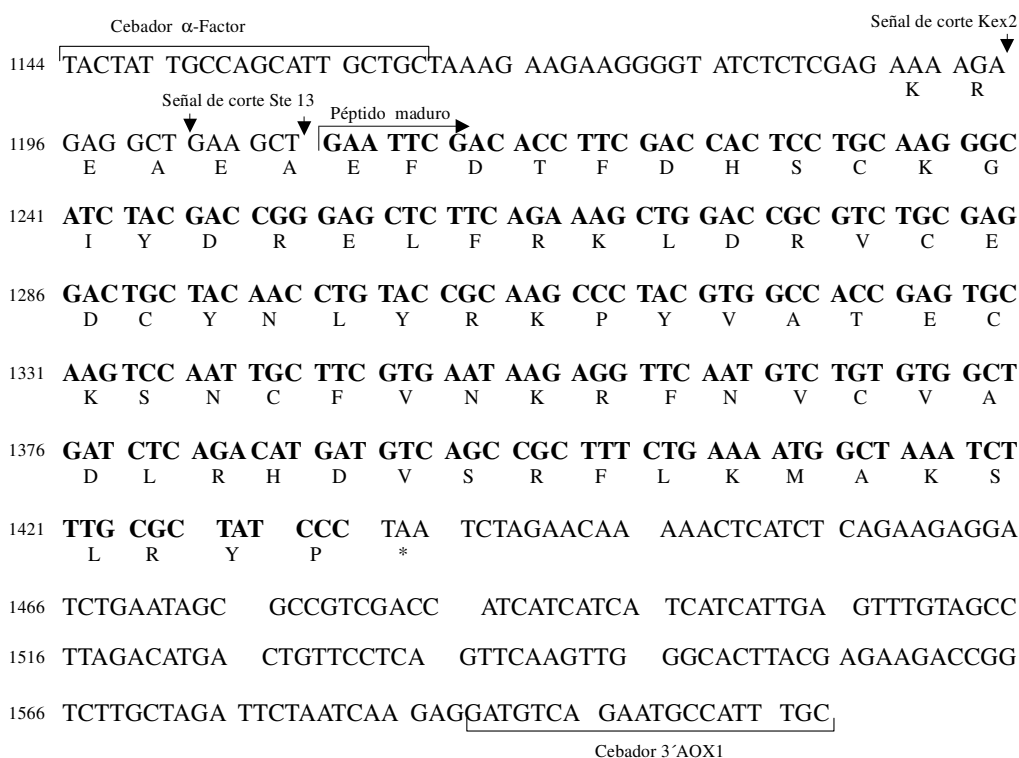


Figura 8. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de MIH_n . El asterisco indica el codón de terminación.

Una vez verificada la correcta inserción de los fragmentos en los vectores $pPICZ\alpha A-CHH_n$ y $pPICZ\alpha A-MIH_n$ se procedió con las transformaciones en la cepa de *P. pastoris* X-33. De forma adicional se llevó a cabo la transformación con el vector sin inserto. El número de clonas transformadas obtenidas fue de aproximadamente 60 en todos los casos, de las cuales se eligieron 20 al azar para su resiembra en placas con medio YPD con zeocina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). De las clonas resembradas se eligieron 10 de cada construcción para verificar la integración de los respectivos fragmentos en el genoma de *P. pastoris*. El análisis de los fragmentos amplificados por PCR en geles de agarosa (1.6 %) evidenció que al menos

nueve de las clonas transformadas con el vector pPICZ α A-CHH_n linearizado lo habían integrados a su genoma. En el caso de pPICZ α A-MIH_n, las diez clonas evaluadas lo integraron en su genoma. Como se observa en la Figura 9, los fragmentos obtenidos para CHH_n y MIH_n corresponden con los tamaños esperados utilizando los cebadores α -Factor y 3' AOX1, 468 pb para CHH_n y 465 pb para MIH_n.

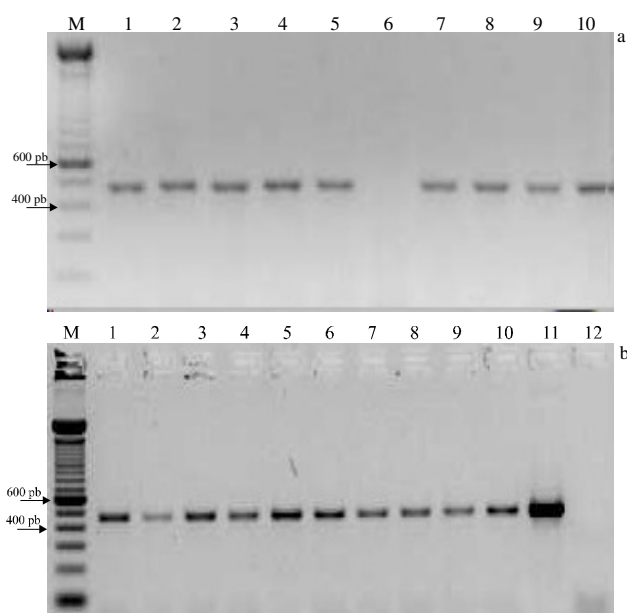


Figura 9. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR de las clonas transformadas de *P. pastoris* (X-33) con el vector pPICZ α A-CHH_n y pPICZ α A-MIH_n. M: Marcador TrackIt 100 pb DNA ladder (Invitrogen). a) Clonas transformadas con el vector pPICZ α A-CHH_n, carriles 1-10 corresponden a las clonas analizadas. b) Clonas transformadas con el vector pPICZ α A-MIH_n, carriles 1-10 corresponde a las clonas analizadas; carril 11, vector pPICZ α A-MIH_n (control positivo); carril 12, *P. pastoris* (X-33) (control negativo).

De las clonas transformadas con el vector sin inserto, sólo se evaluaron seis por PCR y todas presentaron el fragmentos esperado de 299 pb (Fig. 10), confirmando así la integración del vector linearizado en el genoma de *P. pastoris*.

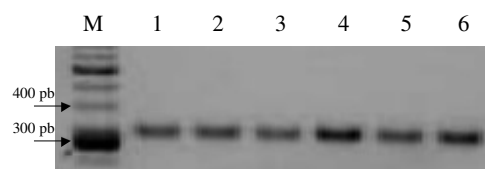


Figura 10. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR de las clonas transformadas de *P. pastoris* (X-33) con el vector pPICZ α A sin inserto. M: Marcador TrackIt 100 pb DNA ladder (Invitrogen), carriles 1-6 corresponden a las clonas analizadas.

De las clonas transformadas de *P. pastoris* (X-33) en las que se verificó por PCR la integración de los fragmentos de interés en su genoma, se eligió una de cada construcción para su secuenciación. El análisis de las secuencias nuevamente mostró que no había mutaciones y que los fragmentos que codifican para las proteínas CHH_n y MIH_n estaban en fase con la señal de secreción de proteínas (α -factor). Estas mismas clonas fueron las que se eligieron para el análisis de síntesis de proteínas.

V.4.1.2 Análisis de la síntesis de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

Las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n sintetizadas y secretadas al medio de cultivo fueron analizadas en geles desnaturalizantes de tricina (Tricina-SDS-PAGE). Una banda evidente correspondiente al tamaño esperado de 9.1 kDa para ambas proteínas heterólogas fue observada en los geles (Figs. 11 y 12). Esta banda no fue visible en los cultivos donde no se adicionó metanol ni en aquellos cultivos de la clona transformada con pPICZ α A pero sin inserto (Fig. 13). De acuerdo con estos resultados las condiciones óptimas para la

síntesis de las proteínas recombinantes fue de 2% de metanol por 2 días, ya que no se observaron diferencias importantes al utilizar una mayor concentración de metanol o un mayor tiempo de inducción. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Sun (1997) donde las condiciones óptimas para la producción de la proteína MIH-like fueron con 0.5% de metanol al día 5 de inducción. En nuestro caso al utilizar 1.0% de metanol la banda esperada se evidenció en el día 1 de inducción tanto para CHH_n como MIH_n, manteniéndose hasta el día 3 y 4 respectivamente (Figs. 11a y 12a). Cabe mencionar que aun cuando se utilizaron cepas diferentes ambas presentaron el fenotipo Mut⁺. Por otro lado, las condiciones óptimas para la síntesis de varias neurohormonas recombinantes de *P. monodon* en *P. pastoris* (KM71) incluyen concentraciones de metanol de 3% y 4% durante 2 y 3 días (Treeratrakool *et al.*, 2002; 2003; Udomkit *et al.*, 2004; Yodmuang *et al.*, 2004). Estas condiciones fueron más acordes a las encontradas en este trabajo aún cuando se utilizaron cepas con diferentes fenotipos, ya que KM71 es Mut⁻ y X-33 es Mut⁺.

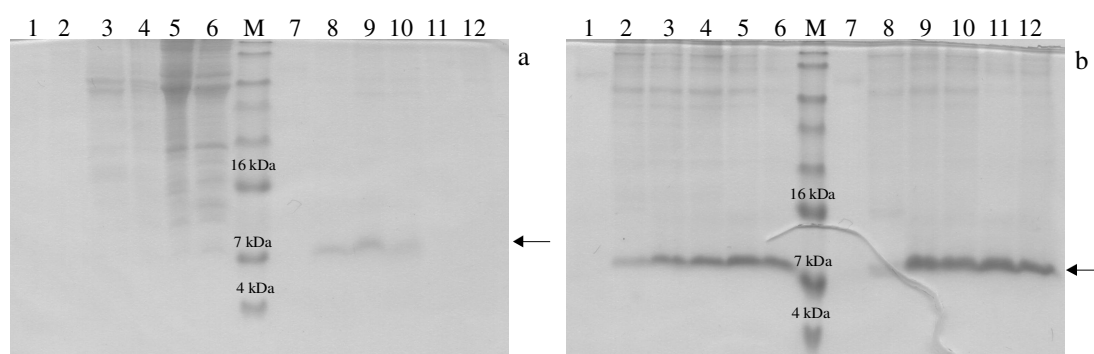


Figura 11. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de síntesis de la proteína recombinante CHH_n en *P. pastoris* (X-33) con diferentes concentraciones de metanol durante 0-5 días. M, marcador SeeBlue Pre-stained Standard (Invitrogen). a) Carriles 1-6 corresponden a la inducción 0% metanol; carriles 7-12 corresponden a la inducción 1% metanol. b) Carriles 1-6 corresponden a la inducción 2% metanol; carriles 7-12 corresponden a la inducción 4% metanol.

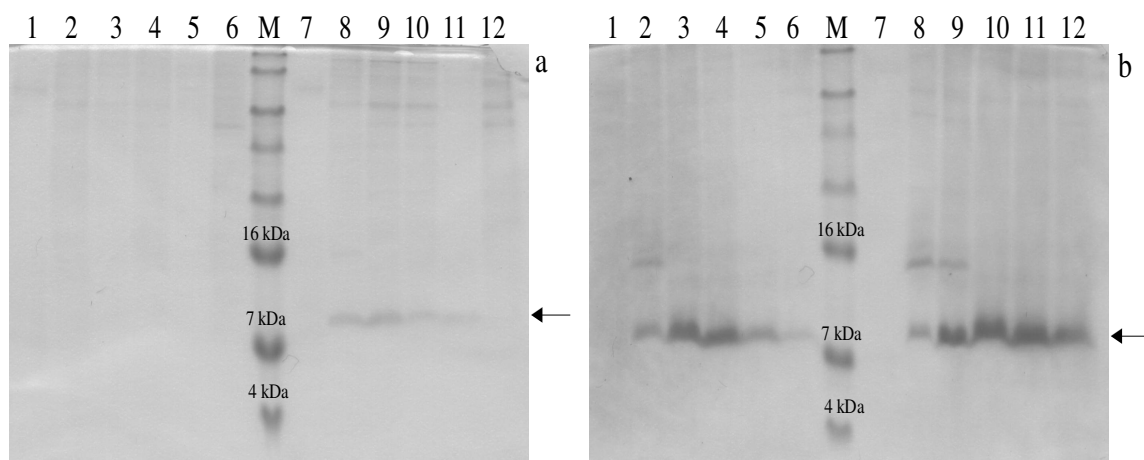


Figura 12. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de síntesis de la proteína recombinante MIH_n en *P. pastoris* (X-33) con diferentes concentraciones de metanol durante 0-5 días. M, marcador SeeBlue Pre-stained Standard (Invitrogen). a) Carriles 1-6 corresponden a la inducción 0% metanol; carriles 7-12 corresponden a la inducción 1% metanol. b) Carriles 1-6 corresponden a la inducción 2% metanol; carriles 7-12 corresponden a la inducción 4% metanol.

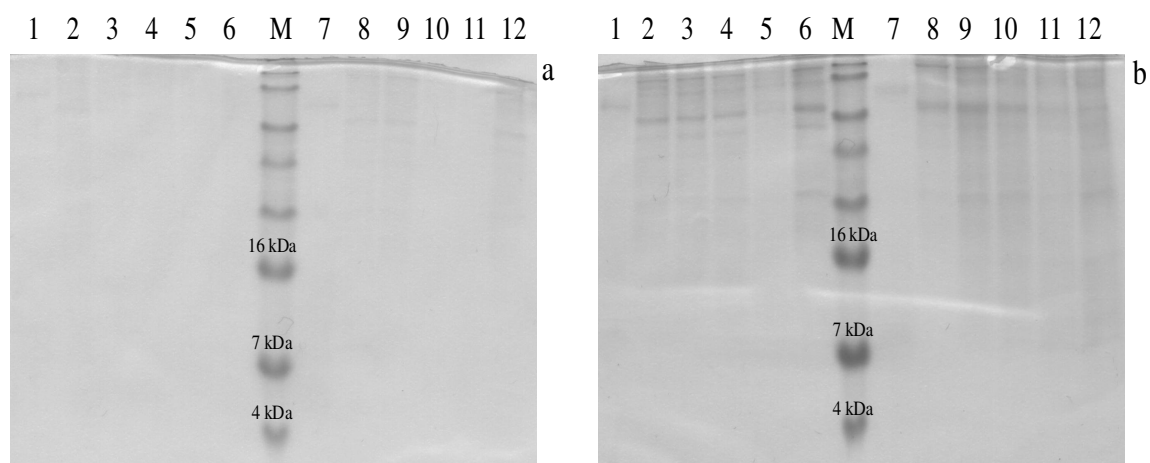


Figura 13. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de síntesis con diferentes concentraciones de metanol durante 0-5 días de *P. pastoris* (X-33) transformada con el vector pPICZ α A sin inserto. M, marcador SeeBlue Pre-stained Standard (Invitrogen). a) Carriles 1-6 corresponden a la inducción 0% metanol; carriles 7-12 corresponden a la inducción 1% metanol. b) Carriles 1-6 corresponden a la inducción 2% metanol; carriles 7-12 corresponden a la inducción 4% metanol.

V.4.1.3 Purificación de las proteínas recombinantes CHH_n y MIH_n

La purificación de neurohormonas recombinantes de *Penaeus monodon* secretadas por *P. pastoris* mediante precipitación con sulfato de amonio y exclusión molecular o RP-HPLC es una estrategia que se ha aplicado de manera exitosa (Yodmuang *et al.*, 2004). A partir de la cromatografía por exclusión molecular del extracto CHH_n obtenido por precipitación con sulfato de amonio se obtuvieron tres fracciones las cuales se denominaron I (tubos 10-13), II (tubos 14-21) y III (tubos 22-32), mismas que fueron analizadas en geles desnaturizantes de tricina (Tricina-SDS-PAGE) teñidos con nitrato de plata (Fig. 14). El análisis de estas fracciones evidenció una separación poco eficiente ya que en todas se observó una mezcla de tres bandas con tamaños que van de los 7 a los 17 kDa. Asimismo, se observó que la banda que se presumía correspondía a la proteína esperada, estaba compuesta por una mezcla de dos bandas, como se observa en las fracciones II y III. Dado lo anterior, resultó difícil determinar cual de ellas era la banda esperada, sin embargo se consideró que la de menor tamaño podría representar cierto nivel de degradación de la proteína debido a la intervención de alguna proteasa. Un patrón similar se observó para MIH_n. De la cromatografía por exclusión molecular de MIH_n se obtuvieron dos fracciones: I (tubos 12-14) y II (15-32) las cuales presentaron la mezcla de proteínas que van de los 7 a los 17 kDa (Fig. 15). Un exceso de muestra analizada en el gel de tricina no permitió una separación eficiente de la banda de menor tamaño de la fracción II, sin embargo es de esperarse que este constituida por dos bandas, como se observó en las fracciones II y III de CHH_n.

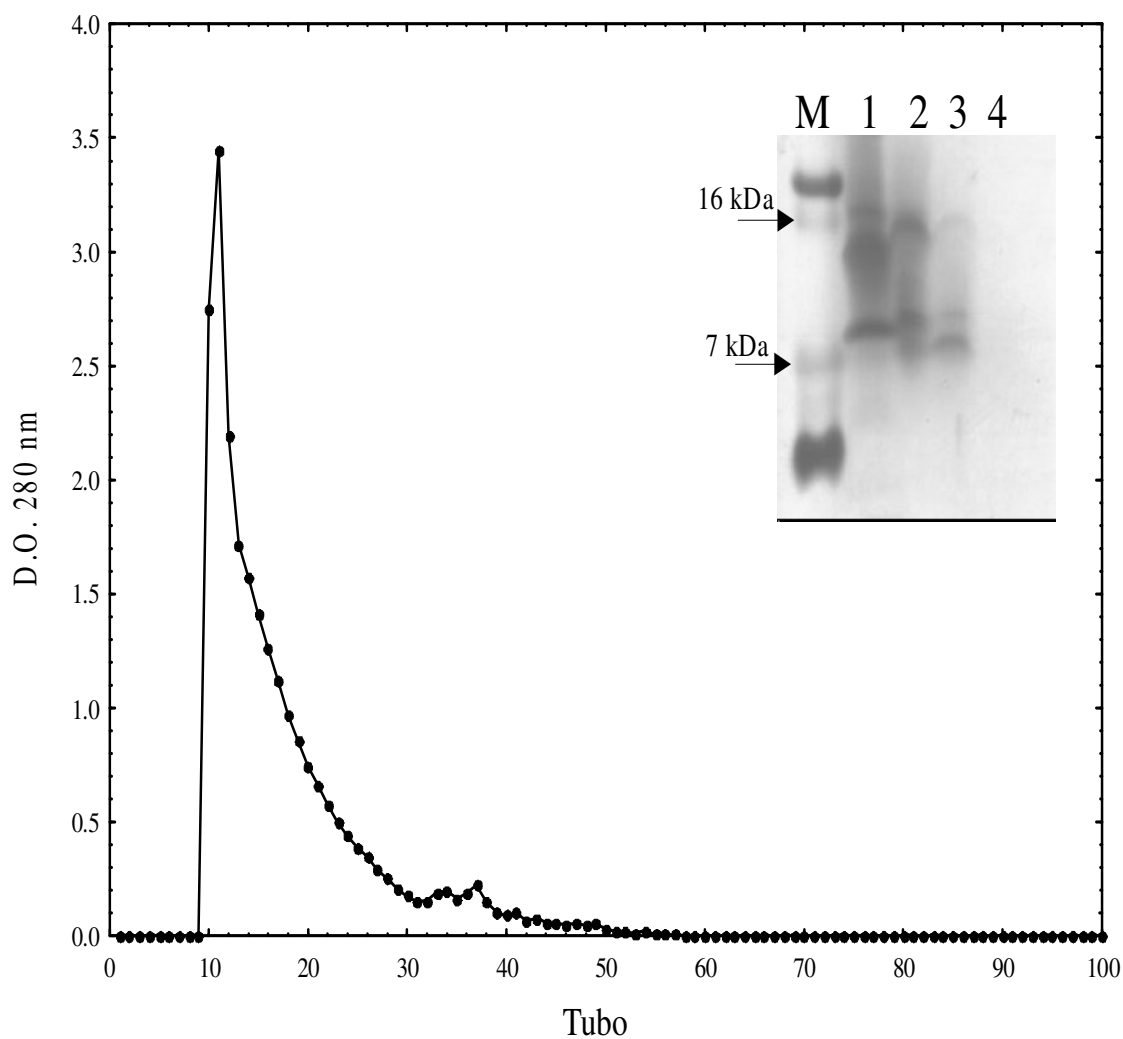


Figura 14. Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular del concentrado proteico secretado por *P. pastoris* (X-33) trasformada con el vector pPICZ α A-CHH_n. Panel A: Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% de las fracciones I, II y III obtenidas de la purificación por cromatografía de exclusión molecular.

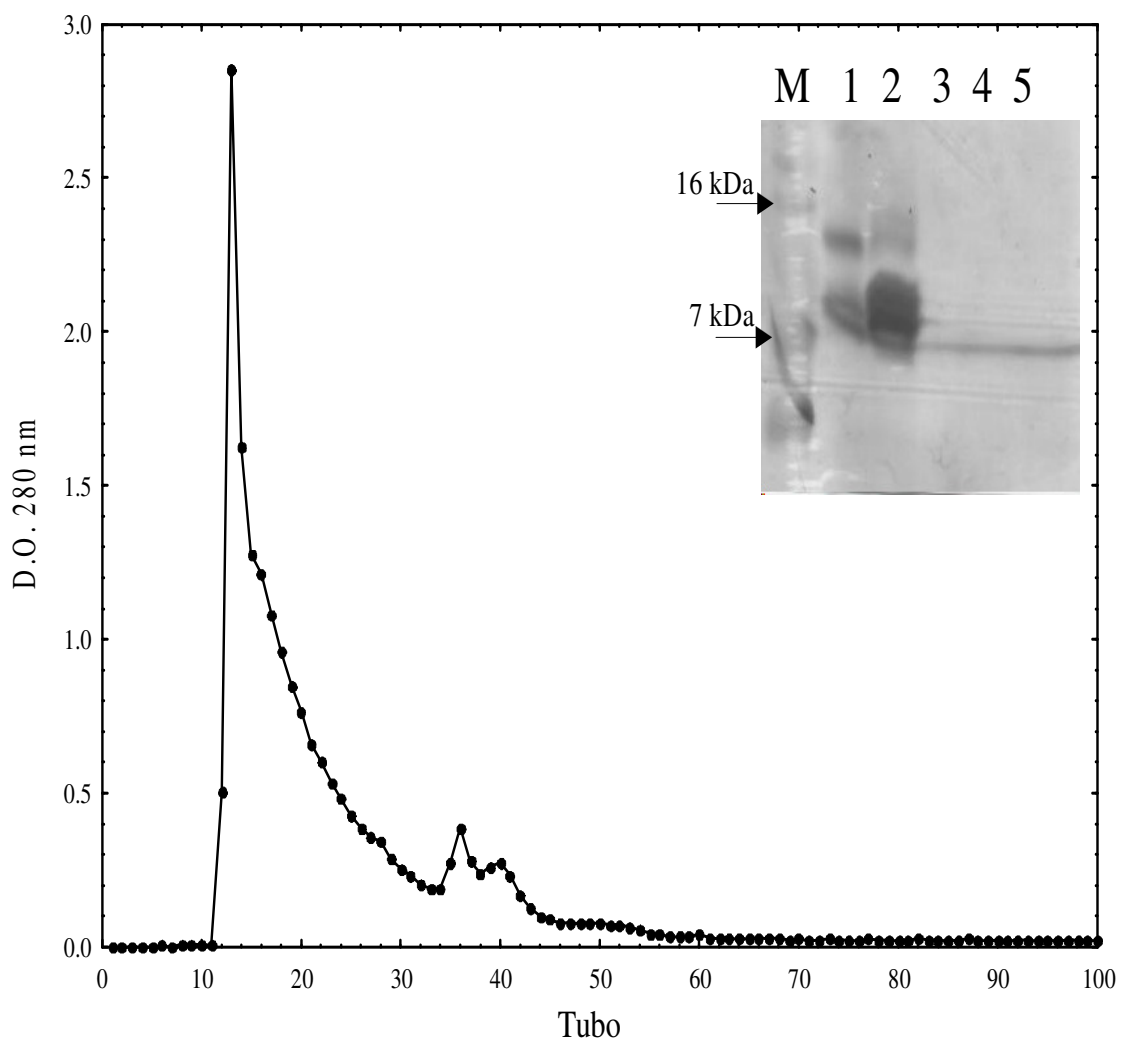


Figura 15. Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular del concentrado proteico secretado por *P. pastoris* (X-33) trasformada con el vector pPICZ α A-MIH_n. Panel A: Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% de las fracciones I y II obtenidas de la purificación por cromatografía de exclusión molecular.

Dado que la fracción II de MIH_n obtenida por exclusión molecular presentó una mayor cantidad de proteínas, esta fue seleccionada para un análisis posterior por RP-HPLC. Las fracciones obtenidas cada 5 minutos por RP-HPLC de la fracción II fueron analizadas en geles desnaturalizantes de tricina (Tricina-SDS-PAGE) teñidos con plata (Fig. 16). Las

fracciones colectadas hasta los 40 min no presentaron componentes de naturaleza proteica, ya que en ninguno de ellos se observó banda en el gel de tricina. La señal observada en estas fracciones probablemente corresponda a remanentes del medio de cultivo que no fueron eliminados en su totalidad mediante la precipitación con sulfato de amonio y diálisis con PBS. Las fracciones que eluyeron después de los 40 min, consideradas como las más hidrofóbicas, presentaron una mezcla de bandas de naturaleza proteica. Las fracciones IX, X, XI y XII presentaron la banda esperada, siendo las 3 primeras en las que se presentó en mayor proporción. Sin embargo, en todas las fracciones se observó una mezcla de 5 bandas que van de los 7 a los 16 kDa, siendo las tres de menor tamaño las que se presentaron en mayor proporción con respecto a las dos de mayor tamaño (Fig. 16). Considerando que las bandas observadas eluyeron entre los 40 y los 60 min (20 min), se sugiere que las condiciones para su separación no fueron las adecuadas, aun cuando estas son las utilizadas de manera general para la purificación de proteínas. Otro aspecto que llama la atención y que se desprende de la electroforesis de las fracciones son las tres bandas de alrededor de 7 kDa. Con esto se observó que la fracción II, obtenida de la exclusión molecular y de la cual provienen las fracciones obtenidas por RP-HPLC, en realidad estuvo constituida por tres bandas y no dos como se había indicado inicialmente. Se sugiere que estas diferentes bandas correspondieron a diferentes niveles de degradación de la proteína esperada o incluso de desnaturalización.

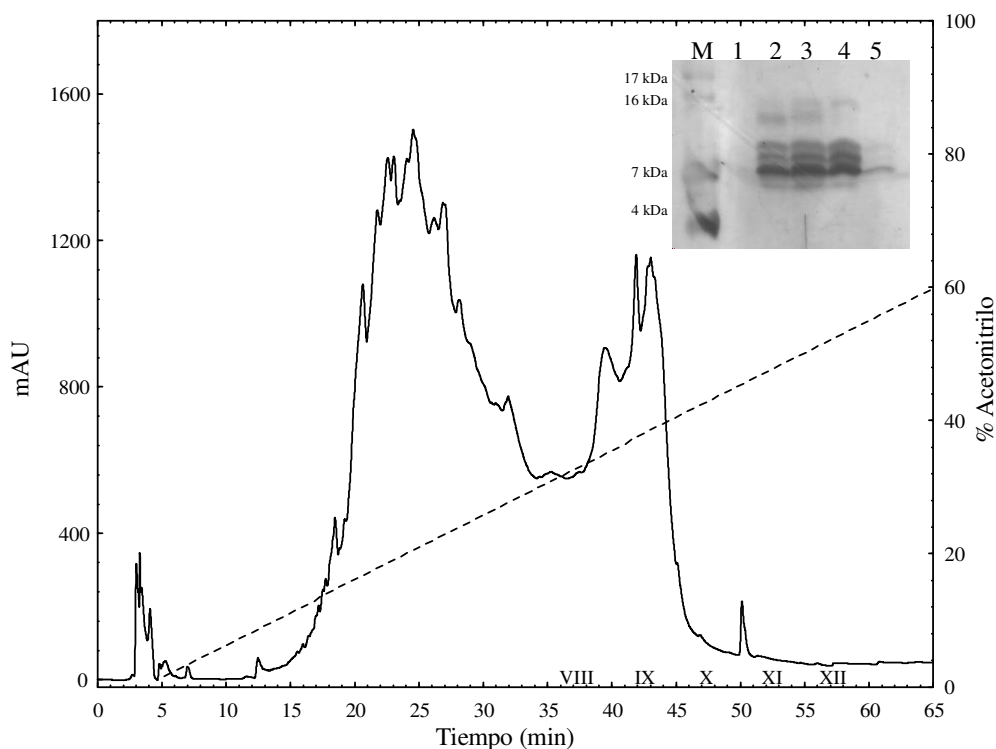


Figura 16. Cromatograma de la fracción II de MIH_n purificada por RP-HPLC. M: marcador SeeBlue Pre-stained Standard (Invitrogen), carril 1, fracción VIII; carril 2, fracción IX; carril 3, fracción X; carril 4, fracción XI; carril 5, fracción XII.

V.4.1.4. Secuenciación de la proteína recombinante MIH_n

Las fracciones IX, X y XII obtenidas de la purificación de MIH_n por RP-HPLC fueron enviadas al Instituto de Neurobiología para la secuenciación de su N-terminal. Los resultados confirmaron la presencia de diferentes péptidos en las fracciones analizadas. En la fracción X y XI, uno de los péptidos mayoritarios presentes fue: EFDTFDH, que corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por el péptido maduro MIH incluyendo los dos aminoácidos (EF) adicionales correspondientes al sitio de restricción *EcoRI*. Otras secuencias obtenidas fueron: EAEFDTF y EAEAEFD las cuales

corresponden al péptido maduro MIH_n con dos y cuatro aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal: EA (Glu-Ala), respectivamente. Con relación a su abundancia en esta fracción, el péptido mayoritario fue EAEFDTF, siguiendo en orden decreciente EFDTFDH y EAEAEFD. Estos resultados indican que el péptido MIH_n fue sintetizado y secretado exitosamente, sin embargo en algunos casos la señal de secreción no fue procesada correctamente. El procesamiento de la señal de secreción involucra varios pasos de hidrólisis en los que intervienen diferentes enzimas. Primero una aminopeptidasa, codificada por el gen *KEX2*, hidroliza en el extremo C-terminal de la secuencia específica KR. Posteriormente la dipetidil aminopeptidasa, que es codificada por el gen *STE13* elimina las repeticiones Glu-Ala del extremo N-terminal en el aparato de golgi. Aunque las repeticiones Glu-Ala incrementan la actividad de la proteasa Kex2 cuando se utiliza la señal de secreción α -factor, como es el caso del vector pPICZ α A utilizado, se ha observado que la posterior eliminación de estas repeticiones por la dipeptidil aminopeptidasa Ste13 no es eficiente en algunos casos, dando como resultado aminoácidos adicionales en la proteína recombinante (Briand *et al.*, 1999; Raemaekers *et al.*, 1999). Algunos estudios sugieren que la eficiencia de este proceso puede ser afectada por los aminoácidos adyacentes. En algunos casos, la eficiencia de la hidrólisis puede estar influenciada por la proximidad de un residuo de prolina, mientras que en otros, la estructura terciaria de la proteína expresada puede esconder los sitios de hidrólisis (Cereghino y Gregg, 2000). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que las repeticiones Glu-Ala no son necesarias para el correcto procesamiento de la señal de secreción α -factor (Briand *et al.*, 1999; Raemaekers *et al.*, 1999; Treerattrakool *et al.*, 2002). Sin embargo, en el estudio realizado por Treerattrakool y

colaboradores (2002), donde se clonó un péptido de la familia CHH/MIH/GIH de *P. monodon* en *P. pastoris*, la presencia o ausencia de las repeticiones Glu-Ala no influyeron en el procesamiento correcto de la secuencia señal α -factor. Otras secuencias detectadas en menor proporción en las fracciones X y XI, pero presentes en gran cantidad en la fracción IX fueron GLOGC y APVCT. Estas secuencias detectadas no corresponden a la proteína MIH, lo que sugiere que fueron proteínas secretadas por el metabolismo de *P. pastoris*. En la fracción IX sólo una pequeña cantidad de la secuencia EFDTF fue detectada.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de las fracciones IX, X y XI no permitieron determinar con precisión cual de las bandas correspondía a la proteína esperada. Considerando los resultados de la electroforesis en tricina de las fracciones, donde el patrón de bandas fue muy parecido (Fig. 16), era de esperarse que estas estuvieran conformadas por las mismas secuencias y en proporciones similares, sin embargo esto no fue corroborado por su secuenciación. En el caso de las fracciones X y XI, los péptidos mayoritarios EAEFDTF, EFDTFDH y EAEAEFD podrían estar representados por las tres bandas de menor tamaño (7 kDa), mientras los péptidos minoritarios GLOGC y APVCT por las bandas de mayor tamaño (16 kDa). Sin embargo, esto se contrapone a lo observado en la fracción IX, ya que si bien se detectaron cinco bandas en el gel de tricina, sólo se detectaron tres secuencias, de las cuales GLOGC y APVCT fueron mayoritarias y EFDTF minoritaria.

Considerando que no hubo un procesamiento adecuado de la secuencia señal α -factor y que la purificación no permitió obtener un péptido recombinante puro para realizar un análisis de su actividad biológica, se procedió con una nueva construcción para solucionar estos problemas.

V.4.2 Proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}.

V.4.2.1. Clonación de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}

Los fragmentos que codifican para los péptidos maduros de CHH_{His} y MIH_{His} fueron amplificados exitosamente por PCR a partir de los vectores procariotas pBAD-CHH y pBAD-MIH, respectivamente, utilizando cebadores que incluían sitios de restricción para las endonucleasas *XhoI* y *XbaI*. El tamaño del fragmento esperado para CHH_{His} fue de 257 pb de los cuales 222 pb correspondieron al péptido maduro, 15 pb al sitio de reconocimiento de la enzima Enteroquinasa, 6 pb al sitio de reconocimiento para la enzima Kex2, 12 pb a los sitios de restricción para *XhoI* y *XbaI* y 2 pb a los nucleótidos adicionados para que quedara en fase de lectura correcta. Para el caso de MIH_{His}, el tamaño del fragmento esperado fue de 254 pb, de los cuales 219 pb correspondieron al péptido maduro y el resto a los mismos sitios descritos previamente para CHH_{His}.

Una vez que los fragmentos CHH_{His} y MIH_{His} fueron clonados río arriba del promotor AOX1, entre los sitios de restricción *XhoI* y *XbaI* del vector pPICZ α A, se obtuvieron los vectores pPICZ α A-CHH_{His} y pPICZ α A-MIH_{His}, con los cuales se transformaron células de *E. coli* TOP10F'. La correcta inserción de los fragmentos en el vector fue verificada por

secuenciación en ambas direcciones a partir de las clonas transformadas obtenidas. Los resultados a este respecto indican que no se produjo ninguna mutación en las secuencias y que los fragmentos se encontraban en fase de lectura con la señal de secreción de proteínas (α -factor). La secuencia nucleotídica del fragmento que codifica para la proteína CHH_{His} obtenida de la secuenciación así como la secuencia de aminoácidos deducida se presenta en la Figura 17. A partir de esta se puede observar que el péptido recombinante CHH_{His} está compuesto por 102 aminoácidos de los cuales 74 corresponden al péptido maduro mientras que el resto de los 28 aminoácidos incluyen el sitio de reconocimiento para Enteroquinasa, el epítipo *c-myc* y la secuencia de seis histidinas (6x His tag). El peso teórico esperado para este péptido recombinante fue de 12.1 kDa.

En la Figura 18 se presenta la secuencia de nucleótidos obtenida del análisis de secuenciación para MIH_{His}. En ella se observa que el péptido recombinante MIH_{His} está formado por 101 aminoácidos de los cuales 73 corresponden al péptido maduro y el resto de los 28 aminoácidos a las secuencias de reconocimiento descritas para CHH_{His} previamente. El peso teórico esperado para este péptido recombinante fue de 12.1 kDa.

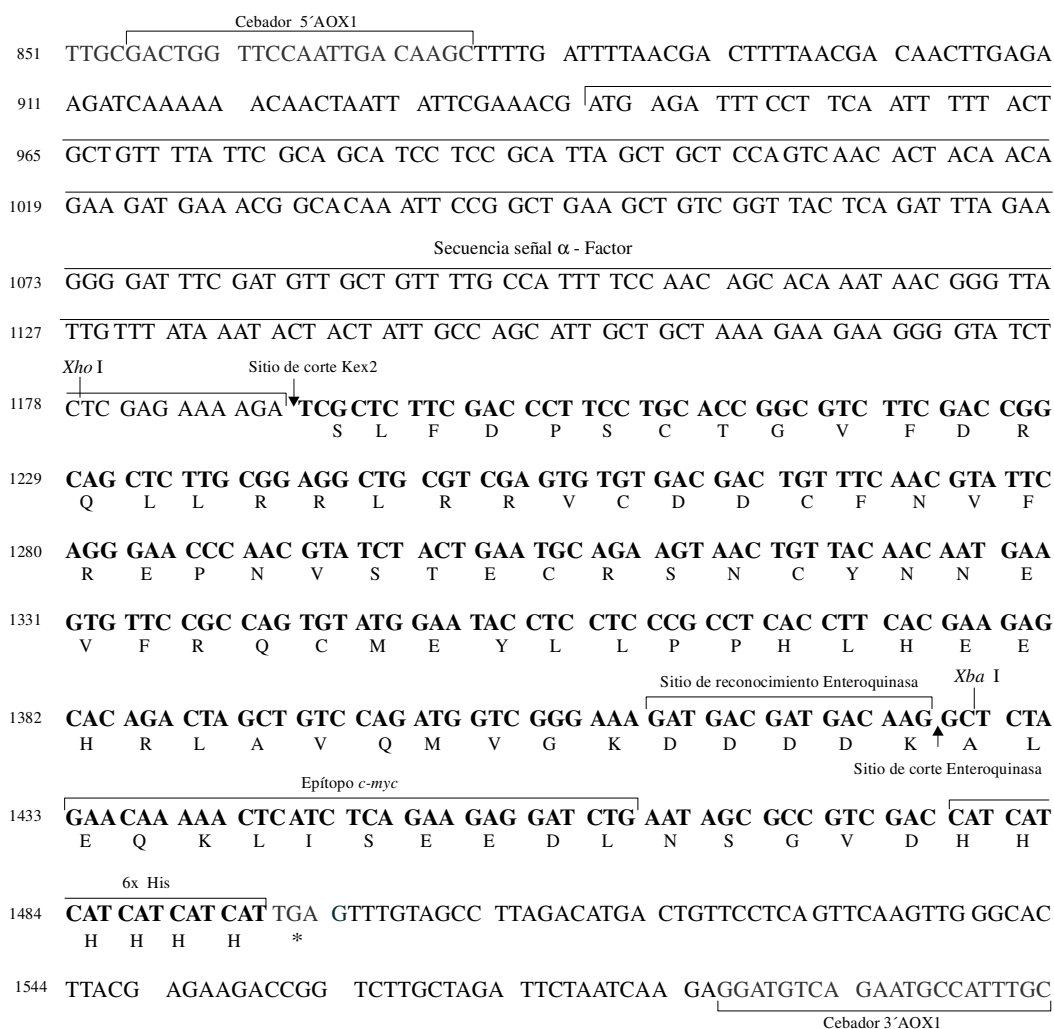


Figura 17. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida de CHH_{His}. El asterisco indica el codón de terminación.

de las cuales se eligieron 20 al azar para su resiembra en placas YPD con zeocina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). De las clonas resembradas se eligieron 10 de cada construcción para verificar la integración de los respectivos fragmentos en el genoma de *P. pastoris* mediante PCR. El análisis de los fragmentos amplificados en geles de agarosa (1.6 %) mostró que todas las clonas transformadas con los vectores pPICZ α A-CHH_{His} y pPICZ α A-MIH_{His} presentaban el fragmento del tamaño esperado, mientras que células sin transformar no lo presentaron. Con base a esto se concluyó que los vectores se habían integrado exitosamente en el genoma de *P. pastoris*. El tamaño del fragmento esperado utilizando los cebadores α -Factor y 3' AOX1 es de 750 pb para CHH_{His} y 747 pb para MIH_{His} (Fig. 19).

De las clonas transformadas de *P. pastoris* (KM71) en las que se verificó la integración del vector en su genoma por PCR, se eligió una de cada construcción para su secuenciación. El análisis de las secuencias nuevamente mostró que no había mutaciones y que los fragmentos que codifican para las proteínas CHH_{His} y MIH_{His} estaban en fase con el marco de lectura de la señal de secreción de proteínas (α -factor). Estas mismas clonas fueron las que se eligieron para el análisis de expresión.

De la transformación con el vector pPICZ α A sin inserto, solo se obtuvieron 10 clonas las cuales fueron resembradas en placas YPD con zeocina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). De estas se analizaron dos mediante PCR, el fragmento amplificado fue de 586 pb, lo que confirmó su integración en el genoma de *P. pastoris* (Fig. 19)

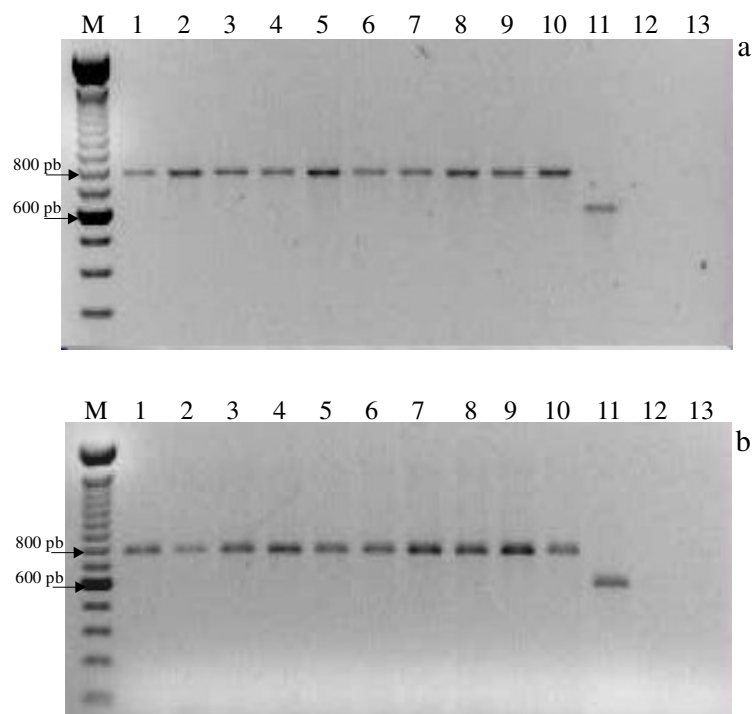


Figura 19. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR de las clonas transformadas de *P. pastoris* (KM71) con el vector pPICZ α A-CHH_{His} y pPICZ α A-MIH_{His}. M: Marcador TrackIt 100 pb DNA ladder (Invitrogen). a) Clonas transformadas con el vector pPICZ α A-CHH_{His}, carriles 1-10 corresponden a las clonas analizadas; carril 11, clona transformada con el vector pPICZ α A sin inserto; carril 12, cepa KM71 no transformada; carril 13, PCR sin ADN. b) Clonas transformadas con el vector pPICZ α A-MIH_{His}, carriles 1-10 corresponden a las clonas analizadas; carril 11, clona transformada con el vector pPICZ α A sin inserto; carril 12, cepa KM71 no transformada; carril 13, PCR sin ADN.

V.4.2.2. Análisis de la síntesis de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His}

Las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} sintetizadas y secretadas al medio de cultivo fueron analizadas por Tricina-SDS-PAGE. Una banda evidente, próxima a la banda de 10 kDa fue observada en los geles para ambas proteínas heterólogas, por lo que se consideró

que esta podría corresponder a la banda esperada de 12.1 kDa (Figs. 20 y 21). Lo anterior se apoya por los resultados obtenidos de aquellos cultivos donde no se adicionó metanol y por los de la clona transformada con pPICZ α A sin inserto, donde no se observó esta banda evidente (Fig. 22). De acuerdo a estos resultados la concentración óptima de metanol tanto para la expresión de CHH_{His} como MIH_{His} fue utilizando 1% de metanol. Sin embargo, con respecto al tiempo, la mayor producción de CHH_{His} se obtuvo en el primer día, mientras que para MIH_{His} fue al segundo día, dado que no se observaron diferencias importantes al utilizar un tiempo de inducción mayor. La concentración considerada como óptima en este estudio es menor a la establecida en otros trabajos donde también se utilizó la cepa *P. pastoris* (KM71) para la síntesis de varias neurohormonas recombinantes de *P. monodon*. En estos trabajos la concentración óptima fue de 3% y 4% metanol durante 2 y 3 días (Treerattrakool *et al.*, 2002; 2003; Udomkit *et al.*, 2004; Yodmuang *et al.*, 2004).

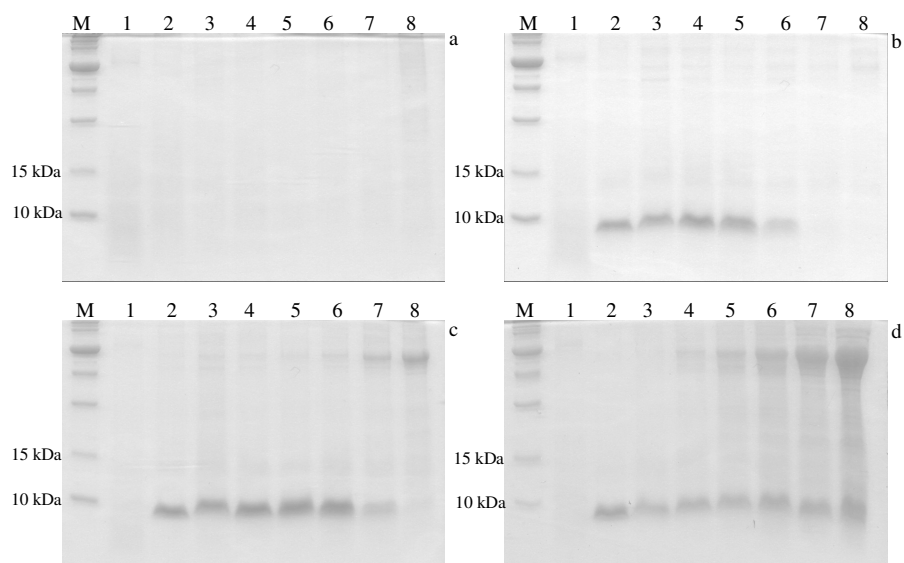


Figura 20. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de expresión con diferentes concentraciones de metanol de *P. pastoris* (KM71) transformada con el vector pPICZ α A-CHH_{His}. M, Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega). Los carriles 1-8 corresponden al tiempo de inducción en días (0-7 día). a) 0% metanol, b) 1% metanol, c) 2% metanol y d) 4% metanol.

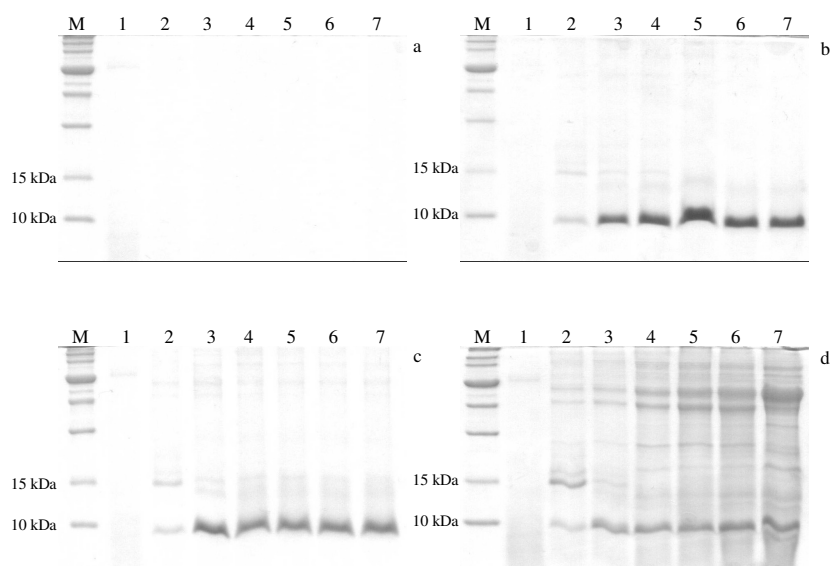


Figura 21. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de expresión con diferentes concentraciones de metanol de *P. pastoris* (KM71) transformada con el vector pPICZ α A-MIH_{His}. M, Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega). Los carriles 1-7 corresponden al tiempo de inducción en días (0-6 día). a) 0% metanol, b) 1% metanol, c) 2% metanol y d) 4% metanol.

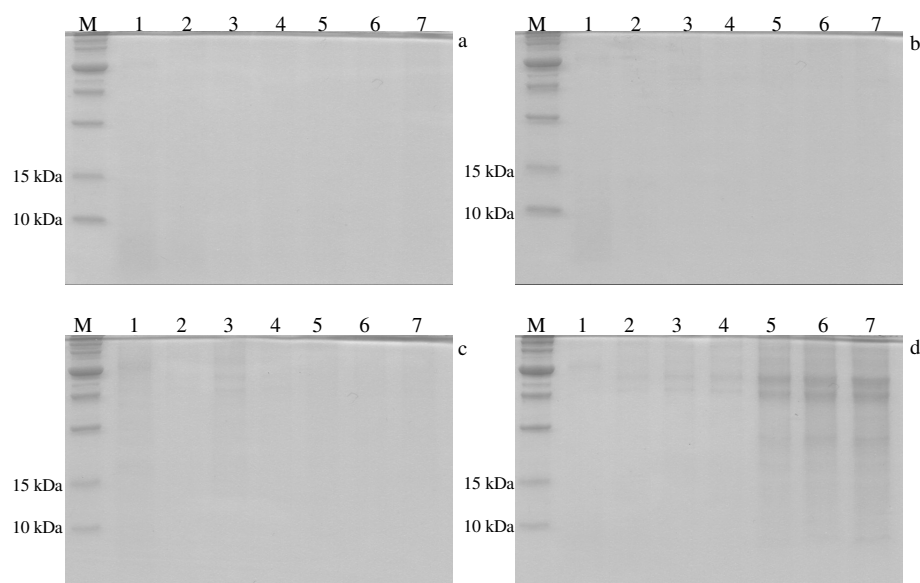


Figura 22. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de expresión con diferentes concentraciones de metanol de *P. pastoris* (KM71) transformada con el vector pPICZ α A sin inserto. M, marcador Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega). Los carriles 1-7 corresponden al tiempo de inducción en días (0-6 día). a) 0% metanol, b) 1% metanol, c) 2% metanol y d) 4% metanol.

El ensayo de inmunodetección (Western blot) de la inducción de CHH_{His} y MIH_{His} en el que se utilizó el anticuerpo anti-*myc*-HRP confirmó la presencia la proteína recombinante MIH_{His} no así la de CHH_{His} (Figs. 23 y 24). Asimismo, se evidenció que la banda de MIH_{His} era la que se ubicaba próxima a la banda de 15 kDa de uno de los marcadores de peso molecular (Fig. 21) o a la de 13 kDa en el otro (Fig. 24) y no a la de 10 kDa como se sugirió inicialmente. Debido a que para el ensayo de inmunodetección de MIH_{His} en donde se utilizaron diferentes concentraciones de metanol (0.5%, 2% y 4% (v/v)) para uno o dos días, se obtuvo una mayor señal al utilizar 4% de metanol por un día (Fig. 24), se decidió utilizar estas condiciones para los ensayos posteriores de producción de la proteína recombinante MIH_{His}. Cabe señalar que esta concentración de metanol es más acorde a las

consideradas como óptimas en trabajos donde se sintetizaron las proteínas recombinantes CHH y MIH de *P. monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2002; Yodmuang *et al.*, 2004).

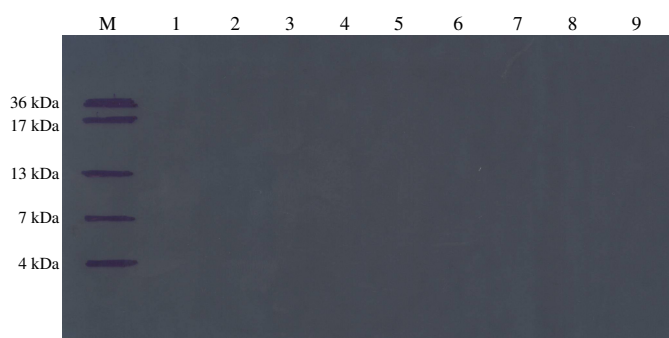


Figura 23. Inmunodetección de la proteína recombinante CHH_{His} a partir de los sobrenadantes obtenidos durante el ensayo de expresión de *P. pastoris* (KM71) transformada con el vector pPICZ α A-CHH_{His}. M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen). Carril 1, KM71 inducida con 2% MeOH; carril 2, KM71 + pPICZ α A sin inserto inducida con 2% MeOH; carriles 3-9 corresponde a la inducción de KM71+ pPICZ α A MIH_{His} inducida con diferentes concentraciones de metanol; carril 3, 0% día 1; carril 4, 0.5% día 1; carril 5, 0.5% día 3; carril 6, 0.5% día 7; carril 7, 2% día 1; carril 8, 2% día 3; carril 9, 2% día 7.



Figura 24. Inmunodetección de la proteína recombinante MIH_{His} a partir de los sobrenadantes obtenidos durante el ensayo de expresión de *P. pastoris* (KM71) transformada con el vector pPICZ α A-MIH_{His}. M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen). Carril 1, KM71 inducida con 2% MeOH; carril 2, KM71 + pPICZ α A sin inserto inducida con 2% MeOH; carriles 3-9 corresponde a la inducción de KM71+ pPICZ α A MIH_{His} inducida con diferentes concentraciones de metanol; carril 3, 0% día 1; carril 4, 0.5% día 1; carril 5, 0.5% día 2; carril 6, 2% día 1; carril 7, 2% día 2; carril 8, 4% día 1; carril 9, 4% día 2.

Considerando que la región que permite la expresión de CHH_{His} fue integrada exitosamente en el genoma de *P. pastoris*, como lo demuestra el análisis de PCR de las clonas transformadas (Fig. 19a) y su secuenciación (Fig. 17), la ausencia de la proteína recombinante CHH_{His} probablemente se debió a un problema a nivel transcripcional. Existen algunos estudios donde se ha observado que aquellos genes con un alto contenido de A+T no son transcritos eficientemente (Romanos *et al.*, 1992). En un estudio realizado por Scorer y colaboradores (1993) demostraron que la secuencia 5'ATTATTTTATAAA3' del gen *HIV-gp120* bloquea la transcripción en *P. pastoris*, sin embargo cuando esta secuencia es sustituida por 5'TTTCTTCTACAAG3' la transcripción del gen se lleva a cabo. En nuestro caso, el gen que codifica para CHH_{His} muestra una secuencia (1292-1304 nt) que presenta cierta homología (53%) con la secuencia que bloquea la transcripción y la cual podría estar funcionando como un terminador. Si bien se desconoce que otras secuencias ricas en A+T podrán actuar como terminadores de la transcripción, se sugiere como estrategia general que los genes que se requieran expresar contengan de 30-55% de A+T, en este sentido CHH_{His} guarda esta proporción ya que su contenido de A+T es de 46.8% (Sreekrishna *et al.*, 1997). Aun cuando existe poca información sobre la producción de proteínas pequeñas (10 kDa), se sugiere que la principal limitación en la expresión de estas se debe a la inestabilidad de su ARN (Burrowes *et al.*, 2005). Para evidenciar si existe algún problema a nivel de transcripción se llevó a cabo un análisis de PCR a partir de ADNc (RT-PCR) de las clonas de CHH_{His} y MIH_{His} transformadas e inducidas con metanol.

El análisis mediante RT-PCR evidenció que el gen *chh* fue transcrito por *P. pastoris* (KM71). La transcripción del gen *chh* a nivel de ADNc se demostró por la presencia de

fragmentos de ADN de 750 pb al igual que para el gen *mih* (747 pb), mientras que para *P. pastoris* (KM71) sin transformar no se detectó ningún fragmento (Fig. 25). Aún cuando el análisis de RT-PCR no fue cuantitativo, el haber empleado cantidades iguales de ARN en la síntesis de ADNc nos permitió comparar la intensidad de las bandas de PCR, las cuales indicaron un nivel de expresión del gen *chh* similar al de *mih*. Asimismo, se observó que aun sin inductor (metanol) ambos genes se expresaron a un nivel menor que para los días 1 y 2, lo cual sugiere su expresión a un nivel basal.

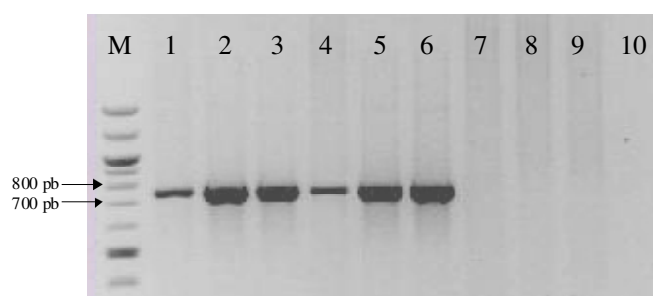


Figura 25. Electroforesis de los fragmentos amplificados por RT-PCR de las clonas transformadas de *P. pastoris* (KM71) con los vectores pPICZ α A-CHH_{His} y pPICZ α A-MIH_{His} así como de la cepa *P. pastoris* (KM71) sin transformar inducidas con metanol 4% durante 2 días. M: Marcador Quick-Load[®] 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). Carriles 1-3 clona pPICZ α A-CHH_{His} para los días 0, 1 y 2 respectivamente; carriles 4-6 clona pPICZ α A-MIH_{His} para los días 0, 1 y 2 respectivamente, carriles 7-9 cepa *P. pastoris* (KM71) sin transformar para los días 0, 1 y 2 respectivamente, carril 10, PCR sin ADN.

Considerando que el gen *chh* fue insertado correctamente en el vector pPICZ α A y que este fue transcrito a nivel de ARN, como lo demuestra el análisis de RT-PCR, se sugiere que la proteína pPICZ α A-CHH_{His} no fue detectada por un problema a nivel traduccional o postraduccional. Algunas de las posibles explicaciones ante la ausencia de expresión de proteínas en sistemas heterólogos, incluyen la falta de componentes celulares del hospedero para la traducción de las proteínas recombinantes, la proteólisis de la proteína una vez que

esta es traducida y el plegamiento incompleto o incorrecto de la misma (Rai y Padh, 2001). En este sentido, la primera opción podría ser descartada ya que se ha logrado expresar de manera exitosa proteínas recombinantes CHH de otras especies de camarón a partir del mismo sistema de expresión y bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo (Treerattrakool *et al.*, 2003; Udomkit *et al.*, 2004). Con respecto al plegamiento incompleto o incorrecto de CHH_{His} como posibles causas de la ausencia de su detección, no se descarta que la adición del sitio de reconocimiento para la Enteroquinasa pudiera estar afectando su plegamiento lo que repercute en su procesamiento para ser secretada al medio de cultivo. El proceso de plegamiento incluye varios pasos en los cuales las proteínas pueden formar agregados insolubles, particularmente a niveles altos de síntesis y a temperaturas altas (Rai y Padh, 2001). Si este fuese el caso de CHH_{His}, un análisis de las proteínas intracelulares podría evidenciar si la síntesis de esta proteína se lleva a cabo, lo que nos permitiría sugerir que existe un problema en su procesamiento para ser secretada al medio de cultivo y por ello no fue detectada en los sobrenadantes analizados.

Otras posibles causas que pueden afectar la producción de proteínas recombinantes están relacionadas con la susceptibilidad a proteólisis. Si bien la estabilidad proteolítica de las proteínas secretadas se controla utilizando un intervalo de pH de 2.8-6.5, se ha encontrado que la adición de casaminoácidos en el medio de cultivo se refleja en un mejor rendimiento. Tal es el caso del factor de crecimiento epidermal de ratón, donde la producción de esta proteína se incrementó de manera importante al adicionar casaminoácidos al medio de cultivo (Clare *et al.*, 1991b). Por otro lado, el empleo de cepas de *P. pastoris* deficientes en proteasas a las cuales se les ha interrumpido el gen que codifica para la Proteasa A (*PEP4*)

y/o la Proteasa B (*PRB1*) han sido utilizadas de manera exitosa como estrategia para evitar la proteólisis de proteínas recombinantes secretadas (Sreekrishna *et al.*, 1997). Dado lo anterior, el empleo de casaminoácidos en el medio de cultivo de CHH_{His} debe ser considerado como una primera opción dado que existe la posibilidad que este siendo sujeta a proteólisis y por ello no ha sido detectada.

Para una proteína dada, el nivel de síntesis depende de las características propias de la proteína, la generación e identificación de clonas sobreproductoras y las condiciones de cultivo. El empleo de bioreactores debe ser considerado para aquellos casos en los que las proteínas no se sintetizan en cultivos en lote como es el caso de CHH_{His} . El cultivo a nivel de bioreactor permite un mejor control de las condiciones de cultivo. Se ha encontrado que un suministro adecuado de oxígeno hace posible una inducción del gen más efectiva (Fisher *et al.*, 1999)

V.4.2.3. Producción y purificación de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} por afinidad

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas para la inducción de MIH_{His} se procedió con su escalamiento, obteniéndose así un volumen de 100 ml de cultivo para su purificación. Aún cuando el análisis de inmunodetección no evidenció la presencia de la proteína recombinante CHH_{His} se decidió llevar a cabo su purificación. Considerando que probablemente la cantidad de muestra analizada en el ensayo de inmunodetección estuvo por debajo de límite de detección (10 pg), su purificación permitiría obtener una muestra concentrada de CHH_{His} que permitiera su detección. La purificación por cromatografía de

afinidad por níquel con la resina ProBond (Invitrogen) permitió remover en su totalidad todas las proteínas contaminantes presentes en el medio de cultivo. Para CHH_{His} no se detectó banda en las fracciones eluídas. Sin embargo, para MIH_{His} se obtuvo una banda que coincidió con la identificada previamente mediante el ensayo de inmunodetección (Fig. 26).

Una estimación conservadora del rendimiento de la proteína recombinante MIH_{His} indicó que este fue de 8.7 mg·l⁻¹. Dicho rendimiento puede considerarse bajo si lo comparamos con los 130 mg·l⁻¹ de proteína MIH-like de *P. vannamei* reportado por Sun (1997), sin embargo esta por arriba de los 270-450 µg·l⁻¹ obtenidos para la proteína CHH2 y CHH3 de *P. monodon* (Udomkit *et al.*, 2004). Si bien se han obtenido buenos rendimientos de proteínas heterólogas mediante cultivos en lote, el empleo de bioreactores debe ser considerado si se desea incrementar su producción. Considerando que los rendimientos están relacionados directamente con la densidad del cultivo, los bioreactores son la opción más adecuada ya que mediante estos se pueden alcanzar densidades celulares de 250-400 g de peso húmedo·l⁻¹. En algunos casos, el cambio de cultivo en lote a bioreactor puede incrementar dramáticamente el rendimiento hasta 10 veces (Clare *et al.*, 1991).

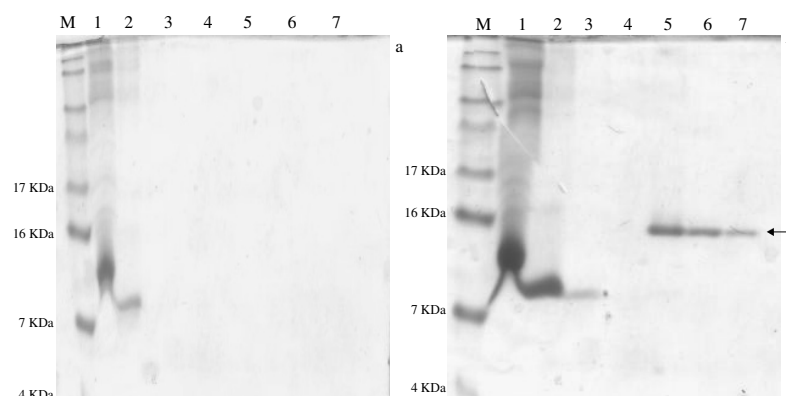


Figura 26. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% teñidos con azul de coomassie de la purificación de las proteínas recombinantes CHH_{His} y MIH_{His} por cromatografía de afinidad a níquel (Probond, Invitrogen). M: Marcador SeeBlue Pre-stained Standard (Invitrogen). a) Purificación de la proteína recombinante CHH_{His} . Carril 1, muestra cargada a la columna para su purificación; carriles 2-4, fracciones no unidas a la columna (lavados); carriles 5-7, fracciones eluidas con 250 mM de Imidazol. b) Purificación de la proteína recombinante MIH_{His} . Carril 1, muestra cargada a la columna para su purificación; carriles 2-4, fracciones no unidas a la columna (lavados); carriles 5-7, fracciones eluidas con 250 mM de Imidazol.

V.4.2.4. Secuenciación de la proteína recombinante MIH_{His}

El análisis de secuenciación del N-terminal de MIH_{His} purificada por afinidad mostró que los primeros cinco aminoácidos (DTFDH) coinciden con los del péptido esperado. Esto confirmó que la secuencia señal α -factor de la construcción $pPICZ\alpha A-MIH_{His}$ fue hidrolizada correctamente por la proteasa Kex2 y que no requirió de la presencia de las repeticiones Glu-Ala para su correcto procesamiento. Aun cuando la presencia de las repeticiones Glu-Ala promueven la actividad de la proteasa Kex2 cuando se utiliza la señal de secreción α -factor, el subsiguiente procesamiento de estas repeticiones por la aminopeptidasa Ste13 no es eficiente en algunos casos, dando como resultado aminoácidos extras en el extremo terminal de la proteína recombinante (Briand *et al.*, 1999; Raemaekers

et al., 1999). El correcto procesamiento de la secuencia señal α -factor sin las repeticiones Glu-Ala ha sido demostrado en varios trabajos (Briand *et al.*, 1999; Raemaekers *et al.*, 1999; Treerattrakool *et al.*, 2002). Para el caso particular de la expresión de una proteína recombinante de la familia CHH/MIH/GIH de *P. monodon* a partir de *P. pastoris*, se encontró que la presencia o ausencia de las repeticiones Glu-Ala no afectaban el correcto procesamiento de la secuencia señal α -factor (Treerattrakool *et al.*, 2002).

Cabe mencionar que en la membrana enviada para su secuenciación se observaron dos bandas adicionales ligeramente mayores a la identificada como MIH_{His}, las cuales no fueron mayores de 23 kDa, este patrón de tres bandas fue igual al observado en la Figura 28 carril 1. Sin embargo, las secuencias del N-terminal de estas bandas indicaron que se trataba de la proteína esperada, lo que sugiere que MIH_{His} no fue desnaturalizada completamente durante su procesamiento para su análisis mediante electroforesis con geles desnaturalizantes de tricina (Tricina-SDS-PAGE).

V.4.2.5 Hidrólisis del extremo C-terminal

Una vez que la proteína recombinante MIH_{His} fue purificada por afinidad, esta fue incubada con la enzima Enteroquinasa para remover el epítipo *c-myc* epítipo y la secuencia 6xHis de su extremo C-terminal. A partir del ensayo con esta enzima donde se evaluaron dos concentraciones de enzima (0.5 y 1.0 U) así como tres temperaturas de incubación (37, 24 y 4 °C), se determinó que a 37 °C la proteína recombinante era completamente degradada ya que no se detectaron bandas (Fig. 27). A 4 °C se observaron dos bandas, una con un peso molecular similar al de la proteína recombinante (12.1 kDa) y otra de menor tamaño, que

correspondió con el tamaño teórico esperado de la proteína al eliminar los 22 aminoácidos del extremo C-terminal (9.4 kDa). Por otro lado, a 24 °C aparentemente la proteína no fue hidrolizada ya que no se observó la banda esperada de 9.4 kDa. Asimismo no se encontraron diferencias importantes al utilizar diferentes concentraciones de enzima ya que el grosor de la banda esperada fue similar en ambos casos (Fig. 27).

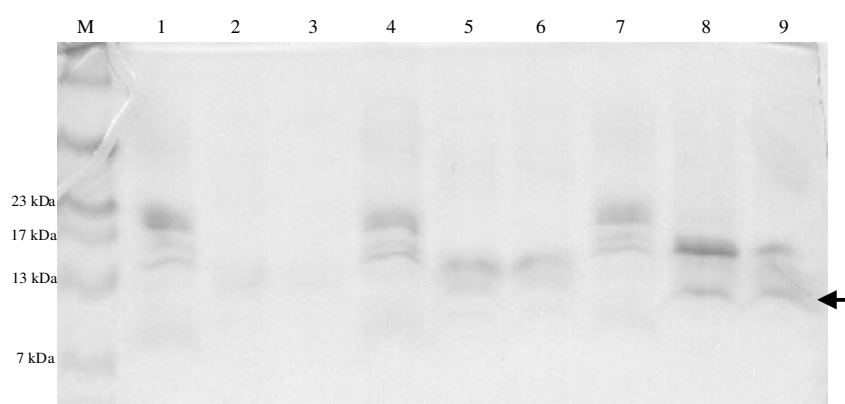


Figura 27. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de MIH_{His} con Enteroquinasa M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen). Carriles 1-3 incubación a 37 °C; carriles 4-6 incubación a 24 °C, carriles 7-9 incubación a 4 °C; carriles 1,4 y 7 corresponden a la proteína sin digerir; carriles 2, 5 y 8 con 0.5 U de Enteroquinasa; carriles 3, 6 y 9 con 1.0 U de Enteroquinasa.

Un nuevo ensayo con Enteroquinasa donde sólo se evaluaron tres concentraciones de enzima (0.1, 0.5 y 1.0 U) a 4 °C corroboró la hidrólisis parcial de la proteína recombinante, por otro lado, no se encontraron diferencias importantes entre las concentraciones utilizadas ya que el grosor de la banda esperada fue similar en todos los casos (Fig. 28). Como se observa en la Figura 28, la enzima Enteroquinasa removió 22 aminoácidos del extremo C-terminal de MIH_{His} , dejando 6 aminoácidos del sitio de reconocimiento para Enteroquinasa (Fig. 18).

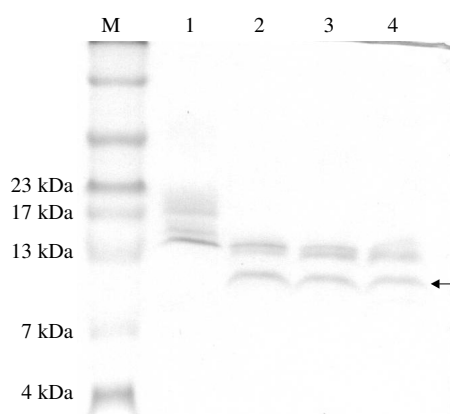


Figura 28. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5% del ensayo de MIH_{His} con Enteroquinasa incubada a 4 °C. M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen). Carril 1 corresponde a la proteína sin Enteroquinasa; carriles 2-4 corresponden a la proteína digerida con Enteroquinasa; carril 2, 0.1 U; carril 3, 0.5 U y carril 4, 1 U.

El procesamiento correcto de la señal de secreción α -factor en el extremo N-terminal así como la remoción del epítipo *c-myc* y la secuencia 6xHis del extremo C-terminal en la proteína heteróloga MIH_{His} pueden ser factores importantes en el plegamiento correcto y la actividad biológica de las proteínas recombinantes. Si bien se ha evaluado el efecto de la presencia de aminoácidos extras en los extremos N y C-terminal en la actividad de proteínas heterólogas, estos no son contundentes. En los casos de las proteínas heterólogas β -criptogeína y la monocito quimioattractante 1, se sugiere que la presencia de un aminoácido extra (Arg) en el extremo N-terminal o la falta de 2 aminoácidos afectaron significativamente su actividad biológica (Gong y Clark-Lewis, 1995; Perez *et al.*, 1999). Sin embargo, en el caso particular de la proteína recombinante CHH de *Metapenaeus ensis*, la presencia de 20 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal no afectó su actividad

hiperglucémica (Gu *et al.*, 2000). Sin duda, un estudio más detallado que evalúe el efecto de aminoácidos extras en los extremos N y C-terminal en la actividad de proteínas recombinantes debe ser considerado en el futuro. Estos estudios deben hacer énfasis en proteínas heterólogas que presentan secuencias específicas de reconocimiento (epítipo *c-myc*) y purificación (6xHis).

Considerando que la neurohormona MIH interviene en procesos biológicos de relevancia como es el ciclo de la muda e incluso la reproducción (Gu *et al.*, 2002), la producción de hormonas recombinantes es una alternativa viable que permitirá estudios sobre su papel fisiológico así como de estructura y función en especies de importancia comercial como lo es *L. vannamei*, donde la disponibilidad de esta neurohormona en su forma nativa resulta una limitante.

V.5. Conclusiones

Los genes que codifican para las neurohormonas CHH y MIH de *L. vannamei*, a los cuales se les incluyó su codón de término para evitar la síntesis de las secuencias utilizadas para su reconocimiento y purificación (*c-myc* y 6xHis) (CHH_n y MIH_n), fueron clonados exitosamente en el vector de expresión eucariota pPICZαA de *P. pastoris*.

De acuerdo al ensayo de inducción para la síntesis de MIH_n y CHH_n, las condiciones óptimas para su producción fueron 2% metanol durante 2 días.

El análisis de secuenciación mediante degradación de Edman del extremo N-terminal de la MIH_n sintetizada, evidenció que esta fue sintetizada de manera exitosa a partir del vector de expresión eucariota pPICZαA de *P. pastoris*.

La MIH_n producida por *P. pastoris* (X-33), estuvo formada por una mezcla heterogénea que incluía la secuencia esperada de MIH_n así como otras MIH_n con 2 y 4 aminoácidos extras (EA, EA EA) en su extremo N-terminal, lo que indicó que las repeticiones Glu-Ala no fueron procesadas correctamente por la proteasa Kex2.

La presencia de otras proteínas mayoritarias propias de la levadura indicó que la estrategia seguida para su purificación no fue la óptima para la obtención de fracciones puras de MIH_n.

Las construcciones que incluyeron los genes que codifican para las neurohormonas CHH y MIH, un sitio de reconocimiento para la proteasa Enteroquinasa y la eliminación de las secuencias correspondientes a las repeticiones Glu-Ala, fueron clonados exitosamente en el vector de expresión eucariota pPICZ α A de *P. pastoris*.

El análisis de Western blot comprobó la síntesis de la hormona recombinante MIH_{His} pero no así la de CHH_{His}. Es probable que un problema a nivel de traducción o postraduccional sea la causa de la ausencia de CHH_{His}, ya que el análisis de secuenciación mostró una correcta inserción de CHH_{His} y el RT-PCR indicó que el gen se transcribió a nivel de ARN_m.

La purificación de MIH_{His} mediante afinidad permitió la eliminación de otras proteínas presentes en el medio de cultivo, obteniéndose fracciones puras de la proteína esperada con un alto rendimiento (8.7 mg·l⁻¹) en comparación con otras hormonas recombinantes producidas en *Pichia*.

El análisis de secuenciación de MIH_{His} indicó que la eliminación de la secuencia que codifica para las repeticiones Glu-Ala no afectó el procesamiento de la señal α -factor, obteniéndose únicamente secuencias de MIH_{His} con el extremo N-terminal esperado.

El sitio de reconocimiento para la enzima Enteroquinasa insertado en el extremo C-terminal de la secuencia de MIH_{His} fue reconocido e hidrolizado exitosamente por la enzima.

CAPÍTULO II

VI. Ensayo de actividad de la hormona recombinante inhibidora de la muda (MIH_{His})

VI.1. Introducción

En endocrinología el análisis de la actividad biológica de las hormonas resulta fundamental para elucidar los procesos fisiológicos en los que interviene. Estos estudios requieren de cantidades importantes de hormonas nativas, lo que representa un problema cuando se trata de organismos de tamaño pequeño como son los camarones peneidos. En el caso de las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH las cuales son sintetizadas por el OX-GS, este problema se incrementa ya que además de requerir grandes cantidad de material biológico (pedúnculos oculares) para obtener un cantidad suficiente de producto, la similitud en tamaño y estructura de las neurohormonas dificulta su aislamiento (Huberman, 2000). Es por ello que la tecnología del ADN recombinante para la producción de neurohormonas heterólogas representa una alternativa viable para obtener de manera relativamente sencilla estas neurohormonas, las cuales pueden ser empleadas en estudios futuros que permitan conocer su papel en fisiológico, sus receptores, su ruta de señalización, así como en estudios de estructura-función (Keller, 1992).

A la fecha existen algunos trabajos donde se han producido y evaluado la actividad biológica hormonas recombinantes CHH y MIH de *Penaeus monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2002 y 2003; Udomki *et al.*, 2004; Yodmuang *et al.*, 2004), *Penaeus japonicus* (Ohira *et al.*, 2003), *Metapenaeus ensis* (Gu *et al.*, 2000 y 2001). Sin embargo, en el caso de *Litopenaeus vannamei* aún cuando se han producido hormonas recombinantes de CHH y MIH, su actividad biológica no ha sido evaluada (Sun, 1997, Organes 2004).

Considerando el papel multifuncional que se ha observado en algunas neurohormonas de la familia CHH/MIH/CHH, la importancia de evaluar las hormonas recombinantes no sólo radica en determinar su efecto en el proceso para el cual ha sido previamente establecido, sino en otros en los que presumiblemente interviene.

VI.2. Objetivo

1. Evaluar la actividad biológica de la neurohormona recombinante MIH_{His} en el metabolismo de la glucosa.

VI.3. Materiales y métodos

Para evaluar el efecto de la neurohormona recombinante MIH_{His} en el metabolismo de la glucosa se diseñó un ensayo en los que se utilizaron camarones juveniles de *L. vannamei* de 10-30 g de peso. Con el propósito de llevar a cabo el seguimiento individualizado de los organismos, se colocó un camarón por cubeta (4 l). Durante el experimento el oxígeno disuelto se mantuvo a $5.8 \pm 0.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ por aereación constante y la temperatura a 26 °C mediante calentadores de 1000 w. Diariamente los camarones fueron alimentados con 5% de su peso y los restos de alimento así como las heces retiradas con un sifón.

Una vez que los organismos alcanzaron el estadio de intermuda se les removió un pedúnculo con tijeras y se cauterizó la herida. Posterior a la cauterización se esperó a que mudaran y alcanzaran el estadio de intermuda nuevamente y se procedió con el ensayo.

VI.3.1 Efecto hiperglucémico de MIH_{His}

Por cada tratamiento se analizaron cinco organismos. Una vez que los organismos ablacionados unilateralmente alcanzaron su estadio de intermuda, estos fueron mantenidos en inanición 12 horas previas al ensayo. Cinco organismos fueron inyectados con 2 μg (aproximadamente 150 pmol) de MIH_{His} disuelta en solución salina (100 μl) mediante una jeringa de insulina a través de la membrana artrodial. Como control positivo se utilizó un grupo de camarones a los que se les inyectaron 100 μl de extracto correspondiente a un pedúnculo. Otro grupo de camarones, a los que se les inyectaron 100 μl de solución salina se utilizó como control negativo. Previo a la inyección se extrajeron 100 μl de hemolinfa con 200 μl de solución anticoagulante para establecer el nivel basal de glucosa. Una vez que los camarones de los diferentes tratamientos fueron inyectados, se extrajeron nuevamente 100 μl de hemolinfa para cuantificar el nivel de glucosa a los 30, 60, 120 y 180 min. La muestra de hemolinfa fue centrifugada (800 x g, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante recuperado y almacenado a -20 °C para su análisis posterior. La determinación de glucosa se llevó a cabo con un kit comercial (Eagle Diagnostics) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y empleando un espectrofotómetro SmartSpec Plus (BioRad).

VI.4. Resultados y Discusión

El efecto hiperglucémico en la hemolinfa de los organismos inyectados con el extracto de pedúnculo (control positivo) y con la proteína recombinante se observó después de 60 minutos de su inyección (Fig. 29). Aun cuando el nivel de glucosa más alto para la hormona recombinante fue de 12.8 $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$, este fue relativamente bajo si lo comparamos con el alcanzado con el extracto de pedúnculo, sin embargo esto pudo deberse a la

diferencia en el tamaño de organismos por lo al inyectar el extracto de glándulas en los organismos más pequeños se pudo haber inyectado más de lo correspondiente al pedúnculo ablacionado. En general, los valores de glucosa obtenidos en este ensayo, incluyendo todos los tratamientos, oscilaron en promedio entre 2 y 22.3 mg·dl⁻¹, los cuales son superiores a los de trabajos similares donde se han reportado valores promedio máximos de alrededor de 8 a 11 mg·dl⁻¹ (Gu *et al.*, 2000; Ohira *et al.*, 2003; Udomkit *et al.*, 2004). Esta diferencia en los valores de glucosa puede deberse a que en nuestro caso se emplearon camarones ablacionados unilateralmente y no bilateralmente, como en los otros ensayos, es por ello que probablemente la liberación de hormonas nativas y en particular de CHH a partir del pedúnculo presente ocasionó un mayor efecto hiperglucémico. Tanto en los organismos inyectados con la hormona recombinante como en los controles se observó un aumento gradual en los niveles de glucosa a los 30 y 60 min de la inyección y una disminución gradual de los niveles a los 120 y 280 min pero sin alcanzar el nivel basal. A los 60 min de la inyección con la proteína recombinante el nivel de glucosa fue más del doble (12.8 mg·dl⁻¹) que para aquellos del control negativo (5.8 mg·dl⁻¹). Sin embargo, no hubo una diferencia significativa entre los valores por lo cual no se puede corroborar que la hormona recombinante MIH_{His} haya tenido un efecto hiperglucémico. Debido a la tendencia observada y los problemas en el número y talla de los organismos empleado se evidenció la necesidad de realizar estudios posteriores con un mayor número de organismos de la misma talla.

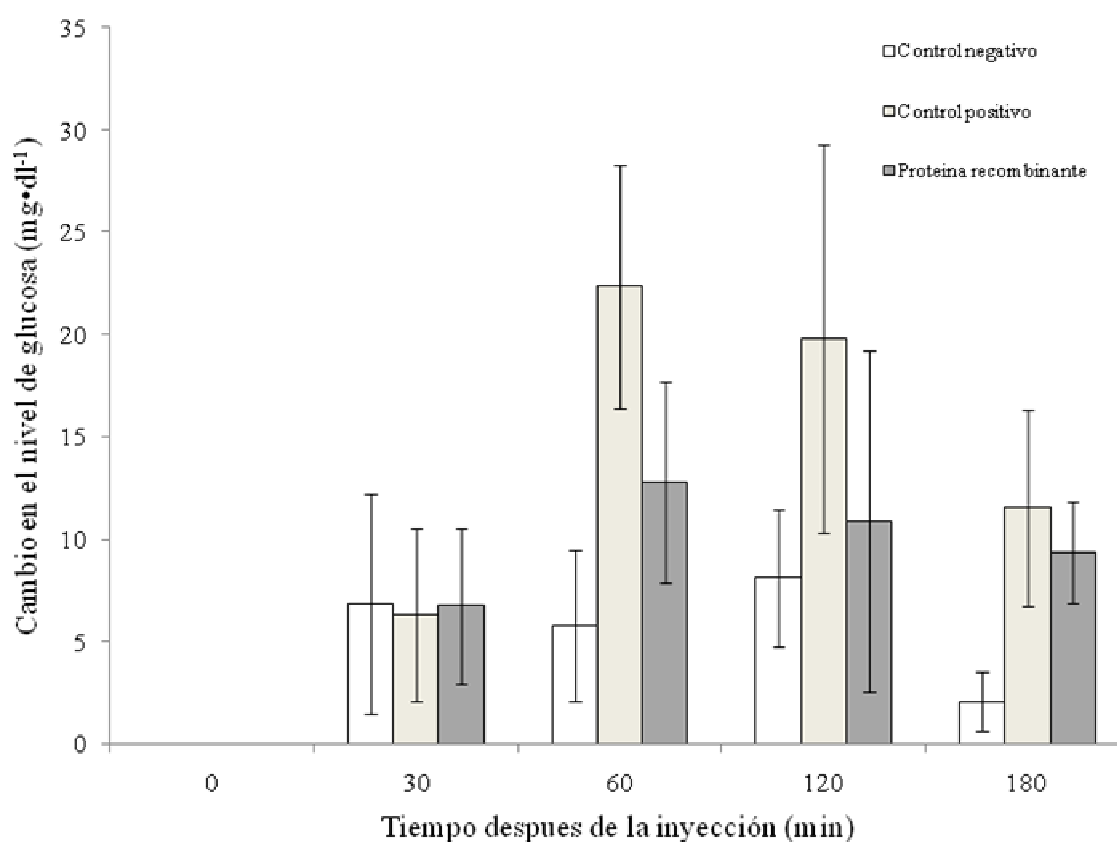


Figura 29. Nivel de glucosa en hemolinfa de camarones *L. vannamei* ablacionados unilateralmente e inyectados con 100 μ l de solución salina (control negativo), extracto crudo de un pedúnculo (control positivo) y 2 μ g de proteína recombinante MIH_{His}. La hiperglucemia se presenta como el cambio en el nivel de glucosa para cada tiempo con respecto al tiempo 0, el cual corresponde a antes de la inyección. Las barras indican la desviación estándar (n=5).

El hecho de haber realizado el ensayo de hiperglucemia para la proteína recombinante MIH_{His}, se debe a que si bien el gen *mih-1* a partir de cual se sintetizó esta hormona fue clonado utilizaron cebadores diseñados a partir de *mih* de *H. americanus*, su arreglo estructural y las características de su secuencia peptídica son más acordes con la subfamilia

CHH (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Por otro lado, MIH de *H. americanus* presenta tanto actividad hiperglucémica como inhibidora de la muda, por lo que este podría ser el caso de MIH_{His} de *L. vannamei* (Chang *et al.*, 1990). De acuerdo al análisis estructural del gen *mih-1* de *L. vannamei* realizado por Lago-Lestón y colaboradores (2007), este gen presenta un arreglo de 4 exones y 3 intrones el cual es considerado como característico de algunos miembros de la subfamilia CHH (Chen *et al.*, 2005). Las evidencias señalan al corte y empalme alternativo en la transcripción de genes *chh* como el origen de las diferentes isoformas encontradas en neurohormonas CHH, lo cual se apoya en el hecho de que las isoformas hasta el momento identificadas corresponden a la subfamilia CHH. Por otro lado, el patrón de 4 exones de *mih-1* también lo presenta la isoforma CHH-L de *M. rosenbergii* y *P. clarkii*, y la isoforma CHH-PO de *C. maenas*, lo cual se considera como un indicativo del posible papel hiperglucémico de MIH_{His} (Lago-Lestón *et al.*, 2007).

Otra característica que sugiere que MIH_{His} es en realidad CHH, se basa en la ausencia de un residuo de glicina en la posición 12 la cual es característica de otros MIH. Todos estos indicios señalan a MIH_{His} como una potencial CHH, es por ello que el análisis de actividad de esta neurohormona se consideró indispensable para comprobar su actividad hiperglucémica y reconsiderar ser reconocida como CHH o si presenta las dos actividades (hiperglucémica e inhibidora de la muda) como la MIH de *H. americanus*.

La ausencia de un extremo C-terminal amidado en la proteína recombinante MIH_{His} pudo haber jugado un papel determinante en su potencial actividad hiperglucémica. En los estudios donde se ha evaluado el efecto hiperglucémico de neurohormonas recombinantes

CHH de *P. monodon* y *M. ensis* a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 min), los niveles máximos de glucosa en hemolinfa se observaron a los 60 min posteriores a la inyección, con valores que van de los 3.05 a 11.0 mg·dl⁻¹ (Gu *et al.*, 2000; Udomkit *et al.*, 2004). Si bien el nivel de respuesta puede ser atribuido en primera instancia a la cantidad de hormona utilizada en los ensayos, llama la atención que los niveles menores de glucosa observados fueron cuando se inyectaron 5 µg de proteína recombinante pura, mientras que los mayores niveles fueron con 2 µg. La baja actividad hiperglucémica (3.05- 3.58 mg·dl⁻¹) se atribuyó a la ausencia de un extremo C-terminal amidado en la proteína recombinante (Udomkit *et al.*, 2004). En el estudio realizado por Katayama y colaboradores (2002) donde se evaluó la actividad hiperglucémica de neurohormonas CHH recombinantes que presentaban el C-terminal libre y amidado se observó que ambas presentaron actividad hiperglucémica, sin embargo esta última presentó una mayor capacidad hiperglucémica, lo que sugiere que no sólo el extremo C-terminal amidado sino también la estructura de la proteína son necesarias para conferir actividad hiperglucémica. Sin embargo, en algunos casos la ausencia del C-terminal amidado no parece ser determinante en la actividad hiperglucémica de CHH. En el trabajo realizado por Gu y colaboradores (2000) con la proteína recombinante CHH de *M. ensis*, esta presentó actividad hiperglucémica aún cuando el extremo C-terminal no estaba amidado. El valor de hiperglucemia para esta proteína fue de aproximadamente 11.0 mg·dl⁻¹, ligeramente mayor al obtenido a partir de la proteína recombinante con el extremos amidado (8.0 mg·dl⁻¹) aún cuando en ambos ensayos se utilizaron cantidades similares de proteína (~100 pmol). Dado lo anterior, es posible que la baja actividad hiperglucémica de MIH_{His} se debiera a la ausencia de su extremo C-terminal amidado, y no se descarta que los 22 aminoácidos adicionales presentes en el extremo C-terminal sean los responsables de

esta baja actividad. Sin embargo, cabe mencionar que en el caso de la hormona recombinante CHH de *M. ensis*, la presencia de 20 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal no afectaron su actividad e incluso su respuesta fue similar a la de extracto crudo de pedúnculo.

Por otro lado, con base en los análisis de transcripción de *mih* realizados por Lago- Lestón y colaboradores (2007), se puede sugerir un posible incremento en la actividad hiperglucémica a temperaturas y salinidades altas, así como en otras condiciones de estrés. De hecho la actividad hiperglucémica podría ser utilizada como un parámetro de estado de salud del camarón

Un ensayo futuro con un mayor número de organismos con un menor intervalo de tallas permitirá corroborar el efecto hiperglucémico de la proteína recombinante MIH_{His}. El hecho de haber utilizado un tamaño de muestra pequeño con organismos con un amplio intervalo de tallas (de 10 a 30 g de peso), repercutió de manera importante en las amplias variaciones observadas. Por otro lado, el ensayo deberá incluir organismos ablacionados bilateralmente con el propósito de determinar si el efecto hiperglucémico observado se debe únicamente a la proteína inyectada y no a la liberada por el pedúnculo como es el caso de organismos ablacionados unilateralmente. Por otro lado, a partir de lo observado en este y otros trabajos, se sugiere que el nivel de hiperglucemia sea evaluado a un sólo tiempo, entre los 60 y 120 min posteriores a la inyección, cuando alcanza su máximo, ya que las extracciones repetidas de hemolinfa pueden estar influyendo de manera importante en los resultados obtenidos.

Finalmente, un ensayo futuro de MIH_{His} para evaluar su efecto en la muda no deber ser descartado. Los estudios de actividad con neurohormonas recombinantes MIH donde se ha evaluado su efecto en la muda de *P. monodon* y *M. ensis*, han demostrado su efecto inhibitorio al incrementar el periodo de muda en hasta 5 días con respecto a los 12 días observados en los tratamientos control donde se inyectó PBS (Gu *et al.*, 2001; Yodmuang *et al.*, 2004). Dado lo anterior, se sugiere que la inyección de hormonas recombinantes MIH_{His} , durante el periodo de intermuda, podría incrementar el efecto de MIH endógeno dando como resultado periodos de muda más largos (Yodmuang *et al.*, 2004). En este sentido si MIH_{His} presentara un efecto inhibitorio en la muda, es de esperarse que esta incremente el periodo de muda hasta en un 50% como se observó en otros trabajos.

VI.5 Conclusiones

Las limitaciones en número de organismos y diferencias en talla no permitieron evidenciar el efecto hiperglucémico significativo de MIH_{His} en los camarones, sin embargo se observó una ligera tendencia hiperglucémica que debe ser corroborada en el futuro.

La eliminación de los 22 aminoácidos adicionales presentes en el extremo C-terminal de MIH_{His} debe ser considerado en futuros ensayos de actividad, ya que esto pudiera incrementar su efecto hiperglucémico.

CAPÍTULO III

VIII. Anticuerpos anti-CHH y anti-MIH

VII.1 Introducción

En los últimos diez años, los estudios relacionados con la endocrinología en crustáceos se han centrado en la purificación y el modo de acción de las neurohormonas de la familia peptídica CHH/MIH/GIH secretadas por el complejo órgano X-glándula sinusal (OX-GS). La importancia de esta familia radica en su papel en el control de varios procesos fisiológicos como son el metabolismo de la glucosa, el crecimiento y la reproducción (Keller, 1992; Fingerman, 1997). Entre los neuropéptidos incluidos en esta familia, y en los que nos enfocaremos en esta sección, se incluyen la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) y la hormona inhibidora de la muda (MIH).

La principal función de CHH es la regulación del metabolismo de la glucosa mientras que la de MIH es la de mantener al organismo en un periodo de intermuda al inhibir la síntesis de ecdiesteroides. Sin embargo, se ha observado que estas hormonas son multifuncionales, ya que regulan procesos adicionales, sobrelapando sus actividades con las de otras hormonas de la misma familia CHH/MIH/GIH (Khayat *et al.*, 1998; de Kleijn y van Herp, 1998; de Kleijn *et al.*, 1998). En el caso de CHH, además de incrementar el nivel de glucosa en hemolinfa, interviene en procesos osmorregulatorios (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000), en el metabolismo de lípidos (Santos *et al.*, 1997), así como en la regulación de la síntesis de ecdiesteroides (Yasuda *et al.*, 1994) y vitelogenina (Khayat *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha observado que MIH puede presentar actividad hiperglucémica (Chang *et al.*, 1990; Sonobe *et al.*, 2001).

Hasta hace algunos años, los estudios para observar el comportamiento de dichas hormonas estaban basados en el empleo de técnicas tales como la ablación del pedúnculo ocular, extirpación o reimplantación de un órgano e inyección de extractos de glándula (de Kleijn y van Herp, 1998). Sin embargo, con la introducción de las técnicas de biología molecular se ha logrado conocer la estructura y secuencia de algunos genes que codifican estas hormonas lo que ha facilitado el estudio de su regulación (Fingerman, 1997; Huberman, 2000). Si bien se han hecho grandes progresos a este respecto, aun no se han logrado establecer de manera precisa los mecanismos de acción de estas neurohormonas ni los factores que desencadenan su respuesta.

La endocrinología en crustáceos es un tema complejo que debe ser abordado desde diferentes aristas, lo cual permitirá tener una visión integral de los procesos tanto a nivel celular como fisiológico. El empleo tanto de neuropéptidos nativos purificados como heterólogos ha permitido conocer su efecto a nivel fisiológico mediante análisis *in vivo*, mismo que ha llevado a reconocer el papel multifuncional tanto de CHH como MIH. Por otro lado, el efecto de los factores ambientales en la síntesis de estas neurohormonas así como sus variaciones internas pueden ser analizadas determinando sus niveles y variaciones en la glándula sinusal y hemolinfa. En este sentido, el empleo de sueros policlonales es una herramienta que ha sido utilizada principalmente en ensayos de inmunocitoquímica para determinar la presencia de estas neurohormonas en diferentes tejidos utilizando tanto sueros homólogos como heterólogos (Giulianini *et al.*, 2002;

Azzouna *et al.* 2003). Sin embargo, ha sido poco empleada para evaluar los cambios de las neurohormonas a través del tiempo.

Los anticuerpos son una de las herramientas más ampliamente utilizadas en los estudios donde se evalúa la expresión de ciertos moduladores endocrinos durante el ciclo reproductivo de varias especies. Por otro lado, Huberman (2000) ha resaltado la importancia de los estudios endocrinológicos básicos y su aplicación en la acuicultura de crustáceos.

La producción de sueros policlonales contra CHH ha permitido desarrollar ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para evaluar sus variaciones en el tiempo como respuesta a diferentes condiciones de estrés en algunas especies de crustáceos. Si bien existen numerosos trabajos donde se analiza el nivel de glucosa como un indicador de estrés ambiental, son pocos los que evalúan los niveles de CHH en la glándula sinusal y la hemolinfa. Con respecto a estos últimos trabajos, los factores de estrés evaluados incluyen hipoxia, temperatura, salinidad, metales pesados y lipopolisacáridos bacterianos entre otros (Webster, 1996; Chang *et al.*, 1998; Wilcockson *et al.*, 2002, Zou *et al.*, 2003; Lorenzon *et al.*, 2004). Por otro lado, se han analizado también las variaciones de CHH durante el ciclo de muda del cangrejo *Carcinus maenas* (Chung *et al.*, 1999). Para la neurohormona MIH, se desarrolló un suero policlonal que permitió evaluar los cambios en el nivel de MIH en la glándula sinusal y hemolinfa con respecto al de ecdiesteroides durante el ciclo de muda de *Procambarus clarkii* (Nakatsuji *et al.*, 2000; Nakatsuji y Sonobe 2003).

En el caso particular de camarones peneidos, se cuenta con dos trabajos donde se han producido sueros policlonales contra las hormonas CHH y MIH a partir de proteínas recombinantes. Por un lado, Treerattrakool y colaboradores (2006), desarrollaron un suero anti-Pem-CHH1 el cual al ser inyectado en camarones redujo su nivel de glucosa en hemolinfa entre 30-50%, lo que ha llevado a sugerir su empleo como una estrategia para regular el crecimiento y reproducción de *P. monodon* al inhibir la neurohormona CHH. Asimismo, Gu y colaboradores (2001) detectaron la presencia de MIH mediante ensayos inmunocitoquímicos en el complejo OX-GS de *Metapenaeus ensis*.

Actualmente no se cuentan con anticuerpos contra CHH y MIH de *L. vannamei*, sin embargo se ha observado actividad cruzada al utilizar un antisuero de langosta (anti-lobster cHH_A) en fracciones purificadas de un extracto de glándula sinusal (Sefiani *et al.*, 1996). Sin duda el empleo de anticuerpos específicos contra CHH y MIH de *L. vannamei* es deseable, sobre todo si se pretenden utilizarlos en estudios que coadyuven en el entendimiento de los procesos en los que intervienen estas neurohormonas así como de los factores ambientales que desencadenan su respuesta. En este sentido, la producción de sueros policlonales contra CHH y MIH permitirá su utilización en ensayos inmunoenzimáticos para evaluar cambios en los niveles de estas neurohormonas por efecto de la exposición de *L. vannamei* a diferentes condiciones de estrés.

VII.2 Objetivos

1. Producir sueros policlonales contra las neurohormonas CHH y MIH de *L. vannamei* a partir de péptidos sintéticos.
2. Evaluar la reacción cruzada de los sueros policlonales obtenidos contra las hormonas MIH y CHH recombinantes purificadas así como de un extracto de glándula sinusal y hemolinfa.

VII.3 Materiales y métodos

VII.3.1 Diseño y síntesis de péptidos CHH y MIH

Para el diseño de los péptidos sintéticos CHH y MIH, se analizaron las secuencias de las neurohormonas maduras respectivas mediante el programa computacional EpiShot™ donde se evaluó su perfil antigénico. Este análisis se realizó mediante la asesoría de la empresa Bio Abgent, Inc (San Diego, CA, USA) la cual desarrolló el programa computacional donde se analizan las secuencias proteicas y se seleccionan los fragmentos considerados como los mejores candidatos para la producción de anticuerpos.

Una vez que se seleccionaron los fragmentos de los péptidos CHH y MIH con mayor valor antigénico, estos fueron sintetizados por la compañía Abgent, Inc mediante el método de síntesis química por Fmoc en fase sólida y acoplados a albúmina de suero bovino (BSA) como proteína acarreadora para incrementar su capacidad inmunogénica.

VII.3.2 Inmunización con antígenos CHH y MIH

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra los péptidos sintéticos CHH y MIH se inmunizaron dos conejos machos raza Nueva Zelanda (*Sylvilagus floridanus*) de 2.5 kg de peso. Los animales utilizados fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California en condiciones óptimas de manejo y alimentación (Purina).

Los péptidos sintéticos CHH y MIH acoplados a BSA fueron disueltos en 500 de amortiguador salino de fosfatos (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y se les agregó en 500 µl de adyuvante completo de Freud (Sigma) o adyuvante incompleto de Freud (Sigma), se emulsificó completamente y se inyectó en los animales por vía subcutánea en varios puntos de la parte dorsal inferior previamente rasurada y desinfectada de acuerdo al protocolo de inmunización (Tabla II).

Tabla II. Esquema de inmunización de los péptidos sintéticos CHH y MIH

Día	Actividad
1	Sangrado preinmune* Inmunización con 100 µg de complejo + 500 µl de PBS + 500 µl de ACF
7	Primer refuerzo Reinmunización con 70 µg de complejo + 500 µl de PBS + 500 µl de AIF
20	Segundo refuerzo Reinmunización con 70 µg de complejo + 500 µl de PBS + 500 µl de AIF
25	Sangrado inmune**

* 3 ml por conejo; ** 15 ml por conejo; PBS: amortiguador salino de fosfatos; ACF: adyuvante completo de Freud; AIF: adyuvante incompleto de Freud.

VII.3.3 Obtención de sueros preinmunes e inmunes de conejo

Antes de iniciar la inmunización de los conejos con los péptidos sintéticos se les extrajeron aproximadamente 3 ml de sangre mediante una incisión en la vena marginal de la oreja. Esto con el objeto de comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente a los antígenos utilizados. La sangre se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. Posteriormente el coágulo fue removido y el suero centrifugado a $2000 \times g$, por 5 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se almacenó a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el sangrado inmune se extrajeron 15 ml de sangre de la oreja de cada conejo. La recuperación del suero inmune se realizó como se describió para el suero preinmune. Los sueros recuperados fueron denominados, sueros preinmunes, suero inmune antiCHH y suero inmune antiMIH.

VII.3.4 Titulación de los sueros inmunes antiCHH y antiMIH

Una vez que se obtuvieron los sueros inmunes antiCHH y antiMIH se procedió con el ensayo de titulación de anticuerpos para evaluar la capacidad inmunogénica de los péptidos sintéticos CHH y MIH mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). En la valoración de los títulos se utilizaron diferentes diluciones de los sueros preinmunes e inmunes en PBS-BSA 1% (v/v), 1:50, 1:100, 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000 y 1:25,000. Como antígeno se emplearon $0.4 \mu\text{g}$ de péptido sintético no acoplado a BSA. Como blanco se utilizó PBS y como control negativo BSA.

Para el ensayo ELISA se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos con $300 \mu\text{l}$ de capacidad y un nivel de adherencia alta (Costar). Las pruebas de titulación se hicieron por

triplicado. A cada pozo se les agregaron 50 μ l de una solución de los péptidos disueltos en PBS ($8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Una vez que se eliminó la solución con los péptidos, se realizó el bloqueo con 200 μ l de BSA-PBS 3% (p/v) y se incubaron en las mismas condiciones. Previo lavado de los pozos con PBST (PBS + 0.05% (v/v) Tween 20), se agregaron 50 μ l de los respectivos sueros preinmunes e inmunes diluidos, y se incubó en las mismas condiciones. Los pozos fueron lavados nuevamente con PBST, se les adicionaron 50 μ l del anticuerpo secundario de carnero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido (1:3000) en BSA-PBS 1% (p/v) y se incubó nuevamente por 2 hrs a 37 °C. Se lavó con PBST y se llevó a cabo el revelado utilizando 50 μ l de sustrato ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en buffer de citratos (ácido cítrico 50 mM; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 mM; pH 4.1) y H_2O_2 al 30%. Finalmente se incubó en oscuridad a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA (BioRad) a los 15 minutos.

VII.3.5. Inmunodetección de la proteína recombinante MIH_{His} , MIH y CHH nativas usando sueros policlonales.

La inmunodetección de la proteína recombinante MIH_{His} y MIH nativa de un extracto de glándula sinusal así como de hemolinfa utilizando suero antiMIH se realizó mediante el método de Western blot y ELISA. Dado que para CHH no se contó con su proteína recombinante la inmunodetección solo se llevo a partir del extracto de glándula y hemolinfa.

La proteína recombinante MIH_{His} utilizada en este análisis se obtuvo de acuerdo a lo descrito en el Capítulo I. El extracto de glándula sinusal se obtuvo a partir de la disección de aproximadamente 50 pedúnculos oculares de camarones juveniles (10-15 g) de *L. vannamei*. Las glándulas fueron homogenizadas en 1 ml de PBS y el homogenizado centrifugado a 10,000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado, liofilizado y finalmente resuspendido en PBS y almacenado a -20 °C hasta su empleo posterior. La hemolinfa de camarón (500 µl) se obtuvo del primer segmento ventral utilizando un jeringa de 3 ml con 1.0 ml de solución anticoagulante fría (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA-Na₂ 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3) (Vargas-Albores *et al.*, 1993). La muestra fue centrifugada (800 x g, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante recuperado y almacenado a -20 °C hasta su análisis. Se determinó la concentración de proteínas del extracto de glándula sinusal y hemolinfa mediante la técnica del ácido bicinónico como lo indica el proveedor (Pierce).

Aproximadamente 10 µg de proteína recombinante purificada MIH_{His} y 90 µg de proteínas totales del extracto de glándula sinusal y hemolinfa fueron analizados en geles desnaturizantes de tricina al 12% (Tricina-SDS-PAGE). Una vez que las proteínas fueron separadas estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante la técnica de transferencia semiseca. Los detalles de esta técnica se describen en la sección V.3.2.2.4.1.3 (Inmunodetección de proteínas recombinantes (Western blot)).

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó por 3 hrs a temperatura ambiente con agitación moderada en PBST con 5% (p/v) de

leche descremada (Svelty), seguida de 12 hrs de incubación a 4 °C y agitación moderada en PBST con 1% (p/v) de leche descremada y los sueros inmunes. Para el suero anti-CHH se utilizó una dilución 1:200 y para anti-MIH 1:2000. Posteriormente la membrana fue lavada cuatro veces durante 10 min con agitación moderada en PBST. Finalmente las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia con el reactivo Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham Biosciences) en una placa fotográfica de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Para el ensayo de ELISA se procedió como se describe en el punto VII.3.4. Como en el caso del Western blot, se analizaron 30 µg de proteínas, las diluciones de los sueros inmunes fueron las utilizadas en el ensayo de Western blot.

VII.4 Resultados y discusión

VII.4.1 Diseño y síntesis de péptidos CHH y MIH

La selección de un péptido o fragmento de aminoácidos a partir de la secuencia completa de una proteína para determinar la región más adecuada para la producción de anticuerpos contra la proteína de interés, ha sido sujeto de estudio mediante diferentes algoritmos predictivos. Aun cuando cada algoritmo evalúa ciertos atributos fisicoquímicos de los aminoácidos, todos se basan en el mismo principio, el cual considera que el sistema inmune produce anticuerpos contra regiones que están presentes en la superficie de la proteína (Jamenson y Wolf, 1988; Pellequer *et al.*, 1991; van Regenmortel y Pellequer, 1994)

Las secuencias de las neurohormonas CHH y MIH fueron evaluadas utilizando el programa EpiShot™. Mediante este programa se analizaron los atributos fisicoquímicos de los aminoácidos (hidrofilicidad, vuelta β , accesibilidad y flexibilidad) asociados a un mayor potencial de antigenicidad. Los resultados de estos análisis se presentan en las Figuras 30 y 31 para CHH y MIH, respectivamente.

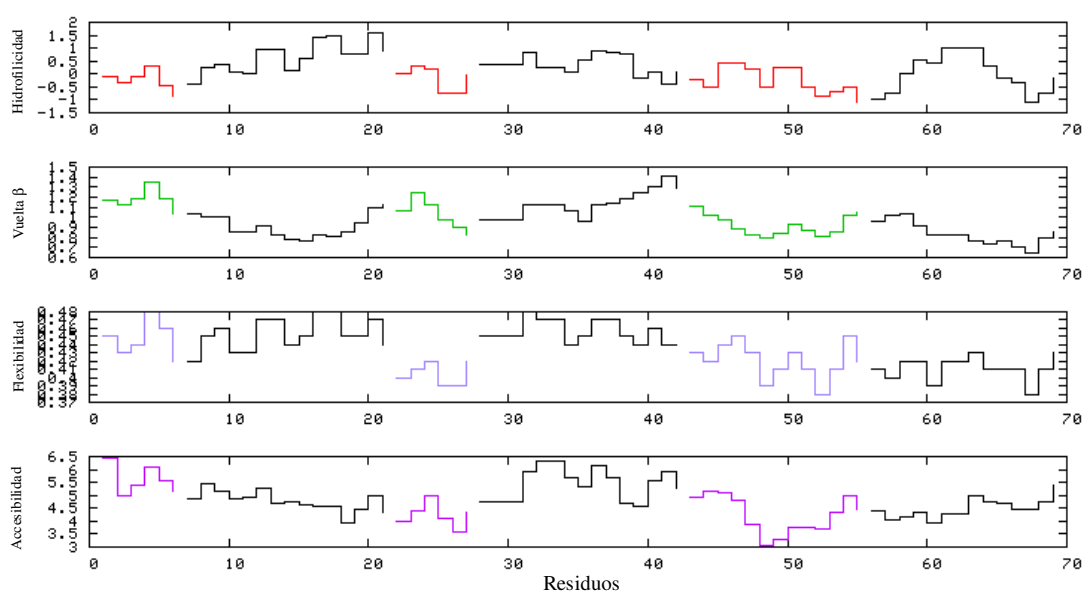


Figura 30. Resultados del análisis teórico de antigenicidad de la neurohormona CHH de *P. vannamei* utilizando el programa EpiShot™. En el eje de las y se presentan los valores de las propiedades analizadas por el programa. El eje de las x representa los residuos de aminoácidos de la proteína CHH. Las regiones antigénicas consideradas para la producción de anticuerpos se señalan en negro.

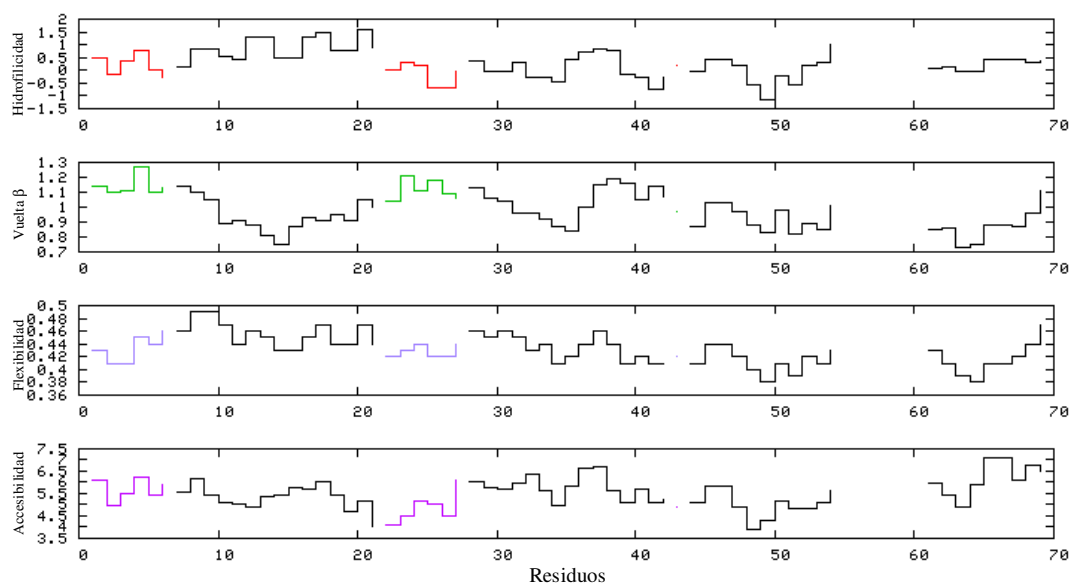


Figura 31. Resultados del análisis teórico de antigenicidad de la neurohormona MIH de *P. vannamei* utilizando el programa EpiShot™. En el eje de las y se presentan los valores de las propiedades analizadas por el programa. El eje de las x representa los residuos de aminoácidos de la proteína MIH. Las regiones antigénicas consideradas para la producción de anticuerpos se señalan en negro.

Dado que el propósito del trabajo era obtener anticuerpos que reconocieran proteínas nativas, el diseño del péptido sintético que se utilizó para generar la respuesta inmunológica fue de vital importancia. Uno de los aspectos a considerar fue la accesibilidad de la secuencia en la proteína nativa, ya que si la secuencia seleccionada no está accesible no será reconocida por los anticuerpos. Las secuencias no accesibles (puntuación baja) son estadísticamente más hidrofóbicas, menos flexibles (más empaquetadas) y menos solubles. En contraparte, un buen epítipo (puntuación alta) es más hidrofílico, más flexible y más accesible a los solventes acuosos.

Otros aspectos que evalúa el programa EpiShot™ incluyen el tamaño del péptido, modificaciones postraduccionales, facilidad de síntesis, solubilidad y homología. Con respecto al tamaño del fragmento se sugiere entre 12 y 25 aminoácidos, ya que péptidos de mayor tamaño pueden adoptar estructuras conformacionales diferentes a la de la nativa dando lugar a anticuerpos que no reconocen a la proteína nativa. Los péptidos pequeños (< 12 aminoácidos) no proveen la suficiente diversidad de epítomos y producirían un intervalo reducido de anticuerpos, limitando así la oportunidad de generar anticuerpos que reconozcan la proteína nativa. Por otro lado, se debe evitar que los péptidos presenten secuencias potenciales de modificaciones postraduccionales ya que estas modificaciones, presentes en la proteína nativa, pueden bloquear el sitio de reconocimiento por los anticuerpos que se generen.

Si bien, para la generación de anticuerpos a partir de un péptido se consideran prioritarias sus características inmunogénicas potenciales, otros aspectos que deben ser considerados incluyen su facilidad de síntesis, solubilidad y homología con otras secuencias de proteínas. Con respecto a este último punto, se seleccionaron regiones únicas de CHH y MIH para evitar reacciones cruzadas entre ellas ya que presentan regiones con una alta homología. Cabe señalar que el porcentaje de homología entre las dos neurohormonas es del 39.7% (Lago-Lestón *et al.*, 2007).

Todos los atributos arriba mencionados fueron considerados para el diseño de los péptidos sintéticos CHH y MIH mediante el programa EpiShot™. Los valores ponderados que resultan de este programa van de 1 al 5, siendo 5 el que predice mayor antigenicidad. En

este sentido, el fragmento sugerido para CHH fue TGVFDRQLLRRLRRV el cual se ubica en la posición 8-22 y presenta un valor de antigenicidad de 3.4 (ver Fig. 30). Para MIH el fragmento fue KGIYDRELFKLDLV, ubicado en la posición 8-22 y un valor de 4.5 (ver Fig. 31). Ambos péptidos fueron acoplados a BSA en su extremo C-terminal con la intención de incrementar la capacidad inmunogénica, debido a que por ser moléculas pequeñas su inmunogenicidad es baja (Harlow y Lane, 1988).

VII.4.2 Titulación de los sueros inmunes antiCHH y antiMIH

La titulación de los sueros inmunes anti-CHH y anti-MIH mostró una buena capacidad de reacción contra los péptidos sintéticos utilizados como antígenos como se observa en las Figuras 32 y 33, respectivamente. Por otro lado, los valores obtenidos para los sueros preinmunes indican que los conejos no presentaron respuesta inmunológica previa frente a los antígenos utilizados para su inmunización. La comparación de las curvas de titulación de los sueros inmunes indica que MIH fue más efectivo en la generación de anticuerpos, ya que su curva de titulación muestra lecturas de absorbancia mayores que la curva de anti-CHH. Esto podría estar relacionado con el valor de antigenicidad teórico calculado para los péptidos sintéticos, ya que para MIH fue de 4.5 y el de CHH fue de 3.2. Mientras las mejores respuestas del suero anti-CHH se observaron en las diluciones 1:50 y 1:100, para anti-MIH lo fueron 1:50, 1:100, 1:1000 y 1:5000, siendo el valor de esta última dilución (0.456 UA) similar al obtenido para la dilución 1:100 de anti-CHH (0.524 UA).

Con respecto a los resultados obtenidos para los controles negativos utilizados en la titulación de los sueros inmunes, se determinó que los conejos no desarrollaron respuesta

inmune contra el BSA como podía haber ocurrido ya que los péptidos fueron acoplados a BSA para incrementar su respuesta inmunogénica. Por otro lado, no se observó una reacción cruzada de los sueros inmunes contra los péptidos utilizados (Fig. 32 y 33).

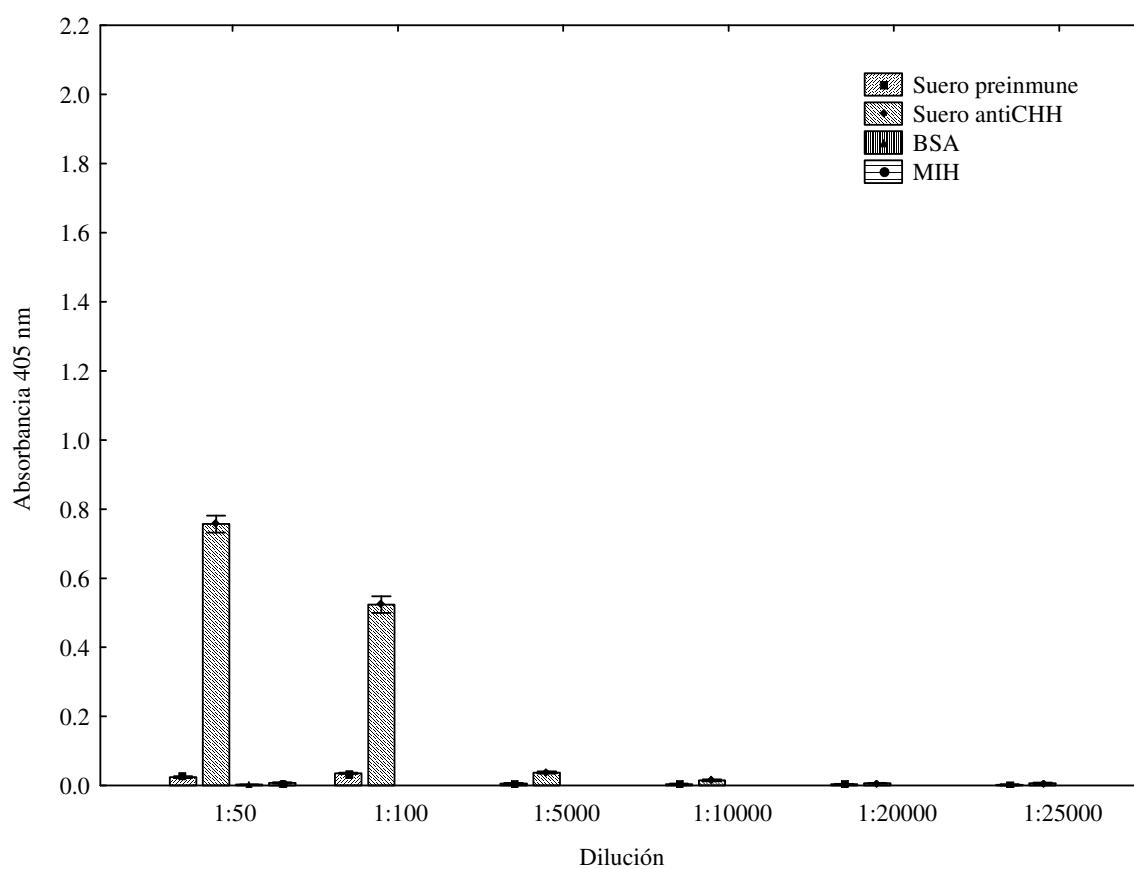


Figura 32. Titulación del suero antiCHH contra el péptido sintético CHH mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las barras indican la desviación estándar (n=3).

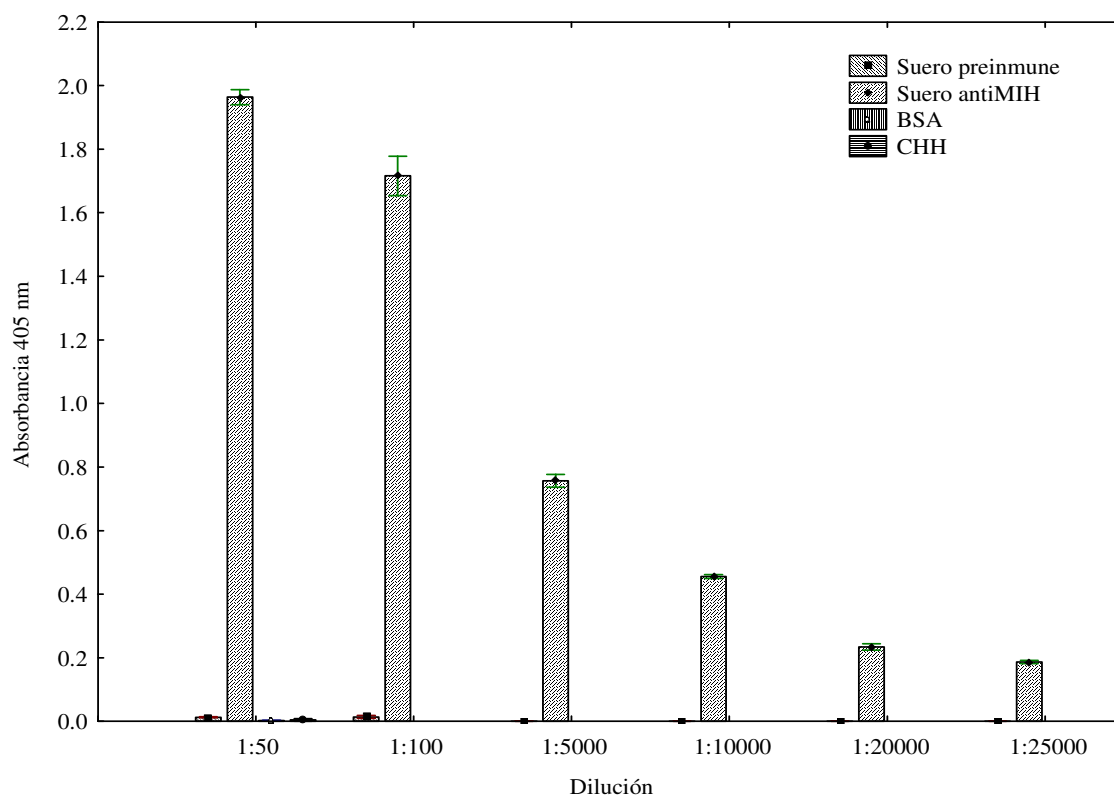


Figura 33. Titulación del suero antiMIH contra el péptido sintético MIH mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las barras indican la desviación estándar (n=3).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la curva de titulación, se sugieren las diluciones 1:50 de anti-CHH y 1:2000 de anti-MIH para su empleo en análisis de inmunodetección de las proteínas CHH y MIH, respectivamente.

VII.4.3 Inmunodetección de la proteína recombinante MIH_{His} , MIH y CHH nativas empleando sueros policlonales.

Aún cuando no se contó con la neurohormona recombinante CHH que pudiera ser utilizada como control positivo se decidió realizar el análisis para la detección de CHH mediante Western blot a partir del extracto de glándula sinusal y hemolinfa.

Los resultados de la electroforesis en gel de tricina (Tricina-SDS-PAGE) y el Western blot se muestran en las Figuras 34 y 35. Como se puede observar en la Figura 35 b, el suero anti-MIH fue capaz de reconocer la proteína recombinante MIH_{His}, sin embargo no detectó ninguna proteína en el extracto de glándula ni de hemolinfa que correspondiera al tamaño esperado de la proteína nativa MIH el cual oscila entre 8 y 9 kDa. Inicialmente se había considerado que la no detección de la hormona nativa se debió a la cantidad de muestra analizada, sin embargo aún cuando esta se triplicó (90 µg) los resultados fueron los mismos. Asimismo el empleo de algunas modificaciones en la metodología seguida, como fueron un menor número de lavados de la membrana y diferentes tiempos de exposición de la placa fotográfica, no evidenciaron la presencia de MIH. Para el caso del suero antiCHH este permitió detectar dos bandas a partir del extracto de glándula, las cuales fueron de 30 y 15 kDa, aproximadamente, por lo que podrían ser multímeros de CHH ya que la proteína CHH nativa es de 8-9 kDa. Otra posibilidad es que el proceso de extracción de proteínas a partir de las glándulas sinusales no fue eficiente y que las proteínas obtenidas correspondan al tejido circundante. Sin duda un extracto de glándula en el cual se haya comprobado la presencia de estas neurohormonas sería lo ideal para corroborar si es posible detectarlas mediante los anticuerpos generados a partir de péptidos sintéticos.

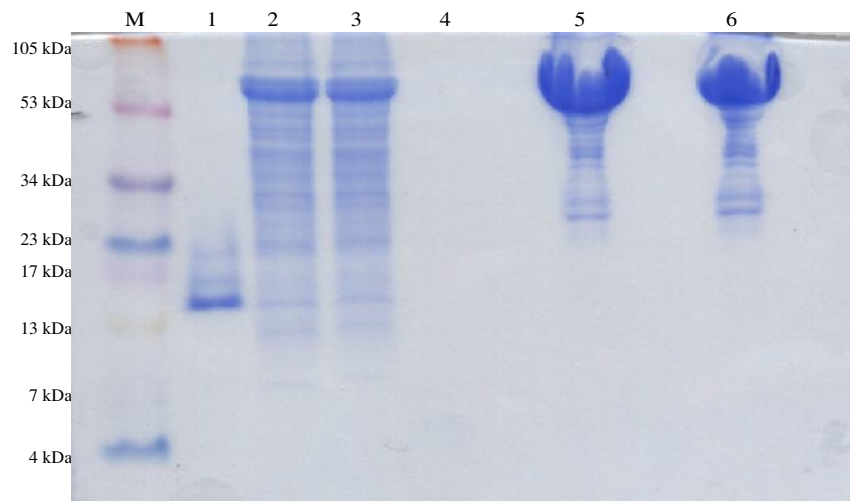


Figura 34. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) de MIH_{His} recombinante y extractos de glándula sinusal y hemolinfa. M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen). Carril 1, MIH_{His} recombinante; carriles 2 y 3, extracto de glándula sinusal, carril 4, péptido sintético MIH; carriles 5 y 6 hemolinfa.

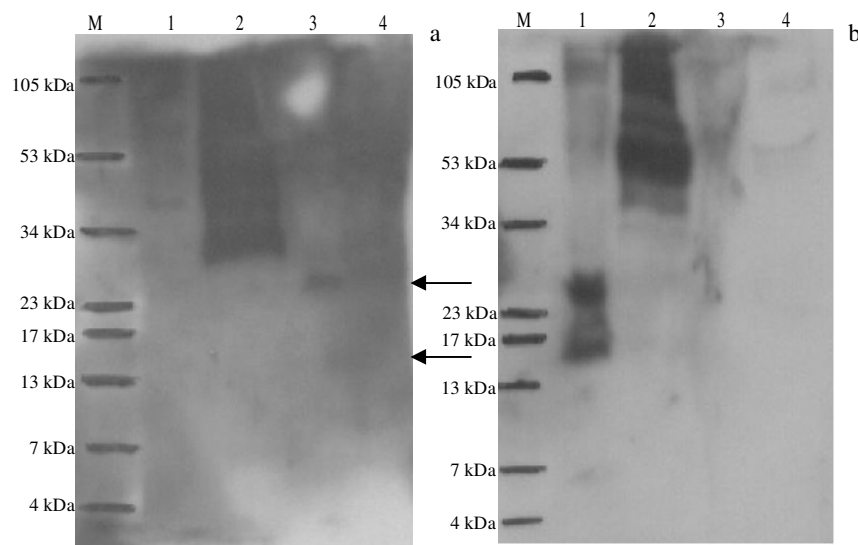


Figura 35. Inmunodetección de MIH_{His} recombinante, sobrenadante de la inducción de CHH_{His} así como de CHH y MIH nativas en extractos de glándula sinusal y hemolinfa empleando sueros policlonales antiCHH y antiMIH. M: Marcador MultiMark Multicolored Standard (Invitrogen). Carril 1, MIH_{His} recombinante; carril 2, sobrenadante de la inducción de CHH_{His} , carril 3, extracto de glándula sinusal, carril 4, hemolinfa. a) Suero policlonal antiCHH. b) Suero policlonal antiMIH.

Por otro lado, en el ensayo de ELISA donde se reconoce la proteína recombinante MIH_{His} , también se observó señal para el extracto de glándula y hemolinfa (Fig. 36). Sin embargo, esto debe considerarse como un efecto inespecífico ya que el análisis de Western blot no evidenció la presencia de alguna banda que sugiera que el anticuerpo está reconociendo alguna proteína de tamaño esperado. A partir de la proteína recombinante MIH_{His} se construyó una curva a partir de diluciones seriadas que permitieron establecer que el nivel mínimo de detección mediante ELISA cuando se utiliza un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa es de 6.3 ng de proteína (Fig. 37).

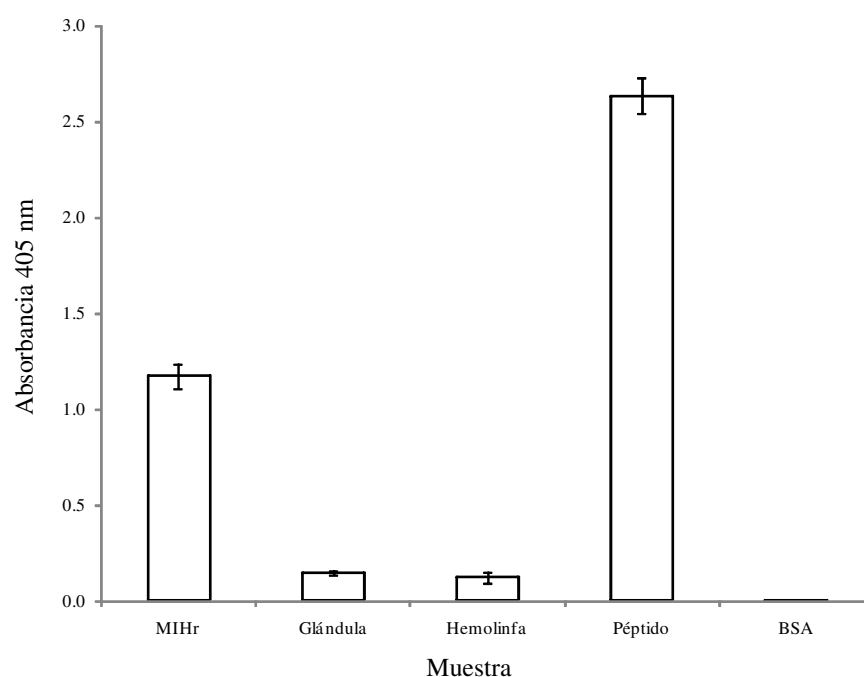


Figura 36. Inmunodetección de MIH recombinante (MIH_{His}) y MIH nativa en extractos de glándula sinusal y hemolinfa mediante ELISA utilizando suero anti-MIH. Control positivo péptido sintético MIH, control negativo BSA. Las barras indican la desviación estándar (n=3).

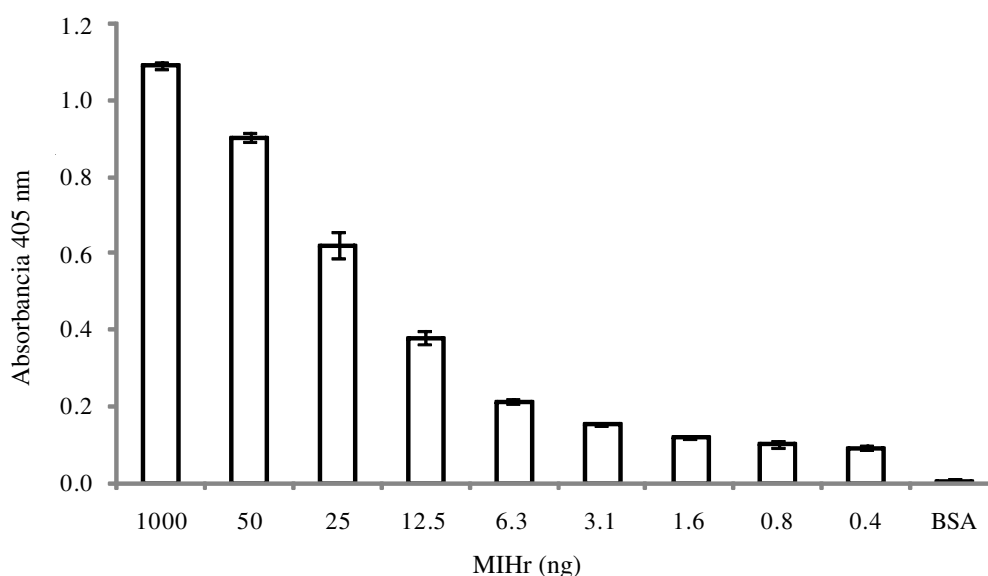


Figura 37. Inmunodetección de MIH recombinante (MIH_{His}) a diferentes concentraciones mediante ELISA utilizando suero anti-MIH. Control negativo BSA. Las barras indican la desviación estándar (n=3).

Considerando que existe la posibilidad de que la cantidad de las neurohormonas CHH y MIH en las muestras de glándula sinusal y hemolinfa estuvo por debajo de límite de detección para la reacción colorimétrica mediante la enzima peroxidasa, se sugiere el empleo de anticuerpos biotinilados y estreptavidina tanto en el análisis de Western blot como ELISA. Chang y colaboradores (1998) desarrollaron un ensayo de ELISA tipo sandwich altamente sensible mediante estreptavidina y anticuerpos biotinilados que les permitió cuantificar los niveles de neurohormonas CHH a partir de volúmenes pequeños de hemolinfa. Dada la alta afinidad entre estreptavidina y biotina, este complejo funciona como un sistema amplificador que eleva la sensibilidad de los ensayos inmunoenzimáticos. Asimismo el ELISA tipo sandwich también conocido como de captura, es un ensayo ampliamente utilizado por su gran especificidad y sensibilidad dado que el antígeno es

reconocido por un anticuerpo que lo retiene y un segundo anticuerpo que lo marca. Mediante esta técnica de ELISA tipo sandwich se han detectado tanto CHH como MIH a partir de hemolinfa en cantidades del orden de fentomoles (Chang *et al.*, 1998), por lo cual no se descarta que este sea la opción más adecuada que deba ser empleada en un futuro.

VII.5 Conclusiones

Los péptidos sintéticos diseñados a partir de las secuencias de las neurohormonas CHH y MIH de *L. vannamei* generaron una respuesta inmune eficiente en conejos.

El suero anti-CHH permitió identificar mediante Western blot dos bandas de 30 y 15 kDa aproximadamente a partir del extracto de glándula sinusal, las cuales pudieran ser multímeros de CHH ya que esta hormona tiene un tamaño de 8-9 kDa. Se sugiere el empleo de un sistema altamente sensible como es la estreptavidina y anticuerpos biotinilados para la detección de CHH y MIH en extractos de glándula y hemolinfa.

El suero anti-MIH reconoció a la hormona recombinante MIH_{His} mediante en un ensayo de Western blot así como de ELISA, sin embargo no detectó la presencia de la proteína nativa a partir del extracto de glándula sinusal y hemolinfa.

El nivel de sensibilidad del anticuerpo anti-MIH mediante ELISA utilizando un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa fue de 6.3 ng de proteína.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años se han logrado un avance importante en el estudio de CHH y MIH. Dichos estudios han evidenciado la participación de estas hormonas en diferentes procesos fisiológicos y han permitido conocer aspectos relacionados con su regulación y modo de acción. Sin embargo, dichos procesos distan de ser completamente conocidos y entendidos. Uno de los principales limitantes en estos estudios es la disponibilidad de las neurohormonas, ya que sólo se han purificado cantidades pequeñas de CHH y MIH a partir del pedúnculo ocular y por otro lado, su similitud en tamaño y estructura dificulta su aislamiento. Es por ello que la tecnología del ADN recombinante representa una alternativa para la producción de estas hormonas, las cuales pueden ser empleadas en estudios que permitan conocer su papel fisiológico así como en estudios de estructura-función.

A la fecha se han utilizado diferentes estrategias para la clonación y expresión de neurohormonas recombinantes en crustáceos utilizando tanto sistemas de expresión procariotas como eucariotas. Sin embargo, es claro que no en todos los casos funciona la misma estrategia y se deben considerar varios aspectos como son el sistema de expresión a utilizar y la cepa, si se desea producir una proteína madura con o sin sitios adicionales que permitan su identificación y purificación, ya que todos estos factores influyen en su producción, así como su estructura y por ende en su función.

En el caso de las neurohormonas CHH y MIH de *L. vannamei*, estas fueron clonadas y producidas previamente en *E. coli*. Sin embargo no se logró producirlas en cantidades suficientes que permitieran su empleo en ensayos de actividad posteriores (Organes, 2004).

Al cambiar a un sistema de expresión como *Pichia*, como se hizo en este trabajo, se logró llevar a cabo exitosamente la clonación y expresión de MIH y CHH nativas utilizando la cepa X-33 de *P. pastoris*. Sin embargo, la purificación de estas proteínas secretadas al medio de cultivo empleando una estrategia que incluyó precipitación con sulfato de amonio, cromatografía por exclusión molecular y RP-HPLC, no permitió obtener un producto puro procesado correctamente. A pesar de que se considera que el empleo del sistema de expresión de *Pichia* presenta ventajas en la purificación de proteínas recombinantes al ser estas secretadas al medio (Cereghino y Cregg, 2000), dado que *Pichia* secreta pocas proteínas endógenas, la fracción purificada de MIH presentó secuencias mayoritarias de proteínas de *Pichia*.

Dado lo anterior la nueva construcción que se hizo con la cepa KM71 de *P. pastoris* y modificaciones de la secuencia de la señal de secreción, así como la adición en el extremo C-terminal de sitios para el reconocimiento y purificación de las neurohormonas recombinante permitió la producción, purificación e identificación de MIH_{His}. Sin embargo, aun cuando CHH_{His} fue clonada correctamente y se determinó que fue transcrita a nivel de ARNm, no se logró producir la neurohormona recombinante, lo que sugiere que existe un problema a nivel traduccional o postraduccional. Un análisis de las proteínas intracelulares de las células transformadas podría evidenciar si CHH_{His} es sintetizada pero no secretada al medio de cultivo debido a problemas de plegamiento o degradación de la proteína. Un caso similar fue observado por Burrowes y colaboradores (2006) los cuales clonaron el gen que codifica para la pleurocidina en el mismo vector utilizado en este trabajo (pPICZ α A).

Estos autores no lograron producir la proteína recombinante aun cuando comprobaron que el gen era transcrito y sugirió un problema postranscripcional como la principal causa por la cual no se detectó la proteína en el medio de cultivo. En este sentido, se consideró que dado el tamaño de la pleurocidina (2.7 kDa) esta pudo ser degradada una vez que fue sintetizada. Esto sugiere que es necesario determinar las condiciones óptimas para su producción antes de descartar a *Pichia* como sistema de expresión. Asimismo, la opción de construir vectores que incluyan varias copias del gen en cuestión, podría ser una alternativa adicional para incrementar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes como se ha observado en otros trabajos (Sreekrishna et al., 1997; Rai y Padh, 2001).

La neurohormona CHH de *L. vannamei* tiene una alta identidad con otras CHHs y SGP's (Sinus Gland Peptide) de otros peneidos, encontrándose un mayor porcentaje de identidad con la SGPII y I de *M. japonicus* (90.5% y 87.8%), seguido por la CHH de *L. schmitti* con 68.1% y 66.2% para *P. monodon*. De estas neurohormonas, la CHH de *P. monodon* ha sido producida exitosamente en *P. pastoris* (Treerattrakool et al., 2003) aunque con un bajo rendimiento (260 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) por lo cual no se descarta que CHH de *L. vannamei* pueda ser producida en *Pichia* utilizando otros medios de cultivo así como bioreactores donde el control en las condiciones de cultivo permite mejores rendimientos. La neurohormona recombinante CHH permitirá realizar ensayos *in vivo* para confirmar su actividad hiperglucémica en organismos ablacionados.

Un aspecto interesante y novedoso en la construcción del vector de expresión para CHH_{His} y MIH_{His} fue la introducción del sitio de reconocimiento de la enzima Enteroquinasa en el

extremo C-terminal, esto con el propósito de eliminar los sitios *c-myc* y 6xHis, una vez que las proteínas recombinantes fueran purificadas mediante afinidad e identificadas por el anticuerpo anti-myc-HRP. Los vectores de expresión procariota disponibles actualmente incluyen el sitio de reconocimiento para Enteroquinasa en el extremo N-terminal de la proteína recombinante previo a la región rica en histidinas. Esto permite eliminar los sitios de reconocimiento y purificación una vez que la proteína ha sido purificada. Sin embargo, en estos casos las proteínas no son secretada al medio sino empaquetadas como cuerpos de inclusión en *E. coli*, por lo que no se requiere de una secuencia señal en el extremo N-terminal.

En este caso, la presencia tanto de señales en el N-terminal como de sitios de reconocimiento para su purificación y detección mediante anticuerpos (6xHis y *c-myc*) en el extremo C-terminal, más el sitio de reconocimiento para Enteroquinasa, permitieron la correcta secreción, purificación e identificación y la posibilidad de eliminar 23 de los 28 aminoácidos de la región C-terminal que no forman parte de la proteína nativa y con ello obtener tener una proteína lo más parecida posible a la producida por *L. vannamei*. Esto resulta de gran importancia si se desea determinar la actividad biológica de esta neurohormona.

El rendimiento de la proteína recombinante MIH_{His} fue alto (8.7 mg·l⁻¹) en comparación con otros trabajos donde también se ha utilizado a *Pichia* como sistema de expresión. Esto resulta de gran importancia ya que se contará con cantidades importantes de MIH_{His} que puedan ser utilizadas en ensayos de actividad o producción de anticuerpos, entre otros.

MIH y CHH exhiben similitudes importantes en sus secuencias de aminoácidos y no es de sorprenderse que MIH_{His} sea multifuncional y que pudiera tener actividad de CHH como se ha encontrado con otras neurohormonas de crustáceos (Chang *et al.*, 1990; Toullec y Dauphin-Villemart, 1999). En este sentido, dadas las características de MIH_{His} en cuanto al porcentaje de identidad con otras CHHs y MIHs, presencia de dominios y otras características, la ubican más con el grupo de las CHHs (subfamilia CHH) que con el de las MIHs (subfamilia MIH/GIH). Sin embargo el hecho de haber sido clonada utilizando cebadores diseñados a partir de la MIH de *H. americanus*, la cual presenta tanto actividad inhibidora de la muda como hiperglucémica, sugiere la posibilidad de que MIH_{His} presente ambas actividades biológicas (Chang *et al.*, 1990; Lago-Leston *et al.*, 2007).

El ensayo de actividad para evaluar la capacidad hiperglucémica no permitió comprobar que MIH_{His} tiene un efecto hiperglucémico. Sin embargo, la tendencia observada sugiere un posible efecto hiperglucémico de MIH_{His} que debe de ser comprobado en el futuro. Asimismo, no se descarta que MIH_{His} también tenga un efecto en la muda para lo cual se deberá llevar a cabo el ensayo pertinente. Ambos ensayos junto con los análisis de estructura función permitirán comprobar si MIH_{His} es en realidad una CHH o una MIH con actividad hiperglucémica y de inhibidora de la muda como la MIH de *H. americanus* (Chang *et al.*, 1990).

El tener ambas actividades implicaría el que la hormona tuviera un sitio activo que permita por un lado aumentar los niveles de glucosa por medio de la regulación de las actividades de la glucógeno fosforilasa y de la glucógeno sintetasa en los sitios blanco, así como la

secreción de amilasa de la glándula del intestino medio (Keller y Sedmeier, 1988). Por otro lado, debe inhibir la síntesis de ecdiesteroides secretados por el órgano Y. A partir de anticuerpos generados contra el extremo C-terminal de MIH de *P. clarkii* se ha observado que estos revierten la inhibición sobre la producción de ecdiesteroides, sin embargo este mismo segmento generado sintéticamente no generó inhibición en la síntesis de ecdiesteroides, por lo que se sugiere que no sólo el extremo C-terminal está involucrado en dicha función sino que se requiere de la estructura completa de la hormona para ejercer su acción inhibitoria (Sonobe *et al.*, 2001).

Una de las aplicaciones esperadas de hormonas recombinantes producidas era su utilización para la producción de anticuerpos policlonales. Sin embargo, por cuestiones de tiempo se optó por obtener anticuerpos utilizando péptidos sintéticos de CHH y MIH. Si bien se obtuvo un título alto de anticuerpos contra los péptidos sintéticos seleccionados a partir del alto valor de su índice antigénico teórico, no fue posible detectar la presencia de MIH y CHH en hemolinfa, por lo que el empleo de proteínas recombinantes completas sería conveniente para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. A diferencia de los anticuerpos policlonales, los monoclonales reconocen sólo el epítipo del antígeno y son altamente específicos. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales son altamente homogéneos y permiten una producción ilimitada con una especificidad sostenida. Esto permitiría determinar la presencia y cambios en los niveles de las neurohormonas provenientes de diferentes tejidos en organismos sometidos a diferentes condiciones de estrés con diferentes ensayos moleculares.

El estudio de la endocrinología en crustáceos puede hacer contribuciones importantes en áreas aplicadas como la acuicultura de especies de importancia económica como *L. vannamei*. Por un lado se puede promover la maduración en reproductores mediante la inyección de anticuerpos anti-MIH y de esta manera evitar la utilización de técnicas intrusivas y evitar daños en las hembras reproductoras y su progenie. Asimismo, es importante estudiar los cambios en los niveles hormonales en diferentes condiciones ambientales (fotoperiodo, contaminantes, temperatura, salinidad, oxígeno, patógenos) así como ubicar la presencia de las mismas en diferentes tejidos del camarón. Dada la función de CHH de aumentar la glucosa en hemolinfa en respuesta a la ritmicidad circadiana del contenido de glucosa en hemolinfa o por estímulos externos (Kallen *et al.*, 1990; Lorenzon *et al.*, 2000), la determinación de los niveles de CHH puede ser utilizado como indicador del estado de salud del camarón junto con otros parámetros que se utilizan regularmente como la concentración de glucosa, proteínas, lactato y triglicéridos, entre otros (Noga, 2000).

IX. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M.B., L.S. Quackenbush, D.T. Hunt, J. Shabanowitz, A. Huberman. 1992. Identification, purification, and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish, *Procambarus bowieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 102:491-498 p.
- Azzouna, A., M. Philippe, T. Jarry, P. Grève y G. Martin G. 2003. Localization of crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in separate cell types in the protocerebrum of the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Gen. Comp. Endocrinol.* 131(2):134-142 p.
- Barr, K.A., S.A. Hopkins y K. Sreekrishna. 1992. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* 12:48-51 p.
- Böcking, D., H. Dirksen y R. Keller. 2002. The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structure and biological activities. En: K. Wiese (ed.) *The crustacean nervous system.* Springer Verlag, New York, 84-97 p.
- Bomirski, A., M. Arendarczyk, E. Kawinska y L. H. Kleinholz. 1981. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *Int. J. Invert. Reprod.* 3:213-219 p.
- Briand, L., V. Perez, J.C. Huet, E. Danty, C. Masson y J.C. Pernollet. 1999. Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 15(3):362-369 p.
- Buckholz, R.G. y M.A.G. Gleeson. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology.* 9: 1067-1072 p.
- Burrowes, O.J., G. Diamond y T.C. Lee. 2005. Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. *J. Biomed. Biotechnol.* 2005(4):374-384 p.
- Caplan, S., R. Green, J. Rocco y J. Kurjan. 1991. Glycosylation and structure of the yeast MF α 1 α -factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway. *J. Bacteriol.* 173(2): 627-635 p.
- Cereghino, G.P.L., J.L Cereghino, C. Ilgen y J.M. Cregg. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:329-332 p.
- Cereghino, J.L. y J.M. Gregg, 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(1):45-66 p.

- Chang, E.S., G.D. Prestwich y M.J. Bruce. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171(2):818-826 p.
- Chang, E.S. y J.D. O'Connor. 1988. Crustacean: molting. En: H. Laufer y R.G.H. Downer (eds). *Endocrinology of selected invertebrate types*. Alan R. Liss, Inc. New York. 259-278 p.
- Chang, E.S., R. Keller y S.A. Chang. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111(3):359-66 p.
- Charniaux-Cotton, H. y G. Payen G. 1988. Crustacean reproduction. En: H. Laufer y R.G.H. Downer (eds). *Endocrinology of selected invertebrate types*. Alan R. Liss, Inc. New York. 279-303 p.
- Chen, S.H., C.Y. Lin y C.M. Kuo. 2005. *In Silico* Analysis of Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. *Mar. Mar. Biotechnol.* 7:193-206 p.
- Chung, J.S., H. Dirksen y S.G. Webster. 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:13103-13107 p.
- Clare, J.J., F.B. Rayment, S.P. Ballantine, K. Sreekrishna y M.A. Romanos. 1991a. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technol.* 9: 455-460 p.
- Clare, J.J., M.A. Romanos, F.B. Rayment, J.E. Rowedder, M.A. Smith, M.M. Payne, K. Sreekrishna y C.A. Henwood. 1991b. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene.* 105(2):205-212 p.
- Cregg, J.M., J.F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W.S. Craig, R.G. Buckholz, K.R. Madden, P.A. Kellaris, G.R. Davis, B.L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Velicelebi y G.P. Thill. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* 5: 479-485 p.
- Cregg, J.M., K.J. Barringer, A.Y. Messier y K.R. Madden. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376-3385 p.
- Cregg, J.M. y K.R. Madden. 1987. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. En: *Biological Research on Industrial Yeasts, Vol. II*. G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein y R.R. Hiebsch (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-18 p.

- Cregg, J.M. y K.R. Madden. 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* 29: 33–41 p.
- Cregg, J.M. y K.R. Madden. 1989. Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.* 219: 320–323 p.
- Cregg, J.M., K.R. Madden, K.J. Barringer, G.P. Thill y C.A. Stillman. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9:1316–1323 p.
- Cregg, J.M., T. Vedvick y W.C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign gene in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* 11: 905–910 p.
- de Kleijn, D.P.V., E.P.H. de Leeuw, M.C. van de Berg, G.J.M. Martens y F. van Herp. 1995. Cloning and expression of two encoding structurally different crustacean hyperglycemic-hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1260:62–66 p.
- de Kleijn, D.P.V. y F. van Herp. 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacean. *Com. Biochem. Physiol.* 112B(4):573-579 p.
- de Kleijn, D.P.V. y F. van Herp. 1998. Involvement of hiperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebr. Reprod. Dev.* 33(2-3):263-272 p.
- de Kleijn, D.P.V., F.J.G.T. Sleutels, G.J.M. Martens y F. van Herp. 1994a. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Lett.* 353:255-258 p.
- de Kleijn, D.P.V., K.P.C. Janssen, G.J.M. Martens y F. van Herp 1994b. Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 224:623-629 p.
- de Kleijn, D.P.V., K.P.C. Janssen, S.L. Waddy, R.W. Hegeman, G.J.M. Martens y F. van Herp. 1998. Expression of crustacean hyperglycaemic hormones and the gonada-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *J. Endocrinol.* 156:291-298 p.
- Digan, M.E., J. Tschopp, L. Grinna, S.V. Lair, W.S. Craig, G. Velicelebi, R. Siegel, G.R. Davis, y G.P. Thill. 1988. Secretion of heterologous proteins from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Dev. Ind. Microbiol.* 29: 59–65 p.

- Ellis, S.B., P.F. Brust, P.J. Koutz, A.F. Waters, M.M. Harpold y T.R. Gingeras. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5:1111–1121 p.
- Fajul-Moles, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 142:390–400 p.
- FAO. 2000. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO. Rome. 160 p.
- Ferraris, J.D., K. Fauchald y B. Kensley. 1994. Physiological responses to fluctuation in temperature of salinity in invertebrates. Adaptations of *Alpheus viridari* (Decapoda, Crustacea), *Terebellides parva* (Polychaeta) and *Golfinigia cylindrata* (Sipunculida) to the mangrove hábitat. *Mar. Biol.* 120:397–406 p.
- Fingerman, M. 1997. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective and introspective analysis. *Physiological Zoology.* 70(3):257–269 p.
- Fischer, R., J. Drossard, N. Emans, U. Commandeur y S. Hellwig. 1999. Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. *Biotechnol Appl Biochem.* 30:117–20 p.
- García, U. y H. Aréchiga. 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity *Cell. Mol. Neurobiol.* 18(1):81–99 p.
- Giulianini, P.G., N. Pandolfelli, S. Lorenzon, E.A. Ferrero y P. Edomi. 2002. An antibody to recombinant crustacean hyperglycaemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. *Cell Tissue Res.* 307(2):243–54 p.
- Gleeson, M.A.G. y P.E. Sudbery. 1988. The methylotrophic yeasts. *Yeast.* 4:1–15 p.
- Gong, J.H. y I. Clark-Lewis. 1995. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH₂-terminal residues. *J. Exp. Med.* 181:631–640 p.
- Goldberg, H.A. y J.K. Warner. 1997. The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of “Stains-All” staining combination with silver nitrate. *Anal. Biochem.* 251:227–233 p.
- Grève, P., O. Sorokine, T. Berges, C. Lacombe, A. van Dorsselaer y G. Martin. 1999. Isolation and amino acid sequence of a peptide with vitellogenesis inhibiting activity from the terrestrial isopod *Armadillium vulgare* (Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.* 115:406–414 p.

- Gu, P.L., K.H. Chu y S.M. Chan. 2001. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell. Tissue Res.* 303(1):129-136 p.
- Gu, P.L., K.L. Yu y S.M. Chan. 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Lett.* 472(1):122-128 p.
- Gu, P.L. y S.M. Chan. 1998a. Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*. *Mol. Mar. Biol.* 7:214-220 p.
- Gu, P.L. y S.M. Chan. 1998b. The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster. *FEBS Lett.* 441(3):397-403 p.
- Gu, P.L., S.S. Tobe, B.K.C. Chow, K.H. Chu, J.G. He y S.M. Chan. 2002. Characterization of an additional molt inhibiting hormone-like neuropeptide from the shrimp *Metapenaeus ensis*. *Peptides.* 23:1875-1883 p.
- Guerrero-Olazarán, M., E. Cab-Barrera, L.J. Galán-Wong y J.M. Viader-Salvadó. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M.G. Nieto-López, D. Villareal, U. Scholz y M. González (eds). *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del Séptimo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 16-18 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México. 418-440 p.
- Harlow, E. y D. Lane. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Primera edición. Cold Spring Harbor. 726p.
- Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture.* 191:191-208 p.
- Huberman, A., A. Hernández-Arana, M.B. Aguilar y A. Rojo-Domínguez. 1989. Secondary structure of a crustacean neuropeptide hormone family by means of CD. *Peptides.* 10(5):1113-1115 p.
- Jameson, B.A. y H. Wolf. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4(1):181-186 p.
- Kallen, J. L., S.L. Abrahamse y F. van Herp, F. 1990. Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. *Biol. Bull.* 179:351-357 p.

- Katayama, H., T. Ohira, K. Aida y H. Nagasawa. 2002. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*. 23:1537-1546 p.
- Katayama, H., K. Nagata, T. Ohira, F. Yumoto, M. Tanokura y H. Nagasawa. 2003. The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.* 278(11):9620-9623 p.
- Katayama, H., T. Ohira, K. Nagata y H. Nagasawa. 2001. A recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn has a similar secondary structure to a native hormone: determination of disulfide bond arrangement and measurements of circular dichroism spectra. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(8):1832-1839 p.
- Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects. *Experientia*. 48:439-448 p.
- Khayat, M., W-J. Yang, K. Aida, H. Nagasawa, A. Tietz, B. Funkenstein y E. Lubzens 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110(3):307-318 p.
- Klein, J.M., S. Mangerich, D.P.V. De Kleijn, R. S  ller y W.M. Weidemann. 1993. Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. *FEBS Lett.* 334(1):139-142 p.
- Kleinholz L.H. y R. Keller. 1979. Endocrine regulation in crustacea. En: E. J. W. Barrington (ed). *Hormones and evolution*. Academic Press. New York. 159-313 p.
- Kurjan, J. e I. Herskowitz. 1982. Structure of a yeast pheromone gene (MF α): a putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell*. 30:933-943 p.
- Lachaise, F., A. Le Roux, M. Hubert y R. Lafont. 1993. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *J. Crust. Biol.*, 13(2): 198-234 p.
- Lago-Lest  n, A., 2001. Estudio de la expresión de los genes de la familia peptídica MIH/GIH/CHH de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en diferentes condiciones de estrés. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada, B.C. México. 85 p.
- Lago-Lestón, A., E. Ponce y M.E. Muñoz. 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(1-4): 343-357 p.

- Laroche, Y., V. Storme, J. De Meutter, J. Messens y M. Lauwereys. 1994. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* 12(11):1119-1124 p.
- Laufer, H. y D.W. Borst. 1988. Juvenile hormone in Crustacean. En: H. Laufer y R.G.H. Downer (eds). *Endocrinology of selected invertebrate types*. Alan R. Liss, Inc. New York. 305-313 p.
- Linder, S., M. Schliwa y E. Kube-Grandenath. 1996. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques*. 20(6):980-982 p.
- Liu, L., H. Laufer, Y. Wang y T Hayes. 1997. A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a crustacean. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237(3):694-701 p.
- Lorenzon, S., M. Francese y E.A. Ferrero. 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39:167-176 p.
- Lorenzon, S., P. Edomi, P.G. Giulianini, R. Mettulio y E.A. Ferrero. 2004. Variation of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *J. Exp. Biol.* 207:4205-4213 p.
- Nakatsuji, T. y H. Sonobe. 2003. Measurement of molt-inhibiting hormone titer in hemolymph of the American crayfish, *Procambarus clarkii*, by time-resolved fluoroimmunoassay. *Zool. Sci.* 20(8):999-1001 p.
- Nakatsuji, T., H. Sonobe y R. D. Watson. 2006. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): Involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 253(1-2):76-82 p.
- Nakatsuji, T., H. Keino, K. Tamura, S. Yoshimura, T. Kawakami, S. Aimoto y H. Sonobe. 2000. Changes in the amounts of the molt-inhibiting hormone in the sinus glands during the molt cycle of the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci.* 17:1129-1136 p.
- Noga, E. J. 2000. Hemolymph biomarkers of crustacean health. En: M. Fingerman y R. Nagabhushanam (eds). *Recent advances in marine biotechnology. Volume 5. Immunobiology and pathology*. Science Publishers Inc., Enfield. 125-163 p.

- Ohira, T., A. Okuno, T. Watanabe, H. Nagasawa, I. Kawazoe, K. Aida, T. Nishimura y H. Sonobe. 1999. Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(9):576-1581 p.
- Ohira, T., H. Katayama, K. Aida y H. Nagasawa. 2003. Expression of a recombinant crustacean hyperglycemic hormone of kuruma prawn *Penaeus japonicus* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fisheries Sci.* 69:95-100 p.
- Ollivaux, C. y D. Soyez. 2000. Dynamic of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormones isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267:5106-5114 p.
- Organes De los Santos, H. C. 2004. Clonación y expresión de los genes *chh* y *mih* para la producción de las neurohormonas hiperglucémica e inhibidora de la muda recombinantes de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada, B.C. México. 90p.
- Pellequer, J.L., E. Westhof y M.H. Regenmortel. 1991. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Methods. Enzymol.* 203:176-201 p.
- Perez, V., J.C. Huet, M.J. O'Donohue, C. Nespoulous y J.C. Pernollet. 1999. A novel elicitor necrotic site revealed by α -cinnamomin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochemistry.* 50(6):961-966 p.
- Quackenbush, L.S. 1986. Crustacean endocrinology, a review. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 43:2271-2282 p.
- Raemaekers, R.J.M., L. de Muro, J.A. Gatehouse y A.P. Fordham-Skelton. 1999. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur. J. Biochem.* 265(1):394-403 p.
- Rai, M. y H. Padh. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.* 80(9):1121- 1128 p.
- Romanos M. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:527-533 p.
- Romanos, M.A., C.A. Scorer y J.J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-488 p.

- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición. Cold Spring Harbor. 2344 p.
- Santos, E.A., L.E. Nery, R. Keller y A.A. Goncalves. 1997. Evidence for the involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol. Zool.* 70:415-420.
- Schägger, H. y G. von Jagow. 1987. Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton. *Anal. Biochem.* 166(2):368–379 p.
- Scorer, C.A., R.G. Buckholz, J.J. Clare y M.A. Romanos. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 136(1-2):111-119 p.
- Sefiani, M., J.P. Le Caer y D. Soyez. 1996. Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103:41-53 p.
- Sibirny, A.A., V.I. Titorenko, M.V. Gonchar V.M. Ubiyvovk, G.P. Ksheminskaya y O.P. Vitvitskaya. 1988. Genetic control of methanol utilization in yeasts. *J. Basic. Microbiol.* 28(5):293–319 p.
- Sonobe, H., T. Nishimura, M. Sonobe, T. Nakatsuji, R. Yanagihara, T. Kawakami, S. Aimoto. 2001. The molt-inhibiting hormone in the American crayfish *Procambarus clarkii*: its chemical synthesis and biological activity. *Gen Comp Endocrinol.* 121(2):196-204 p.
- Soyez, D., F. van Herp, J. Dossier, J.P. Le Caer, C.P. Tensen y R. Lanfont. 1994. Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. D-Amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides. *J. Biol. Chem.* 269(28):18295-18298 p.
- Soyez, D., J.E. van Deijnen y M. Martin. 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesis inhibiting factor from sinus glands of the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Zool.* 244:479-484 p.
- Soyez, D., J.P. Le Caer, P.Y. Noel y J. Rossier. 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides.* 20(1):25-32 p.
- Spanings-Pierrot, C., D. Soyez, F. van Herp, M. Gompel, G. Skaret, E. Grousset y P. Charmantier. 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Phachygrapsus marmoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119:340-350.

- Sreekrishna, K., R.G. Brankamp, K.E. Kropp, D.T. Blankenship, J.-T. Tsay, P.L. Smith, J.D. Wierschke, A. Subramaniam y L.A. Birkenberger. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 190: 55–62 p.
- Sun, P.S. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3(1):1-6 p.
- Sun, P.S. 1997. Recombinant molt-inhibiting hormone-like neuropeptide produced in the yeast *Pichia pastoris*. Pacon 97 Proceedings. Symposium on Resource Development. 6-8 Agosto de 1997, Hong Kong, China. 509-518 p.
- Tang, C., W. Lu, G. Wainwright, S.G. Webster, H.H. Rees y P.C. Turner. 1999. Molecular characterization and expression of mandibular organ-inhibiting hormone, a recently discovered neuropeptide involved in the regulation of growth and reproduction in the crab *Cancer pagurus*. *Biochem. J.* 343:355-60 p.
- Toullec, J.Y. y C. Dauphin-Villemant. 1994. Dissociated cell suspensions of *Carcinus maenas* Y-organs as a tool to study ecdysteroid production and its regulation. *Experientia* 50, 153–158.
- Treeratrakool, S., A. Udomkit y S. Panyim. 2006. Anti-CHH antibody causes impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39(4):371-376 p.
- Treeratrakool, S., A. Udomkit, L. Eurwilaichitr, B. Sonthayanon y P. Sakol. 2003. Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 5:373-379 p.
- Treeratrakool, S., L. Eurwilaichitr, A. Udomkit y P. Sakol. 2002. Secretion of Pem-CMG, a peptide in the CHH/MIH/GIH family of *Penaeus monodon*, in *Pichia pastoris* is directed by secretion signal of α -mating factor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35(2):476-481 p.
- Tschopp, J.F., P.F. Brust, J.M. Cregg, C.A. Stillman y T.R. Gingeras. 1987. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15(9):3859-3876 p.
- Udomkit, A., S. Treeratrakool y P. Sakol. 2004. Crustacean hyperglycemic hormone of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298:79-91 p.
- Udomkit, A., S.Chooluck, B. Sonthayanon y S. Panyim. 2000. Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 244(1):145-156 p.

- Umphrey, H.R., K.J. Lee, R.D. Watson y E. Spaziani. 1998. Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*. *Mol Cell Endocrinol.* 136:145-149 p.
- van Regenmortel, M.H. y J.L. Pellequer. 1994. Predicting antigenic determinants in proteins: looking for unidimensional solutions to a three-dimensional problem? *Pept. Res.* 7(4):224-231 p.
- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán y Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeus shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (2):299-303 p.
- Vedvick, T., R.G. Buckholz, M. Engel, M. Urcan, J. Kinney, S. Provow, R.S. Siegel y G.P. Thill. 1991. High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* 7: 197–201 p.
- Vedvick, T.S. 1991. Gene expression in yeast: *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:742–745 p.
- Veenhuis, M., J.P. van Dijken y W. Harder. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 24: 1–82.
- Wainwright, G., S.G. Webster, M.C. Wilkinson, J.S. Chung y H.H. Rees. 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. Involvement in multihormonal regulation of growth and reproduction. *J. Biol. Chem.* 271(22):12749-12754 p.
- Webster, S. G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.* 199:1579-1585p.
- Wilcockson, D.C., J.S., Chung y S.G. Webster. 2002. Is crustacean hyperglycaemic hormone precursor-related peptide a circulating neurohormone in crabs? *Cell. Tissue Res.* 307:129-138 p.
- Yasuda, A., Y. Yasuda, T. Fujita y Y. Naya. 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*); multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95:387-398 p.
- Yodmuang, S., A. Udomkit, S. Treerattrakool y P. Sakol. 2004. Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 312:101-114 p.

Zou, H.S., C.C. Juan, S.C. Chen, H.Y. Wang y C.Y. Lee. 2003. Dopaminergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone and glucose levels in the hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii*. J. Exp. Zool. 298(1):44-52 p.