

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



**Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Variación del contenido de lípidos en la hemolinfa del
camarón blanco *Litopenaeus vannamei* como respuesta al
tratamiento con rCHH-B2**

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

Presenta:

Ariana Montiel Arzate

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Ariana Montiel Arzate
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dr. Jorge Adrián Rosales Casián



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Ariana Montiel Arzate © 2018

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

Resumen de la tesis que presenta **Ariana Montiel Arzate** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

Variación del contenido de lípidos en la hemolinfa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* como respuesta al tratamiento con rCHH-B2

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de tesis

Las hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHHs) son péptidos producidos en el complejo del órgano X - glándula del seno (OX-GS), uno de los centros neuroendocrinos más importantes en crustáceos. Estas hormonas actúan sobre diversos tejidos, principalmente hepatopáncreas y músculo, promoviendo la glucogenólisis e inhibiendo la gluconeogénesis. Son consideradas hormonas multifuncionales debido a que participan en diversas respuestas fisiológicas de gran importancia. La actividad hiperlipidémica de las CHHs observada en diferentes especies de cangrejos ha permitido sugerir que el metabolismo de lípidos está bajo control endocrino en crustáceos. No obstante, a pesar de la importancia de los lípidos como fuente energética para funciones metabólicas esenciales, a la fecha no se ha estudiado su regulación endocrina en otras especies de crustáceos, incluyendo el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, la especie comercial más cultivada y pescada en el mundo. A la fecha existen 4 variantes diferentes de CHH descritas para esta especie: CHH-A, CHH-B1, CHH-B2 y LvCHH_PO_ES. En los últimos años se han desarrollado herramientas biotecnológicas que han permitido la producción de hormonas recombinantes, lo que ha ampliado el conocimiento acerca de su funcionamiento y de los diferentes procesos en los que participan. En este trabajo se llevó a cabo la determinación del efecto de CHH recombinante sobre el nivel de lípidos y glucosa en la hemolinfa de camarones sub-adultos de *L. vannamei*. Los ensayos de expresión y purificación se llevaron a cabo utilizando como modelo a la hormona recombinante CHH-A (rCHH-A). Se utilizaron 2 plataformas de expresión diferentes: 1) *E. coli* BL21 Star/pET44a(+) y 2) expresando rCHH-A en la levadura *Pichia pastoris* en medio mínimo y rico. Aun cuando en *E. coli* la neurohormona fue producida como proteína de fusión (NusA-CHH-A), no fue posible eliminar los dominios adicionales en el N-terminal para obtener la hormona nativa. Debido a que no se logró purificar la cantidad necesaria de rCHH-A en el tiempo requerido, los bioensayos se realizaron con la hormona rCHH-B2 purificada previamente en el laboratorio utilizando camarones sub-adultos ablacionados bilateralmente aclimatados a condiciones hiper-osmóticas (35 ups) y a una temperatura de 26 °C. Los muestreos de hemolinfa fueron realizados a 0.5, 1, 3 y 6 h post-inyección de la hormona. Como control se utilizaron organismos no ablacionados sin inyectar, así como ablacionados bilateralmente sin inyectar e inyectados con PBS 1X. Camarones ablacionados bilateralmente inyectados con 2 µg/animal (232 pmol) de rCHH-B2 mostraron una respuesta hiperglucémica e hiperlipidémica significativa ($P > 0.05$), obteniéndose los niveles más altos de glucosa en hemolinfa a 1 h post-inyección (27.92 ± 4.3 mg/dL). La mayor concentración de triglicéridos en la hemolinfa (61.8 mg/dL) se observó también a 1 h post-inyección, el cual fue de 1.3 veces mayor que en los camarones ablacionados sin inyección. rCHH-B2 reestableció parcialmente la concentración de ácidos grasos libres (FFA) en la hemolinfa de organismos ablacionados a 1 h post-inyección teniendo un máximo de 0.244 ± 0.05 mmol/L, lo que sugiere la participación de otras moléculas endocrinas presentes en el OX-GS de *L. vannamei*. Los máximos niveles de fosfolípidos en hemolinfa fueron observados a 1 h post-inyección de rCHH-B2 (0.949 ± 0.121 mmol/L) siendo cerca de 1.72 veces más altos que el nivel basal. Estos resultados sugieren que rCHH-B2 influye en el metabolismo de lípidos y glucosa a corto plazo, permitiendo a camarones sub-adultos de *L. vannamei* aclimatados a 35 ups obtener la energía necesaria para contender con procesos altamente exergónicos como la osmorregulación.

Palabras clave: CHH, hormonas recombinantes, metabolismo lipídico, metabolismo glucémico, crustáceos, *L. vannamei*.

Abstract of the thesis presented by **Ariana Montiel Arzate** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Variation of lipid content in the hemolymph of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to treatment with rCHH-B2

Abstract approved by:

Dr. Elizabeth Ponce Rivas
Thesis Director

The hyperglycemic crustacean hormones (CHHs) are peptides produced in the complex of the X-organ - sinus gland (OX - GS), one of the most important neuroendocrine centers in crustaceans. These hormones act on various tissues, mainly hepatopancreas and muscle, promoting glycogenolysis and inhibiting gluconeogenesis. They are considered multifunctional hormones because they participate in several physiological responses of great importance. The hyperlipidemic activity of CHHs observed in different species of crabs has allowed to suggest that lipid metabolism is under endocrine control in crustaceans. However, despite the importance of lipids being an important source for essential metabolic functions, to date their endocrine regulation has not been studied in other crustacean species, including white shrimp *Litopenaeus vannamei*, the most cultured and caught commercial species in the world. Up to date four different variants of CHH has been described for this species: CHH-A, CHH-B1, CHH-B2 and LvCHH_PO_ES. In recent years, biotechnological tools have been developed that have allowed the production of recombinant hormones, which has expanded the knowledge about its operation and the different processes in which they participate. In this work the determination of the effect of recombinant CHH on the level of lipids and glucose of the hemolymph of sub-adult shrimp of *L. vannamei* was carried out. The expression and purification assays were performed using the recombinant hormone CHH-A (rCHH-A) as a model. Two different expression platforms were used: 1) *E. coli* BL21 Star / pET44a (+) and 2) expressing rCHH-A in the yeast *Pichia pastoris* in minimal and rich media. Although in *E. coli* the neurohormone was produced as a fusion protein (NusA-CHH-A), it was not possible to eliminate the additional domains at the N-terminus to obtain the native hormone. Because the required amount of rCHH-A could not be purified within the required time, the bioassays were performed with rCHH-B2 previously purified in the laboratory using sub-adult bilaterally ablated shrimp acclimated to hyper-osmotic conditions (35 psu) and a temperature of 26 °C. Samples of hemolymph were obtained at 0.5, 1, 3 and 6 h post-injection of the hormone. As control, no ablated organisms were used without injection, as well as bilaterally ablated organisms without injection and injected with PBS 1X. Bilaterally ablated shrimp injected with 2 µg/animal (232 pmol) of rCHH-B2 showed a significant hyperglycemic and hyperlipidemic response ($P > 0.05$), obtaining the highest levels of glucose in hemolymph at 1 h post-injection (27.92 ± 4.3 mg/dL). The highest concentration of triglycerides in the hemolymph (61.8 mg/dL) was also observed at 1 h post-injection, which was 1.3 times higher than in ablated shrimps without injection. rCHH-B2 partially re-established the concentration of free fatty acids (FFA) in the hemolymph of ablated organisms at 1 h post-injection with a maximum of 0.244 ± 0.05 mmol/L, which suggest the participation of other endocrine molecules present in the OX- GS of *L. vannamei*. The maximum levels of phospholipids in hemolymph were observed at 1 h post-injection of rCHH-B2 (0.949 ± 0.121 mmol/L) being about 1.72 times higher than the basal level. These results suggest that rCHH-B2 influences the metabolism of lipids and glucose in the short term allowing sub-adults of *L. vannamei* acclimated to 35 psu to obtain the energy necessary to contend with highly exergonic processes such as osmoregulation.

Keywords: CHH, recombinant hormones, lipid metabolism, glycemic metabolism, crustacean, *L. vannamei*.

Dedicatoria

Para Isaac Alexander.

El mundo está lleno de secretos desconocidos. Desde la estructura de una proteína, los procesos moleculares en el interior de un pequeño camarón hasta los seres desconocidos en las profundidades marinas. Espero que en el futuro tengas curiosidad por conocer un poco más de lo que nos rodea y quieras compartir ese conocimiento. En algún lugar de nuestra memoria, siempre recordaremos esas largas caminatas y aventuras al lado del mar, cuyo propósito final fue la culminación de este trabajo, que quizás se quede en un estante con los otros libros, pero que en nuestras vidas resultó en momentos juntos. Te amo.

Dedicado a los camarones que dieron la vida para que pudiese realizar mi trabajo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las facilidades para realizar este trabajo. Así mismo, al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por aceptarme dentro de su alumnado, el uso de sus instalaciones (las cuales fueron una segunda casa para mí).

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, mi directora de tesis, por su dedicación, responsabilidad y su guía constante durante la realización de este trabajo. Para mí, es un ejemplo a seguir. Siempre estuvo al pendiente de mí, de los experimentos, del material, de los organismos y el aprendizaje adquirido. Puedo decir que bajo su tutela no me hizo falta nada. Mil gracias por todo.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, quien compartió su amplia experiencia y conocimiento conmigo y en todo momento buscaba que las cosas se hicieran lo mejor posible. He aprendido mucho estos años gracias a ti.

A los miembros de mi comité: al Dr. Fernando Díaz, a la Dra. Carolina Álvarez y al Dr. Jorge Rosales por siempre estar accesibles en la resolución de dudas, así como en los comentarios constructivos para la escritura de la tesis y en los avances. Estoy muy agradecida por el papel que desempeñaron para que este trabajo quedará lo mejor posible.

Al Ing. Ernesto Lerma, por el mantenimiento oportuno de los sistemas de agua y la ayuda brindada a lo largo del tiempo en que tuve camarones, aparte de ser mi amigo. ¡Gracias!

A todo el personal del CICESE que trabaja muy duro para apoyar la investigación que se realiza en el centro (académico, técnico, administrativo, intendencia, seguridad). En especial a la Dra. Denise Re por su interés en el bienestar de mis organismos, a Guillermo González por su disposición y ayuda con el uso del liofilizador y a la psicóloga Yahaira Castañeda por brindarme su asesoría. He tenido la fortuna de convivir con gente muy amable en mi estancia de posgrado.

A la Dra. Laura Camacho, cuyos trabajos aparecen citados en el presente estudio muchísimas veces, sobre todo por ayudarme en la resolución de dudas y animarme a seguir contando la historia de las CHHs. Así como a los M.C. Yesenia Balderas y M.C. Roberto Arredondo por estar en el laboratorio antes que yo y animarme a seguir el camino de la maestría. Gracias.

A las amistades hechas durante el posgrado. A Pablo por ser mi compañero de laboratorio y compartir logros y desgracias (desgracias momentáneas afortunadamente), a Louisiana por pensar más allá del posgrado (gracias a ti salíamos de vez en cuando), a Blanca y a Manuel por siempre ser amables conmigo y ayudarme cada que había oportunidad. Y a lo lejos, no menos importante, a la futura física Eli Villarreal por leer cada cosa que tuviera que escribir.

A los chicos que me ayudaron al mantenimiento de los camarones, el futuro bioingeniero Ricardo Gámiz y a la futura M.C. Alison Ortega por su buena disposición para hacer esas tareas. A la M.C. Paty Paredes, quien me ayudó cuando aún eran pequeñas postlarvas a darles de comer en la tarde para que no tuviese que echarme otra vuelta.

Al Ing. Alejandro Espinoza Arroyo. Gracias por dar lo mejor de sí durante todos estos años para mantener unida a la familia. A mis tíos Rodrigo Montiel y Araceli Ramírez por ayudarme a visualizar un mejor futuro. A mis abuelos Porfirio Acosta e Irma Arzate por estar al pendiente a lo lejos y por todo su cariño.

A Alejandro Espinoza Jáuregui, has hecho muchísimo para que nuestro proyecto personal de familia crezca y continúe. Espero mucha felicidad para el futuro y ver los frutos de nuestro esfuerzo, además de estar a tu lado cuando lo necesites.

A mi madre, la Dra. Elia Montiel Arzate, por sentar las bases tempranas de este proyecto, los sacrificios hechos, el conocimiento dado, el enorme libro de biología que podía hojear a los seis años. Ahora mi tesis estará en la misma biblioteca que las tuyas.

A mi hijo Isaac Alexander Espinoza Montiel, por estar junto a mi todo, todo, todo el tiempo y ayudar con el mantenimiento de los camarones también, sin tener temor a tocarlos o a alimentarlos. Te amo muchísimo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Órgano X - glándula del seno.....	2
1.1.2 Superfamilia CHH.....	3
1.1.3 Hormona Hiperglucémica de Crustáceos.....	4
1.1.4 Hormonas hiperglucémicas de crustáceos recombinantes (r-CHHs).....	6
1.1.5 Metabolismo de lípidos en crustáceos	8
1.1.6 Control endócrino en el metabolismo de lípidos	10
1.1.7 <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
1.1.8 CHHs de <i>L. vannamei</i>	12
1.2 Justificación	17
1.3 Hipótesis.....	18
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2. Metodología.....	19
2.1 Optimización de la purificación de la proteína de fusión NusA-CHH- A.....	19
2.1.1 Diálisis.....	20
2.1.2 Purificación por cromatografía de afinidad.....	20
2.1.3 Digestión con enterocinasa.....	20
2.1.4 Análisis de proteínas.....	21
2.1.4.1 Precipitación de proteínas.....	21
2.1.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	21
2.1.4.3 Cuantificación de proteínas.....	22

2.1.5 Inmunodetección mediante Western blot	22
2.2 Expresión de CHH-A recombinante nativa en <i>P. pastoris</i>	23
2.2.1 Inducción de cultivos.....	24
2.2.2 Análisis de las proteínas.....	25
2.1.3 Purificación de la neurohormona recombinante nativa CHH-A	25
2.2.3.1 Preparación de las muestras.....	25
2.2.3.1.1 Liofilización.....	26
2.2.3.1.2 Precipitación por sulfato de amonio.....	26
2.2.3.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC).....	27
2.2.4.3 Dot blot.....	27
2.3 Bioensayos de actividad biológica de rCHH-B2.....	28
2.3.1 Crecimiento y mantenimiento de organismos.....	28
2.3.2 Condiciones experimentales y aclimatación.....	25
2.3.3 Ablación y tratamientos experimentales.....	30
2.4 Análisis de las muestras	30
2.5 Análisis estadísticos	31
Capítulo 3. Resultados.....	32
3.1 Optimización de la purificación de la proteína de fusión NusA-CHH-A.....	32
3.1.1 Purificación de NusA-CHH-A.....	32
3.1.2 Digestión con enterocinasa.....	33
3.2 Producción de neurohormona recombinante nativa CHH-A en <i>P. pastoris</i>	35
3.2.1 Expresión de rCHH-A en la cepa SMD1168H cultivada en medio BMM.....	35
3.2.1.1 Preparación de muestra liofilizada.....	36
3.2.1.2 Purificación de rCHH-A expresada en medio mínimo por RP-HPLC.....	36
3.2.2 Expresión de rCHH-A en la cepa X-33 cultivada en medio BMMY.....	38
3.2.2.1 Concentración de rCHH-A con sulfato de amonio.....	39
3.2.2.2 Purificación por RP-HPLC de rCHH-A expresada en medio complejo.....	40
3.3 Bioensayos de actividad de rCHH-B2.....	41
3.3.1 Crecimiento de organismos.....	42
3.3.2. Seguimiento de ciclo de muda y ablación.....	42
3.3.3. Evaluación de actividad hiperglucémica.....	44

3.3.4 Efecto de la neurohormona CHH-B2 en los niveles de triglicéridos de la hemolinfa	45
3.3.5 Efecto de la neurohormona CHH-B2 en los niveles de ácidos grasos de la hemolinfa.....	46
3.3.6. Efecto de la neurohormona CHH-B2 en los niveles de fosfolípidos de la hemolinfa.....	47
Capítulo 4 . Discusión.....	49
4.1 Sistemas de expresión de CHH.....	49
4.2 Aspectos funcionales de CHH.....	51
4.2.1 Efecto hiperglucémico de rCHH-B2.....	51
4.2.2 Efecto hiperlipidémico de CHH.....	53
4.2.3 Proceso de lipólisis en respuesta a CHH.....	55
4.2.4 Cambios del metabolismo de lípidos en respuesta a condiciones ambientales y factores internos y su relación con CHH.....	59
Capítulo 5 . Conclusiones.....	63
Capítulo 6 . Perspectivas	64
Literatura citada.....	65

Lista de figuras

Figura		Página
1	Complejo del órgano X- glándula del seno.....	3
2	Ciclo de vida de los crustáceos peneidos	12
3	Estructura del gen <i>chhB</i> y de las isoformas CHH-B1 y CHH-B2	13
4	Secuencia del gen <i>chhA</i>	15
5	CHH-A recombinante expresada previamente como péptido de fusión	16
6	Esquema del vector de expresión pPICZ α A	23
7	Gel de Tricina SDS-Page de los productos de la purificación obtenidos de la cromatografía de afinidad.....	33
8	Digestiones con enterocinasa.....	34
9	Ensayos con urea.....	34
10	Expresión de rCHH-A en medio mínimo.....	35
11	Análisis de los liofilizados resuspendidos en PBS 1X.....	36
12	Perfil cromatográfico del extracto obtenido al liofilizar el medio de cultivo BMM.....	37
13	Dot blot de las fracciones liofilizadas y resuspendidas en PBS 1X.....	37
15	Expresión de rCHH-A en medio complejo.....	38
16	Días de mayor expresión de rCHH-A en medio complejo.....	39
17	Precipitación de rCHH-A por sulfato de amonio al 50%.....	40
18	Perfil cromatográfico obtenido de la precipitación de proteínas del sobrenadante del medio de cultivo BMM.....	40
19	Dot blot de las fracciones liofilizadas y resuspendidas en PBS 1X provenientes de la purificación por RP-HPLC.....	41
20	Crecimiento de postlarvas de <i>L. vannamei</i>	42
21	Curva de crecimiento de <i>L. vannamei</i> en etapa juvenil a sub-adulta.....	42
22	Mantenimiento de los organismos en condiciones controladas.....	43

23	Ablación.....	43
24	Niveles de glucosa de las muestras de hemolinfa.....	45
25	Niveles de triglicéridos de las muestras de hemolinfa.....	46
26	Concentración de ácidos grasos en las muestras de hemolinfa.....	47
27	Concentración de fosfolípidos en las muestras de hemolinfa.....	48
28	Relación entre liberación de glucosa y lípidos en respuesta a CHH.....	58

Capítulo 1. Introducción

Los crustáceos son un subfilo de los artrópodos caracterizados por ser morfológicamente diversos (Martin y Davis, 2001). Es posible encontrarlos en una gran variedad de ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos (Bliss y Mantel, 1968). Su sistema neuroendocrino les permite responder a una gran variedad de estímulos a través de la regulación de mecanismos fisiológicos a corto, mediano y largo plazo (De Kleijn y Van Herp, 1995). El entendimiento de los aspectos de la fisiología y endocrinología de los crustáceos resulta de gran importancia para el desarrollo de cultivos de especies acuáticas de importancia comercial y biotecnológica.

El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, es un crustáceo peneido del orden Decapoda. Es la especie de camarón más cultivada a nivel mundial dada su alta tasa de sobrevivencia a enfermedades y su capacidad de sobrevivir en altas densidades de cultivo (FAO, 2016). Como todos los crustáceos decápodos, este organismo produce neurohormonas de naturaleza peptídica en el complejo del órgano X - glándula del seno (OX-GS), ubicado en el pedúnculo ocular. Los neuropéptidos más abundantes de este órgano son las hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés), que forman parte de una superfamilia de péptidos entre los cuales se incluyen las hormonas inhibitoras de la muda (MIH), las hormonas inhibitoras de la vitelogénesis (VIH), y las hormonas inhibitoras del órgano mandibular (MOIH) (Lacombe *et al.*, 1999; Böcking *et al.*, 2002).

La principal actividad de las CHHs es promover la glucogenólisis en condiciones de estrés, lo que da lugar al aumento de los niveles de glucosa en la hemolinfa (Sedlmeier, 1985; Fanjul-Moles, 2006). Sin embargo, también están involucradas en otros procesos metabólicos y respuestas fisiológicas de los crustáceos.

Uno de estos procesos es la regulación del metabolismo de lípidos (Santos *et al.*, 1997), el cual es diferente del metabolismo de los mamíferos en algunos aspectos (Chang y O'Connor, 1983) y varía entre los diferentes crustáceos (Reis *et al.*, 2017).

A la fecha se han descrito cuatro isoformas de la neurohormona CHH en *L. vannamei*: CHH-A, CHH-B1, CHH-B2 y LvCHH_PO_ES. Las primeras 3 variantes han sido secuenciadas (Lago-Lestón *et al.*, 2007), clonadas (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; López-Rodríguez, 2009) y expresadas en nuestro grupo en la levadura *Pichia pastoris* (Arredondo-Espinoza, 2014; Balderas-González, 2014, Camacho-Jiménez, 2016) y adicionalmente CHH-A se expresó como proteína de fusión en la bacteria *Escherichia coli* (Montiel-Arzate, 2016). El efecto hiperglucémico de estas tres isoformas ha sido corroborado en diferentes trabajos

(Arredondo-Espinoza, 2014; Camacho-Jiménez *et al.*, 2015, Camacho-Jiménez *et al.*, 2017a). Adicionalmente, se sabe que CHH-B1 y CHH-B2 participan en los procesos de osmorregulación (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017a; 2017b; 2018) y tienen un efecto sobre los niveles de triglicéridos en la hemolinfa de *L. vannamei* (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017b). Sin embargo, no se han estudiado los efectos de estas hormonas sobre otros tipos de lípidos importantes presentes en la hemolinfa de esta especie, como los fosfolípidos, que componen la mayor parte de los lípidos de la hemolinfa (Clarke y Wickins, 1980; Chapelle, 1986). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la neurohormona recombinante CHH sobre el contenido de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triglicéridos en la hemolinfa de *L. vannamei* mediante ensayos *in vivo* con organismos sub-adultos ablacionados analizados en diferentes periodos de tiempo post-inyección.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Órgano X - glándula del seno

El complejo órgano X - glándula del seno (OX-GS) es considerado el principal centro neuroendocrino de crustáceos (De Kleijn y Van Herp, 1995). El órgano X está conformado por un grupo de células neurosecretoras heterogéneas conectadas a la glándula del seno por medio de terminales axónicas (Fig. 1). En la *medulla terminalis* del órgano X se sintetizan neurohormonas de naturaleza peptídica, las cuales son transportadas hacia la glándula del seno en gránulos secretores por medio de largos axones. La glándula del seno es la encargada de almacenar y liberar neurohormonas peptídicas en la hemolinfa (Cooke y Sullivan, 1982; Fanjul-Moles, 2006). Las neurohormonas pueden actuar directamente sobre los tejidos y órganos diana o de forma indirecta mediante otros órganos endocrinos (Cooke y Sullivan, 1982). Entre las principales hormonas producidas en el complejo OX-GS se encuentran las hormonas de la familia de cromatoforotropinas y las que pertenecen a la superfamilia CHH (Fanjul-Moles, 2006).

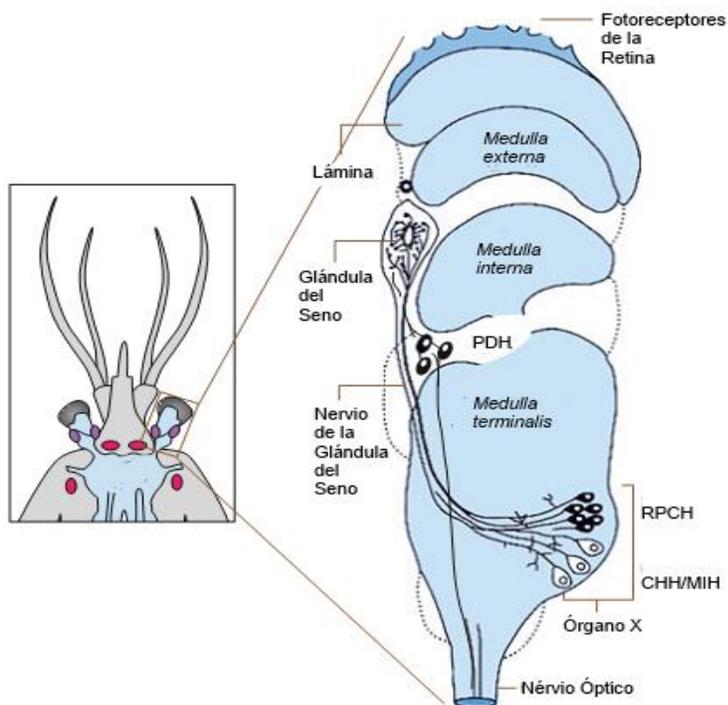


Figura 1. Complejo del órgano X- glándula del seno. Modificado de Nässel y Larhammar (2013), tomado de Camacho-Jiménez (2016).

1.1.2 Superfamilia CHH

La superfamilia CHH recibe su nombre por el péptido mayoritario del complejo OX-GS, el cual es la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH por sus siglas en inglés). Los otros péptidos que forman parte de este grupo son las MIHs, las VIHs y las MOIHs (Lacombe *et al.*, 1999). Para 2012 se habían identificado alrededor de 80 péptidos pertenecientes a esta superfamilia en 40 especies de crustáceos (Webster *et al.*, 2012).

Las hormonas de la superfamilia CHH tienen diversos aspectos en común: todas tienen un peso molecular de entre 8-9 kDa y alrededor de 72-78 residuos de aminoácidos y poseen residuos altamente conservados de arginina, fenilalanina, ácido aspártico y seis residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro en la misma posición (Böcking *et al.*, 2002).

Esta superfamilia de hormonas se subdivide a su vez en la familia CHH (péptidos tipo I), y la familia MIH/VIH/MOIH (péptidos tipo II) (De Kleijn y Van Herp, 1995; Lacombe *et al.*, 1999). Esta división se basa en las propiedades funcionales, moleculares y bioquímicas de las neurohormonas.

Una de las diferencias entre ambas familias es que los péptidos pertenecientes a la familia de las CHHs poseen un péptido precursor relacionado con CHH (CPRP), cuya función es desconocida a la fecha (Hopkins, 2012). Otras diferencias recaen en que la mayoría de los péptidos CHH tienen el N- terminal bloqueado por un residuo de piro-Glu (Kegel *et al.*, 1991; Chung y Webster, 1996) y que algunos péptidos de esta familia pueden presentar el C-terminal amidado (Mosco *et al.*, 2008). Los péptidos CHH carecen de un residuo conservado de glicina en la posición 12 que poseen los péptidos de la familia la familia MIH/VIH/MOIH (Katayama y Nagasawa, 2004).

En el caso específico de los péptidos de la familia CHH, los genes que codifican estas neurohormonas se clasifican dentro de dos categorías: los genes tipo I que poseen 4 exones y 3 intrones; y los genes de tipo II, que presentan 3 exones y 2 intrones (Chan *et al.*, 2003).

1.1.3 Hormona Hiperglucémica de Crustáceos

La actividad más conocida y estudiada de las CHHs es su participación en la regulación del metabolismo de carbohidratos. Su mecanismo de acción implica la oxidación de la glucosa utilizando las reservas de carbohidratos (glucógeno del hepatopáncreas y músculo), provocando un efecto hiperglucémico a corto plazo (Keller *et al.*, 1985). Estas neurohormonas regulan la expresión del ARNm de las enzimas glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa (Nagai *et al.*, 2011) incrementando la actividad de la primera enzima e inhibiendo la segunda, lo que promueve la glucogenólisis (Sedlmeier, 1985). A su vez, las CHHs provocan un aumento en la concentración de nucleótidos cíclicos, como cGMP (Goy *et al.*, 1990) y cAMP (Sedlmeier y Keller, 1981), los cuales actúan como segundos mensajeros para estimular la glucogenólisis (Sedlmeier, 1982; Fanjul-Moles, 2006). En este sentido, Sedlmeier (1985) observó que cuando el hepatopáncreas del cangrejo de los canales *Orconectes limosus* era incubado en solución con CHH las reservas de glucosa se liberaron a la par de la disminución de las reservas de glucógeno. Este autor así mismo observó que las CHHs promueven el aumento de la secreción de amilasa en el hepatopáncreas del mismo organismo mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} (Sedlmeier, 1988).

Por otro lado, se ha encontrado que algunas CHHs están involucradas en procesos como la muda (Chung *et al.*, 1999), inhibición de la muda (Zarubin *et al.*, 2009), secreción de enzimas digestivas (Sedlmeier, 1988), osmorregulación (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003), reproducción (De Kleijn y Van Herp, 1998; De Kleijn *et al.*, 1998), inhibición de la vitelogénesis (Khayat *et al.*, 1998), metabolismo de lípidos (Santos *et al.*, 1997) y fotoperiodo (Kallen *et al.*, 1988). También se sabe que participan en la respuesta al estrés, por ejemplo, a metales pesados en el medio (Lorenzon *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2011), patógenos (Wanlem *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017) e hipoxia, así como a condiciones desfavorables de temperatura y salinidad (Chang, 2005). Por lo tanto, las CHHs están involucradas en múltiples aspectos de la fisiología y mecanismos de regulación en crustáceos por lo que se les considera como hormonas multifuncionales (Webster *et al.*, 2012). Cabe mencionar que debido a las diferencias estructurales entre las hormonas de diferentes especies de crustáceos no todas las CHHs tienen las mismas funciones (Keller *et al.*, 1985). De hecho, se ha observado una correlación entre la actividad de las hormonas y la relación sistemática de las especies. Por ejemplo, las hormonas provenientes de los braquiuros son efectivas en los miembros de este infraorden, pero inefectivas en los miembros del infraorden Astacidea (Keller *et al.*, 1985).

Las CHHs participan de forma específica en diferentes tejidos (Huberman, 2000) y se ha sugerido que la multifuncionalidad de estas hormonas se debe a la presencia de subtipos que se generan por diversos mecanismos, como por ejemplo el ser productos de diferentes genes (Chan *et al.*, 2003). Hay variantes que son producto de modificaciones postraduccionales que se llevan a cabo después de que el péptido es sintetizado en los ribosomas, como es la isomerización L a D de la tercera fenilalanina (Aguilar *et al.*, 1995) o el bloqueo del N-terminal, que es la presencia de un residuo de piroglutamato en lugar de uno de glutamina (Chung y Webster, 1996). En el caso de la isomerización, esta se refiere al proceso químico mediante el cual una molécula es transformada en otra que posee el mismo número y tipo de átomos pero que difiere en la forma en que estos se arreglan (McMurry, 2008).

Las isoformas que se producen por corte y empalme alternativo se conocen como péptidos CHH y CHH-like (Chen *et al.*, 2005). Las CHHs que poseen un grupo amida en el C-terminal se conocen como péptidos tipo CHH, mientras que las CHHs que tienen el C-terminal libre, es decir que conservan el grupo carboxilo terminal se conocen como CHH-like. La amidación del C-terminal es una modificación que se lleva a cabo de manera postraducciona.

La presencia del C-terminal amidado se ha asociado con la actividad hiperglucémica debido a los reportes de péptidos CHH-like que no tienen esta actividad (Ohira *et al.*, 2006) o que requieren estar en altas

concentraciones para promover un efecto en los niveles de nucleótidos cíclicos (Katayama y Chung, 2008). Sin embargo, estudios dosis-respuesta realizados con CHH-B1 de *L. vannamei*, una CHH-like, mostraron que la hormona posee alta actividad hiperglucémica (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015). A partir del análisis de secuencias realizado por Camacho-Jiménez y colaboradores (2015) se sugiere que la secuencia de aminoácidos del C-terminal y su estructura son importantes para la actividad de las CHHs no amidadas como CHH-B1, así como la dosis administrada. Estudios realizados por Mettullo y colaboradores (2004), han mostrado que la delección puntual de aminoácidos en motivos conservados de las CHHs resulta en la pérdida de actividad hiperglucémica de los péptidos.

De hecho, la expresión de estas hormonas varía incluso entre los órganos de un mismo individuo (Gu *et al.*, 2000; Tiu *et al.*, 2007), ya que pueden expresarse en tejidos adicionales al pedúnculo ocular. La expresión de los transcritos de CHH está relacionada con factores físicos como la temperatura y la salinidad (Lago-Lestón *et al.*, 2007), así como con la etapa de desarrollo en la cual se encuentren los organismos (Gu *et al.*, 2000).

1.1.4 Hormonas hiperglucémicas de crustáceos recombinantes (rCHHs)

Debido a la similitud estructural que existe entre los diferentes péptidos CHH producidos en glándula del seno la purificación de una variante en particular resulta complicado. Además, para poder purificar suficiente cantidad de neurohormona para llevar a cabo bioensayos se requiere sacrificar a una cantidad considerable de organismos para obtener suficientes de glándulas del seno (Chang *et al.*, 2010). En este sentido, el avance y el uso de la ingeniería genética ha permitido la expresión de neurohormonas recombinantes en cantidad suficiente para llevar a cabo estudios fisiológicos, bioquímicos y estructurales. Sin embargo, dada la conformación estructural de estos péptidos, la expresión y purificación de CHHs recombinantes (rCHHs) supone varios retos para asegurar que conserven su actividad biológica.

Las plataformas de sistemas de expresión más utilizadas en la actualidad son las que están basadas en la enterobacteria *E. coli*, dado que entre sus ventajas está la alta densidad celular que se puede llegar a obtener en corto tiempo, además de que el escalamiento del proceso es más fácil de realizar que con otros sistemas de expresión (Baneyx y Mujacic, 2004).

A pesar de los altos rendimientos de producción de proteínas que se pueden lograr utilizando a *E. coli* (Nagai *et al.*, 2009), los péptidos se tienen que recuperar del espacio periplásmico en dado caso de que se formen agregados proteicos insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (Hartley y Kane, 1987), lo que ha ocasionado desventajas en la purificación de rCHHs (Ohira *et al.*, 2006; Morera *et al.*, 2013). Cabe señalar que para contrarrestar este inconveniente se han expresado rCHHs de origen bacteriano con etiquetas que promueven la solubilidad de los péptidos, así como etiquetas que ayuden a su purificación, las cuales pueden ser removidas posteriormente para dejar las proteínas con la secuencia idéntica a la hormona natural. De esta forma se han expresado los péptidos Pej-SGP-VII (Nagai *et al.*, 2009) y Pej-SGP-I (Inoue *et al.*, 2011) del camarón Kuruma *Marsopenaeus japonicus*.

Por otro lado, también se han producido rCHHs utilizando plataformas basadas en la levadura *P. pastoris*, como son las CHHs de los crustáceos peneidos *M. japonicus* (Ohira *et al.*, 2003) y *L. vannamei* (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; Camacho-Jiménez *et al.*, 2015; Camacho-Jiménez *et al.*, 2017), así como del cangrejo rojo terrestre *Gecarcinus lateralis*, que es un braquiuro (Zarubin *et al.*, 2009). *P. pastoris*, al ser un microorganismo eucariota puede llevar a cabo modificaciones postraduccionales y permite obtener la proteína secretada en forma soluble (Daly y Hearn, 2005). En esta plataforma existen vectores que permiten la construcción tanto de proteínas nativas como con etiquetas adicionales que ayuden a su identificación y purificación, además de contar con promotores que pueden ser inducidos con varias fuentes de carbono.

Gracias a la producción de rCHHs ha sido posible evaluar la actividad hiperglucémica de las isoformas amidadas y no amidadas (Ohira *et al.*, 2006, Nagai *et al.*, 2009, Camacho-Jiménez *et al.*, 2015). Adicionalmente se ha analizado su efecto en la respuesta de organismos infectados por bacterias patógenas (Wanlem *et al.*, 2011), la inhibición en la producción de ecdisteroides (Zarubin *et al.*, 2009) y su papel en la modificación de la presión osmótica del medio interno de los organismos cuando estos son sometidos a cambios de salinidad (osmoregulación) (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017 a; 2017b), entre otros. Del mismo modo, las rCHHs han permitido llevar a cabo estudios estructurales mediante cristalografía y análisis de rayos X (Inoue *et al.*, 2016; Tsutsui *et al.*, 2016).

1.1.5 Metabolismo de lípidos en crustáceos

Los lípidos son compuestos orgánicos hidrófobos con una gran variedad de funciones biológicas. Tanto en invertebrados como en vertebrados, particularmente los fosfolípidos y los esteroides, son necesarios para mantener la integridad fisiológica de las membranas celulares, dado que son elementos estructurales de las mismas. Los lípidos proveen de energía para la mayoría de los procesos anabólicos al ser la mayor fuente de reservas energéticas, además de cumplir funciones estructurales y reguladoras (Lehninger *et al.*, 2008).

Los triglicéridos están compuestos por tres cadenas de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol mediante un enlace éster. Suelen ser las reservas energéticas de muchos organismos, tanto vertebrados como invertebrados. Por ejemplo, el hepatopáncreas de los crustáceos peneidos contiene el 18% de los lípidos totales del cuerpo, siendo los triglicéridos los más abundantes. Estos constituyen el 8% de los lípidos totales (Chandumpai *et al.*, 1991).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas (pueden tener de 4 a 36 átomos de carbono), que pueden ser saturadas si carecen de dobles enlaces entre estos átomos, o insaturadas si están presentes. Esto es importante debido a que el grado de saturación determina las propiedades físicas de los lípidos (Lehninger *et al.*, 2008). El catabolismo de los ácidos grasos se da principalmente por β -oxidación y en el caso específico de crustáceos, siendo el proceso muy similar al de los vertebrados (Chapelle, 1973).

Los fosfolípidos forman la bicapa lipídica de las membranas celulares. Son moléculas constituidas de dos largas cadenas de ácidos grasos unidas, usualmente por un enlace éster, a un pequeño grupo polar, generalmente un fosfato (Lodish *et al.*, 2016).

En crustáceos, el hepatopáncreas es el mayor sitio de almacenamiento de reservas lipídicas, así como de lipogénesis. La composición de los lípidos de la hemolinfa suele ser un reflejo de los lípidos del hepatopáncreas y la naturaleza de los lípidos almacenados depende de la biosíntesis, nutrición y las interacciones ambientales (Gilbert y O'Connor, 1970).

Con respecto al metabolismo de lípidos, existen diferencias notables entre crustáceos y vertebrados. Una de ellas es que los crustáceos no sintetizan esteroides, dado que no pueden ciclar el escualeno; sin embargo, son capaces de modificar los esteroides ingeridos para cubrir sus requerimientos estructurales y metabólicos, los cuales varían entre las diferentes clases de crustáceos (Chang y O'Connor, 1983) y sus estadios de desarrollo (Rivera-Pérez *et al.*, 2010). La forma en que almacenan los lípidos también difiere entre las especies de crustáceos. En el caso de los copépodos planctónicos las reservas de lípidos están compuestas por ésteres cerosos (Nevenzel, 1970), mientras que los peneidos almacenan principalmente triglicéridos en el hepatopáncreas (Chandumpai *et al.*, 1991).

Con base en estudios realizados con la langosta roja espinosa *Palinurus interruptus* se ha determinado que los lípidos neutrales ingeridos son incorporados principalmente como fosfolípidos, acción que se lleva a cabo en las células R del hepatopáncreas y posteriormente son liberados a la hemolinfa para ser utilizados por otros órganos o para su conversión en triglicéridos y ser almacenados como reservas (Lee y Puppione, 1978).

En la hemolinfa, los lípidos son transportados por lipoproteínas, principalmente HDL (lipoproteínas de alta densidad, por sus siglas en inglés) y VHDL (lipoproteínas de muy alta densidad (Yépiz-Plascencia *et al.*, 2000) en una razón 1:1 entre lípidos y proteína, donde la fracción lipídica está compuesta en su mayoría por fosfolípidos, siendo los más abundantes la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (Brichon *et al.*, 1980; Ju *et al.*, 2011) seguidos de colesterol y triglicéridos (Lee y Puppione, 1978; Chang y O'Connor, 1983). Esto hace que en crustáceos los fosfolípidos sean los principales lípidos de la hemolinfa, constituyendo alrededor del 1% del peso seco de estos organismos (Chapelle, 1986). Los fosfolípidos son importantes en el transporte de tripalmitina y colesterol y se requieren para su incorporación en los tejidos (Clarke y Wickins, 1980).

En decápodos, la utilización de lípidos para funciones esenciales es preferente con respecto a su uso como fuente de energía, por lo que no acumulan gran cantidad de lípidos (Chandumpai *et al.*, 1991). Cuando existe un exceso de lípidos almacenados éstos se utilizan para procesos que son energéticamente desfavorables, como la muda. Durante la etapa de premuda temprana hay un aumento en los lípidos del hepatopáncreas y una disminución en la premuda tardía (Barclay *et al.*, 1983), lo cual se atribuye a que los lípidos son liberados como ácidos grasos libres en la hemolinfa (Gilbert y O'Connor, 1970). Durante la etapa de muda los organismos no pueden alimentarse debido a que el exoesqueleto es muy suave. Por lo tanto, los organismos en premuda utilizan sus reservas lipídicas sintetizadas en la etapa de intermuda (Chang y O'Connor, 1983) y premuda temprana (Barclay *et al.*, 1983). La exposición de crustáceos a

condiciones de inanición similares a las que se enfrentan los organismos durante la etapa de muda, provoca el consumo de los lípidos del hepatopáncreas así como pérdida de fosfolípidos estructurales, como se ha observado en el langostino *Penaeus esculentus* (Chandumpai *et al.*, 1991). Así mismo se han observado cambios en el metabolismo de lípidos en procesos fisiológicos que demandan energía como es la osmoregulación. En el caso del cangrejo granuloso *Neohelice granulata*, se ha observado la movilización de lípidos cuando es expuesto a condiciones hiper-osmóticas (Chittó *et al.*, 2009). Las células que transportan las sales en las branquias en crustáceos tienen una gran cantidad de mitocondrias, en las cuales se lleva a cabo la beta oxidación de los ácidos grasos, y que son necesarias dado el requerimiento energético de este órgano (Hochachka *et al.*, 1970).

Los peneidos tienen una capacidad limitada para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados pertenecientes a las familias n-6 y n-3 *de novo*, así como de elongarlos y desaturarlos (Kanazawa *et al.*, 1979) y dado que se consideran ácidos grasos esenciales estos deben ser obtenidos de la dieta (González-Félix *et al.*, 2003). En *L. vannamei*, la síntesis de ácidos grasos aumenta cuando se encuentran expuesto a salinidades extremas, tanto condiciones hiper-osmóticas como hipo-osmóticas (Chen *et al.*, 2014). La dieta rica en ácidos grasos promueve la sobrevivencia del camarón blanco en estas condiciones (Chen *et al.*, 2015).

1.1.6 Control endocrino en el metabolismo de lípidos

Los primeros estudios endocrinos mostraron que la remoción del pedúnculo ocular de crustáceos decápodos *G. lateralis* y el cangrejo de río viril *Orconectes virilis*, mediante un proceso conocido como ablación, provocó la disminución de lípidos neutrales y fosfolípidos del hepatopáncreas (O'Connor y Gilbert, 1968). Los autores sugirieron que este efecto se debía a la disminución de la síntesis de lípidos o a un aumento de su catabolismo promovido por un factor presente en los pedúnculos oculares, lo que se restituía parcialmente con la inyección de extractos de pedúnculo ocular (O'Connor y Gilbert, 1968). Actualmente se sugiere que la presencia de las neuhormonas CHHs sintetizadas en el complejo OX-GS del pedúnculo ocular de los crustáceos podrían ser uno de los factores que modifican el metabolismo de lípidos.

Santos y colaboradores (1997) observaron una disminución en los lípidos totales de la hemolinfa del cangrejo *N. granulata* cuando el organismo fue ablacionado, lo cual fue revertido por inyecciones de CHH. Estos autores también observaron un incremento en los niveles de triglicéridos y fosfolípidos en la

hemolinfa al inyectar CHH en cangrejos europeos verdes (*Carcinus maenas*) ablacionados bilateralmente. Ensayos *in vitro* con el cangrejo *O. limosus* constataron que la incubación del hepatopáncreas en una solución de CHH provocó la liberación de ácidos grasos y fosfolípidos, más no de triglicéridos (Santos *et al.*, 1997).

Con lo que respecta a *L. vannamei*, la inyección de las hormonas recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 provocó un incremento en los niveles de triglicéridos en la hemolinfa de organismos juveniles expuestos a condiciones hiper-osmóticas. Este es el único trabajo a la fecha sobre control endocrino de metabolismo de lípidos en camarón (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017b).

1.1.7 *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco, *L. vannamei*, es originario de la costa oriental del Océano Pacífico, con una distribución desde Sonora, México, hasta Tumbes, Perú, en aguas con temperaturas superiores a 20°C (FAO, 2006). Sin embargo, su cultivo ha sido introducido en diversas partes del mundo, como son Estados Unidos, Belice, Brasil, Venezuela, el sureste asiático, China e India (FAO, 2006).

Su desarrollo comprende las etapas plactónicas de nauplio, protozoa, misis y postlarva temprana (Fig. 2). Posteriormente, en la etapa de postlarva se trasladan a ecosistemas salobres costeros, en donde viven hasta que son adultos para después regresar al mar para desovar. Una hembra de 30-45 g puede liberar hasta 100,000 y 250,000 huevos de 0.22 mm de diámetro (FAO, 2006). Su ciclo de vida implica que estos organismos cambien de salinidad, temperatura y fuente de alimentación en periodos cortos de tiempo. Es por esta capacidad de adaptación que *L. vannamei* es una especie altamente cultivada (Díaz *et al.*, 2001). En el 2014 esta especie contribuyó con el 45% de la producción de camarón a nivel mundial (FAO, 2016).

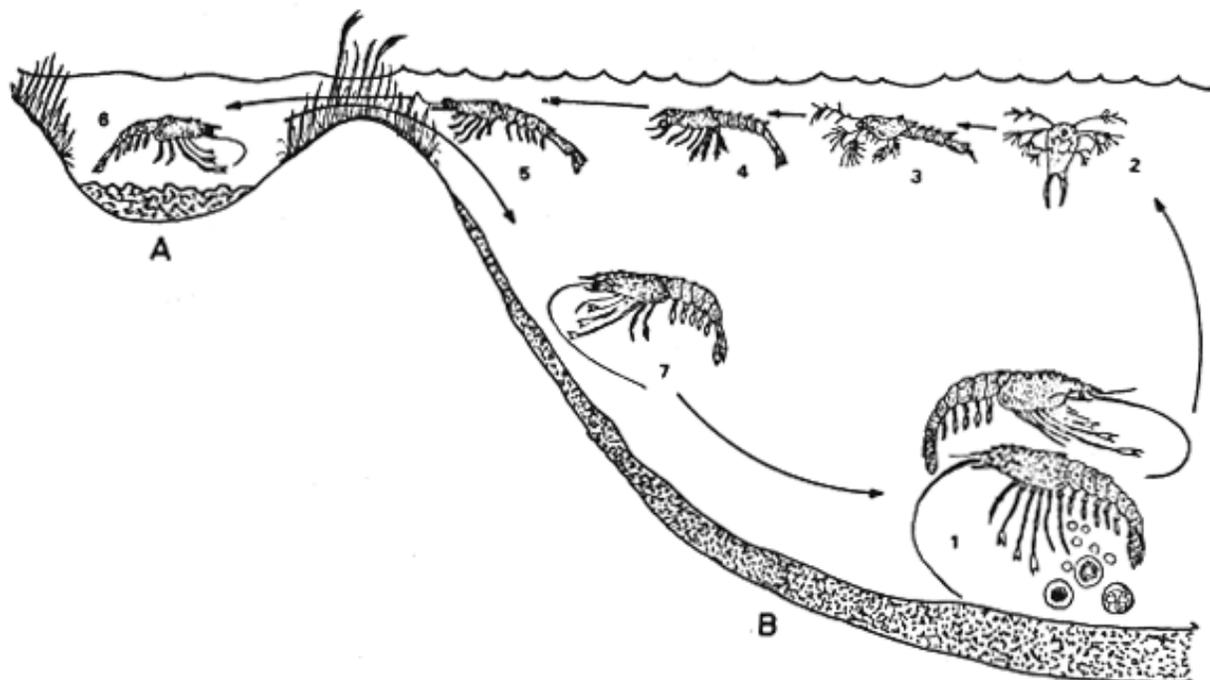


Figura 2. Ciclo de vida de los crustáceos peneidos. Se señalan las etapas de nauplio (2), protozoa (3), misis (4), postlarva (5), juvenil (6) y adulta (7-8). A corresponde a ecosistema salobre y B a mar abierto (FAO, 2006).

En México también es la especie de camarón más cultivada y pescada (FIRA, 2009). La producción nacional de camarón aporta poco más del 10% del volumen de productos pesqueros, aunque en términos monetarios es casi la mitad del valor comercial del sector (Abascal y Macías, 2009). El periodo de 2003-2013 la producción de esta especie fue de 50 mil toneladas (Conapesca, 2013).

1.1.8 CHHs de *L. vannamei*

A la fecha, se han descrito 4 variantes de CHH en *L. vannamei*: CHH-A (GenBank AY434016), CHH-B1 (GenBank AY167045), CHH-B2 (GenBank AY167046), y LvCHH_PO_ES ES (GenBank KJ660843).

LvCHH_PO_ES es un péptido codificado por el gen *Lvchh*, el cual posee 4 exones y 3 intrones. Esta neurohormona de expresión extraneural carece de la amidación en el C-terminal y su actividad aún no ha sido caracterizada. Sin embargo, su alta expresión en el intestino durante el periodo de premuda sugiere que tiene un papel en el proceso de absorción de agua durante la muda (Ventura-López *et al.*, 2016).

Las neurohormonas CHH-B2 y CHH-B1 poseen 74 y 73 residuos de aminoácidos, respectivamente. Son isoformas que se producen mediante corte y empalme alternativo del gen *chhB* y comparten los primeros 40 aminoácidos, mientras que los residuos del C-terminal tienen un bajo nivel de conservación (Lago-Lestón *et al.*, 2007). CHH-B2 posee la señal de procesamiento GK para α -amidación en el C-terminal, característica que no se encuentra presente en CHH-B1. Por lo tanto, CHH-B1 es catalogada como un péptido CHH-like sin C-terminal amidado. Se ha sugerido que la amidación favorece el plegado correcto de los péptidos recombinantes (Nagai *et al.*, 2009) y cambia la carga del C-terminal de negativa a neutra, lo que favorece la afinidad de los péptidos con el receptor de CHH y causa un aumento adicional de los niveles de glucosa de la hemolinfa (Katayama *et al.*, 2002).

El gen *chhB* se encuentra conformado por 4 exones y 4 intrones. CHH-B1 está conformada por todos los exones, mientras que en CHH-B2 solamente se encuentran los exones I, II y IV (Fig. 3). El residuo 40, el cual es una lisina, está localizado en la frontera de los exones II y III o II y VI, según sea el caso. Los primeros 2 nucleótidos que codifican para este aminoácido están en el exón II mientras que el nucleótido faltante se encuentra en el siguiente exón para ambos péptidos maduros (Lago-Lestón *et al.*, 2007).

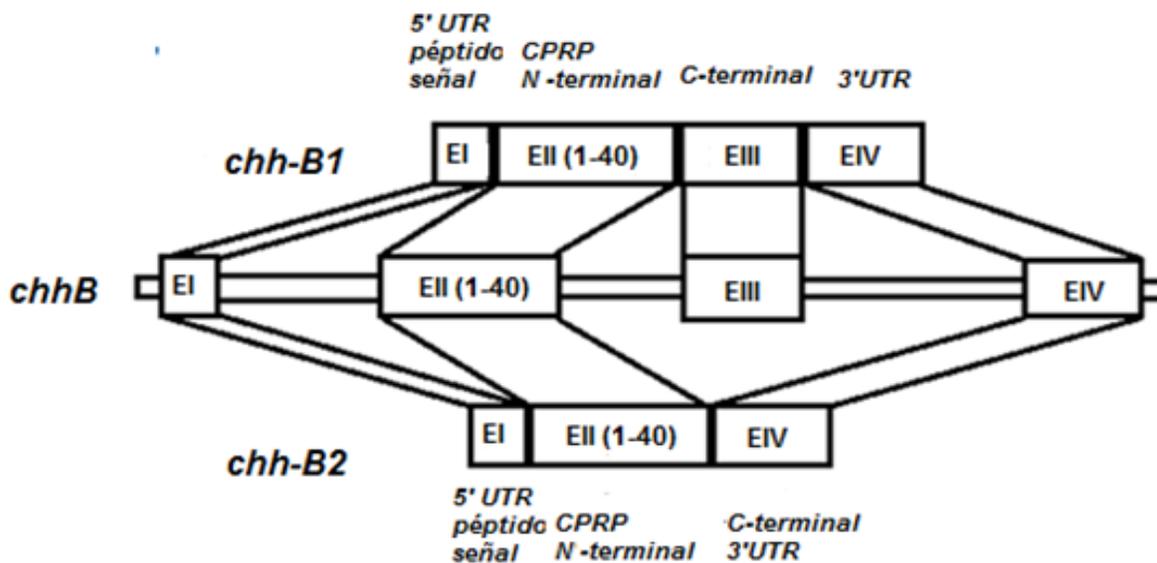


Figura 3. Estructura del gen *chhB* y de las isoformas CHH-B1 y CHH-B2. E representa los exones, UTR es la región no traducida (Modificado de Lago-Lestón *et al.*, 2007, tomado de Camacho-Jiménez, 2015).

El gen *chhB* de *L. vannamei* ha sido clonado y CHH-B1 y CHH-B2 expresadas en la levadura metilotrófica *P. pastoris*. CHH-B1 fue expresada con una etiqueta de histidinas (6x His), un epítipo *c-myc* en el C-terminal y un sitio de reconocimiento de enterocinasa (Sánchez-Castrejón et al, 2007). La actividad hiperglucémica de esta neurohormona fue menor que la observada con el extracto de pedúnculo ocular, posiblemente por la presencia de residuos de aminoácidos adicionales. Se ha sugerido que las etiquetas *c-myc* y 6x His son altamente inmunogénicas, dado que dificultan la síntesis de anticuerpos policlonales que detecten las neurohormonas a baja concentración (Mancera-Flores, 2009).

Debido a la importancia de contar con hormonas con la secuencia lo más parecidas a las formas naturales es que ambos péptidos expresados en su forma nativa usando la levadura *P. pastoris*. Los péptidos CHH-B1 y CHH-B2 recombinantes con un C-terminal libre presentaron actividad hiperglucémica *in vivo* dependiente de la dosis, mientras que la amidación del C-terminal de la hormona CHH-B2 causó un incremento adicional en la actividad hiperglucémica del péptido. Así mismo las hormonas promovieron un aumento directo o indirecto de los niveles de triglicéridos en la hemolinfa de *L. vannamei* (Camacho-Jiménez et al., 2015; 2017a; 2017b). CHH-B1 y CHH-B2 han mostrado también tener efecto sobre la regulación osmótica y iónica de *L. vannamei* en condiciones de estrés salino (Camacho-Jiménez et al., 2018).

La neurohormona CHH-A es producto del gen *chhA*, que se considera un gen de tipo II, de 789 pb. En el exón I se encuentra una secuencia que pertenece a un fragmento corto del péptido señal, mientras que el exón II comprende el resto del péptido señal y el CPRP. Los exones II y III están separados por un residuo de arginina en la posición 40, los primeros dos nucleótidos de su codón están en el exón II y el restante en el exón III. En el C-terminal se encuentra un sitio de procesamiento GK para α -amidación (Lago-Lestón et al., 2007) (Fig. 4).

chh gene	TCACCAAACGGCTCGCTCTTCGACCCTTCCTGCACCGGCGTCTTCGACCGGCAGCTCTGC	60
Liv-CHH	T K R S L F D P S C T G V F D R Q L L	
chh gene	GGAGGCTGCGTCGAGTGTGTGACGACTGTTTCAACGTATTCAGGGAAACCAACGTATCTA	120
Liv-CHH	R R L R R V C D D C F N V F R E P N V S	
chh gene	CTGAATGCAGGTCGGTCATCTATGGATTTCCCTTTTTTTTACATTCCTACATCAATACC	180
Liv-CHH	T E C R-----	
chh gene	CTTGCACGATATCAGTTTCATTGCATATGACACGGAAGGCTGTCTAAGGCACCCATCTT	240
Liv-CHH	-----INTRON-----	
chh gene	TGACACTAATCACATATTTTTACAGAAAGTAACTGTTACAACAATGAAGTGTTCGGCCAGT	300
Liv-CHH	----- S N C Y N N E V F R Q	
chh gene	GTATGGAATACCTCCTCCCGCCTCACCTTCACGAAGAGCACAGACTAGCTGTCCAGATGG	360
Liv-CHH	C M E Y L L P P H L H E E H R L A V Q M	
chh gene	TCGGGAAATAGATTACGGTTAAGACGCTGCAACCCACTTCGCTGACGACAGGAATCCGA	420
Liv-CHH	V G K *	
chh gene	TGATAGTAAAAGGCACCCTAATTCCACTTATTCTACAGCATAGCACTGAGTCCTCGATCG	480
chh gene	CTGTAACGAATGGTTTCCAATGCTGAAGACTTATACTATGAAATGAAGCTGACTTCCACT	540
chh gene	CTAAGAAATAAGAATGAAAGGGTGCAGTTTGCCATTATATTGGGACTATCGTGACACATT	600
chh gene	TAGTTCGGCCACTGATCACAGTATAGAAAATATATATACCCATGAACGCCATTTATCAGG	660
chh gene	AAACTGGAGAAAAAATATCACTGAAAGAGATTGTTCTTAGGACTCGAGGCCTTTAATTAC	720
chh gene	ATTAGAAATAGGTATTTGTGATGTTTTATTATGTTTAAATTTACGAATAAAGGACTGGCAT	780
chh gene	GCA	783

Figura 4. Secuencia del gen *chhA*, el cual codifica para el péptido maduro CHH-A. Se muestra la secuencia de aminoácidos, indicando el sitio de procesamiento KR (subrayado), los residuos conservados de cisteínas en negritas, las uniones exón-intrón en gris y el codón de término con un asterisco. Tomado de Lago-Lestón *et al.* (2007).

El gen *chhA* se expresa principalmente en el pedúnculo ocular y corazón, y en menor medida en nervio abdominal, hepatopáncreas y músculo, mientras que en las branquias no se han encontrado transcritos (Sigala-Andrade, 2010; Liu *et al.*, 2014). El péptido maduro tiene 74 residuos de aminoácidos, tiene alrededor de 8.76 kDa y un punto isoeléctrico de 6.78 (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014, Montiel-Arzate, 2016).

El gen *chhA* ha sido clonado y expresado en la levadura *P. pastoris*, dando lugar a la hormona recombinante CHH-A con un epítipo *c-myc* y una etiqueta de 6x-His en el C-terminal (Arredondo-Espinoza, 2014), así mismo ha sido clonada como en forma nativa (Balderas-González, 2014). Ambas hormonas mostraron actividad hiperglucémica. CHH-A en su forma nativa restableció además la capacidad osmorreguladora de *L. vannamei* 2 horas post-inyección en condiciones hipo-osmóticas (Balderas-González, 2014).

Wanlem y colaboradores (2011) mostraron que la rLV-CHH corresponde a la secuencia de la neurohormna CHH-A, influye en la respuesta de *L. vannamei* contra patógenos. La inyección de la hormona recombinante (proveniente de *E. coli* con una etiqueta 6x-His y un epítipo V5 en el N-terminal) en camarones infectados con la bacteria *Vibrio harveyi* incrementó la concentración de hemocitos, la actividad de la fenoloxidas, la supervivencia de los organismos al promover la reducción de la concentración de bacterias en la hemolinfa.

La hormona recombinante LvCHH, que fue expresada como un péptido de fusión con etiquetas His/S-tag y Trx-tag en *E. coli*, y cuya secuencia corresponde con CHH-A, promovió un aumento de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ en las branquias de los camarones inyectados (Liu *et al.*, 2014).

De manera más reciente, *chhA* se clonó en el vector pET-44a con una secuencia optimizada para *E. coli* y expresada como péptido de fusión en la cepa BL21 Star (DE3) con las etiquetas Nus-tag y 6x-His en el N-terminal, las cuales facilitan su solubilidad y purificación por cromatografía de afinidad (Fig. 5). El sistema de expresión pET-BL21 permitió producir la hormona como un péptido de fusión (NusA-CHH-A) para facilitar su identificación y purificación mediante etiquetas en el N-terminal, las cuales se pueden eliminar posteriormente mediante una digestión con enterocinasa. De esta manera, la hormona CHH-A fue expresada como proteína de fusión (Montiel-Arzate, 2016); sin embargo, se requiere optimizar su purificación y establecer las condiciones para la remoción de las etiquetas adicionales en el N-terminal y obtener la CHH-A nativa.

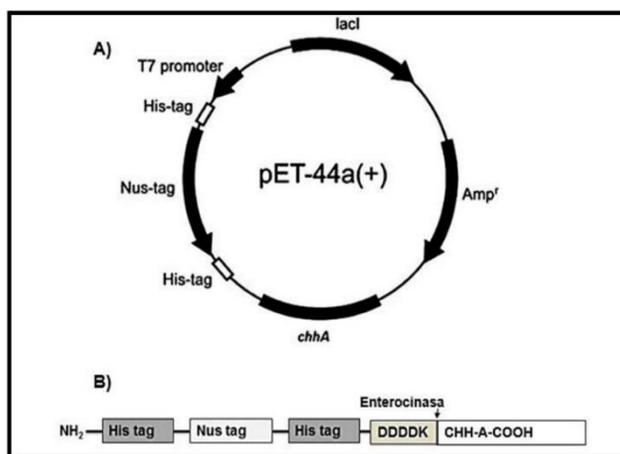


Figura 5. CHH-A recombinante expresada previamente como péptido de fusión. Tomado de Arredondo-Espinoza (2014).

En el presente trabajo se evaluaron dos sistemas de expresión: el vector pET44+(a)-CHH-A en la cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli*, el cual da lugar al péptido de fusión NusA-CHH-A y por otro lado las cepas SMD1168H-CHH_N y X-33-CHH-AN de *P. pastoris*, que produce la neurohormona CHH-A con una secuencia similar a la hormona natural. Asimismo, para conocer más acerca de las funciones fisiológicas de CHH-B2 y su efecto en los niveles de lípidos en la hemolinfa de *L. vannamei*, en el presente trabajo se utilizó el péptido recombinante activo previamente purificado (Camacho-Jiménez, 2016).

1.2 Justificación

El conocimiento de la fisiología y endocrinología de crustáceos de importancia comercial, como *L. vannamei*, es un factor clave para el cultivo exitoso a altas densidades, ya que muchos mecanismos fisiológicos en crustáceos se encuentran regulados de forma endocrina. Actualmente se sabe que las CHHs podrían estar involucradas en el mecanismo de respuesta a estrés y han sido descritas como hormonas multifuncionales, lo que hace importante su estudio. Aunque la principal actividad de las CHHs es el incremento de los niveles de glucosa en la hemolinfa, estas hormonas pueden participar en otros procesos de gran importancia como lo es el metabolismo de lípidos, muda y reproducción, entre otros. A pesar de que los lípidos juegan un papel metabólico importante en la mayoría de los crustáceos, al proveer la energía para la mayoría de los procesos endergónicos (aquellos que requieren del consumo de energía) y ayudar a mantener la integridad estructural y fisiológica de las membranas celulares, los estudios que se han realizado a la fecha sobre control endocrino del metabolismo de lípidos se han enfocado en cangrejos. Entre las CHHs de *L. vannamei* que han sido descritas a la fecha CHH-A y CHH-B2 son hormonas importantes por presentar un C-terminal amidado y mostrar actividad hiperglucémica y osmoreguladora bajo condiciones de estrés osmótico.

Para llevar a cabo ensayos biológicos *in vivo* con estas hormonas se requiere el empleo de péptidos purificados, ya sean naturales o recombinantes. El uso de sistemas procariotas o eucariotas para la producción de CHHs recombinantes permite obtener una mayor cantidad de hormona en comparación a los obtenidos al purificar la hormona natural a partir de los pedúnculos oculares, además del número considerable de organismos que se requieren. Por otro lado, la similitud estructural entre las diversas hormonas producidas en pedúnculo ocular del camarón complica su purificación. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo probar dos sistemas de expresión, uno bacteriano y otro eucariota para la obtención de hormonas recombinantes, utilizando a CHH-A como modelo; así como evaluar el efecto de la neurohormona rCHH-B2, previamente purificada en nuestro laboratorio, sobre el nivel de lípidos de la hemolinfa de camarones sub-adultos de *L. vannamei*.

1.3 Hipótesis

El tratamiento de camarones sub-adultos de *L. vannamei* con la neurohormona rCHH-B2 modificará los niveles de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triglicéridos en la hemolinfa de organismos ablacionados bilateralmente y aclimatados a condiciones hiper-osmóticas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de CHH-B2 recombinante sobre los niveles de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triglicéridos de la hemolinfa de camarones sub-adultos de *L. vannamei*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar la viabilidad de utilización de diferentes plataformas de expresión (bacterias y levaduras) para la producción de CHH.
- Determinar el efecto hiperglucémico de rCHH-B2 en hemolinfa con respecto al tiempo de exposición en camarones sub-adultos ablacionados bilateralmente.
- Determinar el efecto de rCHH-B2 en los niveles de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triglicéridos en hemolinfa de camarones tratados.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Optimización de la purificación de la proteína de fusión NusA-CHH-A

La neurohormona CHH-A fue seleccionada para utilizarse como modelo para estudiar diferentes plataformas de expresión debido a que esta hormona había sido expresada previamente como péptido de fusión usando el plásmido pET44a(+) en la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3), siendo denominada NusA-CHH-A (Montiel-Arzate, 2016). Para realizar la construcción en este plásmido se llevó a cabo optimización de codones (Arredondo-Espinoza, 2014). La expresión del péptido de fusión fue inducida con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), dado que el péptido recombinante se encontraba bajo el control del promotor T7, que solamente es reconocido por la ARN polimerasa T7, cuya producción está regulada por el operón *lac*.

Las condiciones óptimas de expresión fueron determinadas anteriormente, las cuales corresponden a 12 horas de incubación con 30°C y una concentración final de 1 mM de IPTG (Montiel-Arzate, 2016). El péptido de fusión obtenido tiene un peso de alrededor de 70 kDa, lo que se comprobó mediante visualización por geles de Tricina SDS-PAGE e inmunodetección por Western blot. Sin embargo, en ese trabajo previo no se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo su purificación y la remoción de la región N-terminal adicional. Para la optimización de la purificación de NusA-CHH-A en el presente trabajo se partió de los lisados celulares obtenidos previamente por Montiel-Arzate (2016). La proteína de fusión utilizada contenía a la hormona CHH-A fusionada en el extremo N-terminal a una etiqueta Nus-tag (NusA-CHH-A), que es la que promueve la solubilidad del péptido (De Marco *et al.*, 2004; Nallamsetty y Waugh, 2006), en medio de dos etiquetas 6x-His. Las etiquetas de histidinas facilitan la identificación del péptido mediante el uso del anticuerpo anti-his-tag, así como su purificación por cromatografía de afinidad. NusA-CHH-A tiene un sitio de reconocimiento de enterocinasa, lo que permite obtener el péptido sin aminoácidos adicionales una vez que se lleva a cabo la digestión con esta proteasa.

Para la purificación de la proteína de fusión de 70 kDa se usó el sistema de purificación por cromatografía de afinidad ProBond Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los residuos de histidina tienen una fuerte afinidad por los iones de Ni²⁺ que se encuentran inmovilizados en una resina con una matriz de agarosa con ácido iminodiacético, el cual funciona como ligando con propiedades quelantes. NusA-CHH-A se expresó en forma soluble, por lo tanto, se usaron las condiciones nativas de purificación descritas por los fabricantes en las que no se requiere la desnaturalización de las proteínas.

2.1.1 Diálisis

En este trabajo se partió de lisados celulares de la cepa de *E. coli* con la proteína de fusión NusA-CHH-A que se obtuvieron en el trabajo previo, los cuales se analizaron por medio geles de Tricina-SDS PAGE y Western blot (Montiel-Arzate, 2016). Estos lisados celulares fueron dializados usando un casete de diálisis Slide A-Lyzer, de Thermo Fisher Scientific (3.5 de MWCO) con capacidad máxima de 3 mL en contra de buffer de unión nativo (Imidazol 10 mM, Na₂H₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). La diálisis se llevó a cabo a temperatura ambiente por cuatro horas con agitación, cambiando el buffer cada dos horas y posteriormente a 4°C durante toda la noche.

2.1.2 Purificación por cromatografía de afinidad

Una vez que los lisados celulares fueron dializados, se colocaron 2 mL de resina Probond™ Nickel Chelating en una columna de purificación y se dejó asentar por gravedad. Se utilizó buffer de unión nativo para resuspender la resina y se dejó asentar nuevamente por gravedad. Posteriormente se añadieron 500 µL de lisado celular y el sobrenadante obtenido de la columna fue recuperado para su análisis posterior. Se colocaron 30 mL de buffer de lavado en la columna (Imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) para retirar las proteínas contaminantes. Para recuperar la proteína de fusión NusA-CHH-A, se adicionó 1 mL de buffer de elución (Imidazol 250 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0).

2.1.3 Digestión con enterocinasa

Con la finalidad de remover el N-terminal de la proteína de fusión, se realizaron digestiones con la proteasa enterocinasa, que reconoce la secuencia canónica de aminoácidos DDDDK. Para este fin se usó la enterocinasa de Roche (Basilea, Suiza), que es purificada de intestino de becerro. Previo a la digestión, la solución de la proteína de fusión fue dializada en Tris 50 mM, pH 8.0, usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer™ de Thermo Fisher Scientific (MWCO de 3.5 K).

Adicionalmente, para optimizar el corte de la enzima enterocinasa en la proteína de fusión y prevenir cortes inespecíficos debido a su conformación, se adicionó urea en el buffer de digestión (Tris-Base 50

mM, pH 8.00) en concentraciones de 1 M y 2 M (Zhang *et al.*, 2005; Shahravan *et al.*, 2008) y se emplearon periodos de incubación de 1 y 3 horas a una temperatura de 37°C. Se utilizaron 20 µL de la proteína de fusión eluida y 2 µL de enzima (0.3 mg/mL). La reacción fue detenida con la adición de 20 µL de buffer de carga 2X (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%, pH 6.8). Las proteínas obtenidas de las digestiones fueron visualizadas en geles de Tricina SDS-PAGE (12%) y detectadas mediante Western blot.

2.1.4 Análisis de proteínas

2.1.4.1 Precipitación de proteínas

Para llevar a cabo la precipitación de las proteínas presentes en la solución de lavado se tomó una muestra de 1 ml a la cual se le añadieron 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) y se dejó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 13,000 x *g*, por 20 minutos a 4°C y se descartó el TCA. Se añadió 1 mL de acetona fría y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. La acetona fue descartada y el pellet obtenido se resuspendió en 20 µL de buffer de carga 2X. Esto con la finalidad de observar las proteínas concentradas de los lavados en geles de Tricina SDS-PAGE.

2.1.4.2 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

Para evaluar las condiciones de purificación y digestión, las proteínas obtenidas se visualizaron mediante geles de Tricina SDS-PAGE. Con esta finalidad, las muestras fueron resuspendidas en buffer de carga 2X y desnaturalizadas a 95°C. Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (Schägger, 2006) utilizando un amperaje constante a 50 mA, con un voltaje máximo de 150 V. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie blue silver G250 stain (Candiano *et al.*, 2004) y desteñidos con agua destilada hasta obtener el contraste deseado.

2.1.4.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) usando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El método del BCA combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} en presencia de proteínas en medio alcalino con la detección colorimétrica de Cu^{1+} usando BCA. Para utilizarlo se siguieron las instrucciones de los fabricantes, usando estándares de albúmina de suero bovino.

2.1.5 Inmunodetección mediante Western blot

La inmunodetección de la proteína NusA-CHH-A se llevó a cabo mediante Western blot. Para ello se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% (Descrito en la sección 2.1.4.2). Posteriormente, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para esto, se colocaron 3 piezas de papel filtro en una cámara de electrotransferencia (Apollo Instrumentation), luego una membrana de nitrocelulosa Trans-blot Transfer Medium de 0.45 μm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), después el gel y posteriormente otras tres piezas de papel filtro. Todas las piezas de papel filtro fueron saturadas previamente con buffer de transferencia semiseca Towbin 1X (Tris Base 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3). Para realizar la electrotransferencia se usó un amperaje constante de 200 mA, así como un voltaje menor de 20 V durante una hora.

Una vez finalizada la electrotransferencia, la membrana fue incubada con solución bloqueadora, que es un buffer salino de fosfatos (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 0.05%, pH 7.4) (PBS 1X) con Tween 20 al 0.05% (PBST) y leche descremada al 5% (Svelty). Posteriormente se incubó durante toda la noche a 4°C en solución con el anticuerpo anti-CHH-A (2.709 mg/ml) (GenScript, Piscataway, NJ, USA) en una dilución 1:2000 en PBST y leche descremada al 1%. Este anticuerpo policlonal detecta 14 aminoácidos de una región del N-terminal de la neurohormona CHH-A (Balderas-González, 2014). Una vez concluida la incubación, la membrana fue lavada 3 veces con PBST, con lavados de 5 minutos cada uno y posteriormente incubada durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación moderada en solución del anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG-Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich) en una dilución de 1:5000 en PBST y leche descremada al 1%. Para la detección se empleó quimioluminiscencia mediante el kit Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) y un transiluminador ChemiDoc MP (Bio-Rad).

2.2 Expresión de CHH-A recombinante nativa en *P. pastoris*

Así mismo se contaba con el gen *chhA* clonado en el vector pPICZ α -A el cual fue integrado en el genoma de las cepas SMD1168H-CHHA_N y X-33-CHH-A_N de *P. pastoris* mediante recombinación homóloga (Fig. 6). Las neurohormonas producidas por estas cepas se han utilizado previamente para bioensayos de actividad hiperglucémica y de osmorregulación (Balderas-González, 2014).

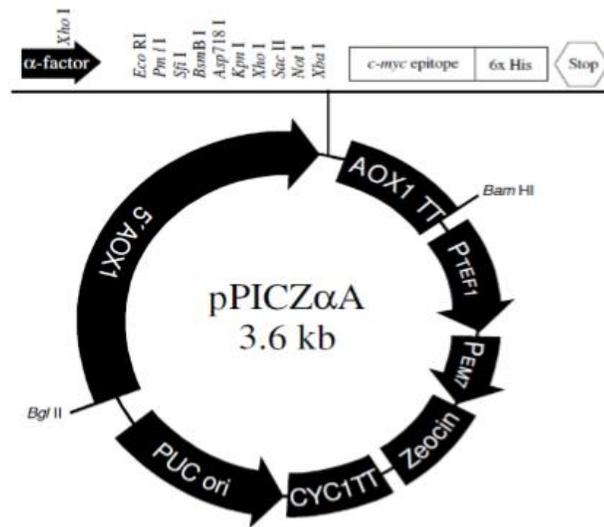


Figura 6. Esquema del vector de expresión pPICZ α A (Invitrogen).

La cepa X-33-CHH-A_N es de genotipo silvestre, es decir, no presenta mutaciones en su genoma, mientras que la cepa SMD1168H-CHHA_N es del fenotipo *pep4* que indica que es deficiente en la expresión de la proteasa vacuolar A, la cual activa a la carboxipeptidasa Y y a la proteasa B1 (Daly y Hearn, 2005), lo que disminuye la degradación de las proteínas recombinantes producidas. Ambas cepas son del fenotipo Mut⁺, lo que significa que su tasa de utilización de metanol es del fenotipo silvestre. El vector contiene un sitio de resistencia a zeocina y la señal de secreción α -MF (α - Mating Factor) mediante el cual las proteínas recombinantes son secretadas al medio de cultivo en forma soluble.

La producción de la neurohormona es controlada por el promotor del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa (AOX), por lo tanto, es producida cuando se induce el cultivo con metanol, el cual es consumido como fuente de carbono (White *et al.*, 1994).

rCHH-A tiene la secuencia idéntica a la neurohormona nativa, excepto que se eliminó la última lisina, quedando la penúltima glicina en el C-terminal. Esto se realizó para tener la opción de llevar a cabo la amidación *in vitro* mediante la enzima monooxigenasa α -amidante de peptidil-glicina (PAM) cuando sea requerido.

2.2.1 Inducción de cultivos

Para llevar a cabo la expresión de CHH-A inicialmente se trabajó con la cepa libre de proteasas SMD1168H y se analizó la posibilidad de que la hormona fuera producida en medio de cultivo mínimo BMG (fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina $4 \times 10^{-5}\%$; glicerol 1%) a diferencia de medio complejo como se había estado produciendo en el laboratorio. Esto con la idea de facilitar la purificación de la hormona y analizar si era posible eliminar los agregados covalentes de la hormona observados anteriormente al expresarla en medio complejo. Sin embargo, debido a la posibilidad de que se obtuviera poca cantidad de hormona en estas condiciones, también se evaluó la cepa X-33 en medio complejo BMGY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 μ M, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, glicerol 1%).

Las cepas transformadas fueron sembradas en cajas Petri con medio YPD-agar (extracto de levadura 1%, peptona 2%, D-glucosa 10%, agar 1.5%) con zeocina (100 μ g/mL) y se incubaron a 30°C hasta observar colonias aisladas.

En ambos casos se tomó una muestra de una colonia fresca con un asa de siembra previamente esterilizada, la cual se usó para inocular 7.5 mL de medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, D-glucosa 10%). Este preinóculo se incubó toda la noche en agitación (200 rpm) a 30°C, posteriormente se usó para inocular 500 mL de medio BMG o medio BMGY en matraces Fernbach, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente (23°C) y 200 rpm. Una vez que se alcanzó una DO_{600} de 4, las células fueron recuperadas en tubos cónicos por centrifugación a 3,000 x g y 5 min, en un equivalente a 100 mL de cultivo por tubo. El pellet de células obtenido fue lavado con agua destilada utilizando las mismas condiciones de centrifugación mencionadas anteriormente. Las células fueron resuspendidas en 30 mL de

medio mínimo inductor BMM (fosfato de potasio 100 μM , pH 6.0; YNB 1.34%; biotina $4 \times 10^{-5}\%$) en el caso de la cepa SMD1168H-CHHA_N y en 30 mL de medio complejo inductor BMMY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 μM , pH 6.0, YNB 1.34%, biotina al $4 \times 10^{-5}\%$) para la cepa X-33-CHH-A_N. En ambos casos se empleó una concentración final de 2% de metanol y las mismas condiciones de incubación. El metanol fue adicionado el primer día (día cero: D0) y posteriormente cada 24 horas durante cuatro días para mantener su concentración en el medio de cultivo. Con la finalidad de determinar el día de mayor expresión se tomaron muestras de 1 mL diariamente.

Para descartar las células el medio de cultivo fue centrifugado (3000 x *g*, 5 min) y el sobrenadante, donde se espera que se encuentre la hormona de interés, fue recuperado y congelado a -20°C para su posterior análisis mediante geles de Tricina SDS-PAGE y Western blot. Una vez que se determinó el tiempo de inducción óptimo, se procedió con la producción de CHH-A.

2.2.2 Análisis de las proteínas

Para concentrar las proteínas del sobrenadante recuperado, se añadieron 150 μL de TCA a cada muestra de 1 mL, tal y como se describe en la sección 2.1.4.1. El análisis de las proteínas precipitadas se realizó mediante geles de Tricina SDS-PAGE al 12% (sección 2.1.4.2) y la inmunodetección de CHH-A por Western blot (sección 2.1.5).

2.2.3 Purificación de la neurohormona recombinante nativa CHH-A

2.2.3.1 Preparación de las muestras

Se siguieron diferentes estrategias de purificación a partir de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos en medio mínimo y medio complejo, como se describe a continuación.

2.2.3.1.1 Liofilización

Los sobrenadantes provenientes del medio mínimo fueron liofilizados en una liofilizadora Labconco durante cinco días en tubos cónicos con capacidad de 50 mL (30 mL de cultivo por cada tubo). Una vez que se obtuvieron las muestras liofilizadas, estas fueron resuspendidas en PBS 1X (1 mL por cada tubo), centrifugadas a 7,000 x *g* y 5 min, recuperando el sobrenadante. Posteriormente, los tubos fueron lavados con PBS 1X para recuperar la proteína presente en las paredes de los tubos. Las proteínas de los sobrenadantes, el pellet y el lavado fueron analizadas para determinar en cual fracción se encontraba rCHH-A por medio de geles de Tricina-SDS PAGE y Western blot, para lo cual se tomó una muestra de 100 μ L del sobrenadante, se aforó a 1 mL con agua destilada y se precipitaron las proteínas con TCA (sección 2.1.4.1). Asimismo, se cuantificaron por el método del ácido bicinónico (sección 2.1.4.3)

2.2.3.1.2 Precipitación por sulfato de amonio

El sobrenadante proveniente del medio complejo fue precipitado usando sulfato de amonio. Previamente, se había determinado mediante un gradiente de saturación con sulfato de amonio que el punto de precipitación para CHH-A en este medio de cultivo era del 50% (Balderas-González, 2014).

Con esta finalidad, se añadió el sulfato de amonio correspondiente al punto de saturación deseado al sobrenadante, el cual se encontraba en agitación lenta a 4°C. Una vez disuelto el sulfato de amonio, se dejó en agitación durante una hora más. Concluido el tiempo, se centrifugó el sobrenadante en tubos cónicos de 50 mL durante media hora (11,000 x *g*, a 4°C). El pellet resultante fue resuspendido en PBS 1X, usando 1 mL de buffer por cada 100 mL de sobrenadante y se dializó en contra de PBS 1X (como se describe en la sección 2.1.1.1) usando un casete de diálisis Slide A-Lyzer, de Thermo Fisher Scientific (3.5 de MWCO) con una capacidad máxima de 3 mL.

Para analizar las proteínas se tomaron 1 mL de sobrenadante y 100 μ L de muestra dializada, los cuales se completaron con 900 μ L de agua destilada y se precipitaron con TCA, según lo descrito en la sección 2.1.3.2. Las proteínas en la muestra fueron visualizadas mediante geles de Tricina SDS-PAGE y analizadas por Western blot.

2.2.3.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)

Los péptidos recombinantes de las muestras provenientes de los medios de cultivo, tanto las que fueron liofilizadas como las precipitadas con sulfato de amonio, fueron purificados mediante RP-HPLC. Se utilizó el sistema Agilent Technologies 10100, el cual se encuentra equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, inyector manual y detector de onda múltiple. La columna utilizada fue una C18 TSK-Gel Octadecyl-4 PW (15 cm X 4.6 mm, 7 μ m) (Tosoh Biosep, Supelco) con una precolumna Eclipse XDB- C18 (12.5 mm x 4.6 mm, 5 μ m) (Zorbax, Agilent). La columna fue equilibrada por 5 minutos con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.12% (solvente A) y posteriormente se usó un gradiente lineal de 0-65% de TFA al 0.1% en acetonitrilo (solvente B). La tasa de flujo fue de 0.8 mL/min durante 50 minutos. La absorbancia fue monitoreada a 230 nm y a 280 nm. Las fracciones fueron colectadas cada 5 minutos y almacenadas a -80°C hasta su liofilización y posterior análisis por Dot blot.

2.2.4.3 Dot blot

Las fracciones liofilizadas fueron resuspendidas en PBS 1X y analizadas por Dot blot. Se colocaron 10 μ L de muestra sobre una membrana de nitrocelulosa, la cual fue incubada con solución de bloqueo PBST con 5% de leche descremada (Svelty) durante 2 horas a temperatura ambiente. Como control positivo, se colocó 1 μ g de antígeno CHH, el cual es un péptido que corresponde a la fracción de la hormona reconocida por el anti-CHH-A (Genscript). Se realizaron tres lavados de la membrana con PBST por 10 minutos cada uno y se colocó en solución con anticuerpo anti-CHH-A (PBST-Svelty 1%) en una dilución de 1:2000. Se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se realizaron tres lavados con PBST, de 10 minutos cada uno. Se procedió a incubar en la solución con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG-Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich) en una dilución de 1:5000. Después de 4 horas la membrana fue revelada usando el kit de quimioluminiscencia Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) en un transiluminador ChemiDoc (Bio-Rad).

2.3 Bioensayos de actividad biológica de rCHH-B2

2.3.1 Crecimiento y mantenimiento de organismos

Se adquirieron 10,000 postlarvas de *L. vannamei* a través del laboratorio de Acuicultura Lutmar (Mazatlán, Sinaloa), las cuales fueron mantenidas a 26°C, salinidad de 35 ups, con aireación de 5.8 ± 0.5 mg/L y fotoperiodo natural y un recambio diario de agua del 100% en estanques de 2000 L en un invernadero de las instalaciones de CICESE.

Se les proporcionó alimento comercial en presentación de migaja con 40% de proteína (Camaronina®) correspondiente al 4% de su peso corporal en dos raciones diarias, una en la mañana y otra antes de oscurecer. Una vez que los organismos pasaron a etapa juvenil, se cambió el alimento por uno con presentación de pellet de 2.38 mm y 35% de proteína (Aquaprofile®). Los restos de heces y alimento se retiraban diariamente por sifoneo.

Los organismos fueron pesados cada dos semanas (30 organismos por estanque) a partir de la semana 10 de su llegada para monitorear su crecimiento hasta que alcanzaron la talla esperada para realizar el bioensayo. Conforme los organismos fueron creciendo, se hicieron varios desdobles en diferentes estanques.

2.3.2 Condiciones experimentales y aclimatación

Debido a que los organismos alcanzaron la talla requerida para llevar a cabo los ensayos *in vivo* pero no se contaba aun con la hormona rCHH-A purificada, se decidió utilizar la neurohormona rCHH-B2 purificada previamente en el laboratorio para evaluar su efecto en el metabolismo de lípidos. Una vez que los organismos alcanzaron el peso requerido para realizar los bioensayos (10-15 gr), estos fueron trasladados al Laboratorio Húmedo del Departamento de Biotecnología Marina de CICESE donde se cuenta con condiciones controladas de temperatura. Los camarones se transfirieron en forma individual a cubetas de 3.5 L dentro de estanques de 200 L, donde fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial (Aquaprofile®, pellet de 2.38 mm y 35% de proteína). Las heces y el alimento no consumido fueron retirados diariamente por sifoneo. La temperatura del agua se mantuvo en 26°C, la salinidad en 35 ups, el fotoperiodo natural, pH de 7.95 y la concentración de oxígeno disuelto en 5.4 ± 0.5 mg/L. Previo a los

experimentos, el proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de CICESE, de tal forma que los procedimientos en los organismos se hicieron de acuerdo a protocolos de artículos anteriores.

2.3.3 Ablación y tratamientos experimentales

Una vez que se determinó el ciclo de muda para cada organismo, estos fueron ablacionados bilateralmente en el periodo de intermuda, el cual se determinó como el intervalo entre dos eventos de muda consecutivos. La ablación consistió de la remoción de ambos pedúnculos oculares hasta la parte baja del pedúnculo con unas tijeras afiladas y la cauterización inmediata del área para prevenir pérdida de hemolinfa y evitar la muerte del organismo. Los organismos ablacionados fueron puestos en ayuno por 48 horas y se procedió inmediatamente con el ensayo.

Para evaluar el efecto de rCHH-B2 (resuspendida en 50 μ L de PBS 1X estéril) cada organismo fue inyectado a través de la membrana artrodial del quinto par de pereiópodos con 2 μ g de hormona (equivalente a 232 pmol) utilizando una jeringa hipodérmica estéril de 1 mL (31 G). Se emplearon grupos de 10 organismos para analizar el efecto de la hormona a diferentes tiempos (0.5, 1, 3 y 6 h). Como controles se utilizaron 1) organismos ablacionados inyectados con 50 μ L de PBS 1X, 2) organismos ablacionados sin inyectar para diferenciar los efectos de la manipulación con respecto a los niveles basales de los metabolitos analizados y 3) organismos sin ablacionar sin inyectar para evaluar los niveles normales de los metabolitos de interés en organismos intactos. Las muestras de hemolinfa (100 μ L aproximadamente) se obtuvieron a través de la parte dorsal del primer segmento abdominal mediante el uso de una jeringa hipodérmica estéril de 1 mL (27 G) a los tiempos correspondientes.

De los 100 μ L de hemolinfa obtenida, 70 μ L fueron diluidos con Solución Salina de Camarón anticoagulante (SSS) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA.Na₂ 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3), en una de proporción 2:1 (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Estas muestras se emplearon para los análisis de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres. La otra parte de las muestras (30 μ L) fue mezclada con NEM (N-etilmaleimida 0.2 M, NaCl 3%) en una proporción 1:1 (Martin *et al.*, 1991). Este anticoagulante no incluye EDTA, que pudiera inhibir algunas enzimas de los kits para cuantificar fosfolípidos. Independientemente del anticoagulante empleado, las muestras fueron centrifugadas (855 x g, 4 °C, 5 min) para recuperar el plasma, el cual fue se almacenado a -80° hasta su análisis posterior.

2.4 Análisis de las muestras

Para medir la concentración de glucosa en la hemolinfa se empleó el kit Liquid Glucose (Oxidase) Reagent Set (Pointe Scientific), mediante el cual se lleva a cabo la reacción de oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno. En presencia de fenol, 4-aminoantipirina y peróxido de hidrógeno, la peroxidasa produce una quinonaimina cuyo color absorbe a 500 nm y es proporcional a la concentración en mg/dL de glucosa en la muestra. Para cada reacción se usó 1 mL de reactivo y 10 μ L de hemolinfa en anticoagulante. De cada muestra se obtuvieron lecturas por triplicado a partir de las cuales se calculó el promedio que fue utilizado para los análisis estadísticos.

La concentración de triglicéridos se estimó utilizando el kit Triglyceride (GPO) (Liquid) Reagent Set (Pointe Scientific). El método se basa en la hidrólisis con una lipasa, lo que produce glicerol que es el sustrato de una enzima glicerol cinasa para dar glicerol-1-fosfato. Posteriormente, mediante la enzima glicerol fosfato oxidasa (GPO) se obtiene peróxido de hidrógeno y fosfato diamónico (DAP). El peróxido reacciona con 4-aminofenazona y en presencia de peroxidasa da lugar a una quinonimina que absorbe a 500 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración en mg/dL de triglicéridos en la muestra. Al igual que con el kit para medir glucosa, la reacción se llevó a cabo con 1 mL de reactivo y 10 μ L de hemolinfa en anticoagulante, obteniendo lecturas de las muestras por triplicado.

Las lecturas de absorbancia de los análisis se realizaron en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific) y una celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz.

Para determinar la concentración de ácidos grasos libres en la hemolinfa, se utilizó el kit Free Fatty Acid Quantitation Kit (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA). Este kit emplea un método enzimático, en el cual se forma acil-coenzima A que reacciona con oxígeno en la presencia de acil-CoA oxidasa para formar enoil-CoA y peróxido de hidrógeno, el cual junto con 2,4,6-tribromuro-3-ácido hidroxibenzoico y 4-aminoantipirina en la presencia de peroxidasa proporciona un producto colorimétrico. El kit estima la concentración de ácidos grasos de más de ocho carbonos.

Los fosfolípidos en la hemolinfa fueron cuantificados con el kit Phospholipid Assay Kit (Sigma-Aldrich). Este kit emplea la degradación de los fosfolípidos con fosfolipasa D en la presencia de colina oxidasa. Esta reacción libera peróxido de hidrógeno junto con 4-aminofenazona y fenol en la presencia de peroxidasa, proporcionando un producto colorimétrico.

Debido a esto, tanto en las mediciones de ácidos grasos libres como de fosfolípidos la absorbancia a 570 nm es directamente proporcional a la concentración de los metabolitos en la muestra. En ambos casos, las muestras se midieron por duplicado en placas de 96 pozos empleando un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific) y el promedio obtenido de los duplicados fue el dato usado en los análisis estadísticos.

En todos los análisis se siguieron las instrucciones de los fabricantes para construir las curvas de calibración correspondientes y estimar la concentración de los metabolitos en las muestras de hemolinfa.

2.5 Análisis estadísticos

Se llevó a cabo la prueba de Kolmogorov-Sminov para determinar si los datos presentaban una distribución normal. Dado que se cumplió el supuesto de normalidad, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía ($P < 0.05$) y la prueba de Tukey. Estas pruebas se realizaron con el software STATISTICA 8 (StatSoft).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Optimización de la purificación de la proteína de fusión NusA-CHH-A

3.1.1 Purificación de NusA-CHH-A

Los lisados celulares de la cepa de *E. coli* con la proteína de fusión NusA-CHH-A (Montiel-Arzate, 2016), con un volumen de 3 mL, presentaron una concentración promedio de 5.5 mg/mL, con un rendimiento en total de 5500 mg/L.

Del lisado celular pasado por la columna de afinidad para su purificación se obtuvieron 6 eluciones de 1 mL. El análisis de Tricina SDS-PAGE de las muestras de proteínas eluidas mostró que la elución 3 era la que contenía el péptido de fusión NusA-CHH-A, el cual tiene un peso molecular de alrededor de 70 kDa (Fig. 7). Esto es debido a la suma de los pesos moleculares de la etiqueta Nus-tag de 54.8 kDa, la neurohormona CHH-A de 8.76 kDa y el resto de los aminoácidos adicionales de 8.8 kDa (entre estos se incluyen las etiquetas 6X-His y el sitio de reconocimiento de enterocinasa). Sin embargo, como se puede observar en el carril 2 del gel (IN), solamente una fracción minoritaria del lisado celular corresponde al péptido de fusión NusA-CHH-A.

En este mismo análisis, en el carril correspondiente a la muestra purificada (E3) se observó una proteína con peso molecular de ~48 kDa. Anteriormente, este segundo fragmento fue detectado por el anticuerpo monoclonal anti-His (Roche) (Montiel-Arzate, 2016) sugiriendo que esta proteína posee la etiqueta 6X-His, por lo que fue purificada en la columna de afinidad junto con la proteína de fusión esperada; sin embargo, al no ser detectada con el anticuerpo anti-CHH-A se sugiere que no contiene la neurohormona CHH-A.



Figura 7. Gel de Tricina SDS-PAGE con los productos de la purificación obtenidos de la cromatografía de afinidad. M, Marcador de peso molecular Prestained SDS-Page Standards High Range (Bio-Rad); IN, lisado celular; W, proteínas precipitadas de la solución de lavado; E1-E6, eluciones; OUT, salida de la columna. La flecha señala el fragmento correspondiente a la proteína de fusión NusA-CHH-A.

3.1.2 Digestión con enterocinasa

En el gel de Tricina SDS-PAGE realizado con los productos de la digestión con enterocinasa se observó que la reacción se llevó a cabo de forma parcial e inespecífica (Fig. 8-A). El fragmento de 70 kDa disminuyó ligeramente de intensidad desde la primera hora de digestión con la enterocinasa con respecto a la muestra control sin digerir observándose un fragmento de alrededor de 25 kDa. Sin embargo, el fragmento esperado de 8.8 kDa que correspondería a la hormona CHH-A con N-terminal libre no fue observado en ningún tiempo. La proteína de fusión desapareció a las 24 hrs de digestión. En el Western blot el anticuerpo anti-CHH-A solamente detectó al péptido de fusión completo de 70 kDa y no al péptido de 25 kDa ni al péptido esperado de 8.8 kDa (Fig. 8-B). Estos resultados sugieren que la digestión fue inespecífica y que la banda de 25 kDa no contiene la región correspondiente a rCHH-A.

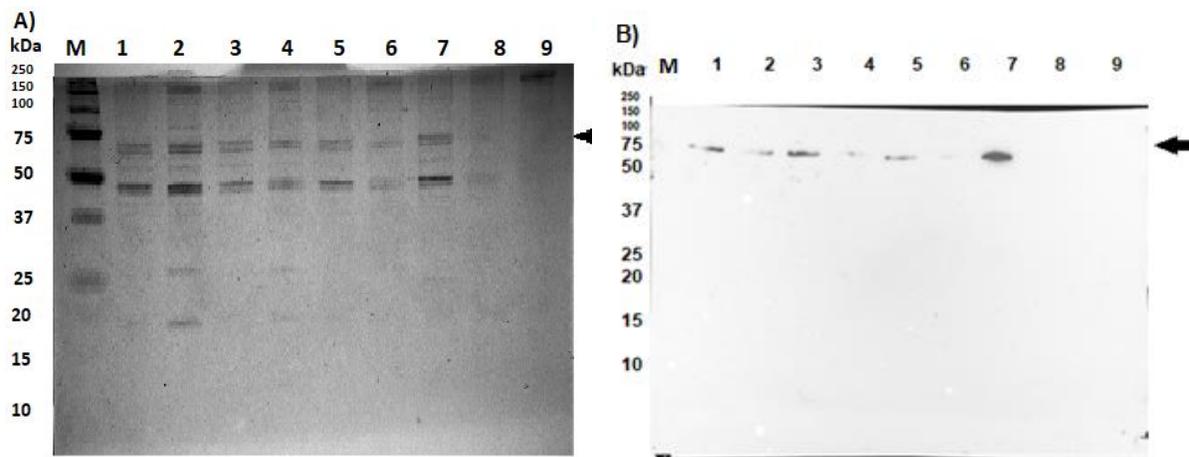


Figura 8. Digestiones con enterocinasa. A) Gel de Tricina SDS-PAGE. B) Western blot. En ambos: M, Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad); 1,3,5,7, proteína sin digerir a 1, 3, 6, y 24 horas, respectivamente; 2,4,6,8, digestiones a 1, 3, 6, y 24 horas; 9, enterocinasa (Roche). Las flechas señalan la proteína de fusión NusA-CHH-A.

El tratamiento con las dos concentraciones de urea (1 y 2 M) a una hora y tres horas de incubación no evitó cortes inespecíficos causados por la enterocinasa en la proteína de fusión (Fig. 9).

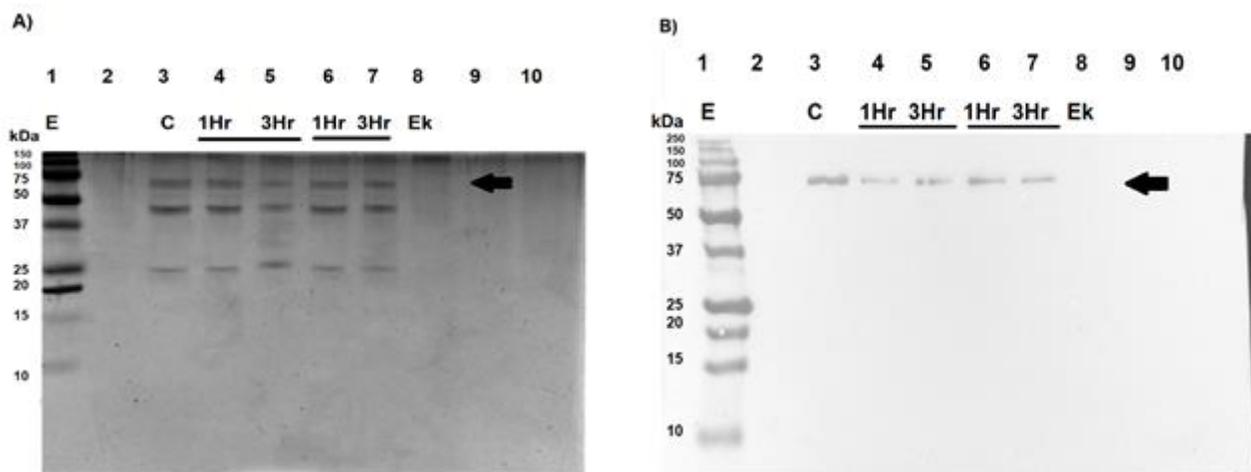


Figura 9. Ensayos con urea. A) Gel de Tricina SDS-PAGE. B) Western blot. En ambas: M, marcador de peso molecular All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad); C, control (proteína sin digerir); 4-7, digestiones con urea a diferente concentración y tiempos de incubación; Ek, enterocinasa (Roche). Las flechas señalan la proteína de fusión NusA-CHH-A.

Debido a la imposibilidad de remover las etiquetas adicionales del N-terminal de la proteína de fusión NusA-CHH-A para obtener la neurohormona CHH-A, se decidió proseguir con la segunda estrategia de expresión de rCHH-A en la levadura *P. pastoris* para producir la hormona recombinante lo más parecida a la hormona natural y en cantidad suficiente para realizar los bioensayos.

3.2 Producción de neurohormona recombinante nativa CHH-A en *P. pastoris*

3.2.1 Expresión de rCHH-A en la cepa SMD1168H cultivada en medio BMM

Como se puede observar en los geles de Tricina SDS-PAGE, los fragmentos obtenidos de la expresión de la cepa SMD1168 de *P. pastoris* en medio mínimo corresponden con el tamaño esperado para la rCHH-A nativa, que es de 10 kDa (Fig. 10-A). Esto fue corroborado en los ensayos de Western blot con el anticuerpo anti-CHH-A (Fig. 11B). La mayor expresión de rCHH-A se obtuvo en el día 3 de la inducción. En el gel de Tricina SDS-PAGE se observó que la intensidad del fragmento del tamaño esperado aumentó ligeramente conforme avanzó el tiempo de inducción (Fig. 10-A); sin embargo, en el Western blot el fragmento que corresponde a CHH-A se observó menos intenso conforme pasaron los días con excepción del día 3 (Fig. 10-B), lo que sugiere la presencia de proteínas accesorias que tienen un peso similar a la neurohormona CHH-A, las cuales deberían ser eliminadas durante la purificación por HPLC.

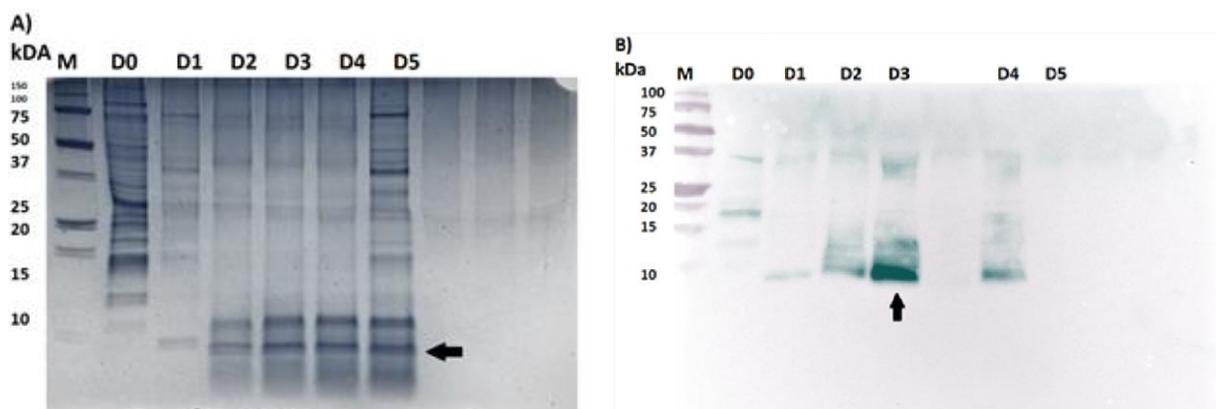


Figura 10. Expresión de rCHH-A en medio mínimo. A) Gel de Tricina SDS-PAGE; B) Western blot. En A: M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). En B: Marcador de peso molecular All Blue Precision Plus Standards (Bio-Rad). En ambas D0-D5 corresponden a los días de la expresión. Las flechas muestran la altura de las bandas de interés.

3.2.1.1 Análisis de muestra liofilizada

Se liofilizaron las muestras correspondientes a las 3 inducciones realizadas en medio mínimo con un volumen de 300 mL por inducción. Al analizar mediante geles de Tricina-SDS y Western blot los extractos de las muestras liofilizadas se corroboró la presencia de la neurohormona recombinante CHH-A en la fracción soluble en PBS 1X (Figura 11-B; carriles 1, 4 y 7), así como en el pellet obtenido de la centrifugación del sobrenadante (carriles 3, 6 y 9). El último lavado con PBS 1X no evidenció la presencia de la hormona (carriles 5 y 8) o la expresión es menor comparada con la fracción soluble y el pellet (carril 2), lo que indica que la mayor parte de la proteína se recuperó ya sea en el sobrenadante o en el pellet.

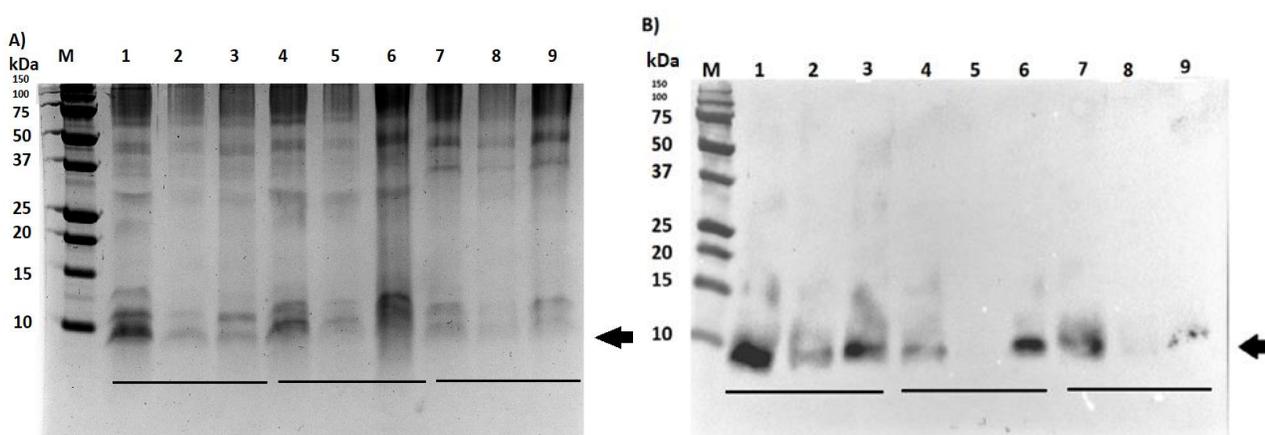


Figura 11. Análisis de los liofilizados resuspendidos en PBS 1X. A) Gel de Tricina SDS-PAGE B) Western blot. En ambas: M, marcador de peso molecular All Blue Precision Plus Standar (Bio-Rad). 1, 4, 7, fracción soluble; 2, 5, 8, lavado de tubos con PBS 1X; 3, 6, 9, pellet obtenido después de centrifugar. Las líneas corresponden a las muestras provenientes de una misma inducción. Las flechas señalan la altura de la banda de interés.

Las fracciones solubles de las 3 muestras liofilizadas presentaron una concentración de proteínas de 15.98, 15.02 y 8.197 mg/mL respectivamente, correspondiendo cada liofilizado a una inducción.

3.2.1.2 Purificación de rCHH-A expresada en medio mínimo por RP-HPLC

Al encontrarse rCHH-A en la fracción soluble y determinarse la cantidad de proteínas presentes en las muestras, se procedió a purificar estas muestras por medio de RP-HPLC. El cromatograma de la purificación de la muestra presentó varios picos prominentes en la lectura a 280 nm, sobre todo en los minutos 10-20 (Fig. 12). El análisis por Dot blot (Fig. 13) reveló una señal positiva de la hormona CHH-A,

aunque muy tenue en las fracciones F7 y en menor grado en la F8, que corresponden a los minutos 30-35 y 35-40, respectivamente. Los resultados mostraron una baja producción de la hormona de interés en este medio de cultivo.

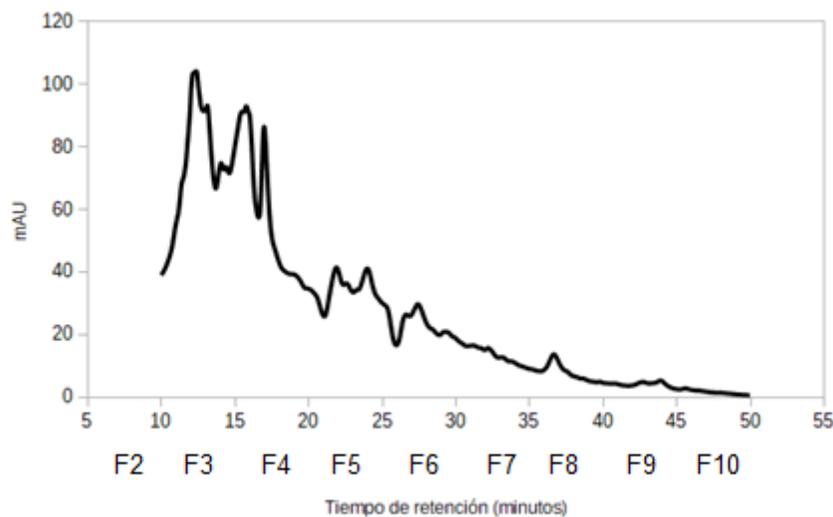


Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto obtenido al liofilizar el medio de cultivo BMM, lectura a 280 nm.

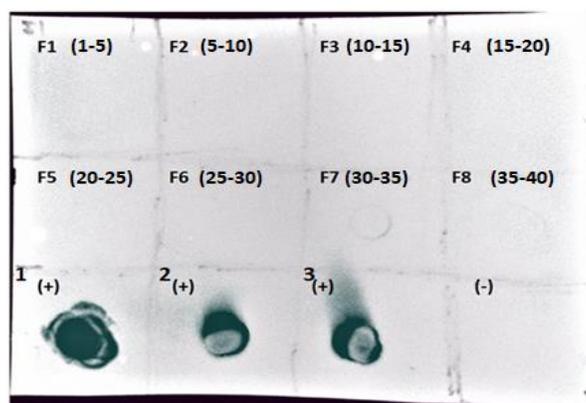


Figura 13. Dot blot de las fracciones obtenidas mediante HPLC a partir de los extractos liofilizados, resuspendidas en PBS 1X. Cada fracción muestra el tiempo (minutos) en el cual fue obtenida. Los controles positivos corresponden a la muestra sin purificar (1) y al antígeno para anti-CHH-A (2 y 3). Control negativo (-), PBS 1X.

Por lo tanto, debido a la gran cantidad de cultivos y purificaciones que se requería para tener suficiente neurohormona para los bioensayos, se optó por expresar CHH-A empleando las condiciones utilizadas previamente en el laboratorio, mediante el uso de la cepa X-33 en medio complejo BMMY.

3.2.2 Expresión de rCHH-A en la cepa X-33 cultivada en medio BMMY.

Los análisis de Tricina SDS-PAGE y Western blot de las muestras de sobrenadantes obtenidos de los cultivos de *Pichia* inducidos con 2% de metanol revelaron que el mejor día de expresión es a las 24 h de la inducción (Fig. 14). Esto debido a que, aunque el día 2 se observó una mayor expresión, el anticuerpo anti-CHH-A también detectó un péptido de alrededor 15 kDa. Este péptido fue descrito por Balderas-González (2014), quien propuso que se trataba de un agregado conformado por moléculas de rCHH-A unidas de forma covalente por enlaces disulfuro. En el gel de Tricina SDS-PAGE se observan con mayor intensidad las bandas correspondientes al péptido de 15 kDa que las que corresponden a la neurohormona de 10 kDa (Fig. 14-A). Conforme pasaron los días, se detectó una menor cantidad de la hormona mientras que el agregado continuó observándose (Fig. 14-B). Las inducciones adicionales realizadas para tener una mayor concentración de proteína para los bioensayos mostraron de igual forma la presencia de hormona rCHH-A tanto en Tricina SDS-PAGE como por Western blot (Fig. 15).

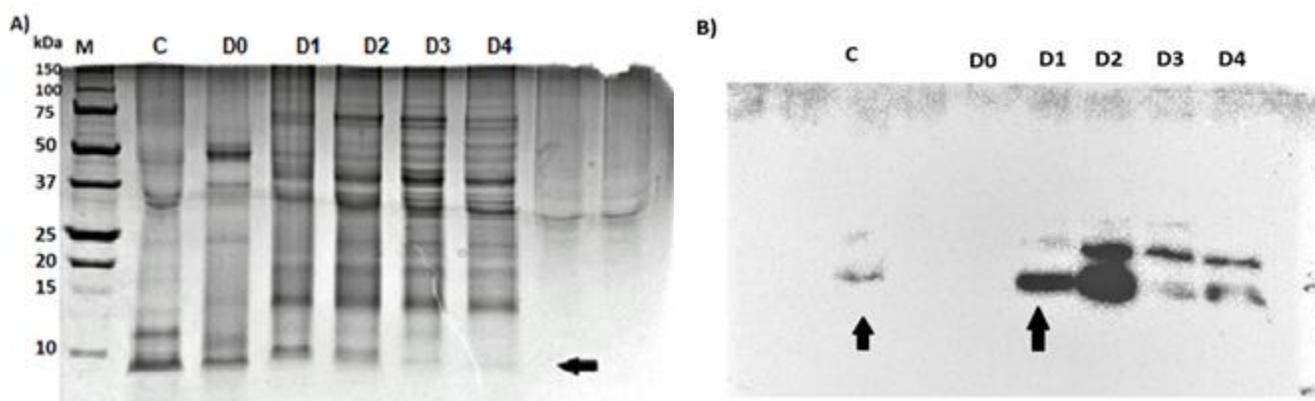


Figura 14. Expresión de rCHH-A en medio complejo (BMMY). A) Gel de Tricina SDS-PAGE. B) Western blot. A) M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad), C, control positivo, para el cual se usó extracto de medio mínimo con rCHH-A; D0-D4, días de la inducción con metanol al 2%.

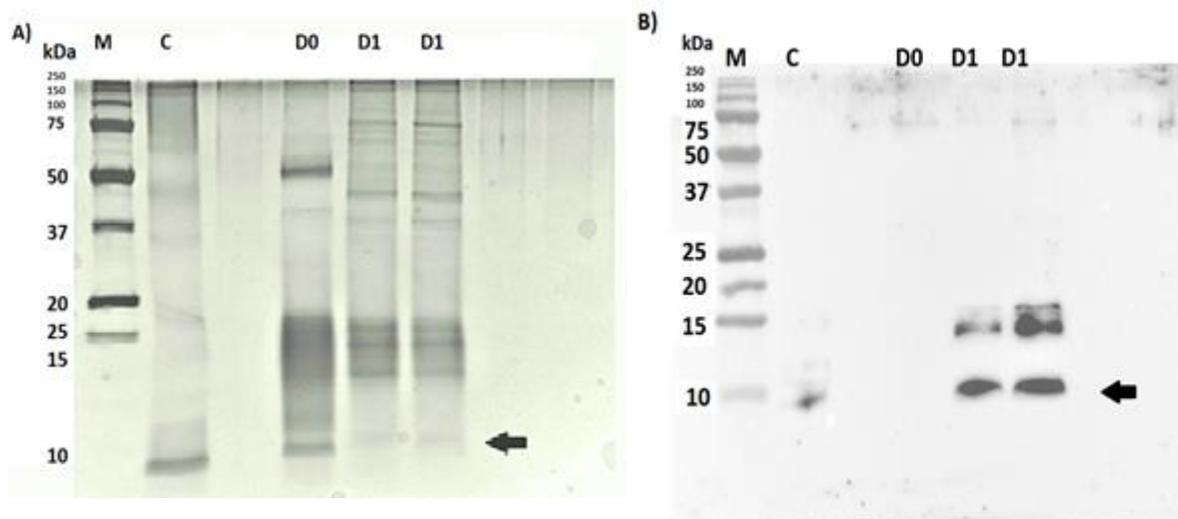


Figura 15. Días de mayor expresión de rCHH-A en medio complejo A) Gel de Tricina SDS-PAGE. B) Western blot. En A): M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). En B): M, marcador de peso molecular All Blue Precision Plus Standards (Bio-Rad), C, control positivo, extracto de medio mínimo con rCHH-A; D0-D1, días de la inducción con metanol al 2%. Se muestran los resultados de dos inducciones diferentes obtenidas para D1.

3.2.2.1 Concentración de rCHH-A con sulfato de amonio

La presencia de rCHH-A fue corroborada en las muestras concentradas de los sobrenadantes provenientes del medio complejo mediante los geles de Tricina SDS-PAGE y Western blot, dada su presencia en las muestras de los pellets resuspendidos en PBS 1X y no en el sobrenadante resultante (Fig. 16). La concentración promedio de la proteína fue de 2.099 mg/mL con un volumen total de 2 mL. Dada la presencia de rCHH-A en estas muestras se procedió a purificar la hormona recombinante por medio de RP-HPLC.

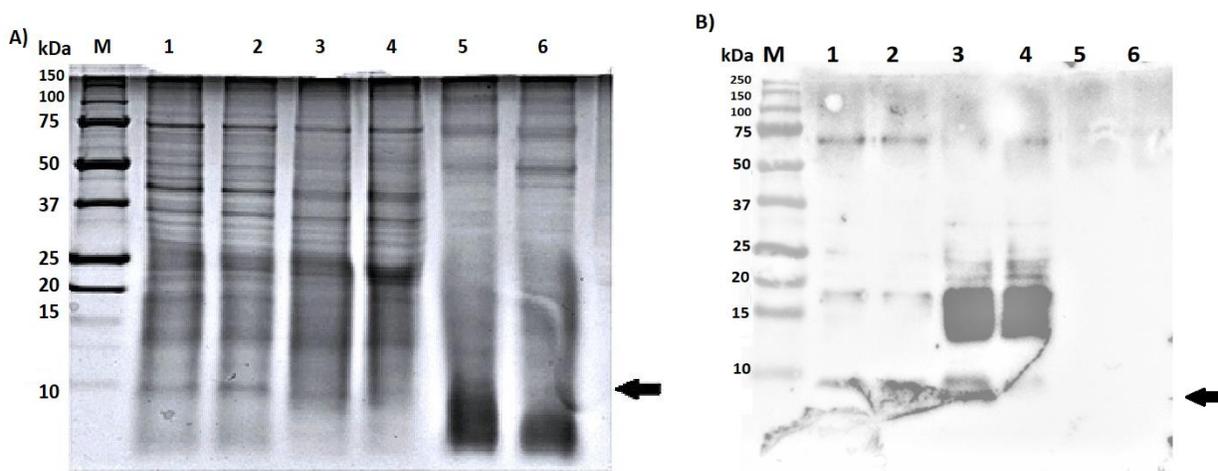


Figura 16. Precipitación de rCHH-A por sulfato de amonio al 50%. A) Gel de Tricina SDS-PAGE. B) Western blot. En A): M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). En B): M, marcador de peso molecular All Blue Precision Plus Standards (Bio-Rad). En ambas: 1 y 2, muestras de las inducciones sin precipitar; 3 y 4, pellet proveniente de la precipitación con sulfato de amonio; 5 y 6, sobrenadante.

3.2.2.2 Purificación por RP-HPLC de rCHH-A expresada en medio complejo

El cromatograma de las muestras precipitadas con sulfato de amonio mostró un pico predominante a 280 nm, el cual comenzó a subir desde el minuto 30 y bajó en el 45 (Fig. 17), a diferencia de las muestras provenientes de la inducción con medio mínimo (Fig. 12).

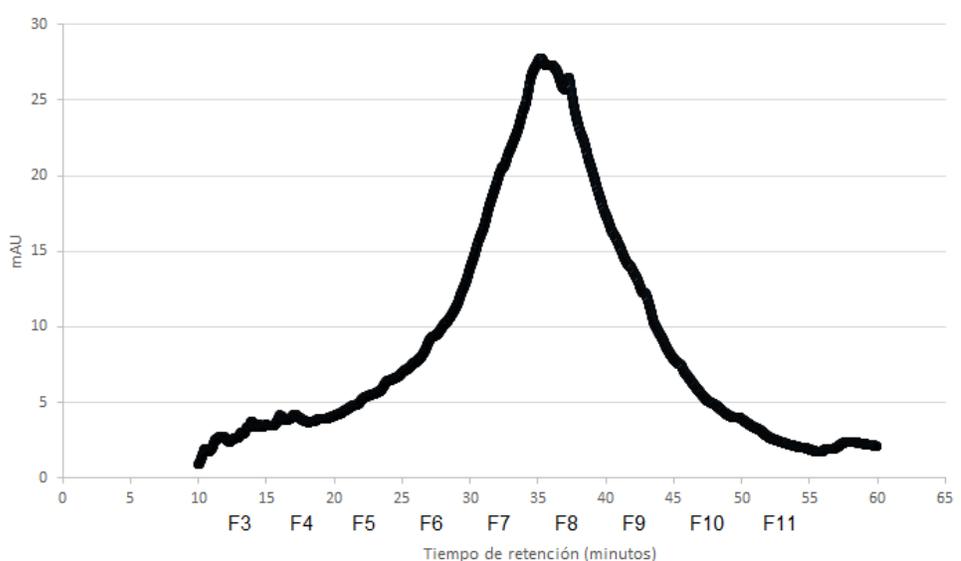


Figura 17. Perfil cromatográfico del pellet resuspendido en PBS 1X, obtenido de la precipitación de proteínas del sobrenadante del medio de cultivo BMM. Lectura a 280 nm

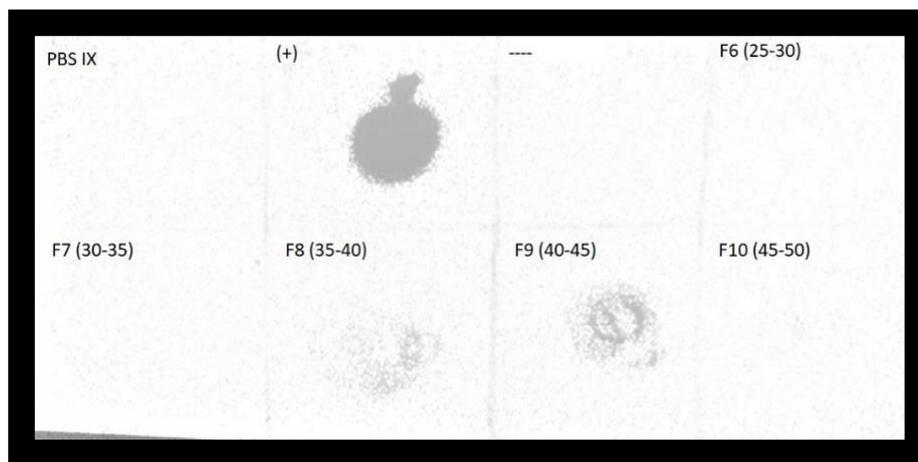


Figura 18. Dot blot de las fracciones liofilizadas y resuspendidas en PBS 1X. Muestras provenientes de la purificación por RP-HPLC del medio de cultivo BMMY. Cada fracción muestra el tiempo (minutos) en el cual fue obtenida. El control positivo corresponde al antígeno para anti-CHH-A (+) y el control negativo (-) es PBS 1X.

No obstante que el cromatograma mostró un pico que abarca las fracciones 7 y 9, el análisis por Dot blot sólo detectó la presencia de CHH-A en las fracciones 8 y 9. (Fig. 18). Estos resultados indicaron que en mediano plazo no era posible obtener la cantidad suficiente de hormona para los bioensayos y dado que los camarones se encontraban en la talla requerida para los ensayos *in vivo* se decidió utilizar la neurohormona rCHH-B2 purificada previamente en el laboratorio (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017a, 2017b, 2018), siempre y cuando se comprobara que conservaba su actividad hiperglucémica.

3.3 Bioensayos de actividad de rCHH-B2

3.3.1 Crecimiento de organismos

Las postlarvas recibidas de *L. vannamei* se mantuvieron en las condiciones mencionadas en la sección 2.3.1 (Fig. 19) hasta que alcanzaron el tamaño requerido para realizar los bioensayos (10 a 15 g). La curva de crecimiento de los camarones desde la etapa de postlarva en cada uno de los 6 estanques en los cuales se hizo el desdoble de organismos se presenta en la Figura 20. Esto permitió planificar el uso de organismos para mantener un intervalo de peso para los bioensayos.



Figura 19. Crecimiento de postlarvas de *L. vannamei*. A) Instalaciones del invernadero del laboratorio de Biología Celular y Molecular del CICESE. B) Postlarvas de *L. vannamei*

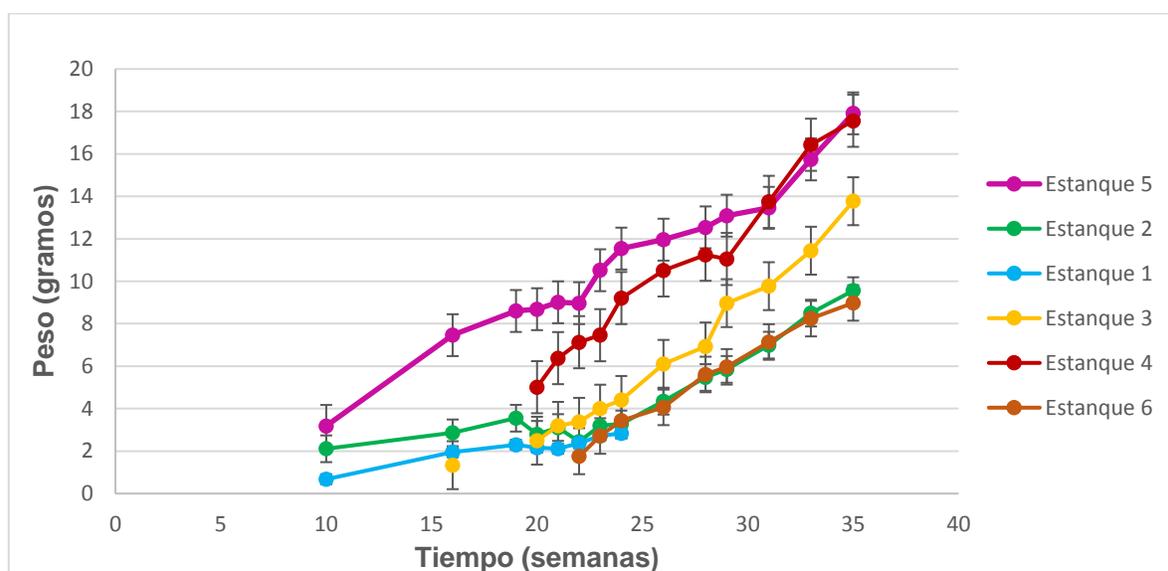


Figura 20. Curva de crecimiento de *L. vannamei* en etapa juvenil a sub-adulta. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar de 30 mediciones realizadas en cada punto.

3.3.2. Seguimiento de ciclo de muda y ablación

Un total de 125 organismos, cuyo peso en promedio fue 13.78 ± 1.7 g, fueron aclimatados en laboratorio húmedo del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE en cubetas individuales (Fig. 21). El ciclo de muda fue calculado de entre 12 y 20 días, lo que permitió determinar el día de intermuda para cada

organismo y llevar a cabo la ablación (Fig. 22). Los organismos que se usaron como control sin ablacionar también fueron muestreados en intermuda. El porcentaje de supervivencia de los camarones ablacionados fue del 94%.

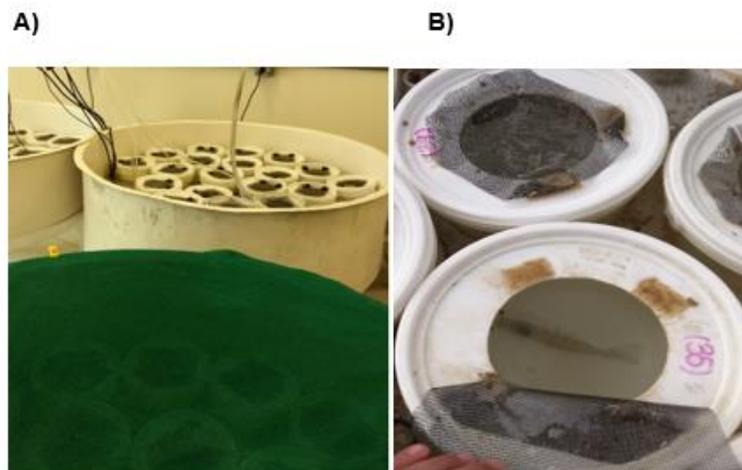


Figura 21. Mantenimiento de los organismos en condiciones controladas. A) Estanques de 200 L. B) Cubetas de 3.5 L con camarones individuales.

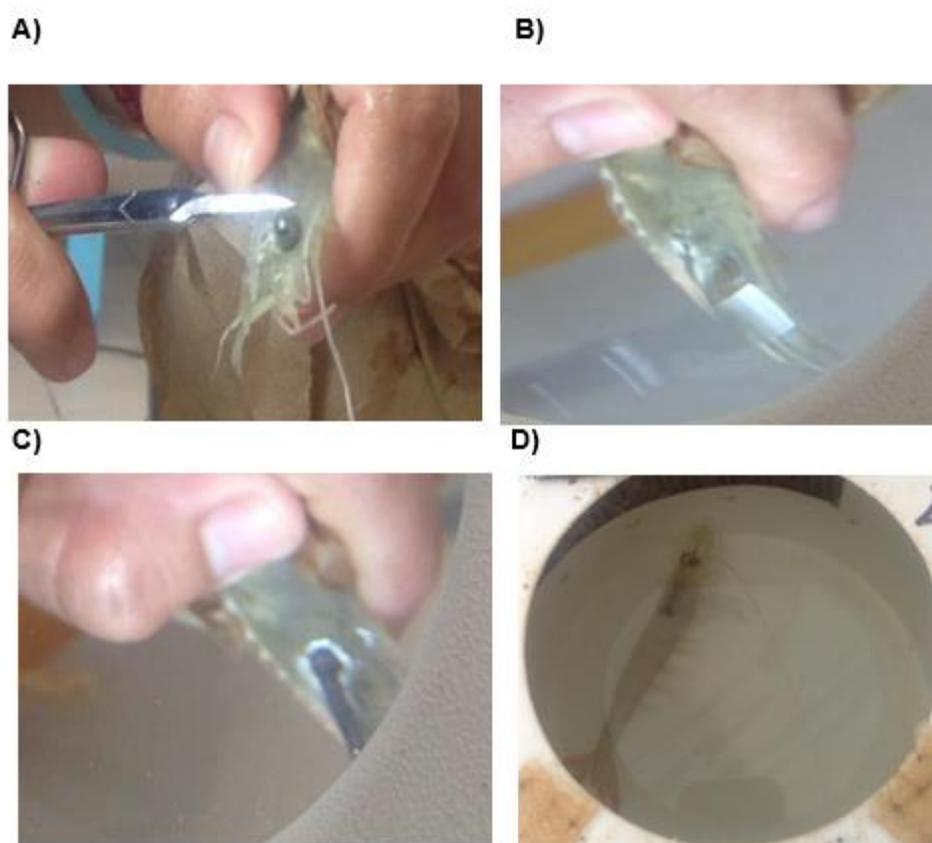


Figura 22. Ablación. A) Corte. B) Remoción del pedúnculo ocular. C) Cauterización. D) Camarón ablacionado en ayuno.

3.3.3 Evaluación de actividad hiperglucémica

Como se observa en la Fig. 23, el tratamiento con 232 pmol del péptido recombinante CHH-B2 promovió la actividad hiperglucémica en los camarones sub-adultos aclimatados a 35 ups con valores significativamente mayores a los controles ($P < 0.05$). Los niveles máximos de glucosa en hemolinfa se presentaron a una hora post-inyección, con un promedio de 27.92 ± 4.3 mg/dL. A media hora post-inyección, los niveles de glucosa fueron de 24.84 ± 2.7 mg/dL, no encontrándose una diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero si con los tratamientos a 3 h (14.29 ± 3.3 mg/dL) y 6 h (5.17 ± 0.75 mg/dL) post-inyección.

En cuanto a los controles, no se encontró una diferencia significativa ($P > 0.05$) en los niveles de glucosa de la hemolinfa entre los camarones no ablacionados sin inyectar (14.64 ± 2.38 mg/dL), los ablacionados sin inyectar (15.01 ± 1.48 mg/dL), y los inyectados con PBS 1X a los diferentes tiempos de muestreo: 1 h (14.68 ± 2.52 mg/dL) y 3 h (14.85 ± 2.26 mg/dL) post-inyección. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la inyección de la hormona a 3 horas y el resto de los controles. Los niveles de glucosa en hemolinfa incrementaron ~2 veces con el tratamiento de rCHH-B2 a una hora post-inyección en comparación con todos los controles.

A su vez, los niveles de glucosa disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) por debajo de estos niveles a seis horas post-inyección (5.17 ± 0.75 mg/dL). Además, el control de PBS 1X a seis horas fue significativamente más bajo que el resto de los controles (10.72 ± 3.12 mg/dL).

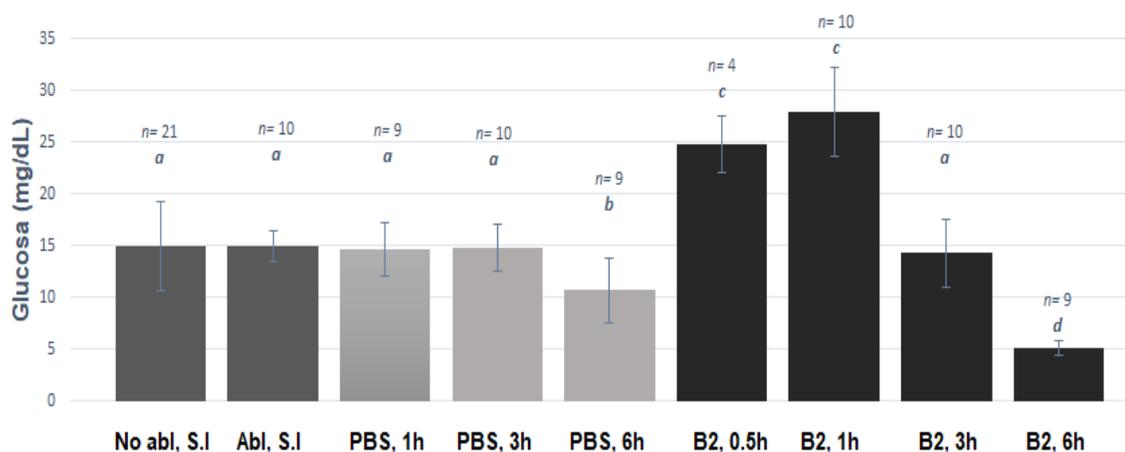


Figura 23. Niveles de glucosa de las muestras de hemolinfa obtenidas de los diferentes tratamientos y controles. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar. Las barras grises muestran a los organismos sin inyectar (abl = ablacionados), las barras claras muestran a los organismos inyectados con PBS 1X (a 1 h, 3 h y 6 h) y las barras oscuras a los organismos tratados con la hormona rCHH-B2 (a 0.5 h, 1 h, 3 h y 6 h). Las letras indican las diferencias significativas (ANOVA de una vía, $P < 0.05$)

3.3.4 Efecto de la neurohormona CHH-B2 en los niveles de triglicéridos de la hemolinfa

La inyección de hormona recombinante CHH-B2 (2 μ g/animal) causó un efecto significativo ($P < 0.05$) en los niveles de triglicéridos de la hemolinfa a una hora post-inyección (Fig. 24). El nivel promedio de triglicéridos obtenido este tratamiento fue de 61.8 ± 7.12 mg/dL.

Para los organismos no ablacionados sin inyectar se obtuvo un valor promedio de $52.87, \pm 8.73$ mg/dL mientras que el promedio de los organismos ablacionados sin inyectar fue de 47.13 ± 8.93 mg/dL, no encontrándose diferencias significativas para ambos controles. Los valores de triglicéridos obtenidos con los organismos muestreados a una hora post-inyección de PBS 1X tampoco fueron significativamente diferentes de estos controles ($P < 0.05$) (49.47 ± 7.02 mg/dL), al igual que los resultados del tratamiento con la hormona a media hora post-inyección (50.8 ± 8.53 mg/dL).

Sin embargo, se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los camarones controles (camarones sin inyectar, ya sea ablacionados o no ablacionados, así como los que fueron inyectados con PBS 1X y muestreados una hora después) y los valores de los organismos inyectados con PBS 1X y muestreados a 3 y 6 horas post-inyección (37.92 ± 8.73 y 37.18 ± 6.63 mg/dL, respectivamente). Cabe mencionar que no hubo diferencias significativas entre estos dos controles que recibieron inyección de PBS 1X a 3 y 6 h post-

inyección ni entre los organismos inyectados con la hormona a 3 horas post-inyección (33.37 ± 10.15 mg/dL).

La concentración de triglicéridos en la hemolinfa de camarones inyectados con la neurohormona a una hora post-inyección fue ~ 1.3 veces mayor en comparación lo obtenido en la hemolinfa de los camarones no ablacionados sin inyectar, ablacionados sin inyectar y muestreados a una 1 post-inyección de PBS 1X.

Para el tratamiento de la hormona a 6 horas post-inyección se obtuvo un promedio de 19.45 ± 10.77 mg/dL, una concentración de triglicéridos significativamente más baja ($P < 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos y controles.

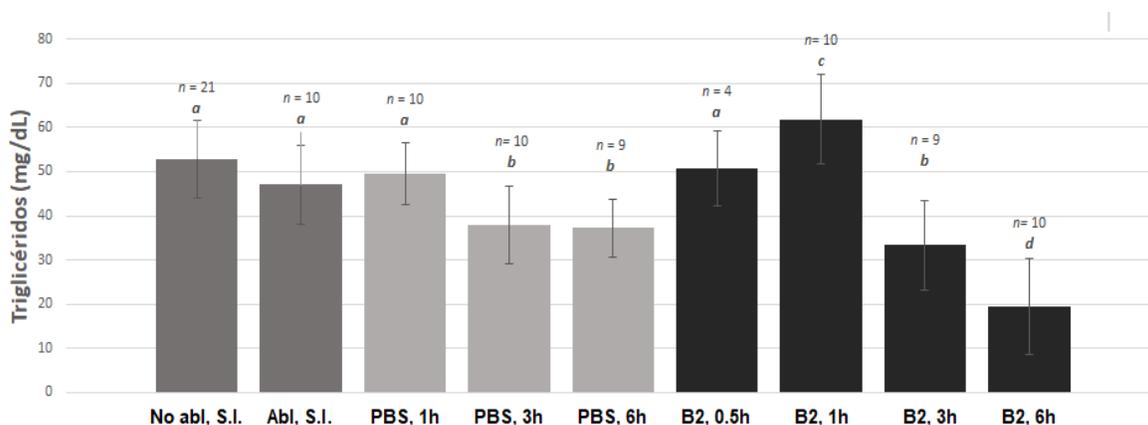


Figura 24. Niveles de triglicéridos de las muestras de hemolinfa obtenidas de los diferentes tratamientos y controles. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Las barras grises muestran a los organismos sin inyectar (abl = ablacionados), las barras claras muestran a los organismos inyectados con PBS 1X (a 1 h, 3 h y 6 h) y las barras oscuras a los organismos tratados con la hormona rCHH-B2 (a 0.5 h, 1 h, 3 h y 6 h). Las diferencias significativas son indicadas por las letras (ANOVA de una vía, $P < 0.05$).

3.3.5 Efecto de la neurohormona CHH-B2 en los niveles de ácidos grasos de la hemolinfa

Los niveles de ácidos grasos en la hemolinfa de los organismos no ablacionados sin inyectar fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) (0.278 ± 0.028 mmol/L) en comparación con los organismos ablacionados de los controles y tratamientos (Fig. 25). Los organismos ablacionados sin inyectar (0.142 ± 0.042 mmol/L) no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los niveles de ácidos grasos de la hemolinfa con los organismos tratados con PBS 1X a 1 h post-inyección (0.156 ± 0.058 mmol/L). La ablación redujo los niveles de ácidos grasos en la hemolinfa en 49%.

Con lo que respecta al tratamiento con la hormona, los organismos inyectados y muestreados a media hora post-inyección mostraron una concentración de ácidos grasos similar a la de camarones ablacionados sin inyectar (0.144 ± 0.028 mmol/L). Se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el nivel de ácidos grasos obtenidos en los organismos muestreados a 1 hora post-inyección de la hormona (0.244 ± 0.05 mmol/L) con los niveles obtenidos con los organismos ablacionados de los controles (S.I y con PBS 1X), siendo ~ 1.9 veces mayor con la hormona en comparación con los organismos ablacionados sin inyectar. Los valores obtenidos con la hormona estuvieron 12% por abajo de los niveles basales obtenidos en los organismos no ablacionados sin inyectar. Los organismos tratados con la hormona y muestreados a 3 y 6 horas post-inyección mostraron valores de ácidos grasos en la hemolinfa de 0.791 ± 0.03 y 0.113 ± 0.03 mmol/L respectivamente, los cuales no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) de los controles con PBS 1X (Fig. 25).

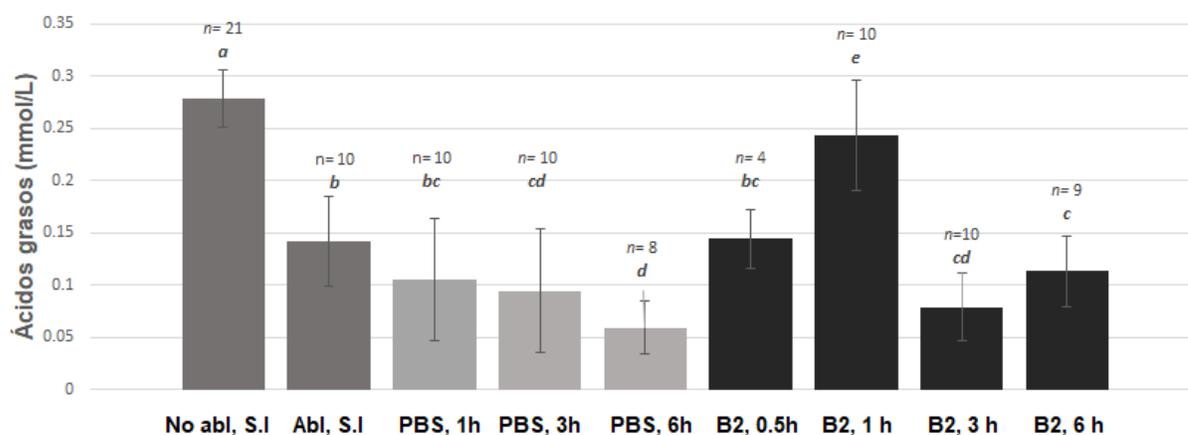


Figura 25. Concentración de ácidos grasos en las muestras de hemolinfa obtenidas de los diferentes tratamientos y controles. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar. Las barras grises muestran a los organismos sin inyectar (abl = ablacionados), las barras claras muestran a los organismos inyectados con PBS 1X (a 1 h, 3 h y 6 h) y las barras oscuras a los organismos tratados con la hormona rCHH-B2 (a 0.5 h, 1 h, 3 h y 6 h). Las letras indican las diferencias significativas (ANOVA de una vía, $P < 0.05$).

3.3.6 Efecto de la neurohormona CHH-B2 en los niveles de fosfolípidos de la hemolinfa

Con respecto a la variación en los niveles de fosfolípidos de la hemolinfa solamente se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el valor obtenido en los camarones a una hora post-inyección de la hormona (0.949 ± 0.121 mmol/L) en comparación con todos los demás tiempos de muestreo tanto con la

hormona a 0.5 h (0.663 ± 0.04 mmol/L), 3 h (0.552 ± 0.09 mmol/L) y 6 h (0.643 ± 0.09 mmol/L), así como con los controles no ablacionados sin inyectar (0.501 ± 0.120 mmol/L), ablacionados sin inyectar (0.540 ± 0.128 mmol/L), y los tratados con PBS 1X, los cuales tuvieron valores de entre 0.428 ± 0.22 y 0.543 ± 0.15 mmol/L. Los camarones muestreados a 1 hora post-inyección de rCHH-B2 tuvieron ~ 1.72 veces más concentración de fosfolípidos en la hemolinfa en comparación con los camarones no ablacionados sin inyectar (Fig. 26).

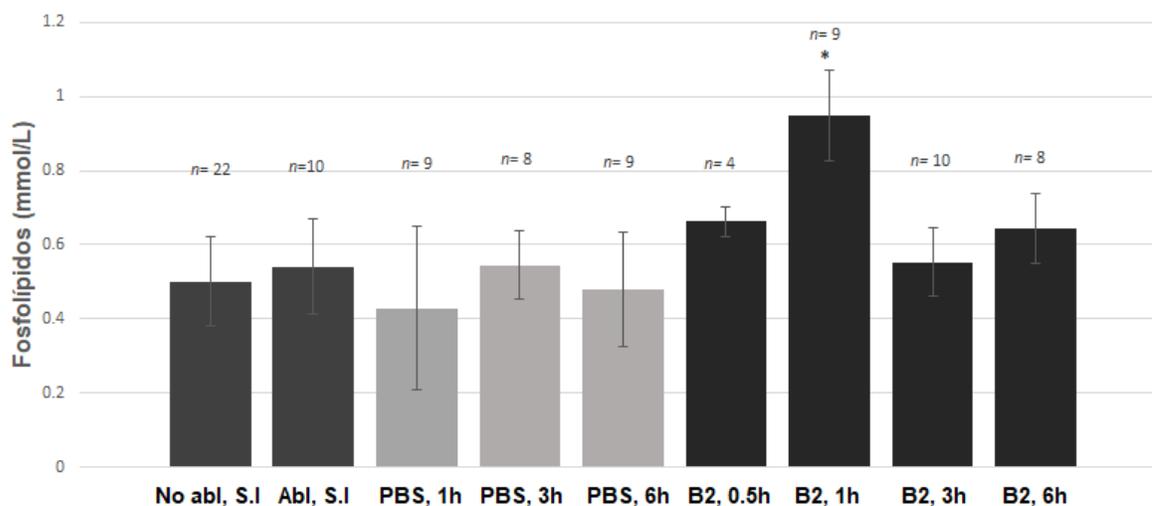


Figura 26. Concentración de fosfolípidos en las muestras de hemolinfa obtenidas de los diferentes tratamientos y controles. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar. Las barras grises muestran a los organismos sin inyectar (abl = ablacionados), las barras claras muestran a los organismos inyectados con PBS 1X (a 1 h, 3 h y 6 h) y las barras oscuras a los organismos tratados con la hormona r-CHH-B2 (a 0.5 h, 1 h, 3 h y 6 h). Las diferencias significativas están marcadas con asterisco.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Sistemas de expresión de CHH

Se evaluaron dos sistemas de expresión de proteínas recombinantes (uno eucariota y uno procariota) utilizando como modelo a la proteína CHH-A de *L. vannamei* con la idea de obtener altos niveles de expresión de la proteína, su fácil purificación y eliminación de conformaciones estructurales de la hormona. El uso de *E. coli* resulta gran interés ya que su genética y bioquímica es bien conocida, es una bacteria de rápido crecimiento y puede producir proteínas con un alto rendimiento (Madigan *et al.*, 2009). Esto permitió la expresión del fragmento correspondiente a la proteína de fusión NusA-CHH-A de 70 kDa mediante la inducción con IPTG, el cual pudo ser claramente visualizado en los geles de Tricina SDS-PAGE y corroborado por el anticuerpo anti-CHH-A. El rendimiento obtenido para NusA-CHH-A (5500 mg/L) fue mucho mayor al reportado por Nagai y colaboradores (2009) para la proteína de fusión NusA-Pej-SGP-VII (120 mg/L). Dado que NusA-CHH-A pudo ser recuperada del sobrenadante del lisado celular esto sugirió que la proteína estaba en forma soluble lo que se asocia al uso de la proteína NusA que se fusionó a CHH-A (Montiel-Arzate, 2016).

NusA es una proteína que promueve la solubilidad de los péptidos a los cuales se encuentra fusionada (Davis *et al.*, 1999). Un modelo sugiere que las proteínas que incrementan la solubilidad pudieran ejercer su efecto formando grandes agregados miceliales que protegen en su interior a las proteínas de los solventes (Nallamsetty y Waugh, 2006). Otros autores sugieren que funcionan como chaperonas moleculares dada su interacción con proteínas parcialmente desnaturalizadas *in vitro* (Li *et al.*, 2013). Independientemente del mecanismo que utilicen, estas etiquetas resultan de gran ayuda ya que la insolubilidad de las proteínas recombinantes es un cuello de botella importante para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Nallamsetty y Waugh, 2006). No obstante haber expresado a NusA-CHH-A en forma soluble con un alto rendimiento y purificarla exitosamente por cromatografía de afinidad mediante el dominio de histidinas, no fue posible remover estas etiquetas adicionales de la región N-terminal con la enzima enterocinasa para tener a la proteína CHH-A con la secuencia lo más parecida a la hormona natural.

Previamente, se han reportado diversos sitios de digestión de enterocinasa que no corresponden a la secuencia canónica de esta enzima (Chen *et al.*, 2003; Kenig *et al.*, 2006) Algunos trabajos han mostrado una mejora de la especificidad de la enterocinasa con el uso de la urea 2 M (Zhang *et al.*, 2005; Shahravan

et al., 2008). Debido a que algunos de estos sitios habían sido detectados en la proteína de fusión NusA-CHH-A utilizando herramientas bioinformáticas (Montiel-Arzate, 2016) se probaron 2 concentraciones diferentes de urea (1 y 2 M) y 2 tiempos de incubación (1 y 3 horas). Sin embargo, no se logró optimizar el corte de la proteína de fusión y prevenir cortes inespecíficos. Por lo tanto, una opción a futuro para remover la N-región adicional de la proteína de fusión es el uso de otras proteasas como la trombina, que ha sido utilizada para purificar CHHs de *M. japonicus* (Nagai *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2011). En el caso del péptido rPej-SGP-VII purificado por Nagai y colaboradores (2009) la trombina produjo cortes inespecíficos en la región de la proteína NusA, sin embargo, esto no afectó la actividad de la proteína recombinante. No obstante, en el caso de CHH-A la introducción del dominio de corte para trombina en lugar del de enterocinasa, daría lugar a un péptido con aminoácidos adicionales en el N-terminal. En cambio, con la enterocinasa se esperaba tener el péptido con la secuencia idéntica a la neurohormona natural, lo cual es importante para evaluar su actividad en los ensayos *in vivo*, ya que se ha reportado que la presencia de aminoácidos adicionales en el N- o C- terminal de CHHs recombinantes pueden influir en su actividad hiperglucémica (Metulio *et al.*, 2004; Zarubin *et al.*, 2009).

El sistema eucariota con la levadura metilotrófica *P. pastoris* ya ha sido utilizado previamente para la expresión y purificación de las hormonas CHH-B1 y CHH-B2 (Camacho-Jiménez, 2016), así como para la expresión de CHH-A (Balderas-González, 2014). Sin embargo, a diferencia de los trabajos previos realizados en el grupo, en el presente trabajo se utilizó medio mínimo para evitar utilizar peptona, uno de los componentes del medio complejo que por tratarse de un hidrolizado de proteínas precipita junto con la hormona recombinante y complica su purificación (Balderas-González, 2014). Aun cuando fue posible observar la expresión de la hormona con medio mínimo y tiempos de elución fueron correspondientes a los observados por Balderas-González (2014) para CHH-A, los picos más grandes en el cromatograma no correspondían a la fracción con la hormona y el Dot blot reveló una detección muy débil de la proteína recombinante, a diferencia de la señal obtenida en el control positivo (1 µg de antígeno). Por lo tanto, es posible que la mayor parte de las proteínas obtenidas en medio mínimo purificadas por HPLC correspondieran a proteínas propias secretadas por *P. pastoris*. De esta manera, esta metodología requería realizar un mayor número de inducciones con un mayor volumen de cultivo para obtener la cantidad requerida de hormona para los bioensayos.

Al utilizar medio complejo con base a las condiciones previamente establecidas para expresar CHHs de *L. vannamei* (Camacho-Jiménez, 2016; Balderas-González, 2014) se obtuvo un cromatograma con un pico mayor que corresponde a las fracciones con la proteína recombinante, lo cual coincide con los resultados obtenidos previamente (Balderas-González, 2014). Sin embargo, la cantidad de proteína presente en el

precipitado con sulfato de amonio (2.099 mg/L) fue menor al rendimiento obtenido por Balderas-González (2014), el cual fue de 12.19 mg/L para CHH-A y que el de Camacho-Jiménez (2016), quien obtuvo 7 mg/L para CHH-B1, mientras que para CHH-B2 fue de 2.3 mg/L. El bajo rendimiento obtenido hizo que se detectara una señal muy tenue en el Dot blot, que si bien confirmó la presencia de la hormona CHH-A sugirió que se requeriría igualmente un mayor número de inducciones y purificaciones. Dado que los organismos ya se encontraban en la talla requerida para los bioensayos, estos fueron realizados con la hormona recombinante CHH-B2 nativa sin amidar, purificada previamente por nuestro grupo (Camacho - Jiménez, *et al.* 2017b).

4.2 Aspectos funcionales de CHH

Las hormonas CHHs tienen un papel importante en diferentes procesos biológicos de crustáceos. La estimulación de la movilización de la glucosa desde los tejidos de reserva, principalmente músculo, tejido tegumentario y hepatopáncreas a la hemolinfa (hiperglucemia) es considerada la principal función (Sedlmeier y Keller, 1981). Sin embargo, se ha propuesto que estas hormonas podrían estar involucradas en otros procesos como crecimiento, reproducción, metabolismo de lípidos y osmorregulación (Fanjul-Moles, 2006; Webster *et al.*, 2012).

4.2.1 Efecto hiperglucémico de rCHH-B2

Los valores de glucosa en la hemolinfa de los organismos ablacionados evidenciaron que la mayor actividad hiperglucémica fue 1 h post-inyección de la hormona rCHH-B2. Los niveles obtenidos en este trabajo, coinciden con los obtenidos por Camacho-Jiménez y colaboradores (2017b) en un ensayo dosis respuesta con organismos juveniles ablacionados bilateralmente (6.9 ± 1.3 g), ya que al inyectar 250 pmol de rCHH-B2 sin amidar determinó una concentración de glucosa en hemolinfa de ~ 27 mg/dL a 1 hora post inyección, un valor similar a obtenido en este trabajo al inyectar 232 pmol (27.92 ± 4.3 mg/dL) en organismos sub-adultos. Estos resultados demuestran que la hormona rCHH-B2 utilizada mantuvo su actividad biológica después de su almacenamiento a -70°C y que $2 \mu\text{g}$ de esta hormona es suficiente para promover una respuesta hiperglucémica en organismos juveniles y sub-adultos. Así mismo se corroboró que la máxima actividad hiperglucémica de rCHH-B2 es a 1 hora post inducción y por primera vez se evidencio que es una

respuesta a corto plazo ya que a 3 h post-inyección la glucosa en hemolinfa se encontraba al mismo nivel que los organismos control (inyectados con PBS 1X a 1 hora y organismos sin inyección). Los niveles basales de glucosa reportados (~15 mg/dL) coincidieron con los de Camacho-Jiménez y colaboradores (2017b) a pesar de las diferencias de peso y estadio de los camarones usados. Esto difiere del estudio realizado por Wang *et al.* (2017) en donde se utilizó la hormona CHH-II, que corresponde a la secuencia de CHH-B2, pero que contiene una etiqueta MBP en el N-terminal, la cual mostró mayor actividad hiperglucémica 3 h post-inyección de la hormona en camarones juveniles de *L. vannamei* no ablacionados. Estas diferencias pueden deberse a la presencia de 382 aminoácidos adicionales en el N-terminal, los cuales pudieran estar interfiriendo con el efecto de la hormona, así como a las diferencias en el estadio de crecimiento de los organismos utilizados.

La actividad hiperglucémica mostrada por rCHH-B2 fue mayor a la presentada por otras CHHs recombinantes estudiadas, tanto isoformas amidadas como sin amidar (Katayama *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2009). Esto indica que la hormona recombinante utilizada tiene una actividad hiperglucémica alta, aun sin amidar y que es estable ya que conserva su actividad original. Se ha sugerido que el efecto hiperglucémico de las hormonas CHH se debe a la activación de la fosforilasa e inhibición de la glucógeno sintasa a partir del aumento en la concentración de nucleótidos cíclicos (Sedlmeier y Keller, 1981).

En algunos organismos se ha observado que la remoción del pedúnculo causa la disminución de los niveles de glucosa en comparación con los no ablacionados (Sainz- Hernández *et al.*, 2008) y que la inyección de CHH's promueve la recuperación de los valores de glucosa en hemolinfa (Serrano *et al.*, 2003). Sin embargo, en este caso no se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa entre los controles ablacionados y no ablacionados. Camacho-Jiménez y colaboradores (2017a) reportaron para *L. vannamei*, una disminución significativa de los niveles de glucosa en organismos sub-adultos ablacionados (23.91 ± 1.46 mg/dL), con una talla de 14.02 ± 1.3 g en comparación con organismos no ablacionados (en promedio 12.93 mg/dL). Esos ensayos se llevaron a cabo bajo un ayuno de 24 horas, no de 48 como en este caso, lo que podría explicar los niveles de glucosa más bajos en los organismos control de este trabajo. Estos resultados coinciden con la disminución gradual de los niveles de carbohidratos totales observado conforme pasaron los días de ayuno en ensayos realizados con el cangrejo azul *Portunus pelagicus* (Sugumar *et al.*, 2013). Aun así, cabe mencionar que el nivel de glucosa obtenido en camarones ablacionados fue similar en ambos trabajos, tanto para organismos sin inyección como para aquellos que fueron inyectados con PBS 1X, lo que sugiere que no hubo estrés por manipulación.

Si bien la actividad hiperglucémica de la CHH se encuentra bien documentada, aún no se conoce si en crustáceos hay una sustancia similar a la insulina de mamíferos, es decir que revierta la hiperglucemia en la hemolinfa (Chung *et al.*, 2010). Sin embargo, se han identificado péptidos en invertebrados (moluscos) con cierta similitud estructural con la insulina de los vertebrados y que causan la disminución de la glucosa en la hemolinfa (Kits *et al.*, 1991).

4.2.2. Efecto hiperlipidémico de CHH

En el presente trabajo, la mayor concentración de triglicéridos se observó a 1 h post-inyección (61.8 mg/dL), el cual fue de 1.3 veces mayor que en los organismos usados como control (organismos sin inyectar, ya sea ablacionados o sin ablacionar, así como inyectados con PBS 1X a una hora post-inyección).

En el estudio realizado con cangrejos de Santos y colaboradores (1997), el cual es el único trabajo en donde se ha observado hiperlipidemia por efecto de la administración de CHH en decápodos, se reportó que el nivel máximo de triglicéridos por la inyección de CHH de *C. maenas* fue de 21 mg/dL. Esta concentración fue casi 3 veces menor a la obtenida en *L. vannamei* en el presente trabajo. Así mismo, este efecto fue observado a un tiempo más corto (30 minutos) a diferencia del presente estudio (1 hora), siendo también ~1.3 veces mayor que el obtenido en los organismos sin inyectar (15.75 mg/dL).

Las diferencias en los niveles pueden deberse tanto a la fisiología de las especies como a las condiciones en las que se realizaron los experimentos, la actividad y tipo de hormona CHH empleada, así como la dosis utilizada, que en el caso de *C. maenas*, que fue de 16 pmol/animal y en el de *L. vannamei*, de 232 pmol/animal. Si bien hubo variación en el tiempo de respuesta máxima de ambas hormonas resulta interesante el hecho de que ambos presentaron un aumento similar con respecto al nivel basal. En ninguna de las dos especies (*L. vannamei* y *C. maenas*) se obtuvo una diferencia significativa en la concentración de triglicéridos en la hemolinfa entre organismos ablacionados y no ablacionados (ANOVA de una vía, $P > 0.05$ en ambos trabajos).

Estudios previos de dosis-respuesta llevados a cabo con rCHH-B2 a 1 h post-inyección mostraron que el efecto de los triglicéridos en la hemolinfa de *L. vannamei* es dependiente de la dosis (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017b). El nivel de triglicéridos que obtuvieron con 250 pmol de hormona fue de ~45 mg/dL, lo que es 30% menor de lo obtenido en el presente trabajo con 232 pmol. Camacho-Jiménez y colaboradores

(2017b) obtuvieron una concentración promedio de triglicéridos en organismos control (inyectados con PBS 1X y ablacionados) de 13 mg/dL. Las diferencias obtenidas podrían deberse a los efectos metabólicos y fisiológicos que se dan en las diferentes etapas de crecimiento del camarón ya que se utilizaron organismos juveniles (6.9 ± 1.3 g). Estudios realizados por Sainz-Hernández y colaboradores (2008) con camarones sub-adultos de *L. vannamei* de 15 ± 1.5 g mostraron diferencias en los niveles de triglicéridos en la hemolinfa dependiendo del sexo de los organismos. La concentración promedio obtenida en machos fue de 40 mg/dL y 22 mg/dL en hembras. Esto podría explicar la amplia desviación estándar (>10%) obtenida en el presente trabajo para organismos no ablacionados sin inyectar (52.87 ± 8.73 mg/dL). Sin embargo, en el trabajo de Sainz-Hernández y colaboradores (2008) destaca el hecho de que no encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en camarones ablacionados bilateralmente, donde la concentración promedio de triglicéridos reportada fue de 25 mg/dL a los 5 días de este procedimiento. En el presente estudio, los organismos fueron muestreados dos días después de la ablación en condiciones de ayuno, obteniéndose una concentración de triglicéridos de 47.13 ± 8.93 mg/dL. Es posible que la diferencia de resultados se deba a la disminución de liberación de triglicéridos en la hemolinfa conforme pasan los días después de la ablación, como se ha observado en el caso de *G. lateralis* (O'Connor y Gilbert, 1968). Para juveniles de *L. vannamei* (8-12 g) se ha reportado una concentración de triglicéridos en la hemolinfa de 35.2 ± 5.4 mg/dL en organismos no ablacionados (Mercier *et al.*, 2006), el cual es menor que en el presente trabajo, donde se usaron organismos más grandes (13.78 ± 1.7 g), y mayor para los organismos control de Camacho-Jiménez *et al.* (2017b), quienes usaron organismos más pequeños.

Con lo que respecta a los ácidos grasos libres, en el presente trabajo los resultados mostraron una disminución significativa en la hemolinfa de los organismos ablacionados bilateralmente (sin inyectar) en comparación con los intactos. Este efecto fue similar al que observado por Santos y colaboradores (1997) en cangrejos *C. maenas* ablacionados, el cual es el único que reporta los efectos de la ablación sobre los niveles de esta clase de lípidos en crustáceos. En ambos casos, la inyección de CHH reestableció los niveles de ácidos grasos libres de la hemolinfa a 1 h post-inyección en organismos ablacionados (0.244 ± 0.05 mmol/L en el presente estudio). En el caso de *L. vannamei*, los niveles de ácidos grasos regresaron a los niveles basales a las 3 h post-inyección mientras que en *C. maenas* se mantuvieron hasta las 2 h post-inyección (0.035 mmol/L).

Con respecto a la concentración basal de ácidos grasos libres esta fue 8 veces mayor en *L. vannamei* (0.278 ± 0.028 mmol/L) con respecto a *C. maenas* (0.035 mmol/L); sin embargo, el incremento entre los valores

máximos de ácidos grasos libres entre el tratamiento con las neurohormonas y los niveles basales fue similar para ambas especies, con un aumento de ~ 1.9 veces para *L. vannamei* y ~ 1.4 veces para *C. maenas*.

En *L. vannamei*, los fosfolípidos son la clase de lípidos más abundantes en la hemolinfa siendo la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina los que se encuentran en mayor concentración (Ju *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la ablación no tuvo efecto en los niveles de fosfolípidos en la hemolinfa de *L. vannamei*, lo que fue observado también en *C. maenas* (Santos *et al.*, 1997). El tratamiento con CHH elevó los niveles de fosfolípidos en la hemolinfa de *C. maenas* por encima de los basales (~ 1.25 veces mayor), teniendo su máximo efecto a los 30 minutos post-inyección, disminuyendo a 1 h post-inyección hasta llegar nuevamente a los niveles basales a las 2 h post-inyección. En el caso de *L. vannamei*, los niveles máximos de fosfolípidos en hemolinfa fueron observados a 1 h post-inyección de rCHH-B2 (0.949 ± 0.121 mmol/L), siendo ~ 1.72 veces más altos que el nivel basal de *L. vannamei*, retornando a sus valores basales a las 3 h del tratamiento con la hormona. El nivel de fosfolípidos en la hemolinfa de organismos no ablacionados sin inyectar de *L. vannamei* (0.501 ± 0.120 mmol/L) fue 1.8 veces menor a los observados en *C. maenas* (0.9 mmol/L).

Los ácidos grasos ingeridos de la dieta se incorporan en el hepatopáncreas y son liberados principalmente como fosfolípidos mientras que los triglicéridos son almacenados y liberados en menor concentración. Los ácidos grasos se liberan de forma más eficiente que el resto de los lípidos al no requerir factores adicionales para su transferencia (García *et al.*, 2002). Por esta razón es probable que el aumento de triglicéridos provocado por la inyección de CHH fuera menos prominente comparado con los niveles basales en hemolinfa que el aumento observado de fosfolípidos, seguido del aumento de ácidos grasos. En *L. vannamei*, los lípidos neutrales como los triglicéridos son catabolizados en condiciones de ayuno, mientras que los lípidos polares, como los fosfolípidos, se conservan dado su papel estructural (Stuck *et al.*, 1996). Es posible que por esta razón la concentración de fosfolípidos en la hemolinfa permaneciera constante a pesar de la ablación y el ayuno, lo que no se observó con los ácidos grasos, que son producto de la lipólisis de los triglicéridos en el hepatopáncreas.

4.2.3 Proceso de lipólisis en respuesta a CHH

En vertebrados, la enzima llamada lipasa sensible a hormonas cataliza la hidrólisis de los triglicéridos dando lugar a tres moléculas de ácidos grasos y una de glicerol. Posteriormente, estos ácidos grasos son transportados a las mitocondrias y sometidos a beta-oxidación, y las moléculas de acetil-CoA resultantes entran al ciclo de Krebs (Salway, 1999). Las reservas de triglicéridos son movilizadas en periodos de estrés o falta de alimento y su movilización se encuentra bajo control hormonal. Para llevar a cabo la beta oxidación, se requiere de disponibilidad de FAD y NAD⁺. En crustáceos, el catabolismo de lípidos se lleva a cabo por beta oxidación de manera similar a como se lleva a cabo en vertebrados, sin diferencias entre especies eurihalinas o estenohalinas (Chapelle, 1973). La hormona glucagón, que se puede considerar análoga a las CHHs en vertebrados, estimula la lipólisis *in vivo* (Liljenquist, *et al.* 1974), pero no tiene efecto sobre la lipasa sensible a hormonas, que es la que lleva a cabo el proceso de lipólisis de los triglicéridos en humanos (Salway, 1999). El metabolismo de lípidos involucra a una proteína cinasa A, que estimula la lipasa sensible a hormonas e inhibe la acetil-CoA carboxilasa, la cual regula la síntesis de ácidos grasos. El glicerol proveniente de la hidrólisis de los triglicéridos va al hígado, donde la glicerol cinasa hepática forma glicerol 3-fosfato, el cual finalmente se incorpora a la gluconeogénesis (Salway, 1999).

En crustáceos decápodos, los triglicéridos son catabolizados a ácidos grasos libres y a glicerol por acción de lipasas, siendo la principal la triacilglicerol éster hidrolasa (Pasquevich *et al.*, 2011). El glicerol puede ser usado como un precursor para la síntesis de glucosa y de esta forma, se mantienen los niveles estables de este metabolito en la hemolinfa (Jiménez y Kinsey, 2015). Estas lipasas y esterasas se encuentran en las células R del hepatopáncreas, que a la vez producen y almacenan glucógeno. Estas son las células encargadas de liberar glucosa a la hemolinfa desde el hepatopáncreas (Verri *et al.*, 2001). Duka y Ahearn (2014) caracterizaron un transportador de glucosa y fructuosa dependiente de Na⁺ en el hepatopáncreas de *H. americanus*. El hepatopáncreas es uno de los órganos diana de CHH, al contar con receptores que se unen con alta afinidad a estas neurohormonas (Kummer y Keller, 1993).

La enzima triacilglicerol éster hidrolasa ha sido caracterizada en *L. vannamei* y se ha determinado que hidroliza con mayor facilidad los triglicéridos de cadena larga, lo que provee al organismo de ácidos grasos esenciales que después se catabolizan por beta-oxidación (Rivera-Pérez *et al.*, 2011). En *L. vannamei*, las lipasas del hepatopáncreas tienen mayor actividad en periodos de falta de alimento, lo que sugiere que los lípidos de reserva son usados como fuente de energía en estas condiciones (Rivera-Pérez *et al.*, 2010). Se ha observado que durante periodos de inanición hay un aumento en los niveles de CHH en la hemolinfa (Santos y Keller, 1993b). La CHH podría actuar sobre la lipólisis en el hepatopáncreas ocasionando la

liberación de lípidos en respuesta a condiciones de falta de alimento, de forma similar a como actúa el glucagón en vertebrados, sin embargo se requieren más estudios al respecto acerca de su mecanismo de acción.

A diferencia de los mamíferos, las reservas de glucógeno en crustáceos están sujetas a varios cambios y se acumulan en el hepatopáncreas durante el periodo de intermuda a premuda, disminuyendo cuando el organismo entra al periodo de muda (Cuzón *et al.*, 2000). La vía de glucólisis es una ruta predominante la etapa de premuda en crustáceos, mientras que en intermuda la vía predominante es la de pentosas (McWhinnie y Kirchenberg, 1962; McWhinnie y Chua, 1964). Esta última vía provee NADPH reducido para la síntesis de ácidos grasos insaturados (Cuzón *et al.*, 2000). La concentración de lípidos en el hepatopáncreas aumenta en la premuda temprana al aumentar la síntesis de estos metabolitos, mientras que disminuye en la premuda tardía debido a su liberación en la hemolinfa (Barclay *et al.*, 1983).

Aparte del efecto modulador sobre la glucogenólisis, las CHHs tienen un efecto modulador en la ruta de glucólisis. En experimentos con *O. limosus* y *C. maenas* se ha observado el incremento de fructosa 2-6 bifosfato por efecto de esta hormona (Santos y Keller, 1993c), el cual es un modulador de la enzima fosfofructocinasa, que tiene un papel regulador en la vía de glucólisis. El aumento de glucosa en la hemolinfa regula de forma negativa los niveles de CHH, mientras que los niveles de lactato, producto del metabolismo anaerobio de la glucosa tienen un efecto contrario, es decir, estimulan la producción de CHH (Santos y Keller, 1993b). En crustáceos, el incremento de citrato regula de forma negativa la fosfofructocinasa (Hochachka *et al.*, 1970).

En vertebrados, el citrato es convertido a oxalacetato y a acetil-CoA, el cual es precursor de la síntesis de ácidos grasos. El citrato también activa a la acetil-CoA carboxilasa, lo que controla la síntesis de ácidos grasos y posteriormente de triglicéridos, proceso que se conoce como lipógenesis (Salway, 1999). De esta manera, la acumulación de citrato, procedente de la beta-oxidación de los ácidos grasos podría inhibir el efecto de lipólisis observado tras la inyección de CHH (Santos *et al.*, 1997). Sin embargo, se requiere más investigación acerca de la forma en que las CHHs pudiesen estar regulando la lipólisis en los tejidos de reserva. En la Figura 28 se puede observar un resumen de las rutas metabólicas descritas en esta sección.

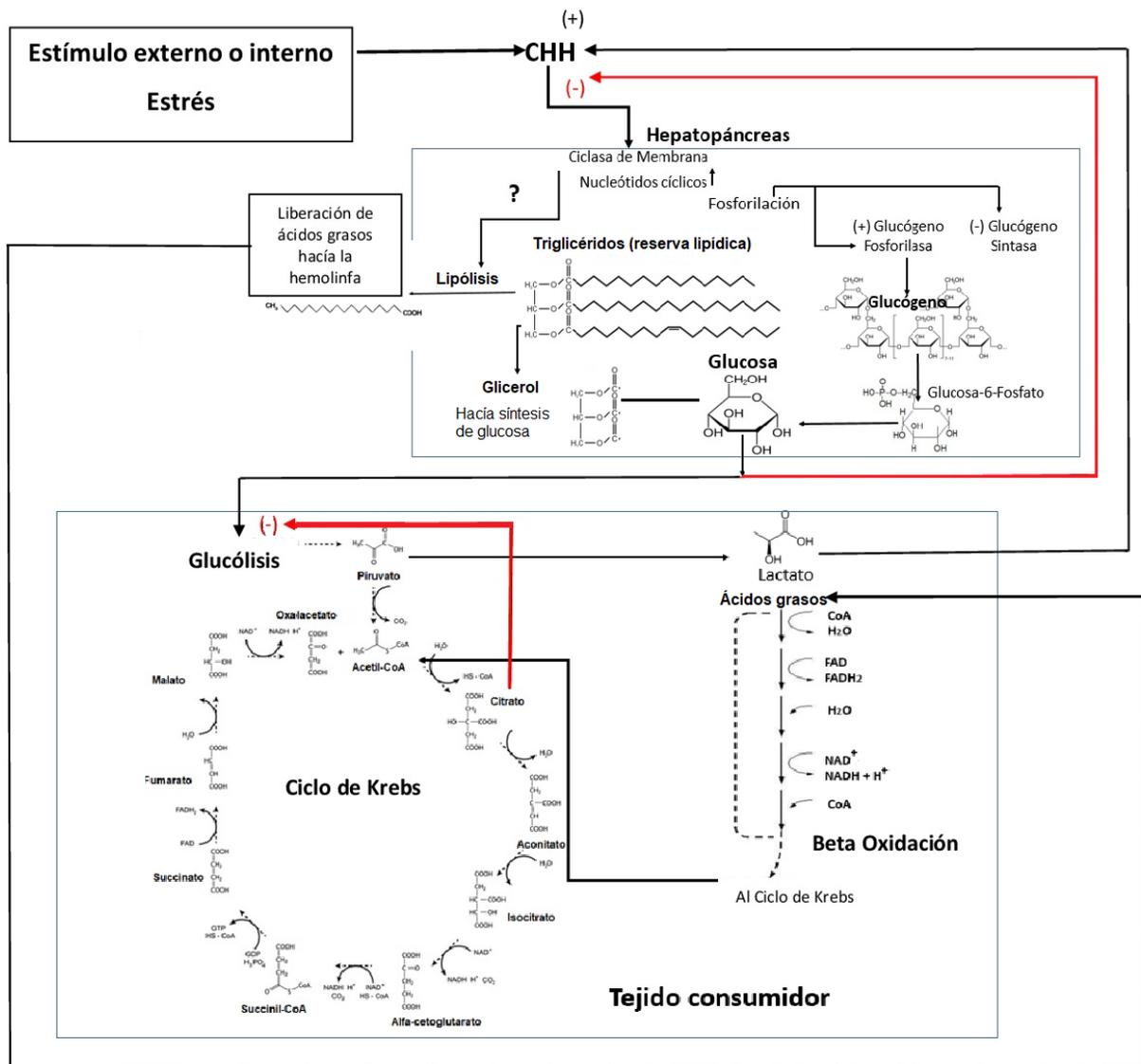


Figura 28. Relación entre liberación de glucosa y lípidos en respuesta a CHH. A la par que se liberan ácidos grasos y glucosa de la hemolinfa por efecto de la hormona, estos serán metabolizados en los tejidos de consumo (por ejemplo, las branquias) por medio de beta-oxidación y glucólisis, respectivamente. Al haber un aumento en la beta-oxidación, podría haber un incremento en los niveles de citrato, el cual tiene un efecto regulador negativo en la ruta de glucólisis.

Por otro lado, se ha reportado que la CHH de *O. limosus* influyó en el aumento de la liberación de amilasa en el hepatopáncreas, la cual degrada los enlaces 1-4 de las unidades de glucosa. Esto sugirió que la CHH puede contribuir al aumento de la concentración de enzimas digestivas en el hepatopáncreas, lo cual es acorde a su actividad hiperglucémica (Sedlmeier, 1988).

4.2.4 Cambios del metabolismo de lípidos en respuesta a condiciones ambientales y factores internos y su relación con CHH

El almacenamiento de carbohidratos y lípidos es importante para el mantenimiento energético en crustáceos, particularmente en periodos donde se requiere consumir ATP. Se han observado cambios en la síntesis o movilización de estas reservas durante variaciones en el estado fisiológico del organismo o en respuesta a cambios ambientales (Jiménez y Kinsey, 2015).

El hecho de haber observado en el presente trabajo tanto una respuesta hiperglucémica como el aumento de triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres a corto plazo (1 h post-inyección de rCHH-B2) sugiere una relación entre el metabolismo de glucosa y lípidos como se ha reportado en vertebrados (Salway, 1999). En el cangrejo *C. granulata* se observó un aumento simultáneo y transitorio de lípidos y glucosa en la hemolinfa y en branquias en condiciones de exposición al oxígeno atmosférico (Schmitt y Santos, 1993). Los autores sugieren que esto ocurre porque al emplear la reserva lipídica, se genera menos CO₂ (30% menos a diferencia del uso del metabolismo de glucosa), lo que beneficia al organismo durante las condiciones de hipoxia al reducir la acidosis. Los autores no descartan la posibilidad de que las CHHs causen este aumento, el cual fue estacional, ya que los autores solamente lo observaron en verano, cuando las temperaturas son más altas y los organismos suelen pasar más tiempo fuera del agua.

Experimentos en donde se ha medido el consumo de O₂ han evidenciado la participación de las CHHs sobre el proceso de respiración de estos organismos. Por ejemplo, la presencia de CHH en el músculo de *C. maenas* y *O. limosus* promovió una disminución en la captación de O₂, lo que se puede atribuir al efecto Crabtree, el cual describe que en altas tasas de actividad glucolítica hay una inhibición de la respiración (Santos y Keller, 1993c). En cangrejos *G. lateralis* ablacionados se ha observado un incremento en el consumo de oxígeno (Bliss, 1953), mientras que en cangrejos *C. maenas* y *O. limosus* ablacionados no hay hiperglucemia cuando son expuestos al aire atmosférico, lo que significa que no pueden tener esta respuesta a estas condiciones de exposición a oxígeno atmosférico.

El hecho de que en algunos crustáceos, como en el cangrejo *C. maenas* se hayan observado cambios en la composición y metabolismo de lípidos en respuesta a cambios de temperatura (Chapelle *et al.*, 1981) resulta interesante ya que se ha visto que la expresión del gen *chhB* de *L. vannamei*, que da lugar a la neurohormona CHH-B2 por corte y empalme alternativo, es dependiente de la salinidad y la temperatura (Lago-Lestón *et al.*, 2007). En condiciones de bajas temperaturas (20°C-22°C) o altas temperaturas (32°C), así como en salinidades extremas (10 o 40 ups) es posible observar mayor expresión de los transcritos que

codifican para CHH-B2, mientras que en condiciones óptimas de salinidad (28 ups) la expresión es prácticamente nula (Lago-Lestón *et al*, 2007).

En camarones *L. vannamei* expuestos a salinidades extremas (3 y 32 ups) se ha observado una mayor actividad de enzimas digestivas y antioxidantes, como la catalasa y superóxido dismutasa (Li *et al.*, 2008) y de enzimas relacionadas con metabolismo de lípidos en hepatopáncreas, tales como lipasas, la sintasa de ácidos grasos, elongasas y desaturasas, así como el incremento de triglicéridos en la hemolinfa (Chen *et al*, 2014). Este aumento de actividad se relaciona con la movilización de nutrientes en los túbulos del hepatopáncreas, aumentando el porcentaje de células B y disminuyendo el de células R, en comparación con organismos en condiciones iso-osmóticas (Li *et al.*, 2008). Las células B tienen funciones secretoras mientras que las células R son consideradas células de reservas de nutrientes (Al-Mohanna y Nott, 1986).

Por lo tanto, se ha sugerido que los organismos requieren de la energía provista por los alimentos para compensar la pérdida energética derivada del proceso de osmorregulación cuando se encuentran en estas condiciones (Li *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2014).

Trabajos recientes de nuestro grupo han mostrado que la neurohormona CHH-B2 de *L. vannamei* actúa reduciendo la concentración de iones de Na^+ y Cl^- en la hemolinfa de camarones expuestos agudamente a altas salinidades (condiciones hiper-osmóticas). En estas condiciones se ha observado un aumento en la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ y de la anhidrasa carbónica en las branquias como respuesta al tratamiento con la hormona rCHH-B2 (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). Tanto la ATPasa de Na^+/K^+ como la anhidrasa carbónica son proteínas importantes en el proceso de osmorregulación (Henry *et al.*, 2012). En estudios con el cangrejo *E. sinensis*, se ha encontrado una correlación entre la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ en las branquias y la renovación de la fosfatidilserina en estos órganos cuando son aclimatados en agua dulce (Chapelle y Zwingelstein, 1984). Por lo tanto, CHH-B2, aparte de elevar los niveles de glucosa en la hemolinfa, podría estar involucrada en la regulación del metabolismo de lípidos en *L. vannamei*, movilizando lípidos desde las reservas en el hepatopáncreas cuando el organismo se encuentra expuesto a condiciones híper o hipo-osmóticas. De esta manera, los organismos son capaces de contrarrestar la alta demanda energética que se requiere para el proceso de osmorregulación. Este proceso consume 20%-50% de las reservas energéticas bajo estrés salino (Chen *et al.*, 2014).

La expresión de los transcritos de este gen que codifica para esta neurohormona también se ve alterada cuando los organismos son inyectados con el virus de la mancha blanca, aumentando su expresión entre las 6 y 12 hs después de la inyección (Wang *et al.*, 2017). Esto sugiere que *chhB* se expresa cuando el

organismo se encuentra sometido a condiciones estresantes y requiere llevar a cabo la movilización de fuentes energéticas.

Por otra parte, se ha visto que en el cangrejo *G. lateralis* la ablación incrementa de forma inmediata la síntesis de lípidos neutrales y fosfolípidos en el hepatopáncreas (O'Connor y Gilbert, 1968), así como en el peneido *P. esculentus* (Barclay *et al.*, 1983). A pesar de esto, la liberación de lípidos en organismos ablacionados se lleva a cabo forma más lenta en la hemolinfa, como se ha reportado anteriormente para *G. lateralis* (O'Connor y Gilbert, 1968). En hembras de *M. japonicus*, la ablación incrementó los lípidos en los ovarios, principalmente triglicéridos y fosfolípidos, con la respectiva disminución de estos metabolitos en el hepatopáncreas, lo que sugiere una transferencia de reservas lipídicas (Teshima *et al.*, 1988).

Santos y colaboradores (1997) reportaron una disminución de lípidos totales en la hemolinfa del cangrejo *C. granulata* 24 después de la ablación y una disminución significativa de ácidos grasos en la hemolinfa de cangrejos *C. maenas* 24 horas después de la ablación, más no de fosfolípidos ni de triglicéridos, de manera similar a lo que se observó en el presente trabajo con *L. vannamei*. Dado que los niveles de ácidos grasos libres en la hemolinfa fueron reestablecidos parcialmente por el tratamiento con rCHH-B2, o incluso incrementaron por arriba de los valores basales en el caso de triglicéridos y fosfolípidos, estos resultados sugieren un efecto directo o indirecto de CHH-B2 y otras moléculas endocrinas presentes en el pedúnculo ocular de *L. vannamei* sobre el metabolismo de lípidos. Así mismo, en respuesta a la ablación, estudios transcriptómicos realizados con el hepatopáncreas de los cangrejos *Pontastacus leptodactylus* (Manfrin *et al.*, 2013) y de *Eriocheir sinensis* (Sun *et al.*, 2014) mostraron que las CHHs causan cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y aminoácidos.

Por otro lado, Chang y O'Connor (1978) reportaron que la tasa de síntesis de lípidos en el hepatopáncreas en la premuda fue mayor que en otras etapas de este ciclo y que esta síntesis no fue compensada con una mayor liberación de lípidos en la hemolinfa. Así mismo, debido a que el aumento de ecdisteroides ocasionado por la remoción de la hormona inhibidora de la muda presente en el OX-GS no influyó en los cambios del metabolismo de lípidos, se sugirió que el factor que promueve la modulación del metabolismo de lípidos durante el ciclo de muda proviene de las hormonas sintetizadas en el OX-GS (Chang y O'Connor, 1978), y por esta razón el ciclo de muda disminuyó su duración en organismos ablacionados (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). De hecho, Tiu *et al.*, 2007 encontraron que la expresión de la neurohormona LvCHH, que coincide en secuencia con CHH-B2, es mayor en la premuda de *L. vannamei*, que es cuando la síntesis de lípidos tiene sus valores más altos en el hepatopáncreas de crustáceos peneidos (Ando *et al.*, 1977; Barclay *et al.*, 1983), lo cual va seguido de la liberación de lípidos en la hemolinfa durante la muda

(Barclay *et al.*, 1983). Por lo tanto, CHH-B2 pudiera tener un efecto modulador en la liberación de lípidos durante esta condición. No obstante, que en los ensayos realizados en *L. vannamei*, con una rCHH-B2 con un C-terminal adicional, no se detectó actividad inhibitoria de la muda, no se descarta la posibilidad de que los 22 aminoácidos adicionales pudieran interferir en esta función (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008).

En conjunto las evidencias encontradas en la literatura para el péptido CHH-B2 sugieren que el gen *chhB* de *L. vannamei* se expresa en condiciones de estrés térmico o salino, infección por patógenos y en premuda. En estudios con diferentes especies de crustáceos decápodos se ha observado un aumento de la vía de glucólisis durante la etapa de premuda (McWhinnie y Kirchenberg, 1962; McWhinnie y Chua, 1964) y una mayor síntesis de lípidos en el hepatopáncreas, los cuales son liberados posteriormente durante el proceso de muda que es cuando el organismo no puede alimentarse (Barclay *et al.*, 1983). En ese sentido, de acuerdo con los resultados de este trabajo, CHH-B2 actúa movilizandoo lípidos de los tejidos de reservas hacia la hemolinfa, a la par de la liberación de glucosa, posiblemente para cubrir los requerimientos energéticos de los organismos en estas condiciones.

Capítulo 5. Conclusiones

- La proteína de fusión NusA-CHH-A (70 kDa) expresada en el sistema *E. coli* BL21 Star/pET44a(+) fue cortada de forma inespecífica por la enzima enterocinasa, por lo que no se lograron remover los dominios adicionales del N-terminal para tener a CHH-A en su forma nativa.
- Los análisis de Tricina SDS-PAGE y Western blot confirmaron la expresión de rCHH-A nativa tanto en las cepas de *P. pastoris* X-33 cultivada en medio complejo, como en SMD1168H cultivada en medio mínimo. Sin embargo, la pérdida de las proteínas durante el proceso de purificación no permitió contar con suficiente hormona para los bioensayos.
- Los ensayos *in vivo* realizados con camarones subadultos de *L. vannamei* aclimatados a 35 ups ablacionados bilateralmente y tratados con 2 µg/animal de rCHH-B2 en su forma nativa evidenciaron un efecto hiperglucémico a corto plazo en la hemolinfa, obteniéndose los niveles más altos de glucosa a 1 h post inyección (27.92 ± 4.3 mg/dL), mientras que a las 3 h se detectaron niveles basales.
- Los lípidos más abundantes detectados en la hemolinfa de camarones sub-adultos intactos de *L. vannamei* fueron los triglicéridos, seguido de fosfolípidos y ácidos grasos.
- Los niveles de triglicéridos y fosfolípidos se mantuvieron sin diferencias significativas entre los organismos intactos y ablacionados sin inyección, a diferencia de los ácidos grasos libres en los que la ablación provocó una disminución significativa de estos lípidos (49%), lo cual concuerda con lo observado en otros crustáceos decápodos como el cangrejo *C. maenas*.
- rCHH-B2 reestableció parcialmente la concentración de ácidos grasos libres en la hemolinfa de organismos ablacionados a 1 h post-inyección, por lo que se sugiere la participación adicional de otras moléculas endocrinas presentes en el OX-GS de *L. vannamei*.
- Los niveles máximos de fosfolípidos y triglicéridos en la hemolinfa de *L. vannamei* fueron obtenidos a 1 h post-inyección de rCHH-B2, siendo estos significativamente más altos (~1.72 y 1.3 veces, respectivamente) con respecto a sus niveles basales.
- rCHH-B2 promovió la movilización a corto plazo de lípidos y glucosa de los tejidos de reservas hacia la hemolinfa en ejemplares sub-adultos de *L. vannamei* ablacionados bilateralmente y aclimatados a 35 ups, permitiéndoles obtener la energía necesaria para contender con procesos altamente energéticos como la osmorregulación.

Capítulo 6. Perspectivas

- Para tener más información del efecto hiperlipidémico de la neurohormona CHH-B2, sería interesante medir los niveles de triglicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos en hepatopáncreas y en músculo (tejidos de almacenamiento) para comparar con los niveles obtenidos en las mediciones en hemolinfa como respuesta a la inyección de la neurohormona.
- Comparar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos (genes que codifiquen para elongasas, sintasas, lipasas) en organismos inyectados con la neurohormona recombinante y en organismos control.
- De igual modo, se podría observar el transporte de lípidos en organismos inyectados con CHH usando técnicas radiocromatográficas.
- Sería de interés evaluar la actividad hiperlipidémica de las otras CHHs de *L. vannamei* que han sido expresadas de manera recombinante: CHH-B1 y CHH-A, dado que estas tienen diferentes patrones de expresión y su efecto hiperglucémico ha sido corroborado con anterioridad.

Literatura citada

- Abascal y Macías, R. (2009). Estudio de mercado para el camarón congelado para el mercado nacional. SAGARPA. Recuperado de: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/CAMARONC ONGELADO.pdf
- Aguilar, M.B., Soyez, D., Falchetto, R., Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hubberman, A. (1995). Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Presence of a D-amino acid. *Peptides*, 16(8), 1375-1383
- Ando, T., Kanazawa, A., Teshima, S., Patrois, J. and Ceccaldi, H.J. (1977) Variation in the Lipids of Tissues during the Molting Cycle of Prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43(12), 1445-1449.
- Arredondo-Espinoza, R.C. (2014) Expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante (rCHH-A) de *Litopenaeus vannamei* y su efecto en la modulación de los niveles de glucosa. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 54 p.
- Balderas-González, V.Y. (2014) Expresión y purificación de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante nativa (rCHH- AN) y su participación en osmorregulación de *Litopenaus vannamei*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 86 p.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399 -1408.
- Barclay, M. C., Dall, W. and Smith, D.M (1983) Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 68(1) 229–244.
- Bliss, D.E. (1953) Endocrine Control of Metabolism in the Land Crab, *Gecarcinus Lateralis* (Fréminville). I. Differences in the Respiratory Metabolism of Sinusglandless and Eystalkless Crabs. *Biological Bulletin*, 104(3), 275-296
- Bliss, D.E. and Mantel, L.H. (1968) Adaptations of Crustaceans to Land: A Summary and Analysis of New Findings. *American Zoologist*, 8(1), 673-685.
- Böcking, D., Dirksen, H. and Keller, R. (2002). The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. In: Korand, W. (Ed). *The Crustacean Nervous System*, (pp. 84-97) Springer.
- Brichon, G., Chapelle, S., and Zwingelstein, G. (1980) Phospholipids composition and metabolism in the hemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda)—Effect of temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 67(4), 647-652.

- Camacho-Jiménez, L. (2016). Efecto de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 de *Litopenaeus vannamei* en los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y osmorregulación. Tesis de doctorado en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 134 p.
- Camacho-Jiménez, L., Díaz, F., Muñoz-Márquez, M.A., Farfán, C., Re, A.D. and Ponce-Rivas, E. (2017a). Hyperglycemic and osmotic effects of dopamine and recombinant hormone CHH-B1 in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 50(1), 67-79.
- Camacho-Jiménez, L., Díaz, F., Sánchez-Castrejón, E. and Ponce-Rivas, E. (2018). Effects of the recombinant crustacean hyperglycemic hormones rCHH-B1 and rCHH-B2 on the osmo-ionic regulation of the shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute salinity stress. *Journal of Comparative Physiology B*, 188(4), 565-579
- Camacho-Jiménez, L., Sánchez-Castrejón, E., Díaz, F., Aguilar, M.B., Muñoz-Márquez, M.A., and Ponce-Rivas, E. (2017b). Cloning and expression of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone isoform B2 (rCHH-B2) and its effects on the metabolism and osmoregulation of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *General and Comparative Endocrinology*, 253(1) 33–43.
- Camacho-Jiménez, L., Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M.E., Aguilar, M.B., Re, A.D. and Díaz, F. (2015). Hyperglycemic activity of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone B1 isoform (CHH-B1) of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides*, 71(1), 32-39.
- Candiano G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L, Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327–1333.
- Chan, S.M; Gu, P.L., Chu, K.H. and Tobe, S.S. (2003) Crustacean neuropeptide genes of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies. *General and Comparative Endocrinology* 134(1), 214–219.
- Chandumpai, A., Dall, W. and Smith, D.M. (1991) Lipid-class composition of organs and tissues of the tiger prawn *Panaeus esculentus* during the moulting cycle and during starvation. *Marine Biology* 108(1), 235-245.
- Chang, C.C., Tsai K.W., Hsiao, N.W., Chang, C.Y., Ling, C.L., Watson, R.D. and Lee, C.Y. (2010) Structural and functional comparisons and production of recombinant crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and CHH-like peptides from the mud crab *Scylla olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(1), 68–76.
- Chang, E.S. (2005) Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. *Integrative and Comparative Biology*. 45(1), 43-50.
- Chang, E. and O'Connor, J.D. (1978) *In vitro* secretion and hydroxylation of α -ecdysone as a function of the crustacean molt cycle. *General and Comparative Endocrinology* 36(1), 151-160

- Chang, E. and O'Connor, J.D. (1983) Metabolism and Transport of Carbohydrates and Lipids. In: Bliss, D.E. (Ed). The Biology of Crustaceans, vol. 5, (pp. 205–290) Academic Press, New York.
- Chapelle, S. (1973) Effect of various salts on the activity of enzymes implicated in the fatty acid-oxidizing cycle in crustacean. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 46(4), 769-777.
- Chapelle, S. (1986) Aspects of phospholipid metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 84(4), 423-439.
- Chapelle, S., Brichon, G. and Zwingselstein, G. (1981). Effect of Environmental Temperature on the Phospholipid Metabolism of Gill Mitochondria of *Carcinus maenas*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 9(4) 333-338.
- Chapelle, S. and Zwingselstein, G. (1984) Phospholipid composition and metabolism of crustacean gills as related to changes in environmental salinities: relationship between Na⁺-K⁺-ATPase activity and phospholipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 78(2), 363-72.
- Chen, Z., Han, S., Cao, Z., Wu, Y., Zhuo, R., Li, W. (2003) Fusion expression and purification of four disulfide-rich peptides reveals enterokinase secondary cleavage sites in animal toxins. *Peptides*, 39(1), 145-151
- Chen, K., Li, E., Gan, L., Wang, X., Xu, C., Lin, H., Qin, J.G. and Chen, L. (2014). Growth and Lipid Metabolism of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* at Different Salinities. *Journal of Shellfish Research*, 33(3), 825–832.
- Chen, K., Li, E., Xu, C., Wang, X., Lin, H., Qin, J.G. and Chen, L. (2015) Evaluation of different lipid sources in diet of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Reports* 2(1), 163–168.
- Chen, S.H., Lin, C.Y. and Kuo, C.M. (2005). In *silico* analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Marine Biotechnology*, 7(3), 193-206.
- Chittó, A.L.F., Schein, V., Etges, R., Kucharski, L.C and Da Silva, R.S.M. (2009). Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. *Invertebrate biology*, 128(3), 261-268.
- Chung, J.S., Dirksen, H. and Webster, S.G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associate to ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96(23), 13103-13107.
- Chung, J.S. and Webster, S.G. (1996) Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological significance for crab hyperglycemic neuropeptides? *European Journal of Biochemistry* 240(2), 358-364

- Chung, J.S., Zmora, N., Katayama, H. and Tsutsui, N. (2010). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), 447-454
- Conapesca (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca). (2013). Anuario estadístico de acuacultura y pesca, Edición 2013. Mazatlán, Sinaloa: Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca.
- Cuzón, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. and Van Wormhoudt, A. (2000) Utilization of carbohydrates by shrimp. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 19-22.
- Cooke, I.M. and Sullivan, R.E. (1982). Hormones and neurosecretion. In: Bliss, D.E. (Ed). *The Biology of Crustaceans*, vol. 3, (pp. 205–290). Academic Press, New York.
- Daly, R. and Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119-138.
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., Harrison, R.G. (1999) New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4), 382-388.
- De Kleijn, D. P., Janssen, K. P., Waddy, S. L., Hegeman, R., Lai, W. Y., Martens, G. J., and Van Herp, F. (1998). Expression of the crustacean hyperglycemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *Journal of endocrinology*, 156(2), 291-298.
- De Kleijn, D. P., and Van Herp, F. (1995). Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(4), 573-579.
- De Kleijn, D. P., and Van Herp, F. (1998) Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33(2-3), 263-272.
- De Marco, V., Stier, G., Blandin, S. and De Marco, A. (2004) The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), 766–771.
- Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E. and Re, A.D. (2001) Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 34(2), 93-104.
- Duka, A. and Ahearn, G.A. (2014) Comparative cation dependency of sugar transport by crustacean hepatopancreas and intestine. *Biology Open* 3(7), 635–643.

- FAO (2006) Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Recuperado en línea: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
- FAO (2016) Shrimp. In: Globefish Highlights. A Quarterly Update on World Seafood Markets. Rome. Recuperado en: <http://www.fao.org/3/a-i6094e.pdf>
- Fanjul-Moles, M.L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapods crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 142(3), 390-400.
- FIRA (2009) Situación actual y perspectivas del camarón en México. *FIRA*, 3(1), 122 p.
- García, F., González-Baró, M. and Pollero, R. (2002). Transfer of Lipids Between Hemolymph and Hepatopancreas in the Shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, 37(6) 581-585.
- Gilbert, L.I. and O'Connor, J.D. (1970) Lipid Metabolism and Transport in Arthropods. In: Florkin, M. *Chemical Zoology V5: Arthropoda* (pp. 229–253) Academic Press, New York.
- González-Félix, M.L., Gatlin, D.M. and Lawrance, A.L. (2003) Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 9(2), 105-113.
- Goy, M.F. (1990) Activation of Membrane Guanylate Cyclase by an Invertebrate Peptide Hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20220-20227.
- Gu, P.L., Yu, K.L., Chan, S.M. (2000) Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 472(1), 122-128.
- Hartley, D. L., and Kane, J. F. (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 16(1),101–102.
- Henry, R.P., Lucu, Č., Onken, H. and Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*, 3, 1-33
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., Schneider, D.E. and Freed, J.M (1970) The organization and control of metabolism in the crustacean gill. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 33 (1), 529-548.
- Hopkins, P.M. (2012) The eyes have it: A brief history of crustacean neuroendocrinology. *General and comparative endocrinology*, 175(3), 357-366.
- Huberman, A (2000) Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191(1), 191-208.

- Inoue, H., Tsutsui, N., Nagai, C., Nagata, K., Tanokura, M., Nagasawa H. (2011) Crystallization and preliminary X-ray analysis of crustacean hyperglycaemic hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* in its weakly active precursor form. *Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(12), 1586-1589.
- Jiménez, A.G. and Kinsey, S.T. (2015) Energetics and Metabolic Regulation. In Chang, E.S and Thiel, M. (Ed): *The Natural History of Crustacean Series: Physiology*, vol 4, (pp. 389–417). Oxford University Press, New York.
- Ju, Y.Z., Forster, I. and Dominy, W. (2011). Classification and Quantification of Phospholipids and Dietary Effects on Lipid Composition in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture* 73(2), 221–229
- Kallen, L., Rigiani, N.R. and Trompenaars, J.A.J. (1988) Aspects of Entrainment of CHH Cell Activity and Hemolymph Glucose Levels in Crayfish. *Biology Bulletin* 175(1), 137-143.
- Kanazawa, A., Teshima S. and Tokiwa S. (1979) Biosynthesis of Fatty Acids from Palmitic Acid in the Prawn, *Penaeus japonicus*. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 28(1), 17-20.
- Katayama, H. and Chung, J.S. (2008) The specific binding sites of eyestalk- and pericardial organ-crustacean hyperglycaemic hormones (CHHs) in multiple tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology*, 212 (1), 542-549.
- Katayama, H. and Nagazawa, H. (2004) Effect of a Glycine Residue Insertion into Crustacean Hyperglycemic Hormone on Hormonal Activity. *Zoological Science*, 21(1), 1121–1124.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K. and Nagasawa, H. (2002). Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*, 23(9), 1537-1546.
- Khayat, M., Yang, W.J., Aida, K., Nagasawa, S.A., Tietz, B., Funkenstein, B. and Lubzens, E. (1998) Hyperglycaemic Hormones Inhibit Protein and mRNA Synthesis in Vitro-Incubated Ovarian Fragments of the Marine Shrimp *Penaeus semisulcatus*. *General and Comparative Endocrinology*. 110(1), 307–318
- Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C.P. and Keller, R. (1991) Amino Acid Sequence of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) From the Crayfish, *Orconectes limosus*: Emergence of a Novel Neuropeptide Family. *Peptides*, 12(1), 909-913.
- Keller, R., Jaros, S.P and Kegel, G. (1985) Crustacean Hyperglycemic Neuropeptides. *American Zoologist*, 25(1), 207-221.
- Kenig, M., Peternel, S., Garbec-Porekar, V., Menart, V. (2006) Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tag removal in purification of recombinant proteins. *Journal of Chromatography Part A*, 1101(1-2), 293–306.

- Kits, K.S., Bobeldijk, R.C., Crest, M. and Lodder, J.C. (1991) Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 417(6):597-604.
- Kummer, G. and Keller, R. (1993). High-Affinity Binding of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) to Hepatopancreatic Plasma Membranes of the Crab *Carcinus maenas* and the Crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides*, 14(1), 103-8.
- Lacombe, C., Greve, P. and Martin, G. (1999) Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides*, 33(1), 71-801537-1546.
- Lago-Lestón, M.A., Ponce, E. and Muñoz, M.E. (2007). Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture*, 270 (1), 343-357.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. 5th edition. New York: Worth Publishers.
- Lee, R.F. and Puppione, D.L. (1978). Serum lipoproteins in the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 59(3), 239-243.
- Li, E. C., Chen, L. Q., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z. Q., Chen, X. F. and Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1), 80–86.
- Li, K., Jiang, T., Yu, B., Wang, L., Gao, C., Ma, C., Xu, P., Ma, X. (2013) *Escherichia coli* transcription termination factor NusA: heat-induced oligomerization and chaperone activity. *Scientific Reports*, 3(1). doi:10.1038/srep02347
- Liljenquist, J.E., Bomboy, J.D., Lewis, S.B., Sinclair-Smith, B.C., Felts, P.W., Lacy, W.W., Crofford, O.B. and Liddle, G.W. (1974) Effects of Glucagon on Lipolysis and Ketogenesis in Normal and Diabetic Men. *The Journal of Clinical Investigation* 53(1), 190–197.
- Liu, M., Pan, L., Li, L., Zheng, D. (2014) Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides*, 53(1), 115-124.
- Lodish, H., Berk., A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. and Martin, K.C. (2016) *Molecular cell biology*. 8th edition. New York: W.H. Freeman and Co.
- López-Rodríguez, H. (2009). Clonación y expresión de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de crustáceos de *Litopenaeus vannamei* (Liv-CHH-SG2) en *Pichia pastoris*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 66 p.

- Lorenzon S., Francese, M., and Ferrero E.A. (2000) Heavy Metal Toxicity and Differential Effects on the Hyperglycemic Stress Response in the Shrimp *Palaemon elegans*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 39(1), 167-176.
- Madigan, M.T and Brock, T.D. (2009) Brock Biology of Microorganisms. 12th ed. San Francisco, CA : Pearson/Benjamin Cummings.
- Mancera-Flores, J.M. (2009). Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales con capacidad de reconocimiento de la neurohormona Liv-CHH-SG1 de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California. 106 p.
- Manfrin, C., Tom, M., De Moro., G., Gerdol., M., Guarnaccia, C., Mosco, A., Pallavicini., A. and Giulianini P.G. (2013) Application of D-Crustacean Hyperglycemic Hormone Induces Peptidases Transcription and Suppresses Glycolysis-Related Transcripts in the Hepatopancreas of the Crayfish *Pontastacus leptodactylus* — Results of a Transcriptomic Study. PLoS ONE 8(6): e65176.
- Martin, G.G., Hose-Omori-Sidne, J.E., Chong, C., Hoodbhoy, T., and McKrell, N. (1991) Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 100(3), 517-522.
- Martin, J.W. and Davis G.E. (2001) An Updated Classification of the Recent Crustacea. Science Series. Natural History Museum of Los Angeles County. 39 (1-124).
- McMurry, J. (2008) Química Orgánica. 7ª edición. México D.F. Cengage Learning Editores, S.A.
- McWhinnie, M.A. and Chua, A.S. (1964) Hormonal regulation of crustacean tissue metabolism. General and Comparative Endocrinology 4(6), 624-633.
- McWhinnie, M.A. and Kirchenberg R.J., (1962) Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermoult cycle. Comparative Biochemistry and Physiology, 6(2), 117-128.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, A.I., Tovar-Ramírez, D., Hernandez-Herrera, D. and Racotta I.S. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to repeated handling stress. Aquaculture 258(1), 633-640.
- Mettulio, R., Giulianini, P.G., Ferrero, E.A., Lorenzon, S. and Edomi, P. (2004). Functional analysis of crustacean Hyperglycemic Hormone by in vivo assay with wild-type and mutant recombinant proteins. Regulatory Peptides, 119(3), 189-197.
- Montiel-Arzate, A. (2016). Determinación de las condiciones óptimas para la expresión bacteriana de la hormona hiperglucémica de crustáceos CHH-A del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de pregrado. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C, México. 73 p.

- Mosco, A. P., Edomi, C. Guarnaccia, S. Lorenzon, Pongor, S., Ferrero, E.A. and Giulianini, P.G. (2008). Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. *Regulatory Peptides*, 147(1), 88-95.
- Morera, Y., Lugo, J.M. Ramos, L., Rodríguez-Ramos, T., Huberman, A. and Estrada, M.P. (2013). A chimeric recombinant crustacean hyperglycemic hormone from *Litopenaeus schmitti* (Bunkenroad) obtained as C-terminus fusion protein boost hemolymph glucose concentration in *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 44(7), 1066-1075.
- Nagai, C., Asazuma, H., Nagata, S., Ohira, T. and Nagasawa, H. (2009) A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides*, 30(3), 507-517.
- Nagai, C., Nagata, S. and Nagasawa, H. (2011). Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 172(2), 293-304.
- Nallamsetty, S. and Waugh, D.S. (2006) Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expression and Purification*, 45(1), 175-182.
- Nässel, D.K. and Larhammar, D. (2013). Neuropeptides and peptide hormones. In: Galizia, N.C. and P.M. Lledo. *Neuro-science. From molecule to behaviour: a university textbook.* (pp. 213-237). Springer Spektrum
- Nevenzel, J.C. (1970) Occurrence, function and biosynthesis of wax esters in marine organisms. *Lipids*, 5(3), 308–319.
- O'Connor, J.D. and Gilbert L.I. (1968) Aspects of Lipid Metabolism in Crustaceans. *Integrative and Comparative Biology*, 8(3), 529-539.
- Ohira, T., Katayama, H., Aida, K. and Nagasawa, H. (2003) Expression of a recombinant crustacean hyperglycemic hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fisheries Science*, 69(1), 95-100.
- Ohira, T., Tsutsui, N., Nagasawa, H., Wilder, M.N. (2006) Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormones for giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and their hyperglycemic activities. *Zoological Science*, 23(4), 383-391.
- Pasquevich, M.Y., Dreon, M.S., Lavarías S. and Heras, H. (2011) Triacylglycerol catabolism in the prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemoniade) *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 160(4), 201–207.
- Reddy, P.S., Reddy, P.R., and Sainath S.B. (2011). Cadmium and mercury-induced hyperglycemia in the fresh water crab *Oziothelphusa senex*: Involment of neuroendocrine system. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(1), 279-283.

- Reis, D.B., Acosta, N.G., Almansa, E., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Andrade J.P., Sykes, A.V, and Rodríguez, C. (2017) Comparative study on fatty acid metabolism of early stages of two crustacean species: *Artemia sp. metanauplii* and *Grapsus adscensionis* zoeae, as live prey for marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 204(1), 53-60
- Rivera-Perez, C., García-Carreño, F.L. and Saborowski, R. (2011) Purification and Biochemical Characterization of Digestive Lipase in Whiteleg Shrimp. *Marine Biotechnology*, 13(2), 284–295.
- Rivera-Perez, C., Navarrete del Toro, M.A. and García-Carreño, F.L. (2010) Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 300(1), 163-168.
- Sainz-Hernández, J.C., Ractotta, I.S., Dumas, S., Hernández-López, J. (2008) Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture* 283(1-4), 188-193.
- Salway, J.G. (1999) *Metabolism at a glance*. Second edition. Paris, France: Blackwell Science Ltd.
- Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, M.B. and Díaz, F. (2008) Molecular Cloning and Expression of a putative crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4), 1-9.
- Santos, E.A., and Keller, R. (1993b) Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *Journal of Comparative Physiology B*, 163(5), 374–379.
- Santos, E.A., and Keller, R. (1993c) Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: Current perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(3), 405-411.
- Santos, E.A., Maia-Nery, L.E., Keller, R. and Gonçalves, A.A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological Zoology*, 70(4), 415-420.
- Schägger, H. (2006). Tricine SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16-23.
- Schmitt A.S.C. and Santos E.A. (1993) Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda), during emersion. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A(2), 329-336.
- Sedlmeier, D. (1982) The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II. Involvement of glycogen synthase. *General and Comparative Endocrinology*, 47(4), 426-432.
- Sedlmeier, D. (1985) Mode of action of Hyperglucemic Hormone. *American Zoologist*. 25(1), 223-232.

- Sedlmeier, D. (1988) The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory Peptides*, 20(2), 91-98.
- Sedlmeier, D. and Keller, R. (1981) The Mode of Action of the Crustacean Neurosecretory Hyperglycemic Hormone I. Involvement of Cyclic Nucleotides. *General and comparative endocrinology*, 45(1), 82-90.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F. and Spanings-Pierrot, C. (2003) Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *The Journal of Experimental Biology* 206(1), 979-988.
- Shahravan, S.H., Qu, X., Chan, I.S., Shin, J.A. (2008) Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein Expression and Purification*, 59(2), 314-319.
- Sigala-Andrade, H. M. (2010). Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. B.C. México. 100 p.
- Spanings-Pierrot, C., Soyez, D. Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. and Charmantier, G. (2000). Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 119(3), 340-350.
- Stuck, K. C., Watts, S. A., & Wang, S. Y. (1996). Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Marine Biology*, 125(1), 33–45.
- Sugumar V., Vijayalakshmi, G. and Saranya K. (2013) Molt cycle related changes and effect of short term starvation on the biochemical constituents of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20(1), 93-103.
- Sun, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Xue, S., Geng, X., Hao, T. and Sun, J. (2014) Changes in the Organics Metabolism in the Hepatopancreas Induced by Eyestalk Ablation of the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis* Determined via Transcriptome and DGE Analysis. *PLoS ONE* 9(4): e95827.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Horinouchi, K. and Koshio S. (1988) Lipid Metabolism in Destalked Prawn *Penaeus Japonicus*: Induced Maturation and Transfer of Lipid Reserves to the Ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54(7), 1123-1129.
- Tiu, S.H.K., He, J. and Chan, S. (2007). The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed ion transport peptide (LvITP) for osmoregulation. *Gene*, 396(2), 226-235.
- Tsutsui, N., Sakamoto, T., Arisaka, F., Tanokura, M., Nagasawa, H., and Nagata, K. (2016) Crystal structure of a crustacean hyperglycemic hormone (CHH) precursor suggests structural variety in the C-terminal regions of CHH superfamily members. *FEBS Journal*, 283(23), 4325-4339.

- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A. and Ochoa, J.L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies in penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A(2): 299-303.
- Ventura-López, C., Gómez-Anduro, G., Arcos, F.G., Llera-Herrera, R., Racotta, I.S. and Ibarra, A.M. (2016). A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra eyestalk tissues. *Gene*, 582(2),148-60.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G.A. and Storelli, C. (2001) D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 130(3), 585-606.
- Wang, L., Chen, H., Xu, J., Xu, Q., Wang, M., Zhao., Wang, L., Song, L. (2017) Crustacean hyperglycemic hormones directly modulate the immune response of hemocytes in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 62(1), 164-174.
- Wanlem, S., Supamattaya, K., Tantikitti, C., Prasertsan, P., and Graidist, P. (2011) Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against bacterial infection. *Fish and shellfish immunology*, 30(3), 877-885.
- White, C.E., Kempf, N.M. and Komives, E.A. (1994) Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure*, 2(11), 1003–1005.
- Yépiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., and Higuera Ciapara, I. (2000) Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191(1-3) 177-189.
- Zarubin, T.P., Chang, E.S., Mykles, D.L. (2009) Expression of recombinant eyestalk crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*, that inhibits Y-organ ecdysteroidogenesis in vitro. *Molecular Biology Reports*, 36(1), 1231-1237.
- Zhang, H., Yuan, Q., Zhu, Y., Ma, R. (2005) Expression and preparation of recombinant hepcidin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 41(2), 409-416.