



Programa de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN Y SECUENCIA PARCIAL DE UN
PÉPTIDO PRESENTE EN LA GLÁNDULA SINUSAL
DE *Penaeus vannamei* (BONNE 1931), RECONOCIDO
POR SUEROS HIPERINMUNES DISEÑADOS A
PARTIR DE LA HORMONA INHIBIDORA DE LAS
GÓNADAS DE CRÚSTACEOS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

**Biol. Gerardo Alfonso
Anguiano Vega.**

La Paz, B. C. S., agosto del 2003

RESUMEN.

Partiendo de tres mil organismos juveniles de *Penaeus vannamei* se obtuvieron seis mil tallos oculares. De ellos se extrajeron por microdissección cuatro mil glándulas sinusales que fueron homogeneizadas y procesadas para obtener su extracto soluble. El extracto fue purificado mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, donde se obtuvieron 22 fracciones, las trece fracciones iniciales corresponden a componentes con baja cantidad de proteína y las últimas nueve muestran como componentes principales moléculas de naturaleza peptídica. Las fracciones peptídicas se encuentran parcialmente purificadas al presentar diversos componentes cuando se corrieron en electroforesis desnaturalizante en PAGE-SDS TRIS-tricina.

Simultáneamente, basándose en la secuencia de un par de segmentos de la hormona inhibidora de las gónadas (GIH) de *Metapenaeus ensis* se diseñaron y elaboraron dos péptidos sintéticos, con 18 y 19 residuos de aminoácidos de longitud respectivamente. Estos péptidos fueron usados para inmunizar y obtener sueros policlonales hiperinmunes en ratón y conejo. Después de la segunda inmunización los sueros mostraron anticuerpos específicos contra los antígenos inductores de la respuesta inmune, los cuales presentan reacción cruzada el extracto completo de la glándula sinusal de *P. vannamei*.

En la fracción F18, resultante de la purificación por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, mediante técnicas inmunoquímicas (ELISA y Western blot) se detectó un péptido reactivo con los sueros hiperinmunes inducidos usando los péptidos sintéticos, el cual migra electroforéticamente entre las bandas de 14200 y 6500 Da y muestra una masa molecular cercana a los 10000 Da.

La secuencia obtenida por degradación de Edman en un secuenciador de aminoácidos automatizado permite identificar seis residuos de aminoácidos correspondientes al segmento aminoterminal de dicho péptido. La secuencia reportada se ordena en la siguiente manera: ser-gly-asp-gly-glu-gly. Aparentemente la secuencia obtenida se encuentra contaminada a juzgar por la elevada cantidad de glicinias encontradas y por presentar baja identidad con los péptidos sintéticos. El escaso número de residuos impide realizar comparaciones en los bancos de datos bioinformáticos.

Palabras clave:

GIH; Glándula sinusal; *Penaeus vannamei*.

Dra. Celia G. Vázquez Boucard.

ABSTRACT

From three thousand of *Penaeus vannamei* young organisms, six thousand eyestalks were extracted. From these, four thousand of sinus glands were extracted by micro-dissection. The sinus glands were homogenized and processed to obtain their soluble extract. The extract was purified by high-pressure liquid chromatography in reverse phase (HPLC-RP), and twenty-two fractions were obtained. The first thirteen fractions were low protein components and the last nine show as main compound molecules of peptide nature. The peptide fractions were partially purified showing several components in denaturing electrophoresis SDS-PAGE-TRIS-tricine.

Simultaneously, and based on the sequence from a couple of segments from the gonad inhibiting hormone (GIH) of *Metapenaeus ensis*, two synthetic peptides were designed and made with 18 and 19 aminoacid residues respectively. These peptides were used to immunize and obtain hyper-immune polyclonal serums in mouse and rabbit. After the second immunization, both serums showed specific antibodies against inductor antigens from the immune response, which show crossed reaction with the complete extract from the *P. vannamei* sinus gland.

The HPLC-RP purified F18 fraction was analyzed by immunochemical techniques (ELISA and Western blotting). From these analyses a reactive peptide was detected. This peptide showed reaction against the hyper-immune serums of the synthetic peptides. When this peptide is run by electrophoresis, it has a migration pattern within 14200 and 6500 Da with a molecular weight near to 10000 Da.

The sequence of this peptide obtained by Edman's degradation in an automatic amino acid sequencer allows us to identify six amino acid residues that belong to the amino terminal end of such peptide. The reported sequence is ordered by the following way: ser-gly-asp-gly-glu-gly. Apparently the obtained sequence is contaminated because of its high glycine content and its low identity with the synthetic peptides. The scarce residues number does not allow us to compare it with another sequence reported in bioinformatic data banks.

Key words

GIH; Sinus gland; *Penaeus vannamei*.

¿Qué sabe el pez del agua donde nada toda su vida?

Albert Einstein.

Para Ana y la camada:

Los que no tienen hijos ignoran muchos placeres,
pero también se evitan muchos dolores.

Honoré de Balzac.

Para Laura:

Porque las cuerdas del porvenir se tuercen mejor entre dos.

El Ponchito Anguiano.

Danzón dedicado a la familia y los alegres danzantes. Sirva este esfuerzo conjunto como pretexto para recordar y mencionar las deudas afectivas personales del autor. Como es debido y sentido, se dedica a los familiares cercanos antecesores determinados, al familiar cercano seleccionado y a los pequeños familiares sucesores existentes y en la inventiva. A los compañeros crónicos y estéricos fraternales que son dos y cinco pero siendo todos en conjunto uno solo.

Remarco la intención y entusiasmo de mis mentores en comité, los ejemplos y aportaciones de personajes acompañantes, profesores coincidentes de aulas, laboratorios, pasillos, cubículos y seminarios que se interesaron en el proyecto e inquirieron o sugirieron en pro de un más alegre fin a la tarea. Sean pues también incluidos en la lista de los pertinentes.

No es factible concluir la dedicatoria sin mencionar sitios e individuos relevantes en la posición en que ahora se ubica el autor, personas distantes y personas habitantes de la memoria. La Baja Sur, la Sinaloa y la Orbe que sostuvieron cada una en su momento la humanidad del sustentante. Nos acercamos al margen en la misma forma nos acercamos al fin del ritual. Él que talvez sea el apartado más leído de la totalidad de este texto.

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., en el laboratorio de la Dra. Celia Vázquez Boucard. Parte del trabajo experimental se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay. Bajo la asesoría de la Dra. Celia Vázquez Boucard, este trabajo fue financiado en parte por las aportaciones de las siguientes entidades:

CONACYT No. 32597-N.
Dirección de Estudios de Posgrado, CIBNOR, S.C.

AGRADECIMIENTOS.

Un sincero agradecimiento a la Dra. Celia Vázquez Boucard por todo el apoyo económico, académico y personal concedido a la elaboración de este trabajo.

De la misma forma se agradece a la Dra. Consuelo García Rodríguez, Dr. Alberto Huberman Wajzman, Dr. Jorge Arellano Blanco y Dr. Héctor Nolasco Soria que muy amablemente se tomaron la molestia de leer este trabajo y fungieron como sinodales.

Quiero agradecer al Dr. Alberto Huberman por permitir familiarizarme con el procedimiento de extracción de la glándula sinusal en el laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y al Dr. Lourival Possani por las facilidades mostradas en la elaboración de parte del trabajo experimental y los comentarios aportados para este trabajo.

Le agradezco a la Dra. Georgina Gurrola, Dr. Fernando Zamudio, Biol. Cipriano Balderas, Candidato a Dr. Ricardo C. Rodríguez de la Vega, y Fredy Coronas que me auxiliaron en la síntesis química de los péptidos y en la purificación y secuenciación del péptido reportado en esta tesis.

Agradezco al personal técnico del CIBNOR que participó en el desarrollo de la tesis: Guillermo Portillo, Sandra de la Paz, Jesús Aguilar, Ernesto Sepúlveda, Ma. del Carmen Rodríguez, Norma Ochoa, Pablo Monsalvo, Carlos Palacios, Alejandro Amador, Carlos Ceseña, Martín Ramírez, Ariel Cruz, Ma. de Jesús Romero, Hortensia Obregón y al personal administrativo de la dirección de estudios de posgrado y de la dirección de apoyo académico.

Se agradece al Biol. Guillermo Lara Anguiano por su colaboración en la obtención de los animales. Al Biol. Fernando Montoya, al Sr. Heriberto Hernández y al personal que labora en la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera “El Playón del Esterón” por las facilidades otorgadas en la donación de organismos.

Agradezco finalmente a la Lic. Olimpia Chong Carrillo por las sugerencias enunciadas en la redacción de este escrito.

CONTENIDO.

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	4
2.1	UBICACIÓN TAXONÓMICA.....	4
2.2	REPRODUCCIÓN Y VITELOGÉNESIS.....	4
2.2.1	VERTEBRADOS.....	6
2.2.2	INSECTOS.....	7
2.2.3	CRUSTÁCEOS.....	10
2.3	EL COMPLEJO ÓRGANO X-GLÁNDULA SINUSAL (OX-GS). 17	
2.4	NEUROHORMONAS DEL COMPLEJO OX-GS.....	19
2.4.1	CROMATOFOROTROPINAS.....	20
2.4.2	FAMILIA PEPTÍDICA CHH/MIH/GIH DE CRUSTÁCEOS.....	23
2.4.2.1	HORMONA HIPERGLICEMIANTE DE CRUSTÁCEOS.....	25
2.4.2.2	HORMONA INHIBIDORA DE LA MUDA.....	27
2.4.2.3	HORMONA INHIBIDORA DE LAS GÓNADAS.....	31
2.4.2.4	HORMONA INHIBIDORA DEL ÓRGANO MANDIBULAR.....	36
2.5	OTROS FACTORES LOCALIZADOS EN EL COMPLEJO OX-GS.....	37
3.	HIPÓTESIS.....	38
4.	OBJETIVOS.....	38
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	38
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1	PUREZA Y CALIDAD DEL MATERIAL QUÍMICO.....	40
5.2	OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
5.3	EXTRACCIÓN POR MICRODISECCIÓN DE LA LA GLÁNDULA SINUSAL.....	40
5.4	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE DE LA GS.....	41
5.5	PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DEL TALLO OCULAR.....	43
5.6	DISEÑO Y ELABORACIÓN QUÍMICA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	44
5.7	PREPARACIÓN E INMUNIZACIÓN DE ANTÍGENOS.....	50
5.8	OBTENCIÓN DE LOS SUEROS PREINMUNES E HIPERINMUNES DE RATÓN Y DE CONEJO.....	52
5.9	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN SOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE LA GLÁNDULA SINUSAL.....	54
5.10	PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL EXTRACTO DE LA GLÁNDULA SINUSAL.....	54
5.11	ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE-SDS).	55
5.12	SECUENCIACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....	56

5.13	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA GS Y SUS FRACCIONES PURIFICADAS USANDO SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 (WESTERN BLOT).....	58
5.14	TITULACIÓN Y REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 POR ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA).....	60
6.	RESULTADOS.....	62
6.1	HISTOLOGÍA DEL TALLO OCULAR DE <i>Penaeus vannamei</i>	62
6.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA GLÁNDULA SINUSAL.....	62
6.3	PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE DE LA GS.....	63
6.4	TITULACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE ANTIP1 Y ANTIP3.....	64
6.5	REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 CONTRA EL EXTRACTO SOLUBLE DE LA GLÁNDULA SINUSAL.....	67
6.6	REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 CONTRA LAS FRACCIONES PURIFICADAS POR HPLC-RP.....	68
6.7	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS USANDO SUERO ANTIP1 Y ANTIP3 (WESTERN BLOT).....	70
6.8	PAGE-SDS TRIS-TRICINA DE LA FRACCIÓN 18 Y SECUENCIA DE LA BANDA CON PESO MOLECULAR CERCANO A LOS 10000 Da.....	73
7.	DISCUSIÓN.....	74
8.	CONCLUSIONES.....	90
9.	PERSPECTIVAS.....	92
10.	REFERENCIAS.....	94
11.	APÉNDICES.....	104
11.1	APÉNDICE I (ABREVIATURAS).....	104
11.2	APÉNDICE II (NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS).....	108

LISTA DE FIGURAS.

1. Control endócrino de la maduración gonádica en crustáceos mayores (<i>Malacostraca</i>). Glándulas principales y órganos blanco en machos y hembras.....	13
2. Modelo esquemático del tallo ocular de crustáceos decápodos.....	18
3. Organización de los precursores de las cromatoforotropinas y neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH.....	23
4. Modelo tridimensional de listón de la estructura terciaria de la hormona inhibidora de la muda caracterizada por resonancia magnética nuclear a partir de la proteína recombinante rMIH de <i>Penaeus japonicus</i>.....	30
5. Esquema de extracción por microdissección de la glándula sinusal en organismos juveniles de <i>Penaeus vanamei</i>.....	42
6. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la GIH de <i>Metapenaeus ensis</i>, <i>Nephrops norvegicus</i> y <i>Homarus americanus</i>.....	46
7. Microfotografía del tallo ocular de <i>Penaeus vannamei</i>.....	63
8. Cromatograma del extracto soluble de la glándula sinusal de <i>Penaeus vannamei</i>. Purificación por HPLC-RP.....	65
9. Curvas de titulación de anticuerpos de los sueros antiP1 y antiP3 contra el antígeno utilizado en su inmunización.....	66
10. Ensayos inmunoquímicos de ELISA de los sueros hiperinmunes de ratón y conejo antiP1 y antiP3 contra el extracto soluble de la glándula sinusal de <i>Penaeus vannamei</i>.....	68
11. Ensayos inmunoquímicos de ELISA de los sueros hiperinmunes de ratón y conejo antiP1 y antiP3 contra el extracto soluble de la glándula sinusal de <i>Penaeus vannamei</i> y las 22 fracciones de purificadas por HPLC-RP.....	69

12. Electroforesis desnaturizante en TRIS-tricina al 16.5% del extracto soluble de la glándula sinusal de *Penaeus vannamei* y de la fracción 15 la fracción 22 purificadas por HPLC-RP. Inmunodetección de proteínas (Western blot) de la GS y de la fracción 15 a la fracción 22 contra los sueros hiperinmunes antiP1 y antiP3 de conejo..... 71

LISTA DE TABLAS.

I	Esquema de Inmunización de los péptidos sintéticos P1 y P3 en ratones y conejos.....	51
II	Rendimiento de extracción de proteínas totales de 238 glándulas sinusales de <i>Penaeus vannamei</i>.....	64

1. INTRODUCCIÓN.

Debido al incremento acelerado de la demanda de productos marinos, aunado al aparente estado máximo de explotación pesquera, las técnicas de cultivo acuícola se enfocan como la opción más viable para solventar este problema (Tobey, *et al.* 1998). Según los reportes de la FAO de 1984 a 1994 el porcentaje de camarón cultivado se incrementó de un 9% hasta un 29.9% de la producción mundial, así para 1998 de los 3.8 millones de toneladas métricas generadas, 800 000 toneladas métricas fueron producidas por la acuicultura lo que corresponde al 21% del total (FAO, 2000). Datos que convierten a la industria acuícola de camarón en un rubro con gran importancia económica a nivel nacional e internacional.

Las técnicas de camaronicultura se fueron mejorando a partir de sus primeros intentos de producción; desde su explotación a escala extensiva hasta la producción en escala intensiva. Cada tipo de explotación varía tanto en los gastos de producción como en su rendimiento. Sin embargo todos ellos generan un alto margen de beneficios, ya que la sobrepesca del camarón silvestre limita el incremento del suministro, lo que provoca un alza en los precios del mercado y un aumento de la inversión en acuicultura del camarón (Tobey, *et al.* 1998).

El cultivo de camarón depende fuertemente de varios factores entre los que destacan la fuente de larva, la infraestructura de los estanques de crecimiento con acceso al agua con la calidad y cantidad adecuada, los suministros alimenticios y

la mano de obra. Sin embargo son los rubros de larva y alimentación los que representan los costos más importantes en las camaroneras (Treece, 1999).

Por ello, el conocimiento a fondo de los mecanismos de control de la reproducción, desove y crecimiento en crustáceos, cobran suma importancia para las ciencias básicas como endocrinología y fisiología comparada y para la aplicación de dichos conocimientos en la optimización de la tecnología de producción de camarón por la acuicultura.

Actualmente la técnica más común para inducir la maduración gonádica de organismos reproductores, en laboratorios de producción de larvas para acuicultura, se realiza mediante la ablación del tallo ocular (Bray y Lawrence, 1992). En esta región anatómica se ubica la glándula sinusal (GS), misma que ha sido reportada como el órgano neurohémico responsable de la liberación de péptidos involucrados en el control de los mecanismos de vitelogénesis, fundamentalmente la hormona inhibidora de las gónadas. De igual forma, se sabe que esta glándula secreta otras hormonas involucradas en varios procesos, algunas de estas son: la hormona inhibidora de la muda que está relacionada con los procesos de ecdisis; la hormona hiperglicemiante de crustáceos vinculada con la regulación de la concentración de glucosa en hemolinfa; y hormonas que regulan la dispersión o concentración de pigmentos de los cromatóforos, conocidas como cromatoforotropinas (Huberman, 2000a). La ablación de la glándula sinusal reduce la concentración de la hormona inhibidora de las gónadas

en la hemolinfa y permite la maduración gonádica del organismo (Bray y Lawrence, 1992).

La ablación del tallo ocular promueve la maduración gonadal. Sin embargo también afecta el balance hormonal para numerosos procesos fisiológicos. Se han reportado diversos efectos colaterales en organismos reproductores ablacionados tales como: reducción en el periodo de muda de los organismos, aumento en la mortalidad de los organismos ablacionados, deterioro en las condiciones de salud de los reproductores, reducción de la tasa de desove comparada con organismos no ablacionados y decaimiento de esta en el transcurso del tiempo (Bray y Lawrence, 1992).

Este trabajo pretende aportar información básica relativa a los mecanismos de regulación y control de la vitelogénesis, al identificar un péptido presente en la glándula sinusal relacionado con la hormona inhibidora de las gónadas del camarón blanco del pacífico *P. vannamei*. Esta información es relevante en la búsqueda de alternativas para los métodos de inducción de maduración utilizados hasta la fecha.

2. ANTECEDENTES.

2.1 UBICACIÓN TAXONÓMICA.

El camarón blanco del Pacífico está considerado dentro de las principales especies de camarones con alto potencial para ser explotadas en acuicultura (Rosenberry, 1995). Taxonómicamente éste se ubica dentro del Phylum: Arthropoda; Subphylum: Crustacea; Orden: Malacostraca; Clase: Decapoda; Familia: Penaeidae; Género: *Penaeus sp.*; Especie *Penaeus vannamei*. Recientemente fue publicada una revisión de las Familias y Géneros de camarones en la que se considera a este camarón como *Litopenaeus vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1998), aunque a la fecha esta nueva propuesta se encuentra bajo una fuerte controversia en la comunidad científica (Lavery y Chu, 2000). Por ello en el transcurso de este trabajo nos apegaremos a la clasificación anterior que denomina a la especie como *Penaeus vannamei* (Boone 1931).

2.2 REPRODUCCIÓN Y VITELOGÉNESIS.

La reproducción sexual en animales involucra la generación y fusión de dos células germinales. Las células germinales son formadas mediante un proceso característico de división celular llamado meiosis, el cual reduce el número de cromosomas a la mitad. A partir de una célula gamética diploide ($2n$) se generan de una a cuatro células germinales haploides (n), la célula germinal masculina es conocida como espermatozoide y la célula germinal femenina se denomina óvulo. Durante la fertilización las células germinales se fusionan y forman un nuevo núcleo cigótico con un número diploide de cromosomas ($2n$). El cigoto se divide

por mitosis para generar al organismo multicelular completo, en el que todas las células presentan el mismo genotipo diploide (Olive, 2002).

Las especies ovíparas de vertebrados e invertebrados; es decir que durante el proceso de reproducción forman huevos, tales como: anélidos, nemátodos, artrópodos, peces, anfibios, reptiles y aves entre otras, requieren de la generación de sustancias acarreadoras de nutrientes a dicho huevo, cuya función principal es el aprovisionamiento del material nutritivo necesario para el desarrollo embrionario. Esta sustancia es conocida como vitelo, el cual está formado principalmente por una fosfolipoproteína llamada vitelina. El proceso de formación, transporte y acumulación de la vitelina es denominado vitelogénesis (Bentley, 2002).

Es importante destacar que el proceso de la vitelogénesis está eficientemente regulado por una serie de factores ambientales, nutricionales y neuroendocrinos que interaccionan y se coordinan con los demás procesos fisiológicos del organismo (Van Herp, 1992).

La vitelogénesis es un proceso relativamente bien estudiado en las especies de vertebrados (Tata y Smith, 1979; Wallace y Selman, 1981) y en algunos invertebrados como insectos (Landau, *et al.* 1997). Pero en otros, como los crustáceos, existen lagunas que requieren ser complementadas adecuadamente si se desea tener un mayor conocimiento y un control más eficiente de los procesos

reproductivos de especies de interés acuícola como es el caso del camarón *P. vannamei*.

2.2.1 VERTEBRADOS.

En peces y anfibios la vitelogénesis se lleva a cabo durante la fase de desarrollo del ovocito. Inicialmente el desarrollo del ovocito se enfoca en la formación de las estructuras celulares básicas, elongación del núcleo y generación de múltiples orgánulos celulares. Existe un aumento de la síntesis proteínica en el interior del ovocito, que es conocida como vitelogénesis primaria o endógena. Se desarrolla un par de capas celulares de gran importancia en la regulación de la vitelogénesis y maduración del ovocito, conocidas como teca y granulosa que encierran al ovocito generando un folículo (Wallace y Selman, 1981).

Posteriormente se desarrolla el proceso de la vitelogénesis secundaria en la cual se involucra la síntesis y acumulación del vitelo en el huevo mediante la interacción de estructuras cerebrales, las células foliculares, el hígado y los ovocitos. Cuando el hipotálamo recibe la señal de arribo de la temporada reproductiva, éste secreta la hormona liberadora de gonadotropina, la cual es detectada por la glándula pituitaria. La glándula pituitaria responde con la liberación de la hormona gonadotrópica al torrente sanguíneo. Estas hormonas estimulan a las células foliculares a secretar estrógenos y los estrógenos inducen al hígado a sintetizar y liberar vitelogenina; la vitelogenina es una molécula carotenoglicoproteína precursora de la vitelina; los estrógenos inducen la síntesis

de vitelogenina tanto a nivel transcripcional o expresión del gen de vitelogenina, como a nivel traduccional o síntesis proteínica de la vitelogenina (Tata y Smith, 1979).

2.2.2 INSECTOS.

El proceso de vitelogénesis en insectos está más relacionado con los eventos que ocurren en crustáceos que con los de vertebrados, debido a que ambos grupos se hallan filogenéticamente más emparentados. Sin embargo, existen similitudes evidentes en los restantes grupos. Es así que en el proceso de maduración gonádica de los ovocitos en insectos, la vitelogénesis ocupa un plano preponderante (Engelmann, 2002). La mosca *Drosophila melanogaster* es el modelo experimental estudiado con mayor intensidad, debido a que los conocimientos genéticos en esta especie se encuentran ampliamente avanzados y ello permite relacionar el proceso reproductivo con los genes involucrados en este mecanismo y la regulación del mismo (Drummond-Barbosa, 2001). Así, los ovarios de *D. melanogaster* están conformados por un grupo de estructuras paralelas conocidas como ovariolas, cada una diferenciada en una elongación anterior o *germinarium* que contiene células ovocíticas inmaduras y el *vitelarium* que es la zona donde la vitelogénesis se lleva a cabo. En el inicio del desarrollo del ovocito se forman grupos celulares en el *germinarium*, compuestos de dieciséis células de las cuales quince de ellas son células nodrizas y una es el ovocito, para culminar con el crecimiento completo del ovocito en el *vitelarium*. Durante el primer estadio y hasta el séptimo el ovocito y las células nodrizas crecen en tasas similares pero

a partir del octavo estadio el ovocito incrementa su tamaño de 4 a 5 veces más rápido que las células nodrizas. Durante este crecimiento el citoplasma de las células nodriza es transferido al ovocito y finalmente en el estadio decimocuarto el ovocito maduro está listo para ser fecundado (Drummond-Barbosa, 2001).

La regulación del proceso de vitelogénesis en insectos es controlado principalmente por dos hormonas, la hormona juvenil (HJ) y la ecdisona. Tanto la HJ como la ecdisona son hormonas que muestran un efecto antagónico y no solo se involucran en el proceso de reproducción sino que también regulan los procesos de muda, crecimiento y metamorfosis de los insectos (Landau, *et al.* 1997).

Los ecdisteroides son una familia de esteroides polihidroxiados cuya estructura tiene gran similitud con los esteroides de vertebrados (Bentley, 2002; Landau, *et al.* 1997). Los ecdisteroides son producidos por la glándula protorácica y transformados en ecdisona. La ecdisona es la molécula que libera la glándula protorácica, es transportada a través de la hemolinfa, sin necesidad de proteínas acarreadoras, hasta ingresar a las células blanco donde es procesada a 20-hidroxiecdisona (20E) para regular la expresión de diversos genes relacionados con la reproducción, crecimiento y muda principalmente.

La HJ es un compuesto sesquiterpenoide que inicialmente fue reconocido como un factor que prevenía la metamorfosis. Esta hormona es producida por el *corpus*

allatum, que es una estructura endocrina asociada al cerebro de insectos. La HJ viaja en la hemolinfa acoplada a proteínas acarreadoras hasta llegar a los órganos blanco como el hepatopáncreas, ovarios y epidermis. La actividad de la HJ en las células blanco se ejerce a dos niveles; en uno existen receptores citosólicos que son translocados al núcleo y que actúan como activadores o represores de la expresión génica y en el otro, el mecanismo de acción se ubica a nivel de la membrana celular donde existen receptores de superficie que inician una cadena de transducción de señales (Landau, *et al.* 1997).

Aun cuando los efectos de la HJ y la 20E sobre la maduración gonádica pueden variar de una especie a otra, por lo general la HJ induce la síntesis y liberación de vitelogeninas por el hepatopáncreas y actúa sobre las células foliculares para inducir el ingreso de las vitelogeninas desde la hemolinfa hacia el ovocito. La HJ también regula la síntesis de los receptores de vitelogeninas que median la endocitosis de estas hacia el ovocito e induce la diferenciación de las células foliculares (Landau, *et al.* 1997).

En *D. melanogaster* la síntesis de vitelogeninas por el hepatopáncreas está influenciada tanto por la HJ como por la 20E mientras que a los folículos ováricos sólo la HJ los estimula. La regulación de la biosíntesis de los ecdisteroides y la HJ está controlada por neurohormonas peptídicas producidas en el cerebro como respuesta a factores ambientales, donde se reconocen las hormonas proracicotrópicas (HPTT), alatoestatinas y alatotropinas (Landau, *et al.* 1997).

La HPTT es producida por células neurosecretoras, liberada a la hemolinfa y transportada a la glándula protorácica, la cual estimula la síntesis y liberación de ecdisona. Las células neurosecretoras del *par intercerebralis* sintetizan alatotropinas que estimulan el crecimiento del *corpus allatum* y la síntesis de la HJ. Esta hormona es reconocida por receptores de membrana presentes en el *corpus allatum* y se desencadena una cascada de transducción de señales involucrando segundos mensajeros. Las alatoestatinas son neurohormonas peptídicas que inhiben la producción de la HJ por el *corpus allatum*, el mecanismo de acción de las alatoestatinas involucra tanto a AMP cíclico como al calcio como segundos mensajeros. Finalmente la síntesis de HJ también está regulada por retroalimentación, en respuesta a la concentración de la HJ en hemolinfa, ya que para que la biosíntesis de ecdisteroides se efectúe son necesarios niveles bajos de HJ. También es inhibida independientemente de los factores neuronales por la acción de los propios ecdisteroides (Landau, *et al.* 1997).

2.2.3 CRUSTÁCEOS.

La maduración ovárica en crustáceos está dividida en cuatro fases: ovario inmaduro, previtelogénesis o vitelogénesis primaria, vitelogénesis o vitelogénesis secundaria y maduración. Al inicio de la ovogénesis, células indiferenciadas salen de la zona germinativa del ovario para convertirse en ovogonias las cuales se dividen mitóticamente y entran a profase meiótica (De Kleijn, *et al.* 1998).

En general la vitelogénesis primaria está caracterizada por un escaso crecimiento en el diámetro y peso del ovocito, se lleva a cabo la generación de varias estructuras celulares que lo preparan para la fase de síntesis de proteínas: proliferación de ribosomas, crecimiento del retículo endoplásmico rugoso y síntesis endógena de glicoproteínas. Los ovocitos primarios que se derivaron de la ovogonia en la zona germinativa son cubiertos por una capa de células foliculares. Al final de este estado se inicia la transición a la vitelogénesis secundaria, aparecen esferas de vitelo en el citoplasma, se incrementa la actividad de micropinocitosis y el ovocito incrementa su tamaño (De Kleijn, *et al.* 1998).

La vitelogénesis secundaria es el estado de maduración donde la mayoría del vitelo se acumula en el ovocito. La vitelina se acumula por contribución endógena y exógena que ingresa al ovocito por micropinocitosis y se obtiene del fluido extracelular. El vitelo en los huevos de crustáceos comprende del 60 al 90% de la proteína total. En los decápodos hay diferentes sitios de síntesis de vitelogeninas; ovario, hemocitos, hepatopáncreas y tejido adiposo (Fainzilber, *et al.* 1992). Estudios moleculares indican que RNA mensajero (mRNA) de vitelogenina se expresa en las células foliculares ováricas y en células parenquimatosas del hepatopáncreas en *P. japonicus* (Tsutsui, *et al.* 2000). En *Macrobrachium rosenbergii*, la expresión de mRNA de vitelogenina fue detectada en tejido hepatopancreático de hembras pero no en ovario. (Yang, *et al.* 2000). Finalmente la maduración termina cuando se rompen las vesículas germinales y la hembra está lista para la liberación de los huevos (Quackenbush, 1991).

El control del proceso de maduración se encuentra directamente relacionado con un neuropéptido producido y almacenado en el principal órgano neurosecretor en crustáceos, complejo órgano X-glándula sinusal (OX-GS). Este péptido fue inicialmente reconocido como una hormona inhibidora de la vitelogénesis. En 1943 Panouse reporta que se induce la maduración ovárica en las hembras cuando a éstas se les extirpa el tallo ocular, posteriormente se reconoce que dicho factor también es capaz de inhibir la maduración gonádica en machos por los que se le denomina hormona inhibidora de las gónadas (GIH, por sus siglas en inglés) (Huberman, 2000a). Esta hormona influye negativamente en la síntesis de vitelina y vitelogenina en el ovario y en los otros sitios de producción de vitelogenina extraovárica (Fig. 1). En el siguiente apartado se mencionarán las más recientes aportaciones reportadas para la GIH y otros péptidos relacionados con la glándula sinusal.

Además de la GIH existen otras moléculas que influyen directamente en el proceso reproductivo. Al igual que en los insectos, en las hembras de crustáceos los ecdisteroides y otros derivados tienen un efecto en la síntesis de vitelogenina (Landau, *et al.* 1997) Se reconoce un neuropéptido producido y liberado por los ganglios torácicos que tiene la capacidad de inducir maduración gonádica y es denominado como hormona estimuladora de las gónadas (GSH) (Otsu, 1963) y el farnesoato de metilo (FM), que es un compuesto terpenoide cuya estructura tiene

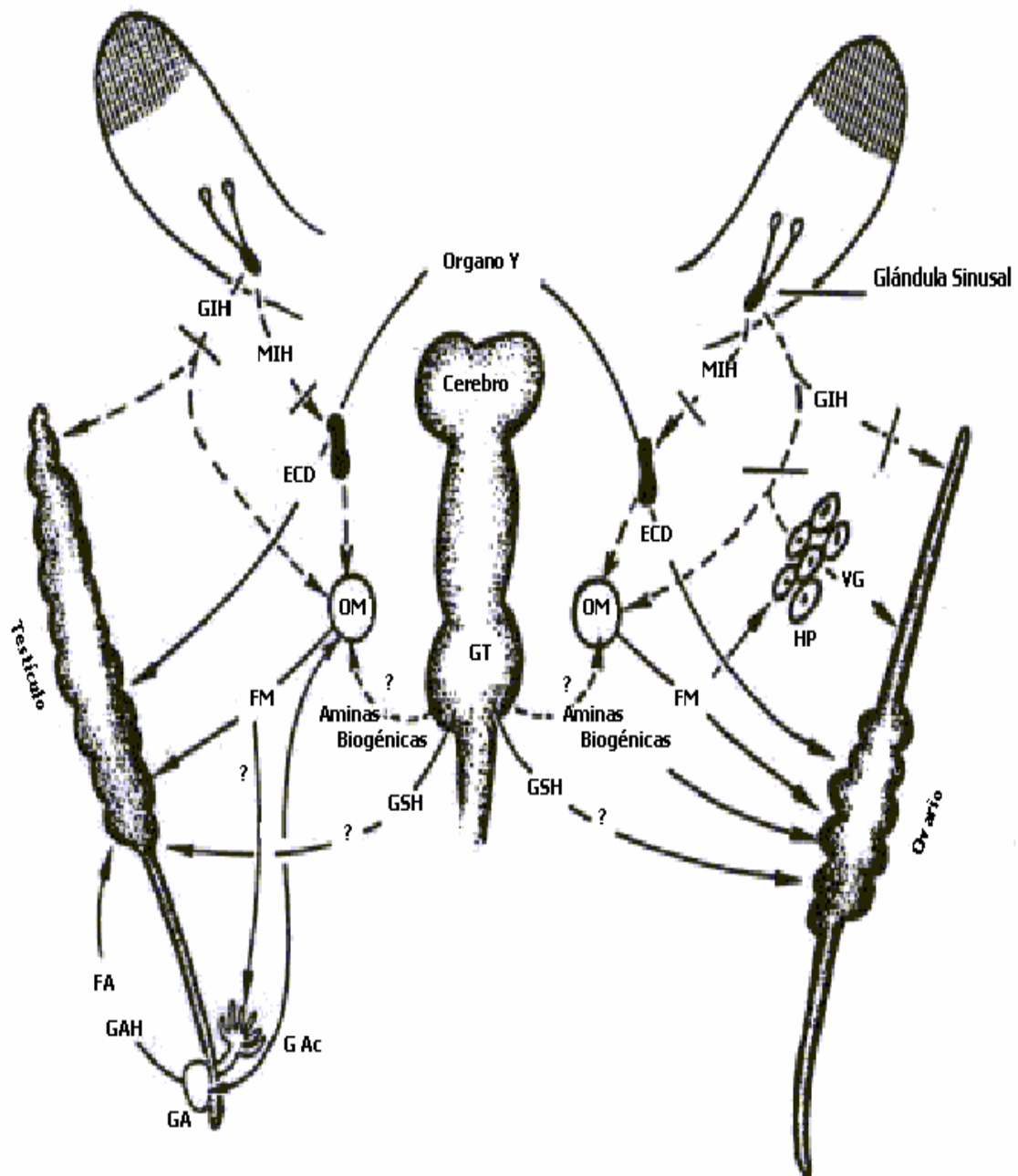


FIGURA 1. Control endócrino de la maduración gonádica en crustáceos mayores (*Malacostraca*). Glándulas principales y órganos blanco en machos y hembras. Los efectos estimulantes se indican en líneas continuas y los inhibitorios con líneas punteadas. Las líneas punteadas con una línea entrecruzada representan los efectos inhibitorios interrumpidos por la ablación del tallo ocular. Las gónadas y órganos: órgano mandibular (OM), ganglios torácicos (GT), hepatopáncreas (HP), glándula accesoria (G Ac), glándula androgénica (GA) y los factores endocrinos y otras moléculas: hormona inhibidora de la muda (MIH), hormona inhibidora de las gónadas (GIH), ecdisteroides (ECD), farnesoato de metilo (FM), hormona estimuladora de las gónadas (GSH), hormona de la glándula androgénica (GAH), farnesilacetona (FA) y vitelogenina (VG). Tomado de Laufer. *et al.* 1991.

una alta similitud con la HJ de insectos, el FM es una forma no epoxidada del HJ III. (Fig. 1) (Laufer, *et al.* 1987a, Laufer, *et al.*, 1993).

La síntesis de ecdisteroides se desarrolla en la glándula conocida como órgano Y, estos aparecen fuertemente involucrados en la regulación del proceso de muda (Vijayan, *et al.* 1993). Se reconoce que cuando el ciclo de muda se ubica en los estados de premuda y ecdisis la concentración de ecdisteroides en hemolinfa presenta sus niveles más altos y declinan en los estados de postmuda e intermuda (Chang, 1993). El principal factor que regula la biosíntesis y liberación de ecdisteroides por el órgano Y es un neuropéptido ubicado en el OX-GS que está estrechamente relacionado con la GIH y conocido como hormona inhibidora de la muda (MIH, por sus siglas en inglés). La MIH inhibe la síntesis de ecdisteroides en el órgano Y. Pero otras hormonas como el FM y sus derivados pueden estar implicadas en la estimulación al órgano Y para producir y liberar ecdisteroides (Subramoniam, 2000).

La 20E, que es la principal forma activa de los ecdisteroides, es capaz de inducir la vitelogénesis y la síntesis ovárica de proteínas. A las fluctuaciones de ecdisteroides en hemolinfa y ovarios se les ha relacionado con el ciclo reproductivo de algunos crustáceos. Algunas hormonas sexuales de vertebrados como testosterona actúan inhibiendo la maduración ovárica (Landau, *et al.* 1997), pero aparentemente otras hormonas como la progesterona y estradiol inducen la

maduración y el desove en ciertas especies de crustáceos (Yano, 1985; Fairs, *et al.* 1990).

El FM es el principal producto secretado por el órgano mandibular. Se ha demostrado que existe una correlación entre la biosíntesis del FM y el ciclo reproductivo (Laufer, *et al.* 1987a). El FM es transportado en la hemolinfa acoplado a proteínas acarreadoras. Además de los efectos antes mencionados en la inducción de ecdisteroides por el órgano Y, se reporta que el FM induce el desarrollo ovárico. Esto fue demostrado al encontrar que inyecciones de FM inducen la vitelogénesis en hembras de cangrejo *Libinia emarginata*, a la vez que los niveles de vitelina en la hemolinfa se incrementan (Landau, 1997). De igual forma estudios *in vitro* con ovocitos de *P. vannamei* indican que estos aumentan considerablemente su tamaño cuando son tratados con FM (Tsukimura y Kamemoto, 1991).

En el mecanismo de regulación de la biosíntesis del FM están implicados varios factores hormonales entre los que destacan neurohormonas liberadas por el OX-SG. Se ha reconocido un péptido que inhibe la síntesis de FM *in vitro* y que fue denominado como hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH, por sus siglas en inglés) (Laufer, 1987b). La MOIH muestra una alta similitud estructural con la GIH y la MIH que junto con la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés) componen una familia peptídica característica de crustáceos (Huberman, 2000a). Algunos factores pigmentarios o

cromatoforotropinas, también sintetizados por el OX-SG, además de tener un efecto en la concentración y dispersión de pigmentos, actúan positivamente en la síntesis de FM como la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH, por sus siglas en inglés) o negativamente como la hormona dispersante de pigmentos (PDH por sus siglas en inglés) (Ranga Rao y Riehm, 1991; Laufer, *et al.* 1993).

Cuando Otsu (1963) extirpó la glándula sinusal de cangrejos se indujo la maduración gonádica en hembras adultas pero no sucedió en juveniles. Concluyó entonces que no solamente era necesaria la eliminación de la GIH presente en la glándula sinusal para inducir maduración sino que debía existir otro factor que no estaba presente en las hembras juveniles y sí se encontraba en hembras adultas. Este factor, denominado como GSH, se encuentra almacenado en los ganglios torácicos de organismos adultos, lo cual quedó demostrado al implantar este tejido en hembras juveniles ablacionadas, dando inicio la maduración ovárica. No solamente en los ganglios torácicos se ubica este factor sino que se ha reconocido su presencia en tejido cerebral (Laufer y Landau, 1991). Extractos de ganglios torácicos y cerebro son capaces de promover la actividad ovárica en algunas especies de crustáceos y aparentemente este factor no es específico de especie pues se ha reportado que implantes de ganglios torácicos de langosta pueden inducir la maduración ovárica en camarones (Landau, 1997).

Algunas aminos bioactivas como dopamina y metil-enkefalina inducen la liberación de RPCH y otras como la serotonina estimulan la liberación de PDH y maduración

gonádica en hembras de *P. vannamei* (Vaca y Alfaro, 2000). La serotonina y octopamina también parecen estar involucradas en el comportamiento característico de la actividad reproductiva (Laufer y Landau, 1991).

Finalmente es importante señalar que los ciclos de muda y reproducción en artrópodos y por consecuencia en crustáceos, son procesos altamente demandantes de recursos energéticos, por lo cual deben estar eficientemente controlados y coordinados en aras de evitar conflictos metabólicos o adaptativos en estos organismos (Subramoniam, 2000). Basado en ello, es lógico pensar que hormonas involucradas en el ciclo de muda también tengan influencia en el ciclo reproductivo como la 20E y el FM, o que la MIH, GIH, CHH y MOIH muestren actividades pleiotrópicas, según el órgano blanco en el que actúen.

2.3 EL COMPLEJO ÓRGANO X- GLÁNDULA SINUSAL.

Anatómicamente el complejo OX-GS se ubica dentro del tallo ocular y se compone de un conglomerado de 150 a 200 cuerpos somáticos secretores localizados en la *medulla terminalis* del tallo ocular (órgano X). Diversos factores neuroendocrinos parecen ser sintetizados en el OX-GS. Dichos factores hormonales son transportados desde el órgano X a través de sus axones, los cuales en su extremo distal conforman un bulbo que se encuentra muy cercano al seno hemolinfático, y se reconoce como un órgano neurohémico próximo a la *medulla externa* del tallo ocular llamado glándula sinusal (Fig. 2) (García y Aréchiga, 1998).

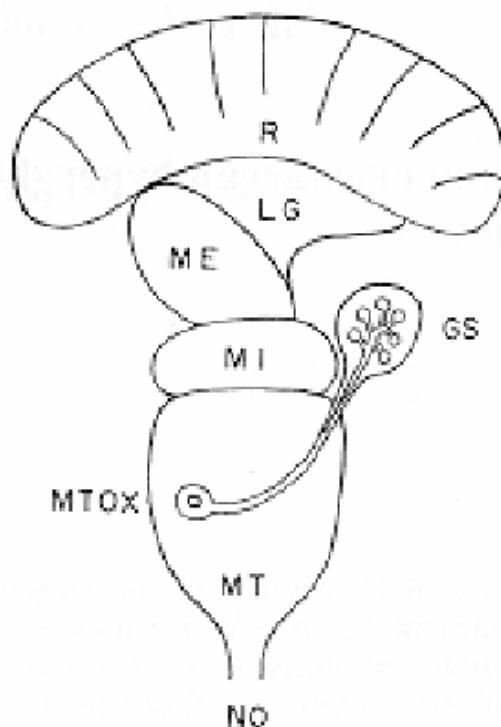


FIGURA 2. Modelo esquemático del tallo ocular de crustáceos decápodos: Nervio Óptico (NO), *medulla terminalis* (MT), *medulla terminalis-órgano X* (MTOX), *medulla interna* (MI), *medulla externa* (ME), *lamina ganglionaris* (LG), retina (R), glándula sinusal (GS). Tomado de Huberman y Aguilar. 1998.

Las hormonas producidas por el OX-GS regulan una serie de funciones fisiológicas como el control de la coloración tegumentaria y retinal del organismo, la actividad gonádica, muda, metabolismo, locomoción y actividad neuronal (García y Aréchiga, 1998). El control del proceso de maduración ovárica está directamente relacionado con el OX-GS. Esto fue corroborado al evaluar la

actividad celular del OX-GS en diferentes estadios de maduración ovárica en *Penaeus indicus*. Los resultados demostraron que durante el estadio inmaduro existe la máxima actividad vacuolar y secretora en las células tipo A y B del OX-GS (Sunilkumar y Diwan, 1991).

La secreción de las neurohormonas del OX-GS está regulada por factores ambientales (fotoperiodo, temperatura, *etc.*), factores nutricionales, factores estresantes, *etc.* y por influencias internas del organismo (Van Herp, 1992; García y Aréchiga, 1998).

2.4 NEUROHORMONAS DEL COMPLEJO OX-GS.

El reconocimiento de la GS como un órgano responsable de almacenar y secretar factores endocrinos data de 1930, cuando Koller aisló la GS del cangrejo *Crangon crangon* y demostró que en ella se ubicaba un factor capaz de inducir cambios en la coloración de los organismos al inyectarles el extracto de dicha glándula (Fingerman, 1997). A la fecha se han identificado diversos péptidos sintetizados y almacenados en el OX-GS con actividad neuroendócrina, fundamentalmente neuropéptidos conocidos como cromatoforotropinas y hormonas de la familia CHH/MIH/GIH en diferentes especies de crustáceos (Huberman, 2000a).

La existencia de los factores generados por el OX-GS es demostrada mediante la técnica de ablación del tallo ocular o extirpación del la GS. Con ello se han reconocido factores involucrados en varios procesos fisiológicos que actúan a diferentes niveles celulares y a distintos tiempos de acción, ya sea a corto, mediano o largo plazo. Por ejemplo, la concentración y dispersión de pigmentos son controladas por las cromatoforotropinas y se realizan en lapsos cortos de tiempo; el control del metabolismo de carbohidratos por la CHH es un proceso que se lleva a cabo a mediano plazo, en comparación con procesos de crecimiento y reproducción controlados por la MIH y la GIH que se desarrollan a largo plazo (De Kleijn y Van Herp, 1995). Los diversos componentes del sistema neuroendocrino se han localizado a través de todo el sistema nervioso central, sin embargo, el complejo OX-GS representa el más importante sistema neuroregulador en crustáceos (De Kleijn y Van Herp, 1995).

2.4.1 CROMATOFOROTROPINAS.

Dentro de los factores pigmentarios presentes en crustáceos se reconocen dos tipos principales de compuestos: las neurohormonas que generan dispersión de los pigmentos en cromatóforos y adaptación de la omatidia a la luz; y las neurohormonas que inducen concentración de los pigmentos en cromatóforos y adaptación a la obscuridad por la omatidia (Ranga Rao y Riehm, 1991).

Las hormonas dispersantes de pigmentos (PDH por sus siglas en inglés) se encuentran en la GS. Se ha propuesto que la PDH y la hormona de adaptación a

la luz también conocida como hormona de adaptación a la luz del pigmento retiniano distal (LAH o DRPH por sus siglas en inglés) son una misma molécula y que sus diversas acciones pigmentarias son inducidas por algunas de las variantes estructurales que presenta la hormona (Ranga Rao y Riehm, 1991).

En 1976, Fernlund aisló y secuenció una molécula con actividad relacionada con la PDH en el camarón *Pandalus borealis*. Esta molécula es de naturaleza peptídica y está compuesta por dieciocho residuos de aminoácidos. Posteriormente, en 1996 Desmoucelles-Carette *et al.* clonaron el DNA complementario (cDNA) de los precursores de PDH en *P. vannamei* y encontraron que los precursores se organizan en un péptido señal de 22 a 23 residuos de aminoácidos, seguido de un péptido precursor relacionado con la PDH (PPRP por sus siglas en inglés) de 33 residuos de aminoácidos de longitud y finalmente por los 18 residuos que conforman el péptido maduro. También se reportó que existían dos variantes moleculares con una sola sustitución de aminoácidos en el péptido maduro. Aparentemente la secuencia del péptido señal es altamente variable en las distintas especies, pero el PPRP muestra una baja variabilidad lo que sugiere que este fragmento puede tener una función fisiológica importante (Huberman, 2000a).

Fernlund y Josefsson, en 1972, aislaron y caracterizaron la primera hormona neuropeptídica de crustáceo en el camarón *Pandalus borealis*. Esta fue nombrada hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH por sus siglas en inglés). La

síntesis de la RPCH se realiza en el complejo OX-SG, aunque se han reconocido otros sitios de síntesis en el cerebro, los ganglios torácicos y el nervio estomatogástrico. Esta hormona es un octapéptido altamente conservado en crustáceos y presenta analogía con la hormona adipocinética (AKH por sus siglas en inglés) de insectos (Huberman, 2000a). El cDNA del precursor de la RPCH fue descrito para varias especies de crustáceos y consta de un péptido señal de 25 residuos de aminoácidos, seguido por la secuencia de la RPCH madura y un segmento de 73 a 74 residuos de aminoácidos llamado péptido relacionado con el precursor de la RPCH (RPRP por sus siglas en inglés). A diferencia del precursor para la PDH el RPRP muestra alta variabilidad (García y Aréchiga 1998).

Además de su efecto en la movilización de pigmentos, a las cromatoforotropinas se les ha involucrado en otros eventos fisiológicos tales como la síntesis de FM por el órgano mandibular o actuando como neurotransmisores en el sistema nervioso central del organismo (Ranga Rao y Riehm, 1991).

El análisis comparativo entre las preprohormonas de la RPCH y la PDH nos demuestra que presentan un arreglo constante (Fig. 3). Los precursores de la RPCH inician con péptido señal seguido por la secuencia de la hormona y flanqueada por la secuencia del RPRP. Por otro lado para la PDH se reconoce una organización que inicia con un péptido señal, un segmento que corresponde al PPRP y finalmente el péptido de la hormona PDH (De Kleijn y Van Herp, 1995).

Factores pigmentarios o Cromatóforotropinas

Péptido Señal	PPRP	PDH	Péptido señal	22 a 23 aa
			PPRP	33 aa
			PDH	18 aa
Péptido Señal	RPCH	RPRP	Péptido señal	25 aa
			RPCH	8 aa
			RPRP	73 a 74 aa

Familia peptídica CHH/MIH/GIH

Subgrupo I

Péptido Señal	CPRP	CHH, ITP	Péptido señal	28 aa
			CPRP	38 aa
			CHH o ITP	72 a 74 aa

Subgrupo II

Péptido Señal	MIH, GIH, MOIH		Péptido señal	21 a 41 aa
			MIH, GIH, MOIH	72 a 83 aa

FIGURA 3. Organización de los precursores de las cromatóforotropinas y neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH. Hormona dispersante de pigmento (PDH), péptido relacionado al precursor de PDH (PPRP), hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH), péptido relacionado al precursor de RPCH (RPRP), hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH), péptido transportador de iones (ITP), péptido relacionado al precursor de la CHH (CPRP), hormona inhibidora de la muda (MIH), hormona inhibidora de las gónadas (GIH), hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH). Tomado de (García y Aréchiga, 1997; Huberman, 2000a).

2.4.2 FAMILIA PEPTÍDICA CHH/MIH/GIH DE CRUSTÁCEOS.

La familia peptídica CHH/MIH/GIH comparte características bioquímicas muy conservadas. Estas neurohormonas son péptidos de 72 a 83 residuos de aminoácidos, los cuales presentan tres puentes disulfuro. La distribución de los residuos de cisteína es idéntica para todos los péptidos así como el arreglo intramolecular de dichos puentes. Por lo que se sugiere que esta familia peptídica

muestra un mismo patrón de plegamiento (Khayat, *et al.* 1998). Esta familia se ha clasificado en dos grupos peptídicos de acuerdo con su estructura primaria. Las características principales de las hormonas del grupo I son el número de residuos de aminoácidos, de 72 a 73 y la amidación del extremo carboxilo. El grupo II se caracteriza por presentar moléculas de 72 a 83 residuos y los extremos carboxilo y amino se encuentran en forma libre (Keller, 1992).

La comparación de las preprohormonas descritas para la GIH en *Homarus americanus*, la MIH y CHH de *Carcinus maenas* y la CHH de *Orconectes limosus* y *H. americanus*, revela que sólo el precursor de la CHH contiene un péptido adicional antecediendo a la hormona el cual es llamado péptido precursor relacionado con la CHH (CPRP, por sus sigla en inglés). Cuando las secuencias de aminoácidos de las preprohormonas de GIH y MIH fueron comparadas mostraron un 53% de identidad, porcentaje similar al encontrado para las preproCHH de las distintas especies, 55%. Pero cuando ambos grupos fueron comparados se encontró sólo un 19% de identidad, por lo que se propuso una clasificación de los precursores peptídicos de esta familia en dos subgrupos (Fig. 3), el primero, que contiene a las preprohormonas de las CHH con un péptido señal de 26 residuos de aminoácidos antecediendo al CPRP de 38 residuos y el péptido de la hormona madura de 72 ó 73 residuos y un segundo grupo donde se encuentran las preprohormonas de la MIH y GIH que muestran sólo el péptido señal de 35 residuos de aminoácidos seguido por la secuencia de la hormona de 78 residuos GIH (De Kleijn y Van Herp,

1995). En 1999 se obtuvo el cDNA del precursor de la MOIH en *Cancer pagurus*, el cual muestra una organización similar al subgrupo II, con un péptido señal de 34 residuos de aminoácidos y el fragmento de la hormona madura de 78 residuos (Tang, *et al.* 1999).

En un principio, se reconocía a la familia peptídica CHH/MIH/GIH por presentar exclusivamente péptidos de crustáceos y ser sintetizados por el OX-GS. Pero en trabajos recientes se reporta la existencia de síntesis de isomorfos de la CHH en otros órganos del sistema nervioso como el órgano pericárdico, o en el intestino (Dirksen, *et al.* 2001; Chung, *et al.* 1999). Así también, se caracterizaron péptidos de artrópodos diferentes a crustáceos, con altos porcentajes de similitud con la preproCHH en la secuencia de aminoácidos y en la organización de sus precursores. En insectos, el péptido transportador de iones aislado de *Schistocerca gregaria* y *Bombix mori*; en arácnidos un péptido, cuya función aún no ha sido reconocida, fue aislado del veneno de la araña *Lactrodectus mactans tridecimguttatus* (Huberman, *et al.* 2000b).

2.4.2.1 HORMONA HIPERGLICEMIANTE DE CRUSTÁCEOS.

La primera CHH purificada y secuenciada fue aislada del cangrejo *Carcinus maenas* en 1989 (Kegel, *et al.* 1989). Posteriormente se reportaron secuencias de CHH en varias especies de crustáceos como *Homarus americanus*, *Orconectes limosus*, *Procambarus bouvieri*, *Armadillidium vulgare*, entre otras (Soyez, *et al.* 1990;

De Kleijn, *et al.* 1995; Huberman, *et al.* 1992; Aguilar, *et al.* 1995; Martin, *et al.* 1993). A la fecha, existen más de veinte diferentes CHH que han sido aisladas y caracterizadas y se ha descrito la organización de algunos de los precursores de dichos neuropéptidos (Subramoniam, *et al.* 1998; Gu, *et al.* 2000; Marco, *et al.* 2000; Wang, *et al.* 2000; Huberman, *et al.* 2000b). Igualmente se empieza a dilucidar la dinámica de su biosíntesis (Ollivaux y Soyez, 2000), así como el significado fisiológico de la presencia de varios isomorfos de CHH en un mismo organismo (Yasuda, *et al.* 1994; Huberman y Aguilar, 1998; Dircksen, *et al.* 2001).

La hormona hiperglicemiante de crustáceos se conforma de 72 a 73 residuos de aminoácidos, muestra seis residuos de cisteína que coinciden en posición con todos los péptidos de la familia, formando tres puentes disulfuro en disposición I-V, II-IV y III-VI, característica constante en la familia y tiene el extremo carboxilo amidado (Huberman, 2000a). La organización de los precursores de la CHH se identifica en el subgrupo I de la familia, con el péptido señal seguido por el CPRP y finalmente el péptido de la CHH madura (De Kleijn, *et al.* 1994; Gu, *et al.* 2000).

La CHH, el neuropéptido más abundante en el OX-GS, desempeña una función importante en el metabolismo de carbohidratos y frecuentemente se encuentran dos o más isomorfos en un mismo organismo. Para el camarón *Penaeus japonicus* se han descrito hasta cinco variantes moleculares con actividad hiperglicemiante (Yang, *et al.* 1995). Además de su efecto en el incremento de la concentración de

glucosa en hemolinfa, la CHH tiene capacidad para inhibir la síntesis de ecdisteroides por el órgano Y e influir en movilización de ácidos grasos en el organismo, en la actividad del músculo cardíaco y en la síntesis de proteínas en ovario; algunos isomorfos de CHH de *Homarus americanus* son capaces de inducir vitelogénesis y maduración de ovocitos (Sefiani, *et al.* 1996; Khayat, *et al.* 1998; De Kleijn, *et al.* 1998; Dircksen, *et al.* 2000). Es importante resaltar que cada uno de los isomorfos reconocidos para la CHH presentan diferencias en la biosíntesis, liberación y magnitud del efecto que inducen en la célula blanco, lo que nos sugiere que los cambios en los isomorfos por ligeros que parezcan son realmente relevantes para la acción de las diversas CHH. La pleiotropicidad y variedad de isomorfos que muestra la CHH es evidencia del amplio campo de acción y de la complicada interacción de estas hormonas en la fisiología de crustáceos.

2.4.2.2 HORMONA INHIBIDORA DE LA MUDA.

El principal factor que ha sido implicado en la regulación de los ciclos de muda en crustáceos es conocido como hormona inhibidora de la muda (MIH). La naturaleza peptídica de esta neurohormona fue establecida en varias especies de crustáceos: *Homarus americanus*, *Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus*, *Penaeus vannamei*, *Procambarus bouvieri* y otros (Chang *et al.* 1990; Webster, 1991; Sun, 1994; Lee, *et al.* 1995; Aguilar, *et al.* 1996).

Dentro de las características bioquímicas de la MIH podemos mencionar que son péptidos de 72 a 78 residuos de aminoácidos con una masa molecular estimada entre los 8000 y 9000 Da. Todas ellas presentan seis residuos de cisteínas los cuales forman tres puentes disulfuro (Huberman, 2000a). En 1994 se clonó y caracterizó el cDNA correspondiente a un neuropéptido del camarón *P. vannamei*, identificado como MIH-like debido a que se usaron oligonucleótidos cebadores diseñados con base en la secuencia de la CHH y porque la actividad del péptido no fue evaluada en dicho trabajo. La secuencia de aminoácidos deducida de este precursor indica la existencia de un segmento de 30 aminoácidos que corresponden al péptido señal, antecediendo a los 72 aminoácidos que muestra la hormona madura (Sun, 1994). La expresión de este gen se ha localizado principalmente en el complejo OX-SG, pero transcritos de la MIH-like fueron ubicados en otros sitios neurosecretores del cerebro de crustáceos, lo que indica que este factor puede desempeñar otras funciones en el sistema nervioso (Sun, 1995). Aunado a ello, se ha reconocido que la expresión de la MIH en *Penaeus japonicus* no disminuye en los estadios de premuda lo que indica que la regulación de la biosíntesis de la MIH se registra a niveles postranscripcionales (Ohira, *et al.* 1997).

Se han ubicado neuropéptidos que presentan actividad hiperglicemiante adicional a la actividad inhibidora de la muda. Incluso al usar anticuerpos generados contra CHH se ha logrado bloquear la actividad hiperglicemiante sin afectar la acción

inhibidora de la muda y eliminando esta inhibición sólo cuando el complejo antígeno-anticuerpo es removido de la solución, por lo cual se deduce entonces que los diferentes epítomos que muestra este factor son específicos para inducir una actividad determinada (Huberman, 2000a). Posteriormente se reconoció que anticuerpos generados contra el segmento carboxilo terminal de la hormona MIH de *Procambarus clarkii* revierten la inhibición sobre la producción de ecdisteroides. Sin embargo, este mismo segmento generado sintéticamente no genera inhibición en la síntesis de ecdisteroides, por lo que se concluye que no sólo el segmento carboxilo está involucrado en dicha función sino que requiere además de la estructura completa de la hormona para ejercer su acción inhibitoria (Sonobe, *et al.* 2001).

Por sus características bioquímicas y la organización de sus precursores la hormona MIH se clasifica dentro del subgrupo II de la familia peptídica CHH/MIH/GIH (Keller, 1992; De Kleijn y Van Herp, 1995). Estudios recientes han logrado elucidar la estructura tridimensional de la neurohormona recombinante de la MIH de *Penaeus japonicus* (Fig. 4), resuelta por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), la cual confirma que se trata de un péptido con abundantes estructuras de hélice- α como se había predicho para algunas hormonas de la familia CHH/MIH/GIH reconocidas por dicroísmo circular (Huberman, *et al.* 1989). La estructura de la MIH de *P. japonicus* está compuesta por una región amino terminal (N-term), cinco **hélices**- α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$),

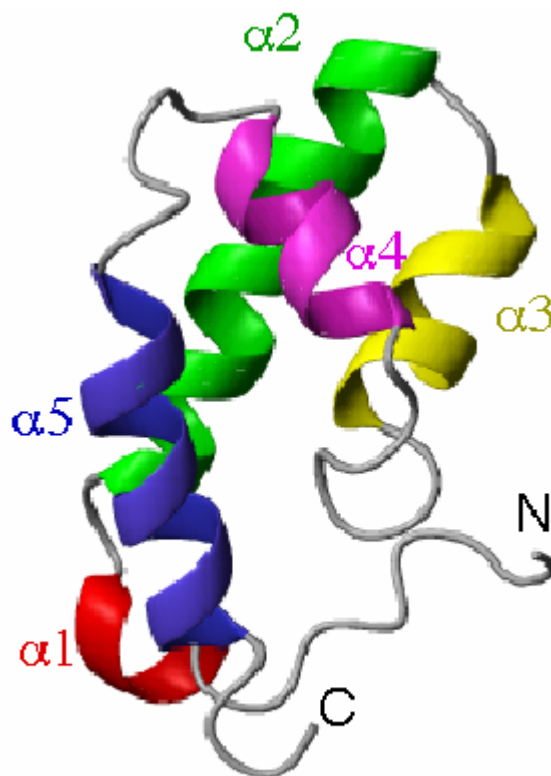


FIGURA 4. Modelo tridimensional de listón de la estructura terciaria de la hormona inhibidora de la muda caracterizada por resonancia magnética nuclear a partir de la proteína recombinante rMIH de *P. japonicus*. Se observan las cinco hélices- α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$), y los extremos carboxilo, C y amino, N. Tomado de (Katayama, *et al.* 2003).

separadas por cuatro asas (L1-2, L2-3, L3-4 y L4-5), y una región carboxilo terminal (C-term). Los tres puentes disulfuro se distribuyen en la hormona uniendo los segmentos N-term y L3-4; $\alpha 2$ y $\alpha 3$; $\alpha 2$ y $\alpha 4$. La conformación de la estructura se estabiliza por los tres puentes disulfuro y por interacciones hidrofóbicas de algunos de sus residuos. Dicha conformación de cinco hélices- α y ausencia de hojas plegadas- β constituyen un motivo estructural novedoso no reportado en ninguna otra proteína (Katayama, *et al.* 2003).

En este mismo trabajo se modela la estructura de la CHH de *P. japonicus*, Pej SGP III que muestra un 32% de identidad en la secuencia de la MIH. La estructura de la CHH tiene alta similitud con la estructura de MIH. Sin embargo, por tener un menor número de residuos en su secuencia, la CHH no presenta la hélice $\alpha 1$ y el segmento C-term con lo que las propiedades hidrofóbicas y el potencial electrostático superficial de esta región en las dos hormonas son claramente distintos. La hélice $\alpha 1$ y el segmento C-term en la MIH se encuentran muy cercanos por lo que se puede concluir que la región $\alpha 1$ y el segmento C-term son relevantes para la actividad inhibitoria de la muda (Katayama, *et al.* 2003).

2.4.2.3 HORMONA INHIBIDORA DE LAS GÓNADAS.

El principal factor regulador del proceso reproductivo en crustáceos fue reconocido hace seis décadas por Panouse en 1943. Sin embargo, este factor neuroendocrino ha sido poco estudiado en comparación con los trabajos realizados para otras hormonas de crustáceos como la CHH o la MIH; a pesar de ello la GIH empieza a ser conocida más a fondo, debido en gran medida, al auge de la acuicultura de camarón que tiene la necesidad de manejar con mayor eficiencia la inducción de maduración de organismos reproductores.

Los primeros intentos de caracterización de este factor se realizaron en diferentes especies de crustáceos como el cangrejo *Cragnon cragnon* (Bomirski, *et al.* 1980), la langosta *Homarus americanus* (Soyez, *et al.* 1987) y el acocíl *Procambarus bouvieri*

(Aguilar, *et al.* 1992). En un principio este factor era conocido como hormona inhibidora de la vitelogénesis por el efecto que inducía en las hembras, pero en trabajos subsecuentes se encontró que este factor también estaba presente en los machos y que no sólo se involucraba en la vitelogénesis, sino que tenía una función más amplia al actuar en la maduración testicular (De Kleijn, *et al.* 1992).

Fue en 1991 cuando se reporta por primera vez la purificación y estructura primaria de dos isomorfos de la GIH en *Homarus americanus* (Soyez, *et al.* 1991). Ambos péptidos muestran la misma secuencia de aminoácidos que consta de 77 residuos con una masa molecular de 9135 Da con sus extremos amino en forma libre y cuya posible diferencia entre estos dos isomorfos podría deberse a la amidación del extremo carboxilo en una de ellas. En 1999 se reporta la segunda GIH, purificada a partir de la GS de un crustáceo terrestre *Armadillidium vulgare* (Grève, *et al.* 1999). Este factor es un neuropéptido cuya secuencia primaria está compuesta por 83 residuos de aminoácidos, con una masa molecular de 9485 Da y presenta los extremos amino y carboxilo en forma libre. De igual forma se reporta la estructura del precursor de esta hormona, el cual está formado por un péptido señal de 31 residuos de aminoácidos seguido por los 83 residuos del péptido maduro. Dicha conformación concuerda con las características presentes en los péptidos de la familia CHH/MIH/GIH subtipo II (Fig. 3), la comparación de la secuencia de *A. vulgare* con la GIH de *H. americanus* arroja un porcentaje de 39% de identidad y un 84% de similitud (Grève, *et al.* 1999). En el año 2000 fue

registrada la secuencia primaria de la GIH del camarón asiático *Metapenaeus ensis*, deducida a partir de la secuencia nucleotídica de su precursor. Este precursor consta de un péptido señal de 21 residuos de aminoácidos y el segmento del péptido correspondiente a la GIH madura de 81 residuos (Chan y Gu, 2000).

Los precursores de un par de péptidos relacionados a la MIH/GIH en *Macrobrachium rosenbergii* fueron clonados y caracterizados. Los precursores deducidos de la secuencia de aminoácidos muestran dos preprohormonas con un péptido señal de 41 y 34 residuos respectivamente y 78 residuos de aminoácidos de la hormona. La expresión de ambos péptidos fue exclusivamente reconocida en el tallo ocular y está presente en ambos sexos. El porcentaje de identidad de estos péptidos contra hormonas del subtipo II oscila entre el 44 y el 69%, mientras que el porcentaje de identidad obtenido al compararlos con las hormonas del subtipo I se ubica entre el 29 y el 32%. El mayor porcentaje de identidad se encuentra entre la GIH de *H. americanus* y uno de estos péptidos MIH/GIH. Sin embargo, las dos hormonas clonadas tienen un 66% de identidad entre ellas lo que sugiere que estos factores podrían tener funciones diferentes en el organismo, aunque la actividad de dichos péptidos no ha sido ensayada (Yang y Ranga Rao, 2001).

La última GIH identificada hasta la fecha fue deducida de la clonación de su precursor en la langosta *Nephrops norvegicus*. Dicho precursor consta de un péptido señal de 31 residuos y un péptido maduro de 81 residuos de aminoácidos.

La secuencia del péptido maduro muestra un porcentaje de identidad del 96% comparada con la GIH de *H. americanus*. Comparado con otras hormonas del subtipo II presenta entre 41 y 56% de identidad en contraste con el 27 a 33% de identidad comparada contra hormonas del subtipo I. La expresión de la GIH fue evaluada en diferentes tejidos del sistema nervioso, con lo cual se demostró que existe expresión del precursor en los ganglios supraesofágicos y el tallo ocular de este organismo, presente tanto en machos como en hembras (Edomi, *et al.* 2002).

Estudios de inmunocitoquímica usando la GIH, CHH y MIH revelan que el antisuero policlonal generado a partir de la GIH purificada de *H. americanus* es capaz de reconocer por reacción cruzada en pruebas de ELISA extractos de GS de algunas especies de crustáceos como: *Palaemonetes varians*, *Palaemon serratus*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Carcinus maenas* y *Porcellio dilatatus*; Sin embargo, no es capaz de reconocer otras especies como: *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei*, *Astacus leptodactylus*, *Orconectes limosus* y *Jasus paulensis*. Este suero es específico para reconocer exclusivamente a GIH pues no tiene reacción cruzada contra la CHH de *H. americanus*. La inmunolocalización de la GIH en *H. americanus* y *Porcellio dilatatus* se ubica en los extremos axónicos que conforman la glándula sinusal (Meusy, *et al.* 1987). Las especies *Jasus lalandii*, *Palinurus homarus* y *Carcinus maenas* fueron examinadas con antisueros generados contra CHH purificada de *H. americanus*, *Procambarus bouvieri* y *Cancer pagurus*; otros antisueros generados contra la MIH de *C. pagurus* y contra la GIH de *H. americanus* también fueron

utilizados. Los resultados de inmunolocalización revelaron que todos los sueros muestran una reacción positiva en el órgano X y en las terminales axónicas que conforman la GS, con lo que se concluye que las hormonas CHH, MIH y GIH se encuentran co-localizadas en diferentes subpoblaciones neuronales del complejo OX-GS (Marco y Gäde, 1999).

Un estudio de expresión del precursor de la CHH y GIH durante el ciclo reproductivo en hembras de *H. americanus* reveló que los niveles de ácido ribonucleico mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés) y almacenamiento de estos péptidos en el OX-SG y en la hemolinfa varía en los diferentes estadios del ciclo reproductivo en hembras, donde los más bajos niveles de mRNA de GIH se encuentran en el estado inmaduro, en contraste con los altos niveles reportados del péptido GIH en hemolinfa en este mismo estado; resalta el hecho que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de almacenamiento de la isoforma I de GIH en los cuatro estados del ciclo reproductivo. Aunado a esto, existe una sincronización con los niveles de expresión, almacenamiento y liberación a hemolinfa de la CHH del tipo A y del tipo B, por lo que se infiere que la CHH y la GIH están implicadas en el control del ciclo reproductivo y en el ciclo de muda, debido a que el proceso de ecdisis se lleva a cabo sólo cuando el desove de los ovocitos concluye (De Kleijn, *et al.* 1998).

2.4.2.4 HORMONA INHIBIDORA DEL ÓRGANO MANDIBULAR.

El último neuropéptido ubicado dentro de la familia CHH/MIH/GIH y que es sintetizado por el complejo OX-GS, fue caracterizado como un factor inhibidor del órgano mandibular (OM). El OM es una glándula que secreta farnesoato de metilo (FM), una hormona químicamente muy relacionada con la hormona juvenil de insectos. El FM está involucrado en el ciclo reproductivo de crustáceos y es negativamente regulado por el factor inhibidor del órgano mandibular. En 1996, se purificaron y caracterizaron dos neurohormonas de la GS del cangrejo *Cancer pagurus* conocidas como hormona inhibidora del órgano mandibular del tipo 1 y del tipo 2 (MOIH-1 y MOIH-2, por sus siglas en inglés). La estructura primaria de la MOIH-1 consta de 78 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 9235 Da. Estas hormonas presentan su extremo amino en forma libre y sus tres puentes disulfuro se conservan en la posición característica de la familia. La MOIH-2 sólo difiere de la secuencia de MOIH-1 por la sustitución de glicina por lisina en la posición 33 de la estructura primaria (Wainwright, *et al.* 1996).

Posteriormente se reconoció que la acción de la MOIH en *C. pagurus* se localizaba en el paso final de la biosíntesis del FM, catalizado por la enzima ácido farnesoico O-metiltransferasa y que este proceso se llevaba a cabo en el citosol de las células secretoras del OM (Wainwright, *et al.* 1998). La caracterización molecular del precursor de la MOIH en *C. pagurus* demuestra que este péptido se clasifica dentro del subgrupo II de la familia peptídica CHH/MIH/GIH, al presentar un

péptido señal de 34 residuos de aminoácidos seguida por la una secuencia de 78 residuos correspondientes a la hormona madura (Tang, *et al.* 1999).

2.5 OTROS FACTORES LOCALIZADOS EN EL COMPLEJO OX-GS.

Algunos estudios sobre otros componentes relevantes en el control de la reproducción como la enzima *O*-metiltransferasa del ácido farnesoico demuestran que se expresa en diferentes tejidos del camarón *Metapenaeus ensis*, incluido el tallo ocular. Además la expresión de dicha enzima por el tallo ocular de hembras está en relación con los diferentes estados de maduración ovárica (Gunawardene *et al.* 2001). La enzima prohormona-convertasa 2, que está vinculada con el procesamiento post-transcripcional de las prohormonas peptídicas y proneuropéptidos, fue clonada y caracterizada a partir de tejido de complejo OX-GS del cangrejo *Orconectes limosus* (Toullec, *et al.* 2002).

3. HIPOTESIS.

La hipótesis trazada en este trabajo enuncia que:

En el extracto soluble de la glándula sinusal de *Penaeus vannamei* se encuentra la hormona inhibidora de las gónadas, dicho factor presenta epítomos susceptibles de ser reconocidos por sueros inmunes generados a partir de fragmentos peptídicos sintéticos diseñados con base en la secuencia de la hormona inhibidora de las gónadas de *Metapenaeus ensis*.

4. OBJETIVOS.

La intención de esta tesis se encamina al aislamiento y caracterización bioquímica del factor inhibidor de las gónadas presente en la fracción soluble del extracto de la glándula sinusal del camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- Purificación y caracterización bioquímica de la GIH de *P. vannamei*.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Localización anatómica de la glándula sinusal en tallo ocular de *P. vannamei*.

- Aislamiento y purificación de los componentes ubicados en la fracción soluble del extracto de la glándula sinusal de juveniles de *P. vannamei*.
- Diseño y elaboración de péptidos sintéticos basados en fragmentos de la secuencia de la GIH de *Metapenaeus ensis*.
- Elaboración de sueros policlonales hiperinmunes en ratón y conejo empleando como antígenos los fragmentos sintéticos de la GIH de *Metapenaeus ensis*.
- Identificación del o los péptidos que muestren reacción cruzada con sueros específicos contra fragmentos sintéticos de la GIH de *Metapenaeus ensis*.
- Caracterización bioquímica de los péptidos identificados como posibles GIH de *P. vannamei*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 PUREZA Y CALIDAD DEL MATERIAL QUÍMICO.

Todos los reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron de pureza grado analítico y obtenidos de las compañías enlistadas a continuación Sigma Chemical Co. St. Louis, MO., E.E.U.U., Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, E.E.U.U., Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI. E.E.U.U., J. T. Baker, Phillipsburg, N.J., E.E.U.U., Acros Organics, N.J., E.E.U.U., Calbiochem-Novabiochem, Laufelfingen, Suiza.

5.2 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

En este trabajo se utilizaron 3000 animales juveniles de 15 a 20 g de peso de *Penaeus vannamei* en estado de intermuda. Estos animales fueron obtenidos de estanques de engorda provenientes de la estanquería supralitoral del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz. B.C.S. y la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera “El Playón del Esterón”, Angostura, Sinaloa.

5.3 EXTRACCIÓN POR MICRODISECCIÓN DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

A los 3000 camarones les fueron extirpados sus dos tallos oculares y de ellos se obtuvo un total de 4000 GS. Los animales fueron anestesiados en frío y sus tallos oculares seccionados y acumulados en solución salina estéril (NaCl 0.3 M pH 7.8) en baño de hielo. Las glándulas sinusales fueron inmediatamente

disecadas para lo cual se utilizó un microscopio estereoscópico (Leica MZ75, Chantilly, Virginia, EE. UU) y material de microcirugía (pinzas rectas de punta fina No.5 Dumont, microtijeras curvas Wecker 7mm, microtijeras vannas rectas 8mm, Microbisturí 3.5 mm, Foster City, CA. E.E.U.U.), siguiendo la metodología empleada por Huberman (com. pers.).

El procedimiento se realizó mediante la eliminación de la cutícula del tallo ocular (Fig. 5A), seguida de la remoción del tejido muscular. Una vez liberado el nervio óptico se ubicó el nacimiento de la glándula sinusal en la *medulla terminalis*, la glándula sinusal se evidencia por su color azul opalescente, que resalta del color blanco translúcido característico del tejido nervioso (Fig. 5B). Ubicada la GS se desprendió el tejido pigmentario de la retina, exponiendo la *medulla interna*, *medulla externa* y *lamina ganglionaris*. Se disecó el tejido con precaución hasta liberar completamente la glándula sinusal (Fig. 5C) y se cortó el fragmento de tejido que la contiene. Las GS fueron depositadas en microtubos de 1.6 mL de volumen que contenían aproximadamente 100 glándulas por cada 0.5 mL de solución salina (NaCl 0.9% pH 7.4) y almacenadas a -80°C.

5.4 OBTENCION DEL EXTRACTO SOLUBLE DE LA GS.

Las GS fueron descongeladas y en grupos de 1000 glándulas se homogeneizaron por maceración mecánica en Potter de vidrio esmerilado (Potter Elvehjem No. 23, Kontes Glass Co., Vineland, N.J., E.E.U.U.); la solución y los restos celulares

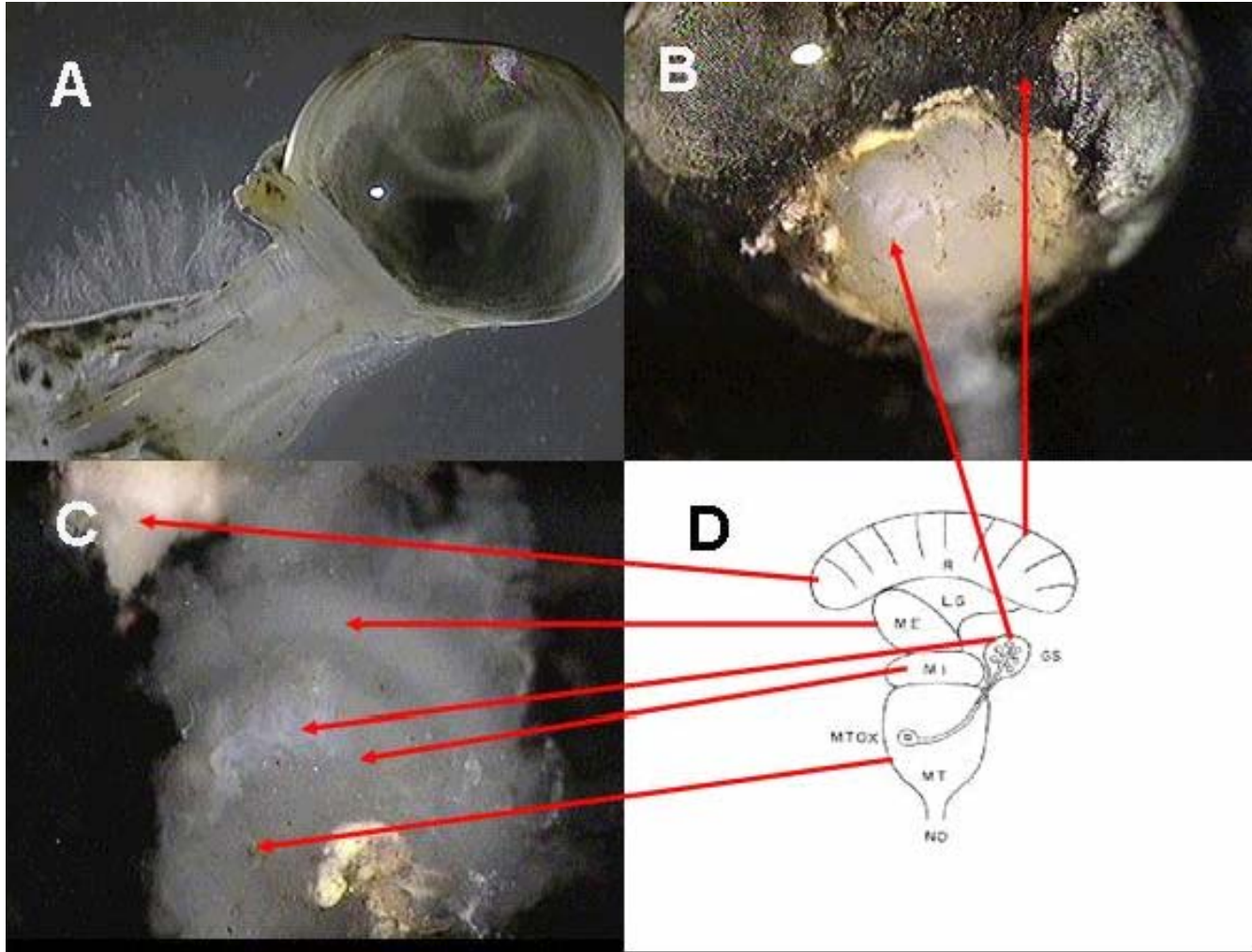


FIGURA 5. Esquema de extracción por microdissección de la glándula sinusal en organismos juveniles de *Penaeus vannamei*. A,B,C) microfotografías del tallo ocular y la glándula sinusal, las microfotografías se tomaron con aumento de 4x. D) Modelo de la organización anatómica del tallo ocular en crustáceos decápodos. Retina, R; lamina ganglionaris, LG; medulla externa, ME; medulla interna, MI; glándula sinusal, GS; medulla terminalis-órgano X, MTOX; medulla terminalis, MT; nervio óptico, NO. Tomado de Huberman A. y Aguilar M. B. 1988.

fueron procesados siguiendo la metodología de Aguilar y Huberman (1992). En un equipo de ultrasonicación (Ultra Sonic Homogenizer 4710 Series, Chicago, Illinois, E.E.U.U.); las glándulas fueron nuevamente homogeneizadas por tres pulsos de 30 segundos a 60 W de potencia y un lapso de espera de 30 segundos entre cada pulso, manteniendo el recipiente en baño de hielo. Posteriormente la solución fue centrifugada en un equipo de ultracentrifugación (Ultracentrifuge L7, Beckman, Fullerton, California, E.E.U.U.) a 108 000xg durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó y el botón de fondo fue resuspendido en 0.8 mL de H₂O bidestilada y centrifugado bajo las mismas condiciones, esta operación se realizó en dos ocasiones. Los tres sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados a 356 000xg durante 30 min a 4°C, el sobrenadante final fue recuperado y filtrado por vacío en una membrana de filtración con tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore, Massachussets, E.E.U.U.), esta solución se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.5 PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DEL TALLO OCULAR.

Se utilizaron dos organismos juveniles de *Penaeus vannamei*, uno macho y otro hembra, con peso entre 15 y 20g. Los tallos oculares de ellos fueron seccionados y destinados al estudio histológico de la glándula sinusal usando la metodología para camarones empleada por Bell y Lightner (1988), con ligeras modificaciones. Los tallos fueron fijados inmediatamente en solución de Davidson (alcohol etílico 96° 33%, formaldehído 22%, ácido acético 11.5%, agua marina filtrada 33.5%). Posteriormente fueron deshidratados mediante inmersiones

consecutivas en soluciones de etanol de concentración creciente (70 a 100%), incluidos en parafina, cortados en capas delgadas de 5 μm de grosor y montados secuencialmente en portaobjetos de vidrio. Enseguida, los cortes se tiñeron por la técnica de hematoxilina-eosina y finalmente las preparaciones fueron montadas en solución de montaje Entellan (Sigma Chemical Co.). Las preparaciones fueron observadas en microscopio de luz (Olympus BX41, Melville, N.Y., E.E.U.U.).

5.6 DISEÑO Y ELABORACIÓN QUÍMICA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS.

La selección de los fragmentos a sintetizar se realizó mediante la comparación de tres GIH de crustáceos decápodos. Estas tres hormonas se encuentran registradas en la base bioinformática del National Center for Biotechnology Information (NCBI Entrez Protein). La secuencia primaria de la GIH de *Homarus americanus* purificada por cromatografía en HPLC-RP, secuencia con clave de registro P55320; la secuencia de aminoácidos deducida a partir del precursor de la GIH de *Nephrops norvegicus* con clave de registro AAK58133 y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del precursor de la GIH de *Metapenaeus ensis*, con clave de registro AAL33882.

Se seleccionaron dos fragmentos de la GIH de *M. ensis*. El primero de ellos fue nombrado P1, consta de 19 residuos de longitud, inicia en la posición 11 y termina en el residuo 29 del péptido maduro. El segundo fragmento seleccionado se

denominó P3, este fragmento se compone de 18 residuos de aminoácidos de longitud que inician en el residuo 60 y terminan en el aminoácido 77 (Fig. 6).

Además del criterio de identidad utilizado para la selección de los fragmentos, se observó la factibilidad para la síntesis química de dichos péptidos por el método de Fmoc (Stuber, *et al.* 1989).

En el método de síntesis por Fmoc en fase sólida cada aminoácido presenta su grupo amino protegido con 9-fluoroenilmetiloxycarbonil (aa-Fmoc). Los aminoácidos Fmoc y los reactivos de activación (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU, por sus siglas en inglés) 0.38 M en dimetilformamida (DMF)) y acoplamiento (N-hidroxibenzotriazol (HOBt) 0.38 M en DMF, N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) 0.742 mg/mL) fueron agregados al frasco de síntesis en la siguiente proporción:

aa-Fmoc :HBTU : HOBt : DIPEA

1 : 1 : 1 : 2

Los cálculos elaborados para la síntesis de los péptidos P1 y P3 se realizaron con la intención de obtener 20 mg de péptido sintético final; para minimizar posibles problemas en la productividad del péptido se triplicaron las cantidades. Por lo que

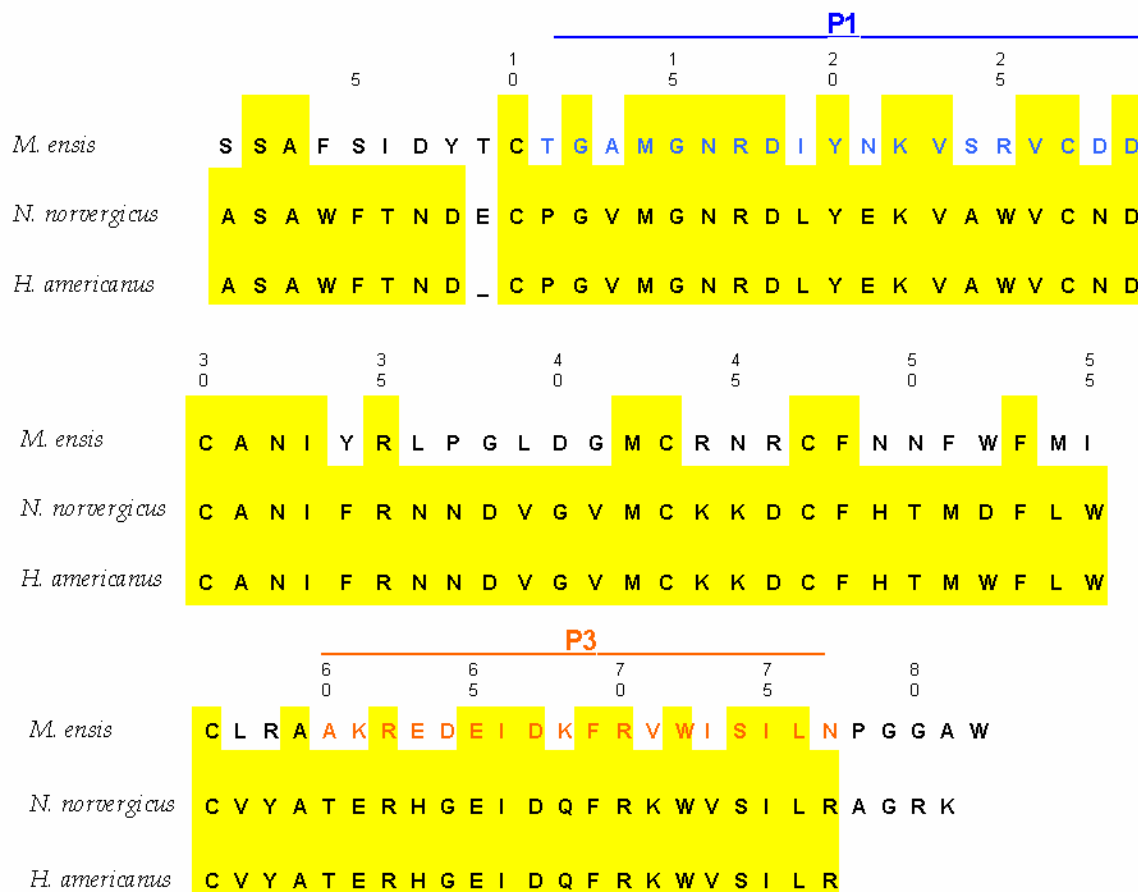


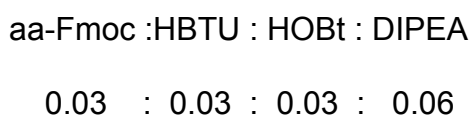
FIGURA 6. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la GIH de *Metapenaeus ensis*, *Nephrops norvegicus* y *Homarus americanus*. Se observan los fragmentos seleccionados para su síntesis química: P1, fragmento con mayor identidad en las tres hormonas; P3, fragmento con menor identidad entre la GIH de *M. ensis* y las dos hormonas restantes. Tomado de Soyez *et al.* 1991; Edomi *et al.* 2002; Chan y Gu, 2000.

los volúmenes de aminoácidos y los reactivos se ajustaron a la siguiente proporción:

aa-Fmoc :HBTU : HOBt : DIPEA

3 : 3 : 3 : 6

Primeramente se calculó el peso molecular aproximado de los péptidos a sintetizar (No. de residuos de aminoácidos por el peso molecular promedio de los aminoácidos, 115); lo que corresponde a 2185 para el P1 y 2070 para el P3, de forma que 20 mg del péptido corresponde a aproximadamente 0.01 mmol. La proporción de los aminoácidos y los reactivos expresados en mmol se ajusta a:



Inicialmente el frasco para síntesis fue lavado con una solución detergente (Hextran/diclorometano en proporción 1:1), enjuagado con H₂O destilada y secado a 300°C. Posteriormente se silanizaron las paredes del frasco con triclorometilsilano durante 4 horas en agitación constante.

La técnica de síntesis de péptidos se basa en el acoplamiento del primer aminoácido a una fase sólida, resina de *p*-metil-benzhidramina.HCl (MBHA, por sus siglas en inglés). Previamente la resina fue pesada para obtener 0.01 mmol de la misma y tratada con una solución de desprotección (piperidina al 20% en DMF) durante 3 minutos en agitación, posteriormente esta solución fue eliminada por vacío y se aplicó nuevamente solución de desprotección fresca durante 20 minutos en agitación constante. La resina fue lavada en flujo con DFM durante 30 segundos y una pequeña cantidad de esta se recuperó para analizar la presencia de aminas libres por el método de Kaiser *et al.* (1969), si la resina no presentó la

desprotección de sus grupos aminos, el paso de desprotección fue repetido hasta que la prueba de Kaiser resultara positiva.

El método de Kaiser requiere de tres soluciones: solución I (0.5 g de ninhidrina en 10 mL de etanol), solución II (8 g de fenol en 2 mL de etanol), solución III (9.8 mL de piridina destilada y 0.2 mL de cianuro de potasio 0.001 M). Se agregó una gota de cada una de las soluciones en un tubo de vidrio que contenía la muestra de la resina y en un tubo sin muestra como control negativo y se calentaron a 110°C durante 6 minutos. La solución se torna azul si existen grupos aminos libres o permanece amarilla si no existen grupos aminos libres.

Una vez que la resina presentó los grupos aminos libres se procedió a la activación del primer aminoácido. Se pesaron los miligramos correspondientes a 0.03 mmol del aminoácido en cuestión y se mezcló con el volumen correspondiente a 0.06 mmol de DIPEA como activador, esta solución se agita durante 2 minutos y se agregan los reactivos de acoplamiento HBTU 0.03 mmol y HOBt 0.03 mmol, inmediatamente la solución fue vertida en la resina donde permaneció en agitación constante por 15 minutos. Posteriormente la resina se lavó en flujo con DMF por 30 segundos y se tomó una pequeña muestra de la resina para la prueba de Kaiser. Cuando la prueba resultó positiva se repitió la operación de activación y acoplamiento del aminoácido, de caso contrario se procedió a la desprotección del aminoácido acoplado en la misma forma como se describió para la desprotección de la resina.

Los procesos de desprotección, activación y acoplamiento se repitieron hasta terminar con la secuencia completa de aminoácidos presentes en el péptido. Cuando el último aminoácido se acopló, la desprotección final se realizó mediante un lavado de la resina con diclorometano y secado en vacío, seguido de un nuevo lavado con etanol absoluto y secado en vacío. La resina se guardó a 4°C hasta su rompimiento.

El rompimiento de los péptidos de la resina se realizó de la manera siguiente. La resina fue secada en vacío durante 2 horas, y se agregó 2.5 mL de la solución de rompimiento reactivo K (ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) 4.2 mL, fenol 250 mg, DL-ditiotreitol (DTT) 50 mg, H₂O 0.25 mL, tioanisol 0.25 mL), se agitó por una hora con agitador magnético, si el péptido contenía argininas se dejó 30 minutos más por cada arginina presente. En tubos para centrifugación de 50 mL (Corning, N. Y., E.E.U.U.) se vertieron 45 mL de dimetilterbutileter (DTE) y se mantuvieron en baño de hielo dejando caer muy lentamente por goteo el reactivo K para propiciar la precipitación del péptido, una vez terminado el goteo la resina se lavó en dos ocasiones con 0.5 mL de TFA realizando nuevamente el goteo. En seguida los tubos fueron centrifugados a 2 000xg en una centrifuga (Beckman J2-HS), por 5 minutos a 4°C, se desecho el sobrenadante y se resuspendió el botón del fondo con 10 mL de DTE y se centrifugó bajo las mismas condiciones; esta operación se realizó en dos ocasiones. Se dejó evaporar completamente el DTE

del botón de fondo y se resuspendió en H₂O destilada, si el péptido no se disolvía se le agregaba ácido acético glacial al 5 % a la disolución.

Una vez terminado el rompimiento y la precipitación, los péptidos fueron liofilizados y almacenados a -4°C. Como estos péptidos se emplearían para la generación de sueros hiperinmunes se decidió no realizar la purificación de estos por HPLC-RP y preparar los antígenos usando el producto liofilizado de los péptidos P1 y P3 para desarrollar los protocolos de inmunización en ratones y conejos.

5.7 PREPARACIÓN E INMUNIZACIÓN DE ANTÍGENOS.

Los péptidos sintéticos P1 y P3 fueron polimerizados con glutaraldehído, para incrementar su capacidad inmunoestimulante, siguiendo el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988). Los péptidos polimerizados se disolvieron en una solución de amortiguador salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), (fosfato de potasio dibásico 0.015 M, fosfato de potasio monobásico 0.015 M, cloruro de sodio 0.15 M; pH 7.4), se agregó adyuvante completo de Freund (ACF) o adyuvante incompleto de Freund (AIF), en proporción de 1:1, se emulsificó perfectamente y se inyectó en los animales por vía subcutánea de acuerdo al protocolo de la Tabla I.

TABLA I. Esquema de Inmunización de los péptidos sintéticos P1 y P3 en ratones y conejos.

- a) Día 1. Sangrado preinmune.*
Inmunización con 100 µg antígeno + 50 µL PBS + 50 µL ACF por ratón.
- Día 7. Primera reinmunización.
Reinmunización con 50 µg antígeno + 50 µL PBS + 50 µL AIF por ratón.
- Día 15. Segunda reinmunización.
Reinmunización con 50 µg antígeno + 50 µL PBS + 50 µL AIF por ratón
- Día 28. Sangrado hiperinmune.**
- b) Día 1. Sangrado preinmune.***
Inmunización con 50 µg antígeno + 500 µL PBS + 500 µL ACF por conejo.
- Día 7. Primera reinmunización
Reinmunización con 70 µg antígeno + 500 µL PBS + 500 µL AIF por conejo.
- Día 30. Segunda reinmunización
Reinmunización con 70 µg antígeno + 500 µL PBS + 500 µL AIF por conejo.
- Día 37. Sangrado hiperinmune.****

* 100µL por ratón. ** 1mL por ratón. *** 5mL por conejo. **** 45 mL por conejo. ACF (adjuvante completo de Freund); PBS (amortiguador salino de fosfatos); AIF (adjuvante incompleto de Freund).

Los animales utilizados en la inmunización fueron producidos y mantenidos en el bioterio de CIBNOR en condiciones óptimas de manejo y alimentación: alimento especial para animales de laboratorio (Purina, Cd. de México, México), agua purificada y aserrín esterilizado.

Se utilizaron 10 ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa CD1 con cuatro semanas de edad y 20 a 25 g de peso. El programa de inmunización se puede observar en la Tabla Ia. Los ratones se manejaron en cajas de acrílico con 5 animales por caja y se dividieron en dos grupos de 5 ratones cada uno. El grupo

uno recibió una dosis de 100 μ L por ratón de una emulsión con el péptido sintético P1 polimerizado en concentración de 1 mg/mL y dos dosis posteriores de 100 μ L por ratón del péptido sintético P1 polimerizado en concentración de 0.5 mg/mL. El grupo dos recibió tres dosis de 100 μ L por ratón de una emulsión que contenía el péptido sintético P3 bajo las mismas condiciones que el primer grupo.

Dos conejos hembra (*Sylvilagus floridanus*), raza Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso, fueron utilizados para la inmunización. El programa de inmunización se observa en la Tabla Ib. Un animal recibió una dosis de 1 mL de una emulsión con el péptido sintético P1 polimerizado en concentración de 0.05 mg/mL y dos dosis posteriores de 1 mL del péptido sintético P1 polimerizado en concentración de 0.07 mg/mL. Al otro conejo se le aplicaron tres dosis de 1 mL de una emulsión que contenía el péptido sintético P3 bajo las mismas condiciones que el primer animal.

5.8 OBTENCIÓN DE LOS SUEROS PREINMUNES E HIPERINMUNES DE RATÓN Y DE CONEJO.

Antes de iniciar la inmunización de los ratones se les extrajo, mediante una pequeña incisión del extremo de la cola, aproximadamente 100 μ L de sangre a cada ratón, obteniendo 2.5 mL totales de sangre, la cual se dejó en reposo por una hora a temperatura ambiente para permitir la coagulación de esta. Posteriormente fue removido el coágulo y el suero se centrifugó a 2000xg por 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C. Para el

sangrado hiperinmune se extrajo de 0.8 a 1mL de sangre aproximadamente por animal y la recuperación del suero hiperinmune fue realizada usando la metodología anteriormente mencionada. Cada uno de los sueros recuperados fueron denominados suero preinmune de ratón, suero hiperinmune de ratón antiP1 y suero hiperinmune de ratón antiP3.

El suero preinmune de conejo fue obtenido mediante el sangrado de 5 mL de la oreja del animal. El sangrado del suero hiperinmune se realizó extrayendo 45 mL de cada uno de los animales. La sangre de conejo fue procesada en forma idéntica a la anteriormente descrita para la obtención de suero de ratón. Cada uno de los sueros recuperados fueron denominados suero preinmune de conejo, suero hiperinmune de conejo antiP1 y suero hiperinmune de conejo antiP3.

Una vez culminados los protocolos de inmunización y obtenidos los sueros preinmunes e hiperinmunes de ratón y conejo antiP1 y antiP3, estos se almacenaron a -20°C hasta ser empleados, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), en pruebas de titulación de anticuerpos evaluando la capacidad inmunogénica de los péptidos sintéticos P1 y P3 y la capacidad de dichos sueros para generar reacción cruzada contra el extracto soluble de la GS y las fracciones obtenidas de la purificación de la GS por HPLC-RP.

5.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN SOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

El contenido de proteína total fue estimado usando el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron de 1 a 10 μL de cada muestra y se diluyeron en un mililitro de H_2O bidestilada. Los valores obtenidos son aproximados y fueron comparados con una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) en concentraciones entre 5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La lectura de la densidad óptica a 595 nm de longitud de onda se realizó en un espectrofotómetro (Beckman DU 640).

5.10 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL EXTRACTO DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

La purificación del extracto soluble se realizó por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (HPLC-RP, por sus siglas en inglés). Se empleó como disolución A (TFA al 0.12% en agua tetradestilada) y como disolución B (TFA al 0.1 % en acetonitrilo). Se inyectó un mililitro de extracto soluble conteniendo 750 μg de proteína total, correspondiente a 30 GS aproximadamente, en una columna C_{18} semipreparativa en fase reversa y se utilizó un programa con un gradiente lineal de 0 a 60% de disolución B en 60 minutos, con un flujo constante de bombeo de 2 mL/minuto. La absorbencia fue leída a 215 nm de longitud de onda, en un equipo de HPLC (Waters 600E con detector de longitud variable uv/visible,

Milford, Massachussets, E.E.U.U.). Cada una de las fracciones obtenidas fue desecada en vacío y almacenada a -20°C hasta su uso.

5.11 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE-SDS).

Los componentes peptídicos del extracto soluble de la GS y sus fracciones purificadas por HPLC-RP fueron separados por PAGE-SDS, empleando el protocolo para moléculas de tamaños moleculares pequeños de 1 a 100 KDa. Este protocolo fue adaptado de la técnica PAGE-SDS en TRIS-tricina (Schägger y Von Jagow, 1987). Los geles de PAGE-SDS TRIS-tricina se elaboraron de forma discontinua con el segmento concentrador al 4% y la porción de separación al 16.5%. Para preparar dos minigeles de 1.5 mm de espesor son suficientes 15 mL de solución separadora en las siguientes proporciones: 5 mL de acrilamida-bisacrilamida 49.5% y 3% respectivamente (93g de acrilamida y 6g de bisacrilamida en 200 mL de H₂O destilada; esta disolución se filtró en vacío a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore)), 5 mL de amortiguador TRIS-SDS (TRIS base 3 M, SDS 0.3%, pH 8.45), 1.6 mL de glicerol, 3.45 mL de agua destilada, 0.15 mL de persulfato de amonio al 10% (PSA 10%) y 0.01 mL de catalizador N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED).

El segmento concentrador al 4% cubre aproximadamente un centímetro de longitud. Para preparar dos minigeles de 1.5 mm de espesor son suficientes 5 mL

de solución concentradora en las siguientes proporciones: 0.4 mL de acrilamida-bisacrilamida 49.5% y 3%, 1.25 mL de amortiguador TRIS-SDS, 3.35 mL de H₂O destilada, 0.06 mL de PSA 10%, 0.01 mL de TEMED. Los geles fueron elaborados de 12 a 24 horas antes de su uso y polimerizados a temperatura ambiente.

Treinta microgramos de proteína total de cada una de las muestras a separar fueron incubados con una disolución de desnaturalizante (TRIS base 0.0625 M pH 6.9, SDS 3%, N,N ácido etilendiaminotetracético (EDTA por sus siglas en inglés) 0.02 M, Mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.02% y sacarosa 0.1 M) en proporción 1:1 v/v, durante 15 minutos a 60°C en un incubador (Fisher Scientific, Dry bath incubator, Pittsburg, PA., E.E.U.U.). La electroforesis se desarrolló usando una solución amortiguadora TRIS-tricina (TRIS base 0.1 M, tricina 0.1 M, SDS 0.1%, pH 8.25) como fase móvil bajo un amperaje constante de 30 mA con un tiempo de corrimiento de 3 a 4 horas (hasta que el frente de corrimiento esté próximo a la base del gel). Empleando un sistema de electroforesis (Bio-Rad Protean 3 System) y una fuente de poder (Bio-Rad Power Pac 300). La tinción del gel se realizó por el método de tinción de plata para detección de proteínas derivada del método de Merrill (Merrill, *et al.* 1981).

5.12 SECUENCIACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.

Durante los procesos electroforesis, transferencia y tinción de la membrana para secuenciación es muy importante utilizar agua destilada estéril en la

preparación de las disoluciones o esterilizar las soluciones por filtración; manejar la membrana de secuenciación con pinzas y emplear guantes limpios para la manipulación del papel filtro y el gel de poliacrilamida. Esto con el objeto de evitar problemas por contaminantes durante la secuenciación.

Aproximadamente 100 μ g de proteína total de las fracciones que contenían la banda reconocida por los sueros hiperinmunes antiP1 y antiP3 fueron desnaturalizados y corridos en PAGE-SDS TRIS-tricina a 16.5%, como se describió en el apartado anterior. Posteriormente estas fracciones fueron transferidas a una membrana de secuenciación de difluoruro de polivinil (PVDF, por sus siglas en inglés) (Immobilon-SQ, Millipore). Se usó el método de transferencia semiseca (Towbin *et al.* 1979). La membrana de PVDF fue pretratada en metanol absoluto durante 5 min y posteriormente equilibrada en el amortiguador de Towbin (TRIS base 0.25 M, glicina 0.192 M, metanol 10% pH 8.3) durante 5 min. Igualmente se equilibraron dos hojas de papel filtro de 3mm de espesor en amortiguador de Towbin durante 10 min. Una vez terminada la migración electroforética el gel fue equilibrado en amortiguador de Towbin durante 2 min. Se realizó la transferencia semiseca colocando las partes en el siguiente orden: una hoja de papel filtro empapada en amortiguador de Towbin, la membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y finalmente la última hoja de papel filtro equilibrada en el amortiguador de Towbin. Es importante rodar un tubo de vidrio limpio sobre cada una de las partes con la finalidad de eliminar el exceso de

amortiguador y las burbujas que pudieran formarse entre las partes. La transferencia se desarrolló durante 45 min bajo un voltaje constante de 10 volts. Terminada la transferencia la membrana fue teñida en una solución de azul de Coomasie para secuencia, sin ácido acético ya que éste podría producir bloqueo del extremo amino (Azul de Coomasie R-250 0.025%, metanol 40%).

La banda transferida a la membrana de PVDF y teñida con azul de Coomasie fue secuenciada usando el método de degradación de Edman (Edman y Begg, 1967) en un secuenciador automatizado (Beckman LF3000 Series Protein Sequencer); se operó el secuenciador para la obtención de 25 ciclos. El equipo se encuentra en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México a cargo de Dr. Lourival D. Possani, jefe del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos.

5.13 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA GS Y SUS FRACCIONES PURIFICADAS USANDO SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 (WESTERN BLOT).

Los péptidos separados en los geles PAGE-SDS TRIS-tricina fueron transferidos a membranas de PVDF para inmunodetección (Immobilon-P Millipore) (Towbin *et al.* 1979), como se describió en el apartado anterior. Terminada la transferencia, la membrana fue lavada con una solución de amortiguador PBS.

El método de detección por Western blot empleado en este trabajo es derivado del método de inmunodetección de proteínas descrito por Brunette y Sambrook (Brunette, 1981; Sambrook y Russell, 2001). Una vez transferidas las bandas a la membrana, ésta se bloqueó con una disolución de amortiguador de PBS y BSA al 5% incubándose por una hora a 37°C. Enseguida la membrana fue incubada por tres horas a 37°C en una disolución de PBS-BSA 5% con el suero hiperinmune de conejo, desarrollado contra los péptidos sintéticos P1 ó P3, diluido en proporción de 1:15 ó 1:20. Posteriormente la membrana fue incubada por una hora a 37°C en una disolución de PBS-BSA 5% con suero monoclonal anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa en una dilución de 1:3000. Finalmente la membrana fue revelada usando una disolución cromogénica (amortiguador de acetato de amonio 0.1 M pH 5.4, *O*-fenil-diaminobencidina 0.25%, peróxido de hidrógeno al 0.005%). La disolución cromogénica es sensible a la luz por lo que se evitó en lo posible la incidencia de luz sobre la disolución y durante la incubación de la membrana. Las bandas positivas se tornaron de color ocre debido a la oxidación del compuesto cromogénico causada por acción de la peroxidasa sobre el peróxido de hidrógeno. Una vez reveladas las bandas, la reacción se detuvo lavando la membrana en PBS. Entre el bloqueo, cada una de las incubaciones y el revelado, la membrana fue lavada en PBS con Tween 20 al 0.05% por diez minutos, repitiendo la operación en dos ocasiones.

5.14 TITULACIÓN Y REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 POR ELISA.

El extracto de la GS y las diferentes fracciones obtenidas por HPLC-RP fueron evaluadas mediante la prueba de ELISA, usando placas de vinil de 96 pozos, cada uno con 300 μ L de capacidad y nivel de adherencia media (Costar, Massachussets, E.E.U.U.). Esta técnica es modificada del método desarrollado por Miles y Hales (1968) y Harlow y Lane (1988). Las pruebas de titulación de anticuerpos se realizaron por duplicado agregando a los pozos 150 μ L de una disolución que contenía amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5 y NaN_3 al 0.05% como conservador), y los péptidos usados como antígenos en concentración de 50 μ g/mL, durante 2 horas a 37°C. Posteriormente los pozos fueron bloqueados con 200 μ L de una disolución de PBS-BSA al 3% durante una hora a 37°C. Enseguida se agregaron 150 μ L por pozo de una solución de suero de preinmunes o hiperinmunes de ratón (suero antiP1 y antiP3, en diluciones de 1:20 y 1:50 respectivamente, diluidas con la disolución de PBS-BSA 3%, las placas se lavaron por dos horas a 37°C. El suero anti-IgG de ratón (suero de ratón anti-IgG) se lavó con solución de fosfato alcalina en dilución 1:3000 y diluido en PBS-BSA 3% fue aplicado en volúmenes de 150 μ L por pozo y se incubó por una hora a 37°C. El revelado se efectuó empleando un Kit comercial SIGMA FAST de paranitrofenilfosfato (pNPP), siguiendo las indicaciones del fabricante (Sigma Chemical Co.), durante el revelado la placa fue protegida de la acción de la luz. La

placa fue leída, 30 minutos después de agregada la solución cromogénica, a 405nm de longitud de onda en un equipo lector de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Boston, E.E.U.U.). Después de la aplicación del antígeno a la placa, el bloqueo con PBS-BSA, la incubación de los sueros de ratón o conejo y la incubación del anticuerpo acoplado a la enzima, la membrana fue lavada con 200 μ L por pozo, usando una solución de PBS con Tween 20 al 0.05%, en tres ocasiones durante cinco minutos cada una.

6. RESULTADOS.

6.1 HISTOLOGÍA DEL TALLO OCULAR DE *Penaeus vannamei*.

Los cortes histológicos están ejemplificados por la figura 7 que muestra el tallo ocular de un macho: se observa la retina en la parte izquierda, una franja de tejido celular correspondiente a la *lamina ganglionaris* colindante con la retina y la *medulla externa* y la glándula sinusal entre la *medulla interna* y la *medulla externa*. La GS se ubica en la vecindad del seno hemolinfático y se reconoce por la presencia de abundantes vacuolas secretoras que se tiñen en color violáceo por la hematoxilina y se presentan en color oscuro en la microfotografía. La GS presenta una longitud entre los 350 y 400 μm . No se observaron diferencias histológicas en los tallos oculares ni en las características de la GS de ambos sexos analizados.

6.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

La tabla II muestra el rendimiento obtenido en proteínas totales a partir de 238 GS homogeneizadas. Este extracto fue destinado para las pruebas inmunoquímicas del extracto completo y en la separación por electroforesis. Los resultados muestran que el porcentaje de extracción de proteínas solubles ronda entre el 30% y la cantidad de proteína total por glándula se encuentra próxima a 25 μg . Los procedimientos de homogeneización de los grupos de mil glándulas muestran rendimientos similares a este.

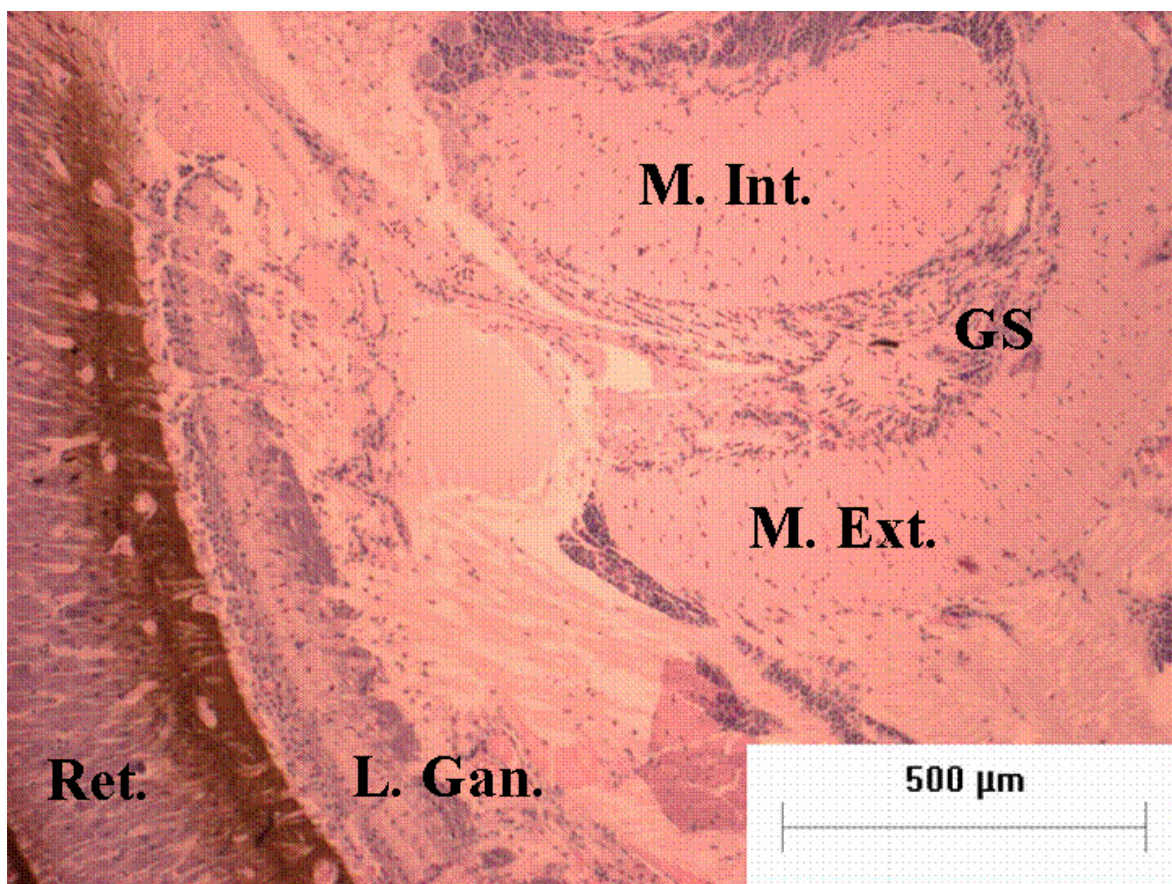


FIGURA 7. Microfotografía del tallo ocular de *Penaeus vannamei*. Retina, Ret.; lamina ganglionaris, L. Gan.; medulla interna, M. Int.; medulla externa, M. Ext.; Glándula sinusal, GS.

6.3 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE DE LA GS.

A partir del cromatograma generado se reconocieron 22 fracciones distintas (Fig. 8). La más hidrofílica (F1) aparece en el minuto 6.8 y la más hidrofóbica (F22) eluye sobre el minuto 60. Las fracciones de la F1 a la F13 se reconocen como los componentes más hidrofílicos al eluir durante los primeros 30 minutos de la corrida; cuándo estas fracciones se corrieron en PAGE-SDS no se tiñeron bandas por la técnica de tinción con plata. Las fracciones F14 a F22 muestran una mezcla

TABLA II. Rendimiento de extracción de proteínas totales de 238 glándulas sinusales de *Penaeus vannamei*.

Proceso	Volumen	Volumen	Abs.	Conc.	Proteína		Proteína
	Total (mL)	muestra* (μ L)	595 nm	Calculada (μ g/mL)	Total (mg)	Rendimiento	Total / Glan (μ g)
Homogeneizado	3.5	2	0.0694	11.09	19.42	100	81.59
Centrifugación	8	10	0.0471	7.52	6.016	30.97	25.27
Filtración 22 μ m	8	10	0.0465	7.43	5.944	30.60	24.97
Conc. al vacío	0.142	1	0.2697	43.10	6.120	31.51	25.71

*El volumen de la muestra se ajustó a un mililitro con H₂O bidestilada.

compleja de bandas cuando son separadas por PAGE-SDS y son sensibles a la tinción con plata, lo que evidencia su naturaleza peptídica.

La fracción más abundante corresponde la F20 que se encuentra en un porcentaje del 26.6% del total de la solución inyectada. A ella le siguen la F2 con el 20.3%, la F21 con 12.8% y la F7 con un 7.8%. Todas las demás fracciones tienen porcentajes menores al 5%.

6.4 TITULACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE ANTIP1 Y ANTIP3.

Tanto en el suero murino como en suero de conejo se observa una buena respuesta después de la segunda inmunización para ambos péptidos (Fig. 9). Las curvas de titulación registradas para los sueros antiP1 y antiP3 presentan la curva exponencial característica en la titulación de sueros hiperinmunes; aun cuando las menores diluciones evaluadas, (1:200 en ratón y 1:100 en conejo) no

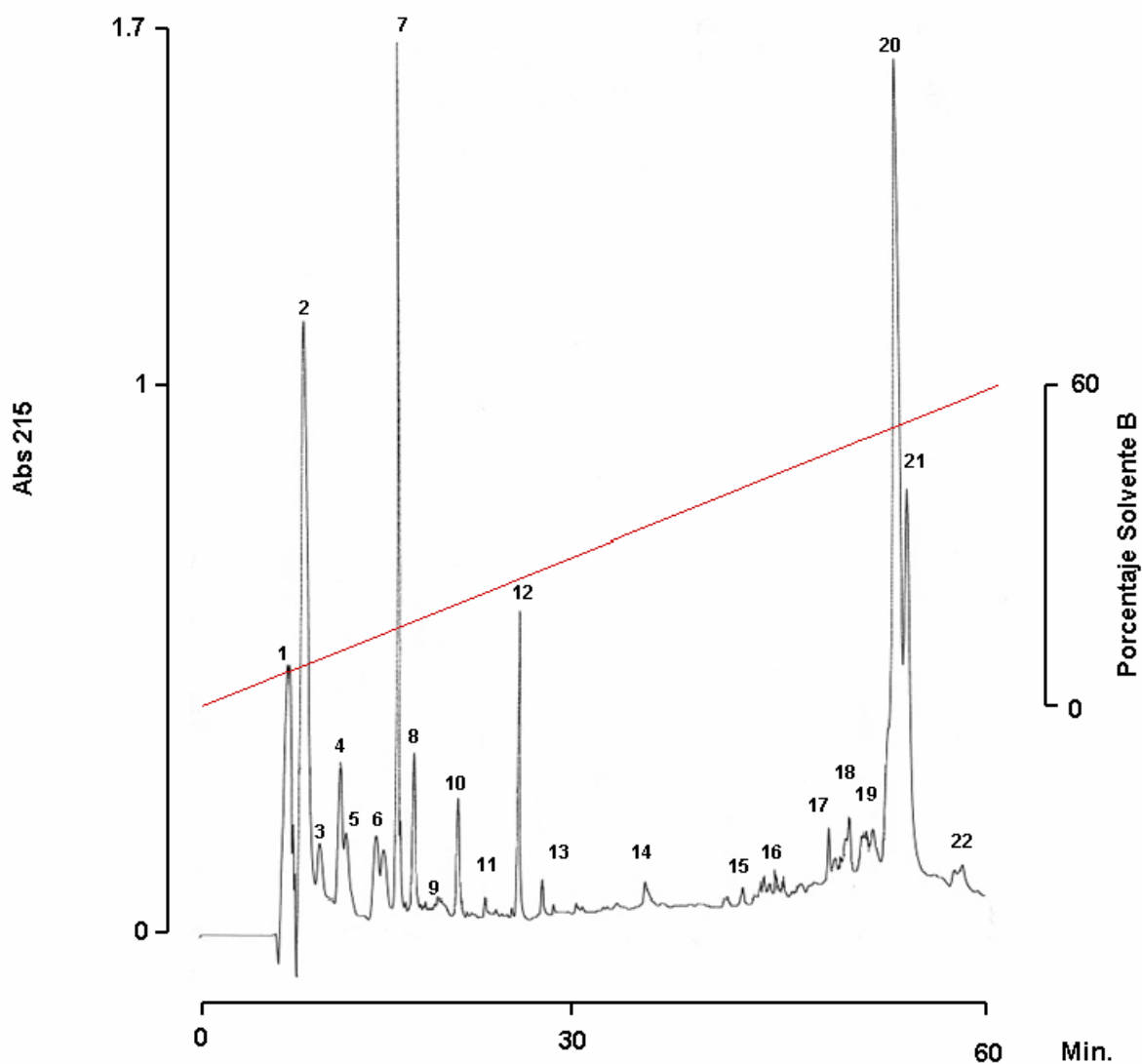


FIGURA 8. Cromatograma del extracto soluble de la glándula sinusal de *Penaes vannamei*. Purificación por HPLC-RP, usando como disolución A (ácido trifluoroacético al 0.12% en agua tetradestilada) y como disolución B (ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo). Se inyectó un mililitro del homogeneizado por corrida, correspondiente 350 μ g de proteína total, 30 GS aproximadamente, en una columna C₁₈ semipreparativa en fase reversa; utilizando un programa con un gradiente lineal de 0 a 60% de solución B en 60 minutos y con un flujo constante de bombeo de 2 mL/minuto, la absorbencia fue leída a 215 nm de longitud de onda.

se ubican en la zona de saturación de la curva. Los sueros preinmunes muestran lecturas bajas en todas las diluciones evaluadas. El suero antiP1 de ratón muestra

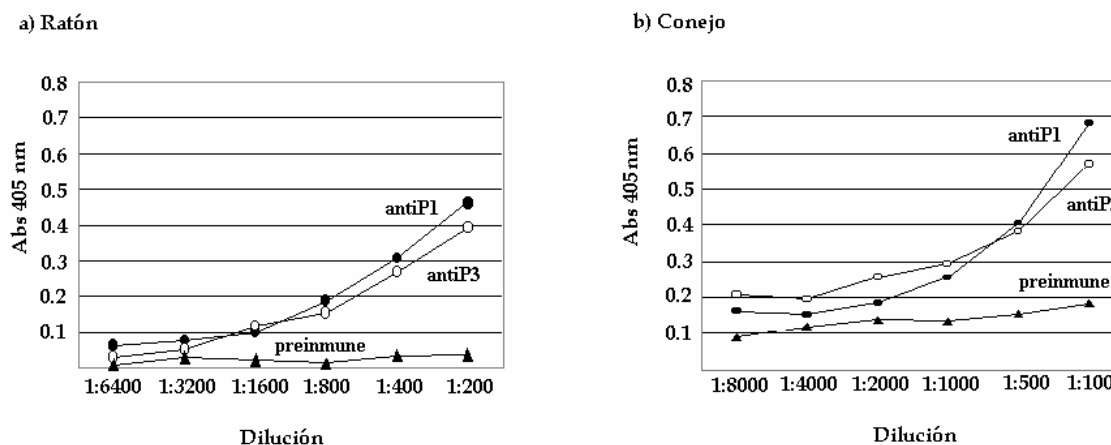


FIGURA 9. Curvas de titulación de anticuerpos de los sueros antiP1 y antiP3 contra el antígeno utilizado en su inmunización. a, sueros murinos hiperinmunes y preinmunes. b, sueros de conejo hiperinmunes y preinmunes. Los círculos negros corresponden a suero hiperinmune antiP1 contra el péptido sintético P1 empleado como antígeno; los círculos blancos corresponden al suero hiperinmune antiP3 contra el péptido sintético P3 empleado como antígeno; los triángulos negros corresponden al suero preinmune contra el péptido sintético P3. El antígeno fue diluido a una concentración de 50 μ g/mL, la absorbancia se leyó a 405 nm de longitud de onda.

la absorbancia más alta en la dilución 1:200 con un valor de 0.464 UA, la dilución 1:1600 muestra valores que no se diferencian mucho de diluciones mayores 1:3200 ó 1:6400, pues tienen valores de 0.098, 0.078 y 0.064 UA respectivamente. Sin embargo, la dilución 1:800 muestra una lectura elevada 0.189 UA con respecto al suero preinmune que tiene como lectura máxima 0.037 UA (Fig. 9a). El suero murino antiP3 muestra una curva similar a la del suero antiP1 y la absorbancia mayor corresponde a la dilución 1:200 con una lectura de 0.391 UA. La dilución 1:1600 con 0.115 UA es la dilución más alta del suero antiP3 en la cual persiste diferencia con las lecturas del suero preinmune. Diluciones mayores como 1:3200 y 1:6400 muestran lecturas de 0.052 y 0.029 UA. Estas diluciones presentan

magnitudes muy cercanas a los valores reportados para el suero preinmune de ratón (Fig. 9a).

Los sueros hiperinmunes de conejo presentan las absorbencias máximas de 0.570 y 0.681 UA en las diluciones 1:100, tales valores resultan mayores que las lecturas reportadas para los sueros de ratón, aunque esta dilución es menor que la dilución evaluada para los sueros murinos 1:200. Sin embargo, los valores de los sueros de conejo en dilución 1:500 con 0.382 y 0.406 UA son mayores que los valores de los sueros murinos en dilución 1:400 con 0.307 y 0.268 UA (Fig. 9b).

Para los sueros hiperinmunes de conejo antiP1 y antiP3 la curva que se forma de la dilución 1:100 a la dilución 1:1000 muestra una pendiente más elevada comparada con la pendiente de la curva que forman las diluciones mayores (de la dilución 1:2000 a la dilución 1:8000). Esta última curva muestra una pendiente semejante a la pendiente de la curva del suero preinmune.

6.5 REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 CONTRA EL EXTRACTO SOLUBLE DE LA GLÁNDULA SINUSAL.

El suero de ratón antiP3 registra la mayor absorbencia con 0.350 UA seguida por el suero murino antiP1 con 0.110 UA y finalmente el suero preinmune con 0.070 UA (Fig. 10a). El ensayo con los sueros de conejo muestra en primer plano al suero antiP1 con 0.205 UA como el suero con mayor absorbencia en la reacción cruzada contra el extracto de la GS, en segundo término se ubica el

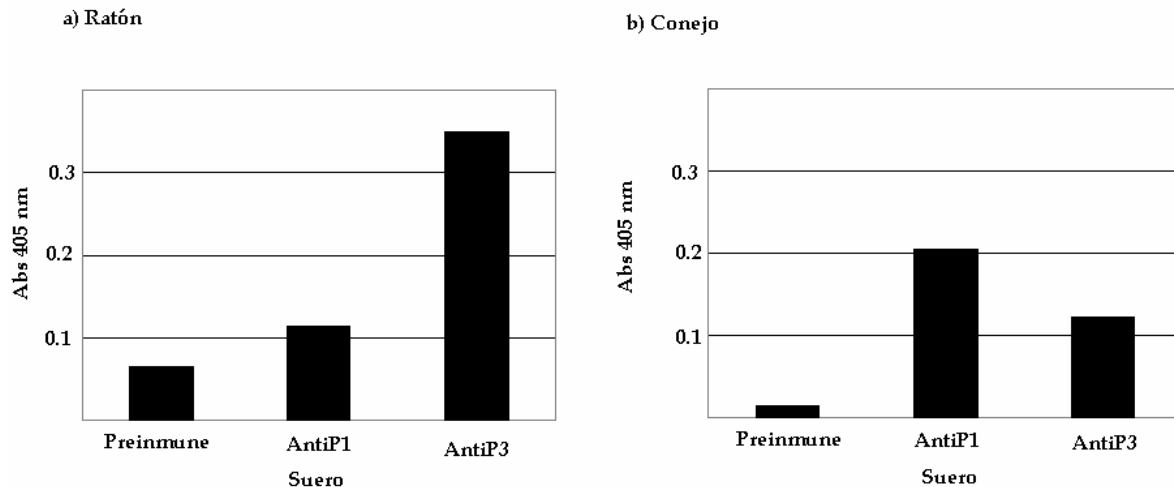


FIGURA 10. Ensayos inmunoquímicos de ELISA de los sueros hiperinmunes de ratón y conejo antiP1 y antiP3 contra el extracto soluble de la glándula sinusal de *Penaeus vannamei*. a) Valores obtenidos por ELISA de los sueros murinos preimmune, antiP1 y anti P3 en dilución 1:50. b) Valores obtenidos por ELISA de los sueros de conejo preimmune, antiP1 y antiP3 en dilución 1:50. El antígeno fue diluido a una concentración de 50 μ g/mL, la absorbencia se leyó a 405 nm de longitud de onda.

suero antiP3 con 0.121 UA, el suero preimmune muestra una reacción cruzada evaluada en 0.014 UA (Fig. 10b).

6.6 REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS SUEROS ANTIP1 Y ANTIP3 CONTRA LAS FRACCIONES PURIFICADAS POR HPLC-RP.

El suero antiP1 de ratón y de conejo resultó ser mucho más específico que el suero antiP3 de ambos animales, pues además de mostrar reacción cruzada contra el extracto crudo de la GS muestra una elevada reacción cruzada contra las fracciones 20 y 21 cuando se empleó el suero de ratón y contra las fracciones 21 y 22 cuando se evaluó el suero de conejo (Fig 11a y Fig. 11c). El suero antiP3 de ratón y conejo por el contrario, muestra mucha inespecificidad al reaccionar contra

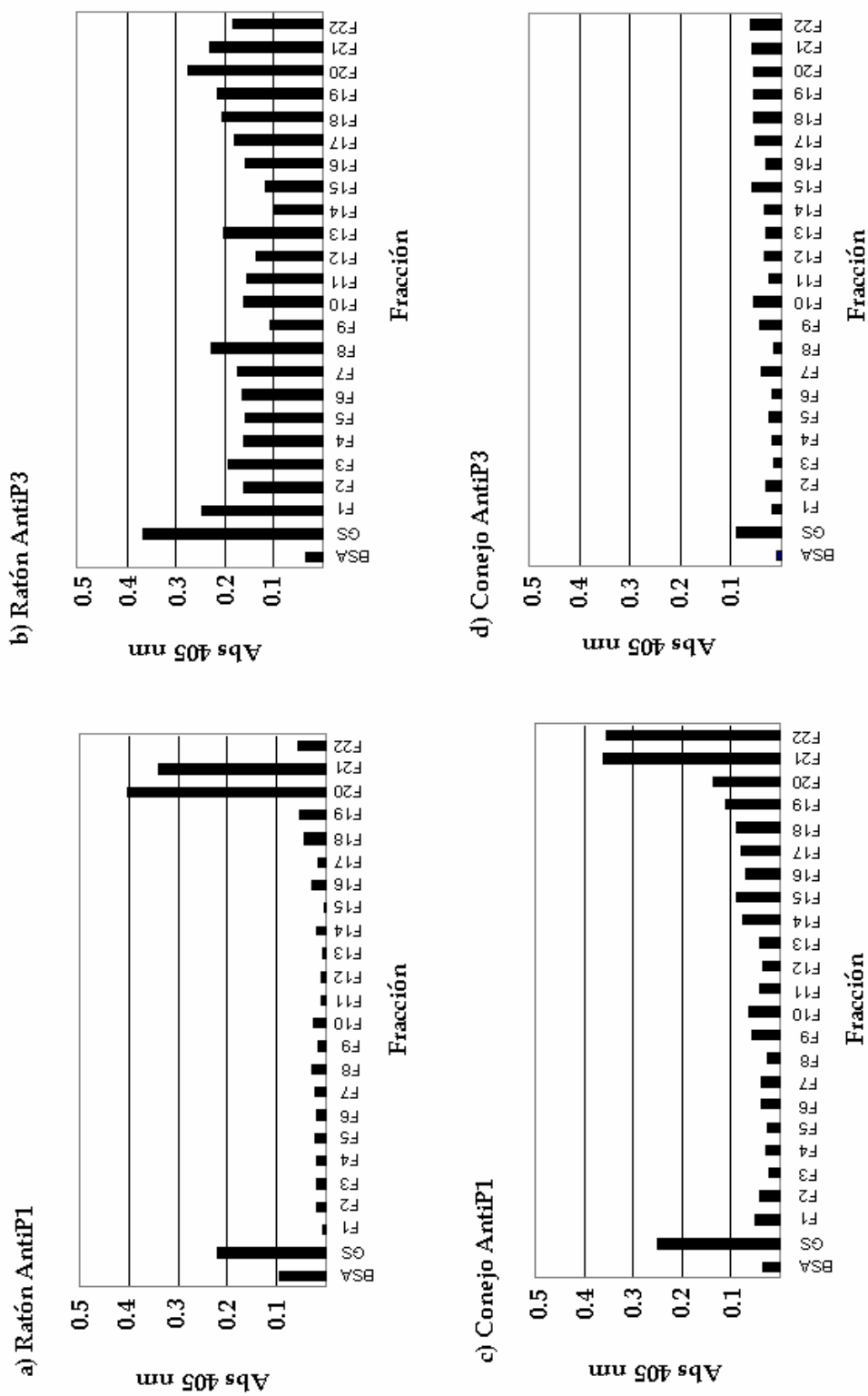


FIGURA 11. Ensayos inmunológicos de ELISA de los sueros hiperinmunes de ratón y conejo antiIP1 y antiIP3 contra el extracto soluble de la glándula sinusal de *Penaeus aztecus* y las 22 fracciones de purificación por HPLC-RP. a) suero murino antiIP1. b) suero murino antiIP3. c) suero de conejo antiIP1. d) suero de conejo antiIP3.

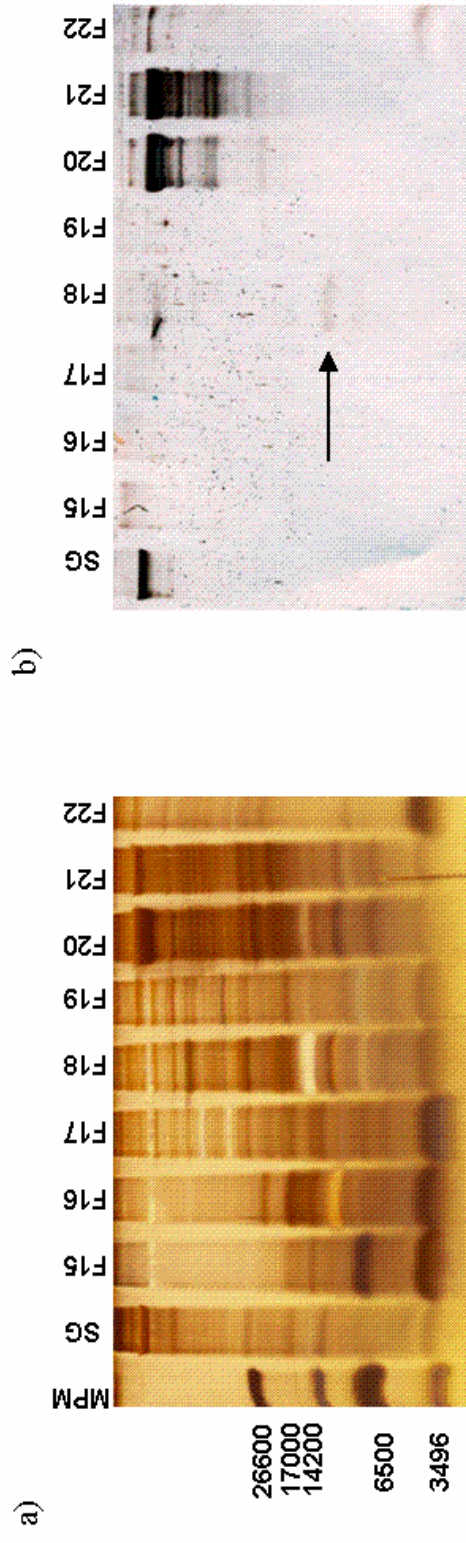
el extracto soluble de la glándula y prácticamente contra las 22 fracciones resultantes de la purificación. Resalta el hecho de que el suero hiperinmune antiP3 en diluciones tan pequeñas como las empleadas en este ensayo (1:20 para sueros de ratón y 1:50 para los sueros de conejo) reporta un valor bajo contra la albúmina.

Las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22 muestran los valores más altos por reacción cruzada contra el suero antiP3 de ratón y las fracciones 15, 18, 19, 20, 21 y 22 muestra los valores máximos contra el suero antiP3 de ratón (Fig. 11b y Fig. 11d).

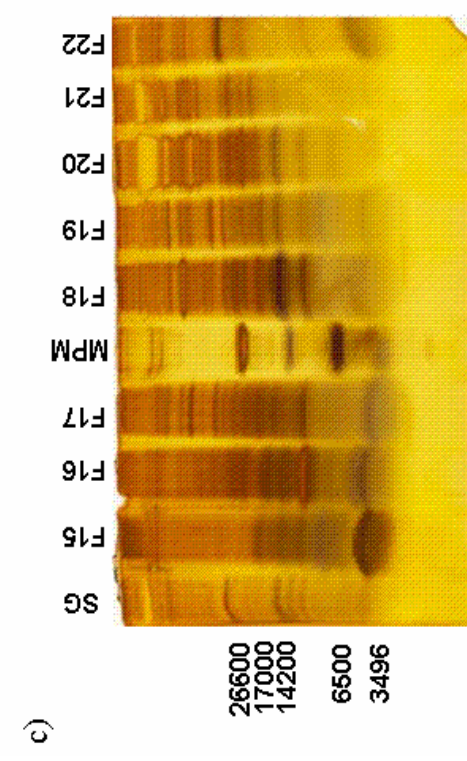
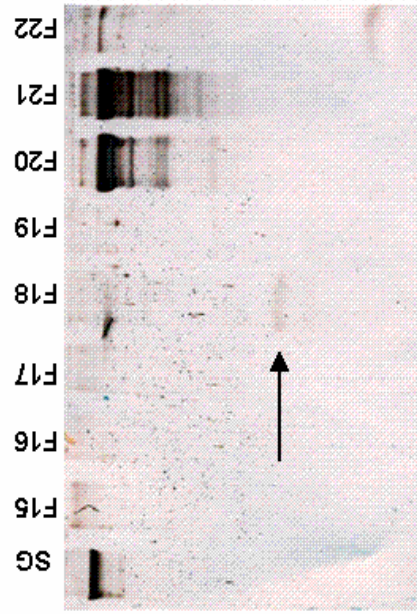
6.7 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS USANDO SUERO ANTIP1 Y ANTIP3 (WESTERN BLOT).

Los sueros hiperinmunes antiP1 y antiP3 de conejo se emplearon para detectar las bandas con reacción positiva presentes en las fracciones purificadas por HPLC-RP separadas por PAGE-SDS (Fig. 12).

En un par de geles de poliacrilamida se cargaron las muestras del extracto soluble de la GS y las fracciones de la F15 a la F22. Uno de ellos fue teñido con plata, donde se observó la presencia de péptidos de tamaños variados en las diferentes fracciones purificadas por HPLC-RP (Fig. 12a y Fig 12c). El otro gel se destinó para la transferencia a membranas de PVDF y revelado inmunoenzimático. En estas membranas se reconocen diversas bandas positivas a los sueros hiperinmunes de conejo antiP1 y antiP3 (Fig. 12b y Fig. 12d). Cuando se empleó



b)



d)

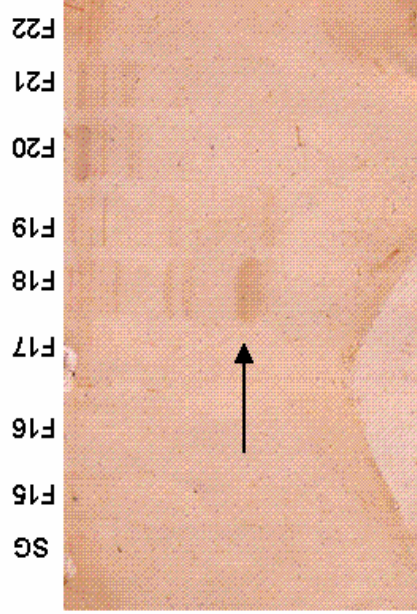


FIGURA 12. a, c) Electroforesis desnaturalizante en tricina PAGE-SDS TRIS-Tricina al 16.5% del extracto soluble de la glándula sinusal de *Penaeus aztecus* y las fracciones purificadas por HPLC-RP de la fracción 15 a la fracción 22; MPM, marcador de peso molecular aproximado con un intervalo de 26600 Da a 3496 Da. b, d) inmunodetección de proteínas, (Western blot), de la GS y de la fracción 15 a la fracción 22 contra los sueros hiperinmunes antiIP1 y antiIP3 de conejo. b) suero hiperinmune de conejo antiIP1. d) suero hiperinmune de conejo antiIP3. a, c) Las bandas oscuras en los gels indican péptidos componentes de las fracciones teñidos por tinción de plata. b, d) Las bandas oscuras en las membranas indican los péptidos con reacción positiva a los sueros antiIP1 o antiIP3 reveladas con peroxidasa. La flecha indica el péptido de masa molecular aproximada a 10000 Da.

el suero antiP1 en dilución 1:20 se observó reacción positiva para la GS y las fracciones 20 y 21 principalmente; sin embargo también se observó reacción positiva en una banda de la fracción 22 y en otra de la fracción 18 (Fig. 12b). Todas las bandas reveladas de la GS y de las fracciones 20 y 21 muestran un tamaño mayor a los 26600 Da y la banda positiva de la fracción 22 tiene un peso aproximado cercano a los 3500 Da. El péptido de la fracción 18 con reacción positiva al suero hiperinmune se ubica en la zona entre los 14200 y los 6500 Da, y la interpolación de la distancia de migración en el gel indica que este péptido posee un tamaño próximo a los 10000 Da (Fig 12a y Fig 12b).

La membrana que fue incubada con el suero hiperinmune antiP3 muestra reacción positiva en la GS y las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22. El revelado de dichos péptidos es más ligero que el observado para el suero antiP1, aun cuando la dilución empleada fue de 1:15 (Fig. 12d). Todas las bandas positivas de la GS, de las fracciones 20, 21 y 22 y algunos péptidos de las fracciones 18 y 19 muestran pesos moleculares mayores a los 26600 Da. Sin embargo, un péptido positivo de la fracción 18 y dos bandas reveladas ligeramente de la fracción 19 se ubican en la zona entre los 14200 Da y los 6500 Da. El péptido de la fracción 18 muestra el revelado más intenso y la interpolación de la distancia de migración en el gel muestra un peso molecular cercano a los 10000 Da (Fig. 12c y Fig. 12d). Esta banda presenta características similares en ambos ensayos, se resalta el hecho de que el péptido positivo de la fracción 18 tenga una distancia de migración similar y que muestre reacción cruzada contra los sueros antiP1 y anti P3.

6.8 PAGE-SDS TRIS-TRICINA DE LA FRACCIÓN 18 Y SECUENCIA DE LA BANDA CON PESO MOLECULAR CERCANO A LOS 10000 Da.

La fracción 18 que muestra el péptido de peso cercano a los 10000 Da y que presenta reacción positiva a los sueros hiperinmunes fue separada por PAGE-SDS TRIS-tricina. Una vez terminada la separación por electroforesis, las bandas generadas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF especial para secuenciación automática. La banda correspondiente fue secuenciada por la técnica de degradación de Edman en un secuenciador de aminoácidos automatizado.

La secuencia parcial obtenida de la banda positiva resultó en seis residuos de aminoácidos en el siguiente orden: ser-gly-asp-gly-glu-gly. Los residuos aparecen partiendo del extremo amino del péptido hacia el extremo carboxilo. El fragmento secuenciado es demasiado corto como para realizar búsquedas en las bases de datos bioinformáticas de proteínas. La alineación de dicha secuencia no presenta un porcentaje de identidad alto con ninguna de las secuencias de las GIH comparadas.

7. DISCUSIÓN.

El análisis histológico de los tallos oculares y la GS de organismos juveniles, machos y hembras, de *Penaeus vannamei* nos revela que no existen diferencias sustanciales entre ambos sexos. Este resultado concuerda con los datos reportados para la expresión del gen de la CHH y la GIH en *Homarus americanus* (De Kleijn, *et al.* 1992), donde se demuestra que no existe diferencia en el número de células que sintetizan la CHH o la GIH en la GS de machos y hembras.

Debido al estado inmaduro en que se encuentran las gónadas en organismos juveniles y al encontrarse los animales seleccionados en estado de intermuda es factible inferir que la actividad de biosíntesis, acumulación y secreción de neuropéptidos por la GS está relacionada principalmente con la MIH y la GIH; como se comprobó para la biosíntesis, acumulación y liberación de la GIH y la CHH durante el ciclo reproductivo en *H. americanus* (De Kleijn, *et al.* 1998) y en el control neuroendócrino de la maduración ovárica en *P. indicus* (Sunilkumar y Diwan, 1991). Sin embargo, otras hormonas como la CHH, la MOIH y factores pigmentarios también se expresan, almacenan y liberan en este estadio conforme a los requerimientos metabólicos de los organismos y a la compleja interacción de los neuropéptidos de la GS en la regulación de los procesos fisiológicos de muda y reproducción (Laufer, *et al.* 1993; Khayat, *et al.* 1998; Sefiani, *et al.* 1996).

El rendimiento de extracción de proteína con la metodología de Aguilar y Huberman (1992) genera un 30% de proteína en proporción con la cantidad de proteína presente en la solución homogeneizada de las GS. La pérdida del 70% de proteína presente en el homogenizado es debida a diversas causas: la mayoría de la proteína perdida se ubica en los restos celulares eliminados por la centrifugación y filtración, una porción de proteína soluble puede ser degradada a causa de proteasas disueltas en el extracto y otra cantidad de proteína se pierde en cada uno de los pasos del procedimiento de extracción. Sin embargo, el rendimiento de extracción es aceptable y el número de GS utilizadas fueron suficientes para desarrollar este trabajo. La cantidad de proteína soluble obtenida por cada GS se aproxima a los 25 μg , la mayoría de esta proteína corresponde a neuropéptidos generados por la GS, aun cuando se encuentran en disolución una cantidad considerable de proteínas citoplásmicas que cumplen funciones diversas en los tejidos nervioso y hemolinfático del organismo.

La proporción de la F18, fracción que muestra reacción positiva a los sueros hiperinmunes, se ubica en menos del 5% del total de proteína purificada por HPLC-RP. Trabajos realizados en la purificación por cromatografía de neuropéptidos de la GS muestran resultados similares al reportar que la fracción donde eluye la GIH no corresponde a los componentes principales (Bomirski, *et al.* 1980; Soyez, *et al.* 1991; Aguilar, *et al.* 1992)

La columna semipreparativa C₁₈ fue seleccionada para purificar por HPLC-RP el extracto soluble de la GS de *P. vannamei* debido a que esta columna permite la aplicación de una mayor cantidad de proteína a purificar e igualmente el equipo permite la inyección de un volumen de muestra mayor. Aun cuando fueron realizadas varias corridas en columna analítica C₁₈, el patrón de separación fue muy similar y los tiempos de elusión de los distintos componentes permanecieron semejantes. Las fracciones iniciales y más hidrofílicas, de la F1 a la F13, parecen corresponder a componentes con una muy baja cantidad de proteína, ya que los procedimientos de tinción por la técnica de plata no revelan banda alguna, posterior al corrimiento de dichas fracciones en PAGE-SDS. Suponemos entonces que estas fracciones incluyen principalmente sales y otras moléculas no peptídicas que tienen una alta absorbencia a los 215 nm de longitud de onda. Las fracciones que eluyen a partir del minuto 30 del gradiente corresponden a las fracciones de la F14 a la F22. Dichas fracciones muestran una purificación parcial que se reconoce cuando estas son separadas por PAGE-SDS. Cada una de las fracciones presenta de una a cinco bandas mayoritarias y una elevada cantidad de bandas menores que se tiñen claramente por la técnica de tinción en plata.

La purificación del extracto soluble de la GS por HPLC-RP se basa en el criterio de hidrofobicidad de los componentes, los cuales interactúan con la fase estacionaria de la columna y eluyen gradualmente a causa del incremento en la proporción del solvente apolar aplicado a la columna (solución B) en correspondencia con la

hidrofobicidad que muestre la molécula. Al tener en cuenta los resultados observados en la separación por PAGE-SDS de las fracciones de la GS, el criterio de hidrofobicidad por sí solo no es suficiente para purificar eficientemente al componente de nuestro interés, usando un gradiente de 0 a 60% de la disolución B (0.1% de TFA en acetonitrilo) en 60 min. Por lo que si se desea mejorar la purificación podría probarse un gradiente más largo en tiempo o una disolución B más polar como la empleada en la purificación de la CHH de *P. schmitti*, en la que se utilizó un gradiente lineal de 0 a 100% de solución B, (0.1% de TFA, acetonitrilo 60% en agua tetradestilada), en 100 minutos (Huberman, *et al.* 2000b). Otra opción viable sería seleccionar un criterio de separación adicional al de hidrofobicidad; como por ejemplo el tamaño molecular, ya que los resultados obtenidos en la electroforesis de las fracciones muestran una separación eficiente. Una cromatografía de exclusión molecular anterior a la purificación por HPLC-RP permitiría la obtención de fracciones con mayor pureza.

Un primer intento de separación de los componentes de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía por HPLC-RP se realizó mediante electroforesis en PAGE-glicina nativa usando un gel al 15%. Esta técnica permite separar bandas con pesos moleculares entre 250 y 10 KDa, desafortunadamente la zona en que se ubican los péptidos de 15 a 10 KDa se encuentra en la parte final del gel y tiene una distancia de separación muy estrecha, poco más de 10 mm, por lo que la identificación de bandas en esta franja es difícil.

Al presentar los péptidos de la familia CHH/MIH/GIH tamaños moleculares cercanos a los 10 KDa (Huberman, 2000a), la separación e identificación de los componentes menores a 15 KDa ubicados en extracto de la GS y las fracciones purificadas por HPLC-RP no fue factible. Por lo que se realizó un nuevo esfuerzo de separación de los péptidos menores a 15 KDa empleando la electroforesis en PAGE-SDS TRIS-tricina.

La electroforesis PAGE-SDS TRIS-tricina permite separar con mayor nitidez péptidos entre 100 y 1 KDa. Así los componentes de la GS y las fracciones purificadas con tamaños moleculares entre 26000 y 3500 Da fueron claramente identificables en el gel. De esta forma reconocimos una gran cantidad de bandas presentes en el extracto soluble de la GS y en cada una de las fracciones purificadas. Sin embargo, el método de electroforesis en PAGE-SDS TRIS-tricina requiere de la desnaturalización de los componentes en la muestra a separar, con lo cual las proteínas presentes en dicha muestra que presenten estructura cuaternaria serán desacopladas y sus subunidades correrán por separado, mostrando en el gel diversas bandas de tamaños variados según el número y magnitud de cada una de las subunidades. Por lo que el número de bandas que se tiñen en cada una de las fracciones separadas no corresponde al número de proteínas y péptidos nativos presentes en la muestra sino al número de proteínas monoméricas y de subunidades de proteínas con estructura cuaternaria.

La combinación de los protocolos de purificación por HPLC-RP, separación de las fracciones péptidas por PAGE-SDS y las pruebas inmunoquímicas (ELISA y Western blot), permitieron la identificación de una banda con alta probabilidad de correspondencia a la GIH de *P. vannamei*.

Si bien no es posible distinguir si la banda que muestra reacción positiva a los sueros hiperinmunes antiP1 y antiP3 es producto de una proteína monomérica o es una subunidad de una proteína cuaternaria, está ampliamente caracterizado que los péptidos clasificados dentro de la familia CHH/GIH/MIH son péptidos monoméricos de 70 a 83 residuos de aminoácidos e incluso se ha descrito la estructura del precursor de estos péptidos (Keller, 1992; De Kleijn y Van Herp, 1995). Por lo que es posible suponer que el péptido identificado por los sueros hiperinmunes antiP1 y antiP3 presente en la F18 corresponde a un posible neuropéptido de esta familia al presentar un peso molecular muy cercano a los 10 KDa, que es similar al peso de la GIH en otras especies de crustáceos (Soyez, *et al.* 1991; Aguilar, *et al.* 1992; Grève *et al.* 1999).

La alineación de las GIH del camarón *Metapenaeus ensis* y las langostas *Nephrops norvegicus* y *H. americanus* presentan un porcentaje de identidad de 43.7%, al poseer 35 residuos de aminoácidos conservados de los 82 residuos totales de la GIH de *M. ensis*. Cuando se comparan las secuencias de las GIH de langostas el porcentaje de identidad entre ellas se incrementa a 93.8% ya que presentan 76

residuos conservados de los 81 residuos totales de la GIH de *N. norvegicus*. A excepción de la inserción de un ácido glutámico (E), en la posición 9 y los cuatro residuos adicionales en el extremo carboxilo de la GIH de *N. norvegicus* el resto de la molécula es idéntica a la GIH de *H. americanus*.

Tomando en cuenta estas consideraciones se seleccionaron dos segmentos de la GIH de *M. ensis* para la elaboración de los péptidos sintéticos P1 y P3. El péptido P1 corresponde a un segmento de 19 residuos de aminoácidos ubicados entre la posición 11 y la posición 29. Dicho segmento está próximo al extremo amino y se caracteriza por presentar el mayor número de residuos conservados en la GIH de las tres especies, que corresponde a 12 de los 19 residuos. El péptido P3 se ubica entre la posición 60 y la posición 77, es un péptido de 18 residuos de longitud cercano al extremo carboxilo de la molécula y que presenta la zona de menor identidad entre la GIH del camarón *M. ensis* y las GIH de las langostas *N. norvegicus* y *H. americanus*, al mostrar 10 residuos conservados de los 18 residuos totales. Adicionalmente a estos aspectos se tomaron en cuenta otras características de los péptidos sintéticos como la baja presencia de residuos de cisteína que pudieran propiciar puentes disulfuro entre las moléculas o residuos de prolina que por sus características de iminoácido complican la elaboración del péptido.

La decisión de preparar los antígenos usando el producto liofilizado de los péptidos sintéticos, evitando el paso de purificación del P1 y del P3 por HPLC-RP, obedece a que supusimos que la inyección de la mezcla del péptido sintético generado junto con otros péptido truncos o diferentes a este, así como residuos de la soluciones empleadas en su síntesis y presentes en el liofilizado ayudaría en la generación de una respuesta inmune más vigorosa, al estimular en mayor número y diversidad a los componentes involucrados en la respuesta inmune. Adicionalmente a esto, la estrategia de polimerización del antígeno por glutaraldeído fue realizada igualmente con la intención de incrementar la capacidad inmunogénica, debido a que la longitud de los péptidos sintéticos es corta y como moléculas pequeñas su inmunogenicidad es baja (Harlow y Lane, 1988).

La titulación de los sueros hiperinmunes en ratón y conejo muestra una buena capacidad de reacción contra los antígenos elaborados P1 y P3, como se observa en la figura 9, donde las lecturas más altas se ubican entre 0.4 y 0.7 UA en las diluciones 1:100 y 1:200, para sueros de ratón y conejo respectivamente. Las diluciones mayores en las que aún se reconoce reacción positiva contra el antígeno se ubican en los niveles de 1:1000 y 1:800 con valores de 0.189 y 0.255 UA en los sueros de ratón y conejo respectivamente. Como se menciona en los resultados los valores máximos en las diluciones 1:100 y 1:200 no se ubican en la zona de saturación de la curva de titulación, sin embargo el segmento de la curva que se genera muestra un comportamiento exponencial y los valores de 0.4 y 0.7

UA son claramente mayores que los valores obtenidos de las mismas diluciones en los sueros preinmunes 0.037 y 0.184 UA respectivamente.

La comparación de las curvas de titulación de los sueros de los distintos animales y los distintos antígenos empleados nos revelan que existe una mejor respuesta inmune en los conejos al presentar lecturas de absorbencia mayores y mejor capacidad de reconocimiento del antígeno en diluciones más altas comparadas con los sueros murinos. Por otro lado, en lo que respecta a los antígenos utilizados, el péptido sintético P1 es más efectivo en la generación de anticuerpos ya que las curvas de titulación del suero antiP1 muestran mejores lecturas de absorbencia que las curvas de los sueros antiP3 tanto en ratones como en conejos.

Cuando los sueros hiperinmunes fueron empleados para evaluar su reacción cruzada contra el extracto soluble de la GS de *P. vannamei* se presenta una reacción cruzada evidente y aun cuando las diluciones necesarias para lograr dicha reacción son bajas (diluciones de 1:50) la especificidad de los sueros hiperinmunes contra los péptidos de la GS es claro. Los valores registrados en los sueros hiperinmunes de ratón y conejo antiP1 se ubican entre 0.1 y 0.2 UA mientras que los sueros hiperinmunes de antiP3 de los dos animales se encuentran entre 0.1 y 0.4 UA, siendo estos valores suficientemente altos comparados contra los valores obtenidos de los sueros preinmunes que muestran

valores de 0.07 UA con el suero de ratón y 0.014 UA con conejo. Con estos datos inferimos que existe una mejor capacidad del péptido P3 para generar anticuerpos que reconozcan por reacción cruzada a péptidos presentes en la GS de *P. vannamei*. Este dato concuerda con el hecho de que el P3 fue elaborado a partir del segmento con menor identidad entre la GIH del camarón *M. ensis* y las GIH de langostas *N. norvegicus* y *H. americanus*, pudiendo entonces presentar una reacción cruzada más importante contra péptidos de camarón que contra péptidos de otros crustáceos como se reporta para el suero hiperinmune antiGIH de *H. americanus* que es capaz de reconocer por reacción cruzada extractos de GS de otras especies de crustáceos, principalmente de langostas y cangrejos, y no es eficiente en el reconocimiento de extractos de GS en algunas especies de camarones (Meusy, *et al.* 1987).

Las pruebas de ELISA contra las 22 fracciones obtenidas en la purificación por HPLC-RP nos revelan con mayor detalle la capacidad de los sueros hiperinmunes para reconocer a más de un péptido presente en el extracto de la GS. Los ensayos elaborados usando el suero hiperinmune antiP1 muestran que los anticuerpos generados a partir del péptido P1 presentan alta especificidad contra las fracciones más hidrofóbicas, fracciones 20, 21 y 22, comparado con los ensayos efectuados con el suero hiperinmune antiP3 que muestra reacción cruzada contra prácticamente las 22 fracciones obtenidas en la purificación del extracto de la GS. Es comprensible entonces que este suero haya mostrado una

reacción cruzada de mayor magnitud contra el extracto completo de la GS comparado con el suero antiP1. Sin embargo, el suero antiP3 presenta las mayores lecturas de absorbencia contra las fracciones de la F15 a la F22. Debido a las condiciones de la purificación parcial de las fracciones y las características del ensayo ELISA no es posible concluir cual de las fracciones pudiera contener la GIH.

La prueba de inmunodetección de proteínas de las fracciones F15 a la F22 nos permitió acercarnos más al péptido correspondiente a la GIH en el extracto de la GS, pues al realizar la PAGE-SDS de la GS y sus principales fracciones proteínicas nos fue posible distinguir las diferentes bandas ubicadas dentro de cada fracción y evaluar su capacidad de reconocimiento por los sueros hiperinmunes de conejo antiP1 y antiP3. Los resultados de esta prueba indican que la mayoría de los péptidos que son reconocidos presentan masas moleculares superiores a los 26000 Da, pero existe una banda dentro de la fracción F18 que es reconocida por los dos sueros, tiene un patrón de corrimiento idéntico en las dos PAGE-SDS elaboradas y que adicionalmente se encuentra en la zona del marcador de peso molecular entre los 14200 y los 6500 Da. La interpolación de la distancia de migración de dicha banda en la curva de migración generada por los péptidos contenidos en la solución del marcador de pesos moleculares nos muestra que la banda se presenta una masa molecular cercana a los 10000 Da. Aunque dicho dato no es concluyente para el tamaño de esta molécula se encuentra muy cercano a la masa molecular reportado para otras GIH (Soyez, *et*

al. 1987; Aguilar, *et al.* 1992; Grève, *et al.* 1999). La capacidad de los sueros para reconocer otros péptidos en el extracto de la GS podría deberse a la presencia de otros antígenos en el liofilizado que no corresponden al péptido sintético de nuestro interés. Pues como se mencionó anteriormente no se realizó la purificación previa de los péptidos sintéticos para la preparación de los antígenos con la intención de estimular con mayor intensidad el sistema inmune y posiblemente se encuentran en estos fragmentos, peptídicos truncos o disímiles a los péptidos deseados. Adicionalmente a ello, otros componentes del extracto de la GS podrían presentar epítomos capaces de generar reacción cruzada con los anticuerpos presentes en los sueros hiperinmunes antiP1 y antiP3.

Los resultados de la secuenciación por degradación de Edman de la banda de los 10000 Da presente en la F18 con reacción positiva contra los sueros hiperinmunes presenta solamente seis residuos de aminoácidos. Dicha secuencia arroja un escaso número de residuos reconocidos y a juzgar por el elevado número de glicinas, 3 de los 6 residuos identificados, esta secuencia se encuentra contaminada. El hecho de que la secuencia del péptido se haya realizado mediante transferencia a membrana impide una caracterización más amplia de este, por lo que sería necesario realizar una repurificación de la F18 con el objeto de obtener este componente suficientemente puro y en cantidad necesaria para evaluar otras características de la molécula.

Los trabajos iniciales de identificación de los componentes con actividad endócrina, para el caso particular de la GIH de crustáceos, se realizaron por la vía clásica. La cual implica la extracción del tejido endócrino sospechoso de generar el factor involucrado y observar el efecto en el proceso fisiológico. Posteriormente se verifica la actividad del factor, al implantar el tejido endócrino de organismos donadores a organismos extirpados regenerando la regulación original del proceso, como el trabajo reportado por Panouse (1946). Estos trabajos permitieron reconocer el sitio de síntesis del factor pero no aportaron información sobre la naturaleza del factor involucrado.

Otros trabajos desarrollaron técnicas de detección del factor mediante la inyección de extractos completos del tejido endócrino o fracciones procesadas por diversos métodos, (cromatografía, diálisis, degradación térmica o ácida, *etc*), a animales extirpados y observando el efecto de la inyección en el organismo. Como los trabajos reportados por Bomirski *et al.* (1980) y Soyez *et al.* (1987). Sin embargo estos métodos requieren de grupos experimentales, estadísticamente representativos, mantenidos en cautiverio y de una cantidad elevada del factor a ensayar.

Bioensayos *in vitro* que pudieran detectar la acción del factor regulador en el órgano blanco se han usado en algunos trabajos (Aguilar *et al.* 1992; Grève *et al.* 1999). Estos bioensayos requieren de técnicas de cultivo celular del tejido blanco y

un método de cuantificación del efecto, que por lo general utiliza compuestos marcados radioactivamente.

Los trabajos más recientes de identificación y caracterización de factores endocrinos se desplazan al campo molecular, principalmente por técnicas de caracterización genómica (De Kleijn *et al.* 1994b; Edomi *et al.* 2000; Chan y Gu, 2000). Estas técnicas emplean las secuencias ya reportadas en bancos bioinformáticos para diseñar oligonucleótidos cebadores específicos, que permitirán clonar el factor de interés y reconocer la secuencia nucleotídica correspondiente a éste, para posteriormente analizar la similitud de la secuencia con otras y deducir la secuencia peptídica del factor. Sin embargo, estas técnicas no identifican al péptido directamente; y es necesario producir el factor por tecnología recombinante para evaluar su efecto endócrino en el órgano blanco.

Este trabajo aborda técnicas poco utilizadas en la identificación y purificación de factores endócrinos de crustáceos, involucra la síntesis química de fragmentos de la GIH de *M. ensis* y el empleo de técnicas inmunoquímicas que nos permiten reconocer la fracción cromatográfica en donde se ubica el péptido de *P. vannamei*.

La síntesis química de péptidos permitió a Sonobe *et al.* (2000) reconocer la actividad biológica de la MIH sintética y empleando sueros específicos contra dos

fragmentos sintéticos de la MIH evaluaron la relevancia de la estructura terciaria y de la región carboxilo terminal en la función de la molécula.

Si bien el uso de sueros hiperinmunes contra neuropéptidos de la GS se ha empleado para reconocer hormonas en especies distintas a la utilizada para generar el suero (Meusy *et al.* 1987; Marco y Gäde, 1999). Estos trabajos se han avocado a ubicar el sitio de síntesis y almacenamiento de los factores en el complejo OX-GS por inmunohistoquímica o al reconocimiento cruzado del extracto completo de varias especies contra el suero hiperinmune.

La innovación de herramientas de detección de factores neuroendócrinos de la SG es un tópico de importancia en el área de endocrinología de crustáceos y el uso de péptidos sintéticos y de los sueros hiperinmunes generados a partir de ellos son una opción interesante en el desarrollo de dichas herramientas.

La caracterización bioquímica del componente inhibidor de la maduración gónadica del *P. vannamei* es un tema de investigación básico para la comprensión a fondo de los mecanismos de regulación de la vitelogénesis y un requisito para el diseño de nuevas tecnologías que permitan la inducción de la maduración gonádica en especies de interés acuícola. Los resultados reportados en esta tesis nos introducen en la caracterización de un péptido reconocido por sueros hiperinmunes generados a partir de fragmentos de la GIH de *M. ensis* y que

presenta un tamaño molecular cercano a las dimensiones de la GIH de otros crustáceos. Este trabajo puede considerarse como un acercamiento a la identificación y caracterización del la GIH del camarón blanco del Pacífico *P. vannamei*.

8. CONCLUSIONES.

La purificación del extracto soluble de la GS de *Penaeus vannamei* mediante HPLC-RP revela la separación de 22 fracciones, donde las primeras 13 presentan componentes que contienen péptidos en escasa proporción, esto fue corroborado al no presentar suficiente cantidad de péptidos para ser detectados por tinción en plata cuando las fracciones fueron corridas en electroforesis; en tanto que las últimas 9 contienen diversos péptidos monoméricos y subunidades que son susceptibles de ser separados por electroforesis. Dentro de estas fracciones, la fracción más abundante corresponde a la F20 con el 26.6% de la proteína total, seguida por la F21 con el 12.8%. El resto de las fracciones no rebasan el 5% de la proteína total.

Los péptidos sintéticos elaborados a partir de segmentos de la secuencia de la GIH de *Metapenaeus ensis* son capaces de generar una respuesta inmune eficiente en ratón y conejo cuando son polimerizados con glutaraldehído. Los sueros hiperinmunes generados con estos péptidos presentan reacción cruzada específica contra el extracto completo de la GS de *P. vannamei* y contra algunas de las fracciones purificadas por HPLC-RP.

Ensayos inmunoquímicos en los cuales se han utilizado los sueros hiperinmunes contra los péptidos sintéticos ubican una banda con reacción positiva y con un

patrón de migración en electroforesis cercano a los 10000 Da. Este péptido se encuentra contenido en la fracción F18 obtenida a partir de la purificación por HPLC-RP de la GS de *P. vannamei*. La secuencia obtenida por degradación de Edman del péptido de la F18 resultó en una secuencia contaminada por otros péptidos próximos a la banda

El empleo de péptidos sintéticos para generar sueros hiperinmunes y el uso de estos sueros en pruebas inmunoquímicas nos permitió detectar, por reacción cruzada, péptidos presentes en el extracto soluble de la glándula sinusal. Esta estrategia probó ser eficiente y podría emplearse para detectar otros péptidos de interés ubicados en la glándula sinusal.

9. PERSPECTIVAS.

Los resultados de éste trabajo nos permiten plantear acciones futuras para la purificación y caracterización de a la GIH de *P. vannamei*.

Fraccionamiento del extracto soluble de la GS por cromatografía de filtración en gel, que nos permita eliminar los componentes moleculares de masa molecular mayor a 10 KDa, previo a la purificación por HPLC-RP.

Purificación de la fracción F18 por HPLC-RP empleando un gradiente distinto al usado en este trabajo. Si se abre el gradiente en la repurificación de la F18 probablemente la definición de los diferentes componentes se resolvería con mayor eficiencia. Esto permitiría obtener los componentes en forma libre para análisis bioquímicos, caracterización de la masa molecular por espectrometría de masas y secuencia primaria.

Inmunohistoquímica cortes histológicos del tallo ocular de *P. vannamei*. Este ensayo permitiría confirmar la especificidad de los sueros hiperinmunes contra componentes de la GS.

Inmunodifusión radial de los sueros hiperinmunes contra las distintas fracciones separadas por HPLC-RP. Corroborando la especificidad contra los componentes presentes en dichas fracciones.

Incremento de la especificidad de los sueros mediante la purificación del producto liofilizado de los péptidos sintéticos que nos permitan la obtención de sueros hiperinmunes con mayor calidad y capacidad de reconocimiento por reacción cruzada del extracto de la GS y sus fracciones purificadas.

Diseño de bioensayos efectivos que permitan corroborar la función inhibitoria del desarrollo gonadal del péptido ubicado por los sueros hiperinmunes.

10. REFERENCIAS

- Aguilar, M.B., L.S. Quackenbush, D.T. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the mexican crayfish *Procambarus bowvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 491-498.
- Aguilar, M.B., D. Soyez, R. Falchetto, D. Arnott, J. Shabanowitz, D.F. Hunt and A. Huberman. 1995. Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the mexican crayfish *Procambarus bowvieri* (Ortmann): Presence of a D-amino acid. *Peptides*. 16: 1375- 1383.
- Aguilar, M.B., R. Falchetto, J. Shabanowitz, D.F. Hunt and A. Huberman. 1996. Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the mexican crayfish *Procambarus bowvieri* (Ortmann). *Peptides*. 17 (3): 367-374.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Allen Press. Baton Rouge, Louisiana. 114 pp.
- Bomirski, A., M. Arendarczyk, E. Kawinska and L.H. Kleinholz. 1980. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *Internat. J. Invert. Reprod.* 3: 213-219.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence. 1992. Reproduction on *Penaeus* species in captivity. En: Fast A. W. and L. J. Lester. *Marine shrimp culture: principles and practices. Developments in aquaculture and fisheries sciences*, Vol. 23. Elsevier Science Publisher B. V. The Netherlands. 93-170.
- Bentley P.J. 2002. Sex hormones in vertebrates. En: *Nature Publishing Group. Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, England.
- Brunette, W.N. 1981. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- Chan, S.M. and P.L. Gu. 2000. Identification of the shrimp gonad inhibiting hormone: cDNA cloning and gene organization, expression, immunodetection and bioassay. Unpublished.

Chang, E.S., G.D. Prestwich and M.J. Bruce. 1990. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the lobster *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 65: 56-64.

Chang E. S. 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. Annu. Rev. Entomol. 38:161-180.

Chung, J.S., H. Dircksen and S.G. Webster. 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13103-13107.

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

De Kleijn, D.P.V., K.P.C. Janssen, G.J. M. Martens and F. Van Herp. 1994a. Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. Eur. J. Biochem. 224: 623-629.

De Kleijn, D.P.V., F.J. Sleutels, G.J. Martens and F. Van Herp. 1994b. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. FEBS Lett. 353 (3): 255-258

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

De Kleijn D.P.V., K.P. Janssen, S.L. Waddy, R. Hegeman, W.Y. Lai, G.J. Martens and F. Van Herp. 1998. Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. J. Endocrinol. 156(2):291-298.

Desmoucelles-Carette, C., D. Sellos, A. Von Wormhoudt. 1996. Molecular cloning of the precursors of pigment dispersing hormone in crustaceans. Biochem. Biophys. Res. Commun. 221: 739-743.

Dircksen, H., D. Böcking, U. Heyn, C. Mandel, J.S. Chung, G. Baggerman, P. Verhaert, S. Daufeldst, T. Plösch, P.P. Jaros, E. Waelkens, R. Keller and S.G. Webster. 2001. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the

shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem. J.* 356: 159-170.

Drummond-Barbosa, D. and A. Spradling. 2001. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* Oogenesis. *Dev Biol.* 231(1):265-278.

Edman, P. and G. Begg. 1967. A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1 (1): 80-91.

Edomi, P., E. Azzoni, R. Mettullo, N. Pandolfelli, E.A. Ferrero and P.G. Giulianini. 2002. Gonad-inhibiting hormona of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production and immunolocalization. *Gene.* 284: 93-102.

Engelmann, F. 2002. Ecdysteroids, Juvenile Hormone and Vitellogenesis in the Cockroach *Leucophaea maderae*. *Journal of Insect Science*, 20 (2): 1-8.

Fainzilber M., M. Tom, S. Shafir, S.W. Applebaum and E. Lubzens. 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? *Biol. Bull.* 183: 233-241.

Fairs N.J., P.T. Quinian and L.J. Goad. 1990. Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 89: 83-99.

FAO. 2000. The state of world fisheries and aquaculture. Editorial Group FAO Information Division. Rome.

Fernlund, P. and L. Josefsson. 1972. Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science.* 177: 173-174.

Fernlund P. 1976. Structure of a light-adapting hormone from the shrimp *Pandalus borealis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 439: 17-25.

Fingerman M. 1997. Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiol. Zool.* 70 (3): 257-269.

García, U. and H. Aréchiga. 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell and Mol. Neurobiol.* 18 (1): 83-99.

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

Gu, P.L., K.L. Yu and S.M. Chan. 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS letters*. 472: 122-128.

Gunawardene, S.Y.I.N., B.K.C. Chow, J.G. He and S.M. Chan. 2001. The shrimp FATMet cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methylfarnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 1115-1124.

Harlow E. and D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 726 pp.

Huberman. A., A. Hernandez-Arana, M.B. Aguilar, A. Rojo-Dominguez. 1989. Secondary structure of a crustacean neuropeptide hormone family by means of CD. *Peptides*. 10(5):1113-5.

Huberman, A., M.B. Aguilar, K. Brew, J. Shabanowitz, and D.F. Hunt. 1992. Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the Sinus gland of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Interspecies comparison. *Peptides* 14: 7-16.

Huberman, A. and M.B. Aguilar. 1998. D-amino acids in crustacean hyperglycemic neurohormones. En: *D-amino acid in sequence of secreted peptides of multicellular organisms*. Jollés, P. (Ed.). Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. 73-83.

Huberman, A. 2000a. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*.191:191-208.

Huberman, A., M.B. Aguilar, I. Navarro-Quiroga, L. Ramos, I. Fernández, F.M. White and D.F. Hunt. 2000b. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus) schmitti*. *Peptides* 21: 331-338.

Kaiser, E., R.L. Colescott, C.D. Bossinger and P.I. Cook. 1969. Color tests for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34: 595-598.

Katayama, H., K. Nagata, T. Ohira, F. Yumoto, M. Tanokura and H. Nagasawa. 2003. The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.* 278 (11): 9620-9623.

Khayat, M., W.J. Yang, K. Aida, H. Nagasawa, A.Tietz, B. Funkenstein and E. Lubzens. 1998. Hyperglycaemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in

in vitro- incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. General and Comparative Endocrinology. 110: 307- 318.

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

Keller R. 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. Experientia. 48: 439- 448.

Landau M., W.J. Biggers and H. Laufer. 1997. Invertebrate endocrinology. En: Dantzler W. H. Handbook of physiology. Section 13: Comparative physiology. Vol II. Oxford University Press. New York. 1291-1391.

Laufer H., D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C.C. Reuter, L.W. Tsai, D.A. Schooley. 1987a. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. Science.235:202-205.

Laufer H., E. Homola and M. Landau. 1987b. Control of methyl farnesoate synthesis in crustacean mandibular organs. American Zool. 27:69A.

Laufer H. and M. Landau.1991. Endocrine control of reproduction in shrimp and other Crustacea. En: De Loach P. F., W. J. Dougherty and M. A. Davidson. Development in aquaculture and fisheries sciences. Vol 22. Frontiers of shrimp Research. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 65-83.

Laufer, H., J.S.B. Ahl and A. Sagi. 1993. The role of juvenile hormone in crustacean reproduction. Amer. Zool. 33: 365-374.

Lavery, S. and K.H. Chu. 2000. Phylogenetics relationships within the genus *Penaeus*. Unpublished.

Lee, K.J., T.S. Elton, A.K. Bej, S.A. Watts and R.D. Watson. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209: 1126-1131.

Marco, H.G. and G. Gäde. 1999. A comparative immunocytochemical study of the hyperglycaemic, moult-inhibiting and vitellogenesis-inhibiting neurohormone family in three species of decapod crustacea. Cell Tissue Res. 295(1):171-182.

Marco, H.G., W. Brandt, S. Stoeva, W. Voelter and G. Gäde. 2000. Primary structures of a hyperglycemic peptide and of two truncated forms in the spiny lobster, *Jasus lalandii*. Peptides. 21: 19-27.

Martin, G., O. Sorokine and A. Van Dorsselaer. 1993. Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). *Eur. J. Biochem.* 211: 601-607.

Meusy, J.J., G. Martin, D. Soyez, J.E. Van Deijnen and J.M. Gallo. 1987. Immunochemical and immunocytochemical studies of the crustacean vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH). *General and Comparative Endocrinology.* 67: 333-341.

Miles, L.E.M. and C.N. Hales. 1968. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219: 186-189.

Ohira, T., T. Watanabe, H. Nagasawa and K. Akida. 1997. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 14: 785-789.

Olive P. J. W. 2002. Reproduction and life cycles in invertebrates. En: Nature Publishing Group. *Encyclopedia of Life Sciences.* Macmillan Publishers Ltd, England.

Ollivaux, C. and D. Soyez. 2000. Dynamics of bioynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5106-5114.

Otsu T. 1963. Precocious development of ovaries in the crab *Potamon dehaani*, following implantation of the thoracic ganglion. *Annot Zool Jpn.* 33:90-96.

Panouse, J.B. 1946. Recherches sur les phenomenes humoreaux chez le crustacés. L'adaptation chromatique et la croissance ovarienne chez la crevette *Leander serratus*. *Ann. Instit. Océanogr.* 23: 65-147.

Pérez-Farfante I. and B. Kensley. 1998. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. (Keys and Diagnoses for the Families and Genera). *Museum National D'Historie Naturelle.* France. 233 p.

Quackenbush, L. S. 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp. En: De Loach P. F., W. J. Dougherty and M. A. Davidson. *Development in aquaculture and fisheries sciences.* Vol 22. *Frontiers of shrimp research.* Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 125-140.

Ranga Rao K. and J.P. Riehm. 1991. Structure-activity relations of crustacean neuropeptides. En: De Loach P. F., W. J. Dougherty and M. A. Davidson.

Development in aquaculture and fisheries sciences. Vol 22. Frontiers of shrimp research. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 107-125.

Rosenberry, B. 1995. World shrimp farming. Shrimp News Internacional. U.S.A. 68p.

Sambrook, J. and D.W. Russell 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. A8.52, A9.28.

Schägger, H. and G. Von Jagow. 1987. Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.

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

Stuber, W., J. Knoll and G. Breipohl. 1989. Synthesis of peptide amides by Fmoc-solid-phase peptide synthesis and acid labile anchor groups. : Int. J. Pept. Protein Res. 34(3):215-21.

Sonobe, H., T. Nishimura, M. Sonobe, T. Nakatsuji, R. Yanagihara, T. Kawakami and S. Aimoto. 2001. The molt-inhibiting hormone in the american crayfish *Procambarus clarkii*: Its synthesis and biological activity. Gen. Comp. Endocrinol. 121: 196-204.

Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus gland of the lobster *Homarus americanus*. J. Exp. Zool. 244: 479-484.

Soyez, D., P.Y. Noel, J.E. Van Deijnen, M. Martin, A. Morel and G.G. Payen. 1990. Neuropeptides from the sinus gland in the *Homarus americanus*. Characterization of hyperglycemic peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 79: 261-274.

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

Subramoniam, T., B. Reichwein, H. Dircksen and R. Keller. 1998. On the isolation and characterization of a crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the shrimp *Penaeus indicus*. Aquaculture. 162: 99-111.

Subramoniam, T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Com Biochem and Physiol Part C*. 125:135-156.

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

Sun, P.S. 1995. Expression of the molt-inhibit hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4 (3): 262-268.

Sunilkumar, M. and A.D. Diwan. 1991. Neuroendocrine regulation of ovarian maturation in the Indian prawn *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards). *Aquaculture* 98: 381-393.

Tang, C., W. Lu, G. Wainwright, S.G. Webster, H.H. Rees and P.C. Turner. 1999. Molecular characterization and expression of mandibular organ-inhibiting hormone, a recently discovered neuropeptide involved in the regulation of growth and reproduction in the crab *Cancer pagurus*. *Biochem. J.* 343: 355-360.

Tata J.R. and D.F. Smith. 1979. Vitellogenesis: a versatile model for hormonal regulation of gene expression. *Recent Prog Horm Res.* 35:47-95.

Tobey J., J. Clay y P. Vergne. 1998. Resumen de la producción, consumo y comercio de la acuicultura del camarón en Latinoamérica. En: David Hales. Impactos económicos, ambientales y sociales del cultivo de camarón en Latinoamérica. USAID/G/ENV Centro de recursos costeros, Universidad de Rhode Island, pag 6-17.

Toullec, J.Y., N. Kmech, D. Gallois, M. Maïbèche, V. Papon, M. Boscaméric and D. Soyez. 2002. Molecular cloning and cellular expression of crustacean PC2-like prohormone convertase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1547: 145-151.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gorgon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

Treece G.D. 1999. Shrimp maturation and spawning. 28th Panel Proceedings UJNR, Report No. 28:121-134.

Tsukimura B. and F.I. Kamemoto. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 92: 59-66.

- Tsutsui, N., I. Kawazoe, T. Ohira and S. Jasmani. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zool. Sci. 17 (5): 37-50.
- Vaca, A.A. and J. Alfaro. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. Aquaculture 182: 373-385.
- Van Herp, F. 1992. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. Invert. Reprod. and Develop. 22: 21-30.
- Vijayan, K., M. Sunilkumar and A.D. Diwan. 1993. On the structure and molt controlling function of the Y-organ in the prawn *Penaeus indicus*. Journal of the World Aquaculture Society. 24 (4): 516-521.
- Wallace, R.A. and K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer. Zool. 21:325-343.
- Wainwright, G., S.G. Webster, M.C. Wilkinson, J.S. Chung and H.H. Rees. 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab *Cancer pagurus*. J. Biol. Chem. 271 (22): 12749-12754.
- Wainwright, G. and S.G. Webster. 1998. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate, in the edible crab, *Cancer pagurus*. Biochem. J. 334: 651-657.
- Wang, Y.J., T.K. Hayes, G.M. Holman, A.R. Chavez, L.L. Keeley. 2000. Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei*. Peptides. 21: 477-484.
- Webster, S.G. 1991. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone (MIH) from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. London B. 244: 247-252.
- Yang, W.J., K. Aida, H. Nagasawa. 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 135: 205-212.
- Yang, W.J., T. Ohira, N. Tsutsui, T. Subramoniam, D. Thanh Huong, K. Aida and M. Wilder. 2000. Determination of amino acid sequence and site of mRNA expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Exp. Zool. 287: 413-422.

Yang W.J. and K. Ranga Rao. 2001. Cloning of precursors for two MIH/GIH-related peptides in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 407-413.

Yano, I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. Aquaculture. 47: 233-229.

Yasuda, A., Y. Yasuda, T. Fujita and Y. Naya. 1994. Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone from the Crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiplicity Forms by Stereoisomerism and Diverse Function. Gen. Comp. Endocrinol. 95: 387-398.

11. APENDICES.

11.1 APENDICE I. (ABREVIATURAS).

°C	Grados centígrados.
20E	Hidroxicedisona.
2n	Célula diploide.
Abs	Absorbencia.
ACF	Adyuvante completo de Freund.
AIF	Adyuvante incompleto de Freund.
AKH	Hormona adipocinética (siglas en inglés).
AMP	Adenosin monofosfato.
BSA	Albúmina sérica bovina (siglas en inglés).
C	Carboxilo terminal.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (siglas en inglés).
com. pers.	Comunicación personal.
CPRP	Péptido relacionado al precursor de la CHH (siglas en inglés).
C-term	Región carboxiloterminale de la rMIH.
CHH	Hormona hiperglicemiante de crustáceos (siglas en inglés).
Da	Daltons.
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina.
DMF	Dimetilformamida.
DRPH	Hormona de adaptación a la luz del pigmento distal (siglas en inglés).
DTE	Dimetilterbutileter.
DTT	DL-ditiotreitol.
ECD	Ecdisteroides.
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (siglas en inglés).
F1	Fracción 1 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F10	Fracción 10 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F11	Fracción 11 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F12	Fracción 12 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F13	Fracción 13 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F14	Fracción 14 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F15	Fracción 15 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F16	Fracción 16 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F17	Fracción 17 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F18	Fracción 18 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F19	Fracción 19 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F2	Fracción 2 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F20	Fracción 20 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F21	Fracción 21 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F22	Fracción 22 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F3	Fracción 3 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F4	Fracción 4 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F5	Fracción 5 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.

F6	Fracción 6 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F7	Fracción 7 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F8	Fracción 8 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
F9	Fracción 9 del extracto soluble de la GS purificada por HPLC-RP.
FA	Farnesilacetona.
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación (siglas en inglés).
FM	Farnesoato de metilo.
Fmoc	9-fluoroenilmetiloxycarbonil.
G Ac	Glándula accesoria.
g	Gramos.
<i>g</i>	Gravedades.
GA	Glándula androgénica.
GAH	Hormona de la glándula androgénica (siglas en inglés).
GIH	Hormona inhibidora de las gónadas (sigla en inglés).
GS	Glándula sinusal.
GSH	Hormona estimuladora de las gónadas (siglas en inglés).
GT	Ganglios torácicos.
H₂O	Agua.
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato.
HJ	Hormona juvenil de insectos.
HOBt	N-hidroxibenzotriazol.
HP	Hepatopáncreas.
HPLC-RP	Cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (sigla en inglés).
HPTT	Hormona protoraxicotrópica.
IgG	Inmunoglobulina tipo G.
ITP	Péptido transportador de iones (siglas en inglés).
KDa	KiloDaltons.
Kg	Kilogramos.
L. Gan.	<i>lamina ganglionaris.</i>
L1-2	Asa intermedia entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la rMIH.
L2-3	Asa intermedia entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la rMIH.
L3-4	Asa intermedia entre las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ de la rMIH.
L4-5	Asa intermedio entre las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de la rMIH.
LAH	Hormona de adaptación a la luz (siglas en inglés).
LG	<i>lamina ganglionaris.</i>
M	Molar.
M. Ext.	<i>medulla externa.</i>
M. Int.	<i>medulla interna.</i>
mA	Miliamperes.
MBHA	p-Metil-benzhidramina.HCl.
ME	<i>medulla externa.</i>
mg	Miligramos.
MI	<i>medulla interna.</i>
MIH	Hormona inhibidora de la muda (siglas en inglés).

min	Minutos.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
mmol	Milimol.
MOIH	Hormona inhibidora del órgano mandibular (siglas en inglés).
MOIH1	Hormona inhibidora del órgano mandibular del tipo 1 (siglas en inglés).
MOIH2	Hormona inhibidora del órgano mandibular del tipo 2 (siglas en inglés).
mRNA	Ácido ribonucleico tipo mensajero (siglas en inglés).
MT	<i>medulla terminalis</i> .
MTOX	<i>medulla terminalis</i> -órgano X.
N	Extremo Amino.
n	Célula Haploide.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaN₃	Acida de sodio.
nm	Nanómetros,
NMR	Resonancia magnética nuclear (siglas en inglés).
NO	Nervio óptico.
No.	Número.
N-term	Región aminoterminal de la rMIH.
N₂EDTA	N,N Ácido Etilendiaminotetracético (siglas en inglés).
OM	Órgano mandibular.
OX-GS	Complejo órgano X-glándula sinusal.
P1	Péptido sintético 1 de la GIH de <i>Metapenaeus ensis</i> .
P3	Péptido sintético 3 de la GH de <i>Metapenaeus ensis</i> .
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (siglas en inglés).
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (siglas en inglés).
PDH	Hormona dispersante de pigmentos (siglas en inglés).
Pej SGP III	Péptido tres de la glándula sinusal de <i>Penaeus japonicus</i> .
pH	Logaritmo negativo de la concentración de protones.
pNPP	Paranitrofenilfosfato (siglas en inglés).
PPRP	Péptido relacionado al precursor de la PDH (siglas en inglés).
PSA	Persulfato de amonio.
PVDF	Difluoruro de polivinil.
R	Retina.
Ret.	Retina.
rMIH	Hormona inhibidora de la muda recombinante de <i>Penaeus japonicus</i> .
RPCH	Hormona concentradora del pigmento rojo (siglas en inglés).
RPRP	Péptido relacionado al precursor de la RPCH (siglas en inglés).
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFA	Ácido trifluoroacético (siglas en inglés).
UA	Unidades de absorbancia.
VG	Vitelogenina.
α1	Hélice alfa 1 de la rMIH.

$\alpha 2$	Hélice alfa 2 de la rMIH.
$\alpha 3$	Hélice alfa 3 de la rMIH.
$\alpha 4$	Hélice alfa 4 de la rMIH.
$\alpha 5$	Hélice alfa 5 de la rMIH.
μg	Microgramos.
μL	Microlitros.
μm	Micrómetros.

11.2 APENDICE II. (NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS).

Nomenclatura de una y tres letras para los principales aminoácidos componentes de proteínas.

Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ac. Aspártico	Asp	D
Ac. Glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y