



Programa de Estudios de Posgrado

**Vitelogénesis de la langosta de agua dulce *Cherax
quadricarinatus* (von Martens, 1868; Decapoda:
Parastacidae). Caracterización de las moléculas vitelinas
y determinación del lugar de síntesis de la Vitelogenina.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

p r e s e n t a

Vania Verónica Serrano Pinto

La Paz, B. C. S., (Enero, 2004)

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 15 del Mes de Enero del 2004, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

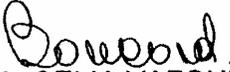
**" VITELOGENESIS DE LA LANGOSTA DE AGUA DULCE *Cherax quadricarinatus* (VON MARTENS, 1868; DECAPODA: PARASTACIDAE).
CARACTERIZACION DE LAS MOLECULAS VITELINAS Y DETERMINACION DEL LUGAR DE SÍNTESIS DE LA VITELOGENINA"**

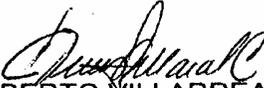
Presentada por el alumno:

VANIA VERONICA SERRANO PINTO

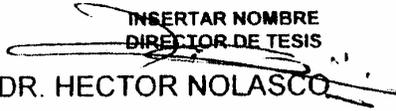
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUACULTURA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

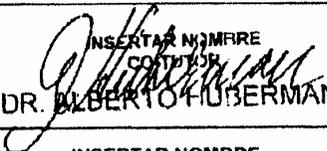

DRA. CELIA VAZQUEZ BOUCARD


DR. HUMBERTO VILLARREAL

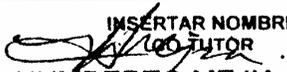
INSERTAR NOMBRE
DIRECTOR DE TESIS


DR. HECTOR NOLASCO

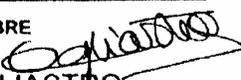
INSERTAR NOMBRE
COMISOR


DR. ALBERTO HUBERMAN

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR


DR. HUMBERTO MEJIA

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR


DRA. MYLENE OGLIASTRO

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR

INSERTAR NOMBRE
REVISOR


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Celia Vázquez Boucard	CIBNOR
Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Alberto Huberman Wajsman	INCMNSZ
Dra. Catherine Badens	CERGM

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Celia Vázquez Boucard	CIBNOR
Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Alberto Huberman Wajsman	INCMNSZ
Dra. Mylene Ogliastro	INRA
Dr. Humberto Mejía Ruíz (Suplente)	CIBNOR
Dr. Dariel Tovar (Suplente)	CIBNOR

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Celia Vázquez Boucard	CIBNOR
Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dra. Mylene Ogliastro	INRA
Dr. Dariel Tovar (Suplente)	CIBNOR

RESUMEN

La vitelogenina (Vg) de la hemolinfa y las vitelinas (Vts) del ovario y de diferentes estadios de desarrollo en huevos de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* fueron analizados mediante diversas técnicas de electroforesis PAGE, SDS-PAGE y cromatografía. Con estos métodos, en la hemolinfa de hembras en estado de vitelogénesis secundaria, una posible Vg fue encontrada con una masa molecular nativa de 500 kDa. En ovarios y en huevos en estadios I y V, dos formas de Vts (Vt₁ y Vt₂) fueron observados. En ovarios en vitelogénesis secundaria, la masa molecular nativa fue de 470 kDa (Vt₁) y 440 kDa (Vt₂). Los huevos en diversos estadios de desarrollo, mostraron un patrón electroforético más complejo, consistente en proteínas con diferentes masas moleculares; en huevos en estadio I, la masa molecular nativa fue de 650 kDa (Vt₁) y 440 kDa (Vt₂) y huevos en estadio V, la masa molecular nativa fue de 390 kDa (Vt₁) y 340 kDa (Vt₂).

La composición bioquímica de las Vts mostró que se tratan de lipo-glicoproteínas. En el análisis SDS-PAGE una similar composición polipeptídica fue observada en las dos formas de Vts en el ovario y en los huevos en estadio V. En los ovarios, el análisis mostró 4 subunidades con masas moleculares alrededor de 180, 120, 95, y 80 kDa (Vt₁ y Vt₂) y en huevos en estadio V, masas moleculares de 110, 95, 87, y 75 kDa (Vt₁ y Vt₂). La composición polipeptídica en las dos Vts en huevos en estadio I y en estadio III fue diferente: 195, 190, 130, y 110 kDa (Vt₁) y 116 y 107 kDa (Vt₂). En huevos en estadio V fueron también identificadas dos formas de Vts mediante cromatografía en columnas de Sepharose CL-2B y de hidroxilapatita. Dos anticuerpos antivitelina (Ac₁ y Ac₂) fueron preparados a partir de electroforesis preparativas de extracto de huevos en estadio V y su especificidad fue demostrada por el análisis ELISA, doble inmunodifusión radial y Western blot.

Un producto de PCR de 1.1 Kb fue obtenido utilizando ADN genómico de *C. quadricarinatus* como molde. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores a partir del ADNc de la Vg del hepatopáncreas de la misma especie. El producto de PCR fue clonado, secuenciado y se utilizó como sonda para hibridar en el análisis de Northern blot. El ARN total del hepatopáncreas y del ovario de hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración fue extraído y utilizado como molde para la obtención de su correspondiente ADNc por transcripción reversa (RT). Los resultados del análisis del Northern blot mostraron que el ARNm de la Vg estuvo presente en el ovario como en el hepatopáncreas, no detectándose en el hepatopáncreas de machos maduros de la misma especie. Los resultados de RT-PCR mostraron que el ARNm que codifica la región 3' del ADNc de la Vg estuvo presente también simultáneamente en ambos tejidos. Asimismo, se sugiere la presencia de más de un gen que codifican la síntesis de la Vg.

Palabras clave: *Cherax quadricarinatus*, síntesis, vitelogenina.

Dra. Celia Vázquez Boucard.

ABSTRACT

Vitellogenin (Vg) from hemolymph and vitellins (Vts) from ovaries and eggs with different stage in development of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* were examined by chromatography, PAGE and SDS-PAGE.

With these methods, one possible vitellogenin (Vg) was found in the in secondary vitellogenesis female hemolymph. Native molecular mass was 500 kDa. Two forms of vitellin (Vt₁ and Vt₂) were observed in ovaries and eggs (stages I and V). In ovaries in secondary vitellogenesis, native molecular mass were 470 kDa (Vt₁) and 440 kDa (Vt₂); eggs in progressively more advanced development showed a more complex electrophoretic pattern, consisting of proteins with different molecular mass; stage I, 650 kDa (Vt₁) and 440 kDa (Vt₂); stage V, 390 kDa (Vt₁) and 340 kDa (Vt₂).

The identified vitellins appear to be lipo-glyco-protein. A similar vitellin polypeptide composition was observed in the two forms of vitellin from ovaries and eggs in stage V. In ovaries the SDS-PAGE analysis showed 4 subunits with molecular mass around 180, 120, 95, and 80 kDa (Vt₁ and Vt₂). The polypeptide composition in the two forms of vitellins in stage I and stage III eggs were different at 195, 190, 130, and 110 kDa (Vt₁) and 116 and 107 kDa (Vt₂). On the other hand, in stage V eggs, 110, 95, 87, and 75 kDa (Vt₁ and Vt₂) were identified. Two forms of vitellins were also found in stage V eggs after chromatography on Sepharose CL-2B, hydroxylapatite column, and polyacrylamide gel electrophoresis. Two antibodies (Ab₁ and Ab₂) were prepared against the purified proteins of stage V eggs and their specificity was demonstrated by ELISA assay, radial immunoprecipitation, and Western blotting analysis.

A 1.1 Kb PCR product was obtained using genomic DNA of *Cherax quadricarinatus* as a template. The PCR product was cloned and sequenced. Total RNA isolated from the hepatopancreas and ovary from spawned for the first time secondary-vitellogenic female was used as a reverse transcription (RT) template to synthesize first strand cDNA. Results of RT-PCR analysis showed that mRNA encoding the 3' end cDNA vitellogenin were present simultaneously in the hepatopancreas and ovary. Results of Northern blot analysis showed that mRNA was also present in both tissues in secondary-vitellogenic female but was not detected in male hepatopancreas. We suggest the presence of more than one gene encoding the vitellogenin synthesis.

Keywords: *Cherax quadricarinatus*, synthesis, vitellogenin.

Esta Tesis la dedico con todo mi amor a mi Familia adorada, porque todos ellos son mi más grande motivación. A mis padres Mary y Humberto, porque ellos son mi mejor ejemplo y porque de ellos he recibido todo su amor y apoyo para que yo cumpla todos mis metas en todo momento.

A Thierry por haber dejado todo para poder estar juntos.

A Norma, Humberto y Guillermo por todo lo que hemos compartido y porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado.

A mis muñecos preciosos Gusy, Pris y Emiliano por iluminar nuestras vidas.

A Lorena y Gustavo porque junto con ustedes hemos formado una linda familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por la vida y por todas sus bendiciones.

Un agradecimiento muy sincero a la Dra. Celia Vázquez Boucard por su dirección, apoyo y amistad durante la realización de esta tesis.

Al Comité Tutorial y al Comité Revisor de la Tesis, compuesto por la Dra. Celia Vázquez Boucard, Dr. Humberto Villarreal, Dr. Héctor Nolasco, Dr. Alberto Huberman, Dra. Catherine Badens, Dra. Mylene Ogliastro, Dr. Humberto Mejía y Dr. Dariel Tovar por sus valiosas asesorías y comentarios.

De manera muy especial a la Dra. Mylene Ogliastro, Dr. Igor Landais, Dr. Devauchelle y a toda la comunidad del Institute National de la Recherche Agronomique (INRA) en St. Christol Lez Ales, Francia, por su aceptación, su valiosísima asesoría y amistad recibida durante mis estancias de investigación.

A la Dra. Alejandra García por su apoyo en la secuenciación nucleotídica realizada en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa y al técnico Alfredo Coronas por su apoyo en la secuenciación de aminoácidos en el departamento de Medicina

Molecular y Bioprocesos a cargo del Dr. Possani Postay en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Al personal directivo, académico, técnico y amigos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., por el apoyo recibido durante el tiempo de la realización de esta tesis: Aradit Castellanos, Martín Ramírez, Sofía Ramos, Melisa Gutiérrez, Lupita Carrisoza, Antonio Díaz, Ira Fogel, Ariel Cruz, Lilia Ibarra, Rubén Valles, Sergio Sevilla, Josefina Villa, Neftalí Gutiérrez, Carlos Ceseña, Adriana Landa, Francisco Encarnación, Ismael Valdivia, al personal administrativo de la Dirección de Estudios de Posgrado, al personal de los laboratorios de Especialidades del edificio de Patología (edificio A) y de los laboratorios de Cromatografía, Biología Molecular y Microbiología, a la Dirección de Apoyo Académico, a la Dirección General y de manera muy especial al Dr. Mario Martínez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca crédito que me otorgó.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
GENERALIDADES DE LA ESPECIE	15
Taxonomía	15
Distribución	16
Morfología	17
Fisiología.....	19
Reproducción	19
Sistema endocrino	22
Comportamiento.....	23
Alimentación.....	23
Patología y parasitología.....	23
Cultivo en estanques.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA VITELINA (Vt)	28
Introducción.....	29
Materiales y Métodos	30
Homogenización de las muestras.....	30
Identificación y caracterización de las vitelinas de la hemolinfa, del ovario y de los huevos.....	31
Purificación de las Vts de los huevos	33
Preparación de anticuerpos	36
Especificidad de los anticuerpos.....	38
Transferencia electroforética de las proteínas sobre filtro (Western blotting)	38
Doble Inmunodifusión Radial.....	39
Análisis Inmunoenzimático (ELISA)	39
Secuenciación de aminoácidos de las subunidades de las Vts del ovario.	40
Resultados	41
CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA VITELOGENINA (Vg)	60
Introducción.....	61
Materiales y métodos	62
Extracción de ADN (Ácido-desoxi- ribonucleico).....	62
Precipitación del ADN	63
Cuantificación de ADN	64
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
Purificación del ADN	65
Marcaje de sonda con α 32P	66
Técnica de clonación.....	66
Extracción de ARN (Ácido-ribonucleico)	69
Cuantificación de ARN	70
Tratamiento con ADNasa.....	70
Preparación del ADNc por transcriptasa reversa (RT-PCR)	71

Northern Blot	71
Secuenciación	73
RESULTADOS	74
DISCUSIÓN E INTEGRACIÓN	85
Identificación, purificación y caracterización de la Vt.	85
Determinación del sitio de expresión del ARNm de la vitelogenina (Vg).....	90
CONCLUSIONES GENERALES.....	96
PERSPECTIVAS	99
REFERENCIAS	101
ANEXO I.....	122
Análisis bioquímico	122
ANEXO II.....	125
Análisis molecular	125
ANEXO III.....	128
Publicaciones	128

LISTA DE PUBLICACIONES

Vania Serrano-Pinto, Celia Vazquez-Boucard and Humberto Villarreal-Colmenares. 2003. Characterization of yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 134. 33-43.

Vania Serrano-Pinto, Igor Landais, Celia Vazquez-Boucard, Meliza Gutiérrez-Ayala, Humberto Mejía-Ruíz, Humberto Villarreal-Colmenares, Alejandra García and Mylene Ogliastro. Determination site of mRNA expression of vitellogenin in secondary-vitellogenic female of *Cherax quadricarinatus*. *Molecular Reproduction and Development*. (En impresión).

Vania Serrano-Pinto, Celia Vazquez-Boucard, Humberto Villarreal-Colmenares, Determination site of mRNA expression of vitellogenin in different stages of maturity of *Cherax quadricarinatus*. (En elaboración).

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO I

Figura 1. Langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*.

Figura 2. I) Morfología de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, tomada de Villarreal y Peláez, 1999. II) Organos reproductores femeninos y masculinos. OV= Ovario; T= Testículos; PG= Poro genital; GA= Glándula Androgénica, tomada de Sagi et al., 1996.

Figura 3. I. Electroforesis PAGE-nativa (6%) de *Cherax quadricarinatus*. A. Proteínas (azul de Coomasie). B. Lípidos (negro de Sudán). a) Extracto de hemolinfa de hembra en vitelogénesis secundaria, b) Extracto de hemolinfa de hembra previtelogénica. II. Electroforesis PAGE-nativa en gradiente (4-20%), teñida con azul de Coomassie. a) Extracto de hemolinfa de hembra en previtelogénesis; b) Extracto de hemolinfa de hembra en vitelogénesis secundaria; c) Marcadores de peso molecular (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sweden).

Figura 4. Electroforesis PAGE (6%) de *C. quadricarinatus*. I. Proteínas (azul de Coomasie). II. Lípidos (negro de Sudán). III. Carbohidratos (reactivo de Schiff). a) Extracto de ovario de hembra previtelogénica; b) Extracto de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria; c) Extracto de huevo en estadio I; d) Extracto de huevo en estadio V.

Figura 5. Electroforesis PAGE (4-20%) de *C. quadricarinatus*. I. Proteínas (azul de Coomasie). II. Lípidos (negro de Sudán). a) Marcadores (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sweden); b) Extracto de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria; c) Extracto de huevo en estadio I; d) Extracto de huevo en estadio V.

Figura 6. A) Perfil de elución de extracto de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus*, separado en cromatografía en gel de filtración en Sepharose CL-2B (61.5 cm x 2 cm diam.) equilibrada con amortiguador 0.01M Tris-HCl, con flujo de 0.3 mL/min y fracciones de 2.5 mL Pico I y II (Vitelinas en pico II). B) El pico II separado por cromatografía en columna de adsorción de hidroxilapatita equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio (PPB) (0.01M), con gradientes de concentración 0.01M, 0.10M, 0.20M y 0.35M; y un flujo de 0.3 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 2.5 mL. 1-6 picos de proteínas. Vitelinas (Vt_1 y Vt_2) pico 6.

Figura 7. I) Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas (Vt_1 y Vt_2) de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* en cromatografía en gel de filtración en Sepharose CL-2B. II) Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas (Vt_1 y Vt_2), (Pico 6) de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* en cromatografía en columna de hidroxilapatita. a) Proteínas (azul de Coomasie); b) Lípidos (negro de Sudán); c) Carbohidratos (reactivo de Schiff). (Vt_1) Vitelina 1; (Vt_2) Vitelina. 2.

Figura 8. SDS-PAGE (7.5%) de las vitelinas teñidas con azul de Coomasie en: a) Ovario de hembra en vitelogénesis secundaria; a) Vt_1 , a') Vt_2 ; b) Huevos en el estadio I; b) Vt_1 , b') Vt_2 ; c) Huevos en el estadio III; c) Vt_1 , c') Vt_2 ; d) Huevos en el estadio V; d) Vt_1 , d') Vt_2 ; Marcadores (Bio-Rad, California, USA).

Figura 9. Western blotting de las Vts purificadas de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* obtenidas del pico 6 de la cromatografía de hidroxilapatita. I) Marcadores (Bio-Rad, California, USA). II) SDS-PAGE (7.5%) teñidas con azul de Coomasie. III) Reacción de la transferencia con los anticuerpos antivitelina 1 (Ac_1). IV) Reacción de la transferencia con los anticuerpos antivitelina 2 (Ac_2).

Figura 10. Doble inmunodifusión radial. I. Anticuerpo 1 (Ac_1). II. Anticuerpo 2 (Ac_2). a) Vitelinas purificadas de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus*, (Pico 6); b) Extracto de huevos en estadio V; c) Extracto de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria; d) Extracto de hemolinfa de hembra en vitelogénesis secundaria; e) Extracto de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria; f) Extracto de huevo en estadio I.

Figura 11. Curva de titulación del anticuerpo 1 (Ac_1) realizada por ELISA en siete diluciones (1/100, 1/500, 1/1,000, 1/5,000, 1/20,000, 1/50,000 y 1/100,000).

Figura 12. Curva de titulación del anticuerpo 2 (Ac_2) realizada por ELISA en siete diluciones (1/100, 1/500, 1/1,000, 1/5,000, 1/20,000, 1/50,000 y 1/100,000).

Figura 13. Perfil de elución de extracto de ovarios de hembra vitelogénica de *C. quadricarinatus*, separado en cromatografía en gel de filtración en Sepharose CL-2B (61.5 cm x 2 cm diam.) equilibrada con amortiguador 0.01M Tris-HCl con 2 mM PMSF pH, 7.0, con flujo de 0.30 mL/min y fracciones de 2.5 mL. Picos A, B y C. (Vitelinas en pico C).

Figura 14. Perfil de elución de los picos A-G separados por cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B) equilibrada con amortiguador A (25 mM Tris HCl, con 1 mM PMSF, pH, 7.5). La elución se realizó con amortiguador B (500 mM NaCl, pH 7.5) en un gradiente lineal en dos etapas: la primera, de 0% a 50% de amortiguador B en 150 mL y la segunda de 50 a 100% de amortiguador B en 30 mL., en un flujo de 0.60 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 3.0 mL.

Figura 15. Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas de ovario de hembra vitelogénica de *C. quadricarinatus* en cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B). A-G) Fracciones de proteínas. Vitelinas en fracciones E, F y G (→).

Figura 16. Perfil de elución de los picos 1-8 separados en la segunda cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B), equilibrada con amortiguador de 25 mM Tris HCl, con 1 mM PMSF, pH, 7.5. La elución se realizó con amortiguador B (500 mM NaCl, pH 7.5) en un gradiente lineal en diversas etapas: de 0% a 7% de amortiguador B en 20 mL, de 7 a 10% de amortiguador B en 35 mL, de 10 a 13% de amortiguador B en 30 mL, de 13 a 16% de amortiguador B en 30 mL, de 16 a 20% de amortiguador B en 30 mL y de 20 a 100% de amortiguador B en 40 mL, a una tasa de 0.60 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 3.0 mL..

Figura 17. Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas de ovario de hembra vitelogénica de *C. quadricarinatus* de la segunda cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B) Vitelinas en picos 4, 5 y 6 (→).

Figura 18. Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa obtenida en la Vt_1 purificada de huevos en estadio V localizada dentro de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc de la Vg de *C. quadricarinatus* obtenida por Abdu et al., (2002).

ÍNDICE DE TABLAS DEL CAPÍTULO I

Tabla I. Masas moleculares (kDa) de las Vts de la hemolinfa, de los ovarios y de huevos en los estadios I y V de hembra en vitelogénesis secundaria de *Cherax quadricarinatus* obtenidas por electroforesis PAGE-nativa en gradiente 4-20%.

Tabla II. Masas moleculares (kDa) de las subunidades de las vitelinas (Vt₁ y Vt₂) del ovario de hembra en vitelogénesis secundaria y de huevos en diferentes estadios de desarrollo de *C. quadricarinatus* obtenidas por electroforesis SDS-PAGE.

Tabla III. Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa obtenida de la Vt₁ purificada de huevos en el estadio V de *C. quadricarinatus* mediante técnicas cromatográficas.

Tabla IV. Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 120 kDa obtenida en la Vt₁ purificada de ovario de *C. quadricarinatus*, mediante técnicas cromatográficas.

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO II

Figura 19. Producto de PCR de 1.1 Kb utilizado como molde el ADN genómico de una hembra de *Cherax quadricarinatus* en vitelogénesis secundaria de primera maduración. Los oligonucleótidos cebadores (VgF- 5' GTG CGT CGC CTA CTG GAA CA 3' y VgR- 5' CTT GGC GGA ATA CTC GGA CTG 3') fueron diseñados a partir del ADNc de la vitelogenina (Vg) de *C. quadricarinatus*. a) Electroforetograma realizado en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. b) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France).

Figura 20. Plásmido pGEM-T "Easy Vector System" utilizado en la clonación del fragmento obtenido a partir del ADN genómico de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración de *C. quadricarinatus*.

Figura 21. Secuencia nucleotídica de la región 3' del ADNc de la Vg de *C. quadricarinatus* (AF306784). Par de oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar la región 3' (en negritas).

Figura 22. Esquema del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de *C. quadricarinatus* (AF306784) (Banda negra gruesa). Región 3' del ADNc de la Vg amplificada por PCR en este estudio (Banda negra delgada). Fragmento de sonda (Recuadro blanco).

Figura 23. Alineación de la sonda utilizada en este estudio contra el ADNc del hepatopáncreas de la Vg obtenido por Abdu et al., 2002 (AF306784). Sonda obtenida del fragmento de 1.1 kb utilizada en este estudio (Letras negritas); ADNc del hepatopáncreas de la Vg obtenido por Abdu et al., 2002 (Letras en itálicas).

Figura 24. a) Digestión con la enzima de restricción *Eco* RI, de la clonación del producto de PCR de 1.1 Kb con el plásmido pGEM-T "Easy Vector System". b) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France). Análisis del Northern blot obtenido a partir de ARN total de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración de *C. quadricarinatus* c) hepatopáncreas de macho maduro; d) ovario de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración; e) hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración; f) Escalera de marcadores de peso molecular de ARN (281 - 6,583 pb) (RNA Marker-Promega, U.S.A.).

Figura 25. ADNc obtenidos en el análisis de RT-PCR a partir de ARN total de *C. quadricarinatus* de muestras de ovario y de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración. a) ovario; b) hepatopáncreas; c)

Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France).

Figura 26. ADNc obtenidos en el análisis de RT-PCR a partir de RNA total de *C. quadricarinatus* de muestras de ovario y de hepatopáncreas. a) Ovario de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración; b) Hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración; c) Ovario de hembra en vitelogénesis secundaria de desoves consecutivos; d) Hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de desoves consecutivos; e) Ovario de hembra ovígera; f) Hepatopáncreas de hembra ovígera; g) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France).

Figura 27. Secuencias nucleotídicas del ARNm de ovario y de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración de *C. quadricarinatus* obtenidas a partir de la clonación de los productos de RT-PCR. a) ovario; b) hepatopáncreas.

Figura 28. Secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración de *C. quadricarinatus*, alineada contra la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de la misma especie, obtenida por Abdu et al., 2002 (AF306784).

Figura 29. Secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración de *C. quadricarinatus*, alineada contra la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de la misma especie, obtenida por Abdu et al., 2002 (AF306784).

ABREVIATURAS

Ac₁	Anticuerpo 1.
Ac₂	Anticuerpo 2.
ADN	Ácido-desoxi-ribonucleico.
ARN	Ácido-ribonucleico.
ARNm	Ácido-ribonucleico mensajero.
AT	Adenina-timina.
ATP	Adenosina-trifosfato.
α³²P	Fósforo radiactivo.
B	Amortiguador (500 mM NaCl), pH 7.5.
BSA	Albúmina serosa bovina (siglas en inglés).
C-terminal	Carboxilo terminal.
°C	Grado centígrado.
CaCO₃	Carbonato de calcio.
cDNA	Ácido-desoxi-ribonucleico complementario (siglas en inglés).
CHH	Hormona hiperglicemiante de los crustáceos (siglas en inglés).
CTP	Citosina trifosfato.
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
dCTP	Desoxicitosina trifosfato (siglas en inglés).
cm	Centímetro.
DEPC	Dietil pirocarbonato.
dNTP's	Trifosfato desoxinucleótidos (siglas en inglés).
DEAE	Dietilaminoetil.

DMSO	Dimetilsulfoxido.
Eco R1	Enzima de restricción (<i>Escherichia coli</i> RY 13).
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético (siglas en ingles).
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (siglas en ingles).
FPH	Amortiguador (50% formamida, 5X SSC, 1% SDS, 5X Denhardt's y 100µg/ml de ADN de timo de ternero desnaturalizado) (Solución Prehibridadora).
g	Gramo.
g	Gravedades.
GIH	Hormona inhibidora de la gónada (siglas en inglés).
GTP	Guanosina trifosfato.
H₂O	Agua.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
Ha	Hectárea.
HDL	Lipoproteína de alta densidad (siglas en inglés).
IgG	Inmunoglobulina tipo G.
IPTG	Isopropil-β-tiogalactopiranosido.
Kb	Kilobases.
Kg	Kilogramo.
KDa	Kilo Daltons.
LB	Medio rico para enterobacterias (Luria-Bertani).
M	Molar.
m²	Metro cuadrado.
MIH	Hormona inhibidora de la muda (siglas en inglés).

min	Minuto.
mL	Mililitro.
μL	Microlitro.
mM	Milimolar.
μg	Microgramo.
MgCl₂	Cloruro de Magnesio.
MOIH	Hormona inhibidora del órgano mandibular.
NaCl	Cloruro de sodio.
nm	Nanómetros.
nmol	Nanomol.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (siglas en ingles).
pb	Pares de bases.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (siglas en ingles).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en ingles).
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	lones hidrógeno.
PVDF	Difluoruro de polivinilo (siglas en inglés).
PMSF	Fluoruro de sulfonil fenil metilo (siglas en ingles).
PPB	Amortiguador de fosfato de potasio (siglas en inglés).
ppt	Partes por mil.
PSA	Persulfato de amónio.
OP	Densidad óptica.

RT-PCR	Transcriptasa Reversa- reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés).
S1	Amortiguador de resuspensión (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg ARNasa/mL, pH 8.0).
S2	Amortiguador de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS).
S3	Amortiguador neutralizante (280 M KAc, pH 5.0).
sp.	Especie.
SDS	Dodecil sulfato de sodio (siglas en inglés).
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (siglas en inglés).
SSC	Amortiguador 20X (3M Na Cl, 0.3M Citrato de sodio, pH 7.0).
TAE	Amortiguador 1X (Tris-acetato-EDTA), pH 8.3.
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Amortiguador 1X (0.01M Tris-HCl, 1mM EDTA Na ₂), pH 8.0.
TEMED	Tetrametiletilenodiamina.
Ton	Toneladas.
Tris HCl	Amortiguador (Tris Hidroclorídrico).
v/v	Volumen/volumen.
VIH	Hormona inhibidora de la vitelogenesis (siglas en inglés).
VSH	Hormona estimuladora de la vitelogenesis (siglas en inglés).
VSOH	Hormona ovárica estimuladora de la vitelogenesis (siglas en inglés).
Vt	Vitelina.
Vg	Vitelogenina.
x-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido.

- 5'** Extremo amino.
- 3'** Extremo carboxilo.
- 1X** Concentrado una vez.

NOMENCLATURA DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS

Nucleótidos

Alanina	a
Citosina	c
Guanina	g
Timina	t
Uracilo	u

Aminoácidos

Alanina	A
Ác. aspártico	D
Ác. glutámico	E
Arginina	R
Asparagina	N
Cisteina	C
Fenilalanina	F
Glicina	G
Glutamina	Q
Histidina	H
Isoleucina	I
Lisina	K

Leucina	L
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T
Triptófano	W
Valina	V

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola se ha venido desarrollando alrededor de todo el mundo como una alternativa para disminuir la captura de organismos silvestres. Se espera que las actividades de la acuicultura se extiendan de manera significativa en un futuro próximo a medida que su práctica aumente y se diversifique, con el fin de producir organismos de buen tamaño y calidad, atractivos para el mercado (Villarreal y Peláez, 1999).

En México, la producción acuícola se ha basado principalmente en especies marinas de interés comercial como son los peces, los moluscos y camarones peneidos, sin embargo, los cuerpos de agua continentales también poseen una gran diversidad de organismos con características ideales para el cultivo y son una excelente alternativa (Villarreal y Peláez, 1999). Un ejemplo de ello es el cultivo de acociles y langostinos (Jones, 1995). En nuestro país se producen especies dulceacuícolas que no superan los 60 gramos después de seis meses de cultivo, no logrando alcanzar tallas comerciales atractivas para el mercado internacional (Jones, 1999). Sin embargo, en otros países esto se ha logrado cultivando especies provenientes de Australia como la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (redclaw o langosta de agua dulce) (Jones y Curtis, 1994). La misma ha sido considerada para la acuicultura por sus excepcionales atributos, entre los que se menciona la gran adaptabilidad a condiciones de cultivo, ciclo de vida corto, alta supervivencia y crecimiento, en un amplio intervalo

de condiciones ambientales. Presenta una buena tasa de crecimiento, gran aceptación en el mercado y su producción es económicamente viable (Villarreal y Peláez, 1999). La textura de su carne cumple con los más altos estándares de calidad y el sabor de su carne es agradable (García-Guerrero, 2002). Presenta una gran capacidad para ser introducida con éxito en cualquier región templada o tropical (Jones, 1990), lo que la hace tener un amplio potencial de distribución geográfica.

Gracias a su fácil manejo, varios países como Australia, China, Ecuador y Estados Unidos de Norte América la han cultivado con éxito. La producción actual en Australia es de 60 ton/año (Jones 1990). En nuestro país también ha sido introducida con éxito en granjas comerciales del Estado de Tamaulipas, con rendimientos de 2,200 a 2,500 kg/ha en un ciclo de 9 meses (Villarreal y Peláez, 1999).

Esta adaptabilidad la hace una candidata ideal para su cultivo en diversas regiones de México; sin embargo, a pesar de que se conoce la tecnología básica para la producción a escala comercial, la tecnología orientada a mejorar sustancialmente su producción, esta en vías de desarrollo (García-Guerrero, 2002). Existe poca información referente a la biología de la especie, principalmente en el conocimiento de su fisiología reproductiva.

El proceso reproductivo ha sido estudiado en diversos crustáceos (Frentz 1960; Ceccaldi y Martín, 1969; Kerr, 1969; Vázquez-Boucard, 1986; Tom et al., 1987; Fainzilber et al., 1989; Shafir et al., 1992; Sagi et al., 1995; Chang et al., 1996;

Lee y Chang 1997; Lubzens et al., 1997); sin embargo, la complejidad de las moléculas implicadas en la reproducción como las diferentes metodologías utilizadas y la diversidad de especies estudiadas, no han permitido clarificar la relación existente entre los polipéptidos que componen las vitelogeninas (Vgs) transportadas y las vitelinas (Vts) acumuladas en el ovario. Las controversias se refieren, por un lado, a la composición de estas moléculas (naturaleza lipo-glico-caroteno-fosfo-proteínica) así como el número de subunidades que la componen (2-8 según la especie). Por otro lado, se han propuesto diferentes lugares de síntesis de la Vg dependiendo de la especie, encontrándose síntesis exógena tanto en el hepatopáncreas como en el tejido adiposo, así como síntesis endógena en el ovario (Khayat et al., 1994; Tsutsui et al., 2000; Abdu et al., 2002; Avarre et al., 2003; Tsang et al., 2003); sin embargo, no se han podido aún explicar los mecanismos desarrollados por estas moléculas desde su síntesis hasta su acumulación en el ovocito. Existe la duda también si el ADNc de la Vg obtenido del hepatopáncreas y del ovario es producto de un mismo gen, o si el ARNm se expresa tanto en el hepatopáncreas como en el ovario y si esta expresión varía durante el ciclo del desarrollo ovárico (Lubzens et al., 1995; Avarre et al., 2003; Tsang et al., 2003).

Este proceso ha sido estudiado también en diversos crustáceos con características acuaculturales, encontrándose con graves problemas en la etapa de maduración de las hembras en cautiverio donde la mayoría de las veces se ha tenido que utilizar la cruda técnica de la ablación para inducir el desarrollo gonadal y lograr obtener el desove. La técnica de ablación remueve el tallo ocular donde se

encuentra la hormona inhibidora de la gónada (GIH) produciéndose una rápida vitelogénesis (Tsang et al., 2003). Sin embargo, esta técnica da como resultado una baja calidad en las postlarvas de algunas especies de crustáceos ya que puede llegar a causar alteraciones fisiológicas en comparación con las hembras que desovan en el medio natural (Jayasankar et al., 2002). En las hembras que desovan en varias ocasiones durante el año, decrece el vigor en las larvas de cada sucesivo desove incrementándose la susceptibilidad a la muerte lo cual provoca un grave problema para la industria. Esta biotecnología ha sido aplicada para inducir la maduración ovárica; sin embargo, los resultados son inconsistentes debido ante todo a la falta de conocimiento genético y control endocrino que regulan la vitelogénesis (Jayasankar et al., 2002).

De esta manera, en relación al creciente interés en el cultivo de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, es importante conocer diferentes aspectos relacionados con su fisiología reproductiva y sus mecanismos de expresión para poder mejorar su estrategia de maduración en los sistemas acuaculturales con la finalidad de obtener organismos más sanos, resistentes y de mayor calidad en un menor tiempo, reduciendo con esto costos de operación.

Con base en esto, el estudio a escala bioquímica y molecular presentado en esta investigación pretende aportar el conocimiento relacionado con la identificación y la caracterización de las moléculas de la Vt y con la determinación del lugar de síntesis de la Vg. Estos resultados servirán como base para subsecuentes estudios relacionados con los controles hormonales que regulan la

síntesis de esta molécula y mediante esto, lograr controlar la maduración ovárica en condiciones de cultivo.

ANTECEDENTES

El proceso reproductivo en crustáceos conformado por las fases de previtelogénesis, vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria o maduración, desove y fecundación puede ser evaluado mediante la inspección visual de la talla y el color de los ovarios (Yano et al., 1988; Jones, 1988). Asimismo, el monitoreo histológico, el uso de escalas morfocromáticas del desarrollo de los ovarios y los cambios del desarrollo de la gónada expresados como índices gonadosomáticos, gonádicos, factores de condición, etc., son índices confiables de la evaluación del proceso reproductivo (Browdy, 1992; Medina et al., 1996; Sagi et al., 1996; Sagi et al., 1997). Por otro lado, este proceso también puede ser evaluado en función de los cambios bioquímicos que ocurren dentro de la gónada, principalmente mediante la localización de los sitios de síntesis bioquímica intensa durante la gametogénesis (Sagi et al., 1996).

Una de las principales características de la reproducción de los invertebrados es la acumulación de sustancias de reserva en los ovocitos por los individuos reproductores, las que serán transmitidas, además del material genético, a los huevos y larvas. Este proceso recibe el nombre de vitelogénesis. El vitelo, una lipoglico-fosfo-caroteno-proteína es el principal componente del huevo (Adiyodi, 1985), contiene todos los constituyentes bioquímicos necesarios para la embriogénesis y supervivencia de la progenie hasta el momento en que puedan alimentarse por sí mismas. Su principal lipoproteína es la vitelina (Vt), y su precursor la vitelogenina (Vg) es una de las dos lipoproteínas conocidas en la hemolinfa de los crustáceos.

El primero en identificar en la hemolinfa la presencia de una fracción proteínica específica de hembras en vitelogénesis fue Frenz en 1960, en *Carcinus maenas*. Posteriormente la misma fue identificada en varios decápodos (Ceccaldi y Martín, 1969; Kerr, 1969; Fielder et al., 1971; Junera, 1973; Picaud y Besse, 1973; Lee, 1991; Quackenbush, 1991).

Paralelamente, se realizaron estudios ultraestructurales en ovocitos de langosta (Beams y Kessel, 1963), quienes señalaron la abundante presencia de material lipídico en el vitelo. Por su parte Munn (1963) y Allen (1972) determinaron el importante papel desempeñado por los lípidos en la vitelogénesis de los decápodos. Albanese-Carmignani et al., (1973) trabajando con *Maja verrucosa* y Bonina (1974) con *Palaemon adspersus* confirmaron estos resultados, determinando la naturaleza lipo-glico-proteínica del vitelo. Chang et al., (1994) niegan la existencia de carotenoides en la Vg transportada por la hemolinfa en *P. monodon*, señalando que los carotenoides serían incorporados a la molécula de la Vt en el mismo ovario, siendo la Vg de la hemolinfa de naturaleza lipo-glico-fosfo-proteínica.

La Vg de la hemolinfa y la Vt del ovario han sido identificadas, purificadas y caracterizadas en diversas especies de camarones peneidos (*Penaeus japonicus*, Vázquez-Boucard et al., 1986; Kawasoe et al., 2000; *P. semisulcatus*, Browdy et al., 1992, Tom et al., 1992 y Lubzens et al., 1997; *P. monodon*, Qunitio et al., 1990, Chen y Chen, 1993, Chang et al., 1993 y Chang et al., 1994; *P. chinensis*, Chang y Jeng, 1995, Chang et al., 1996; *Litopenaeus vannamei*, Vázquez-

Boucard et al., 2003) y en especies de crustáceos dulceacuícolas (*Macrobrachium rosenbergii*, Lee y Chang, 1997; Lee et al., 1997; Chen y Kuo, 1998; Lee y Chang, 1999).

Una lipoproteína de alta densidad (HDL) ha sido aislada en la hemolinfa de hembras en vitelogénesis secundaria de *Cherax quadricarinatus*, conteniendo cuatro polipéptidos con masas moleculares de 208, 196, 177, y 80 kDa (Abdu et al., 2000). Asimismo, Yehezkel et al. (2000) reportaron una lipoproteína de alta densidad en hemolinfa característica de hembras en vitelogénesis secundaria, integrada por dos polipéptidos con una masa molecular de 177 y 80 kDa. Abdu et al. (2001) estudiando las proteínas del vitelo, encontraron seis subunidades lipoproteínicas de alta densidad (HDL) en la hemolinfa con masas moleculares aproximadas de 177, 155, 106, 95, 86 y 75 kDa.

Por otro lado, algunas técnicas bioquímicas e inmunológicas se han utilizado para evidenciar la identidad inmunoquímica entre la proteína sérica específica de las hembras (Vg) y la Vt acumulada por los ovocitos en crecimiento en crustáceos (Fyffe y O'Connor, 1974). Wolin et al., (1973) demostraron la identidad inmunoquímica existente entre la Vg y una proteína del hepatopáncreas en *Uca pugilator* y *Carcinus maenas*. Posteriormente, Vázquez-Boucard (1990) comprobó la identidad antigénica y una similitud en la estructura molecular de las Vts del ovario y Vg de la hemolinfa en tres especies de peneidos. Varios de estos resultados fueron corroborados en otras especies por Tom et al., (1987); Fainzilber et al., (1989); Shafir et al., (1992); Chang et al., (1996); Lee y Chang (1997); Lubzens et al., (1997).

Estas técnicas han sido aplicadas para mostrar la presencia de la Vt y de la Vg en diversos tejidos, sugiriendo además, el origen de la síntesis de la Vg. Existe una controversia en relación al lugar de síntesis de la Vg en diferentes especies de invertebrados. Tanto síntesis exógena (hepatopáncreas, tejido adiposo) como endógena (ovario) han sido propuesta para diversas especies marinas y dulce acuícolas (Ganion y Kessel, 1972; Lui et al., 1974; Picaud y Souty, 1981; Meusy et al., 1983; Tom et al., 1987; Sagi et al., 1995).

Una de las primeras hipótesis relacionadas con la síntesis del vitelo fue dada por Ceccaldi y Martin (1969) trabajando con *Carcinus maenas*, en la cual se implicaba la participación del hepatopáncreas. Esta hipótesis estaba fundamentada con la observación del tránsito de pigmentos carotenoides de este órgano hacia el ovario. Sin embargo, no se pudo comprobar que la fracción proteínica de la Vt tuviera el mismo origen que los carotenoides asociados.

Por otro lado, Kerr (1968) incubando tejidos y órganos de la jaiba *Callinectes sapidus* en presencia de C14-leucina, sugirió como lugar de síntesis de la Vg los hemocitos del hepatopáncreas. Posteriormente, Paulus y Laufer (1987) localizaron la Vg en las células del hepatopáncreas llamándolas vitelogenocitos en *Libinia emarginata* y *Carcinus maenas*.

Siguiendo el modelo de los insectos, Croissille y Junera (1980) mencionan al tejido adiposo subepidérmico como lugar de síntesis de la Vg en el anfípodo *Orchestia gammarellus*, hipótesis corroborada por Picaud y Souty (1981) y Meusy et al., (1983). Más tarde Vázquez-Boucard (1986) identificó un tejido adiposo en

Penaeus japonicus con reacción frente a anticuerpos policlonales antivitelina específicos de la especie. Asimismo, Tom et al., (1987) detectaron en *Parapenaeus longirostris* la Vg en el tejido adiposo y en la hemolinfa, sugiriendo su origen extraovárico. En especies dulceacuícolas, Chang-Hee et al., (1994), trabajando con hembras de *Macrobrachium nipponense*, sugieren que la Vg presenta una doble síntesis, en el hepatopáncreas y en el tejido adiposo subepidérmico. Si bien la presencia de la Vg ha sido detectada en el tejido adiposo en crustáceos, no se ha constatado síntesis en este tejido. Asimismo, Sagi et al., (1995), trabajando con *M. rosenbergii* sugieren la existencia de una fuente extraovárica para la síntesis de la Vg.

Por otro lado, varios autores señalaron síntesis de la Vt en el ovario de algunos crustáceos decápodos (Ganion y Kessel, 1972; Lui et al., 1974; Yano y Chinzei, 1987; Rankin et al., 1989; Khayat et al., 1998). Lui y O'Connor (1976 y 1977), incorporando *in vitro* aminoácidos marcados en el ovario de algunos crustáceos, constataron la presencia de 3H-leucina en la Vt, lo que les permitió deducir que el lugar de síntesis de la Vt era el mismo ovario. Esta hipótesis fue puesta en duda por Charniaux-Cotton (1978) quien señaló que el origen de la Vg era extraovárico, transportada por la hemolinfa, esta molécula penetraría en los ovocitos por micropinocitosis y su síntesis sería controlada por una hormona ovárica: la HOSV (hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis). Yano y Chinzei (1992) proponen que las reservas del hepatopáncreas podrían servir como precursores del

vitelo, los cuales transportados por la hemolinfa al ovario por medio de una apoproteína específica serían utilizados en una síntesis intraovárica de Vt.

Sin embargo, Fainzilber et al. (1992) trabajando con *Penaeus semisulcatus*, confirman una doble síntesis de la Vg activada en el hepatopáncreas y en el ovario, pero en proporciones diferentes en función del estadio de maduración ovárica. Mencionan que el hepatopáncreas sintetizará como máximo 4% de vitelo en la fase intermedia de la vitelogénesis (ovocitos de tallas 110-200 μ m), mientras que en esta misma fase, la actividad de síntesis en el ovario sería de 42%. En la última fase de la vitelogénesis, toda la síntesis se desarrollaría en el ovario (ovocitos de talla 220-280 μ m). Chang et al., (1994 y 1996) establecen una relación entre la Vg de la hemolinfa y la Vt incorporada en los ovocitos de dos especies de peneidos; solamente una de las subunidades de la Vg sería digerida parcialmente y transformada en Vt en combinación con otra subunidad de menor masa molecular. Estos autores afirman que los carotenoides están incorporados solamente a una forma de la Vg (Vg₁), mientras que en la otra forma menor (Vg₂) se encuentra ausente. Posteriormente, el estudio ultraestructural de la ovogénesis efectuado por Carvalho et al. (1998) en *P. kerathurus* demostró que el origen de la producción de la Vt es mixto (endógeno y exógeno).

Por otro lado, la síntesis endógena en el ovario ha sido encontrada en el cangrejo *Uca pugilator* (Eastman-Reks y Fingerman, 1985); en camarones peneidos (Yano y Chinzei, 1987; Rankin et al., 1989; Khayat et al., 1994) y en la jaiba *Callinectes sapidus* (Lee y Watson, 1995).

En las especies dulceacuícolas, el hepatopáncreas parece ser el lugar de síntesis de la Vg en *Macrobrachium rosenbergii* (Lee y Chang, 1997; Chen et al., 1999; Soroka et al., 2000; Yang et al., 2000, Jayasankar et al., 2002; Okuno et al., 2002); en *M. nipponense* (Han et al., 1994) y en *Cherax quadricarinatus*, no encontrándose síntesis en el ovario (Abdu et al., 2002).

En camarones peneidos, el mRNA que codifica a la Vg ha sido encontrado en ambos tejidos, en el ovario y en el hepatopáncreas (Khayat et al., 1994; Tsutsui et al., 2000; Avarre et al., 2003; Tsang et al., 2003). Lubzens et al. (1995) en el transcurso del estudio del ADN del ovario y de la hemolinfa en camarones peneidos, sugirieron que la Vg de la hemolinfa y la Vt del ovario son productos de un mismo gen. Sin embargo, Tsang et al. (2003), en *Metapenaeus ensis*, demostraron que existen dos genes implicados en la expresión de la Vg, el gen Vg₁ que se expresa tanto en ovario como en hepatopáncreas, así como el gen Vg₂ que sólo se expresa en el hepatopáncreas.

Por otro lado, se han realizado estudios relacionados sobre aspectos reproductivos en *Cherax quadricarinatus*, encontrándose los de Yeh y Rouse, (1994), quienes describen aspectos relacionados con su fecundidad y el desarrollo larvario. Analizando el ciclo reproductivo anual, encontrándose el pico de maduración de mayo a julio. Diversos autores como King (1994); Anson y Rouse (1994); Yeh y Rouse (1995); Barki et al., (1997), estudiaron la frecuencia del desove en condiciones del medio necesarias para que este proceso se realice en cautiverio, determinando que la temperatura y el fotoperiodo son los factores ambientales más

importantes para obtener el desove. Zimmermann y Fielder (1994), realizaron la ablación del tallo ocular en machos juveniles y observaron que desarrollaron caracteres sexuales femeninos.

Sagi et al., (1996a) estudiaron los caracteres sexuales, los cambios morfológicos y fisiológicos durante el ciclo reproductivo, mencionando que el caroteno más abundante en el ovario es la astaxantina. Asimismo, señalan que existe una fuerte correlación entre el incremento del diámetro de los ovocitos con la concentración de astaxantina en el ovario y en la hemolinfa. Sagi et al., (1996b) señalaron la funcionalidad de los intersexos (individuos con ovarios previtelogénicos); sin embargo, como tienen todos sus órganos masculinos, también son viables como machos, no implicando con esto, que exista hermafroditismo en estos organismos. La reproducción y la muda en hembras ablacionadas en primer desove y en hembras con desoves previos durante el invierno fueron estudiadas por Sagi et al., (1997). Ellos mencionan que las hembras que desovan por primera vez presentan ovarios tempranos con ovocitos vitelogénicos de tamaño homogéneo y de un solo color. En tanto que las hembras con desoves posteriores presentan ovarios con dos diferentes poblaciones de ovocitos de diferentes colores. Estos incluyen a la población de pequeños ovocitos, similares a los ovocitos de las hembras en primer desove. Posteriormente, Sagi et al., (1999) mediante el análisis ELISA mostraron la influencia que presenta la glándula androgénica en la expresión de la Vg en hembras y machos intersexuales. Khalaila et al., (1999) estudiaron el balance endocrino entre los componentes masculinos y femeninos del sistema reproductivo en intersexos,

obteniéndose machos funcionales pero que también poseen ovarios no funcionales. Abdu et al., (2000) y Yehezkel et al., (2000) estudiaron el desarrollo de los ovocitos y la dinámica de los polipéptidos durante la maduración ovárica, así como una lipoproteína de alta densidad de 96 kDa asociada con la vitelogénesis secundaria. Posteriormente, Abdu et al., (2002) obtuvieron la secuencia nucleotídica que codifica al ADNc de la Vg y García-Guerrero et al, (2003) realizaron la descripción del desarrollo embrionario y postembrionario con base en el método de porcentajes, mencionando que la langosta de agua dulce presenta diez estadios embrionarios que ocurren antes de la eclosión y tres después de la eclosión.

GENERALIDADES DE LA ESPECIE

Taxonomía

La langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Fig. 1) pertenece al:

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Clase: Malacostraca

Superorden: Eucarida

Orden: Decapoda

Infraorden: Astacida (Scholtz & Richter, 1995)

Superfamilia: Parastacoidea (DeHann, 1841)

Familia: Parastacidae (Huxley, 1878)

Género: *Cherax* (Erichson 1846)

Especie: *quadricarinatus* (von Martens 1868)



Figura 1. Langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*.

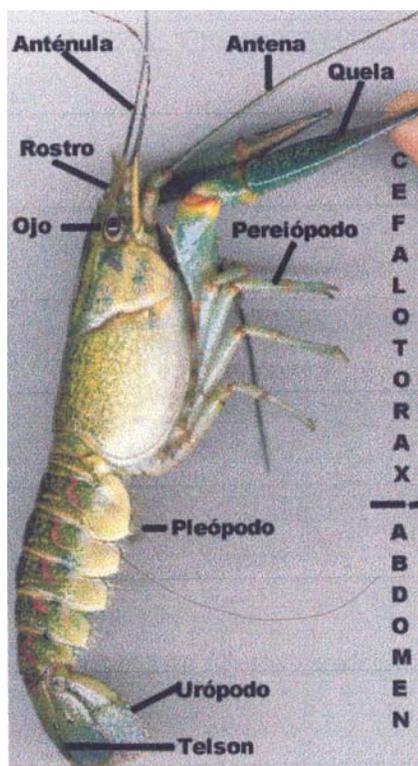
Distribución

La langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (redclaw o langosta de quelas rojas) es una especie nativa del norte de Australia (Jones y Curtis, 1994). Se localiza en los ríos del noroeste de Queensland, Australia y Papua, Nueva Guinea (Jones, 1990).

Morfología

La langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* presenta un cuerpo dividido principalmente en tres regiones: cefalotórax, abdomen y télson. El cefalotórax está conformado por la fusión de la cabeza y el tórax. Externamente, la línea cervical marca la división entre ambas. El cefalotórax presenta cuatro protuberancias que la caracterizan como especie (Jones, 1990; Villarreal y Peláez, 1999). La cabeza está conformada por cinco pares de apéndices: antenas, anténulas, mandíbulas, maxilas y maxílulas. El tórax presenta 8 secciones o somites: tres pares de maxilípedos y cinco pares de pereiópodos, siendo el primero largo y con quelas grandes. El segundo y tercer pereiópodo presentan branquias por un extremo y por el otro presentan pequeñas quelas que les permiten recolectar el alimento. El cuarto y quinto pereiópodo terminan en una espina redondeada que les permite alimentarse (Jones, 1990; Villarreal y Peláez, 1999). Los machos presentan dos apéndices copuladores o pigidios en el 5° par de pereiópodos y las hembras presentan el poro genital en el coxopodito del 3^{er} par de pereiópodos. La cavidad abdominal está conformada por apéndices denominados pleópodos, que incluyen las funciones de circulación de agua, natación, cópula y retención de los huevos en las hembras (Jones, 1990; Villarreal y Peláez, 1999) (Fig. 2).

I)



II)

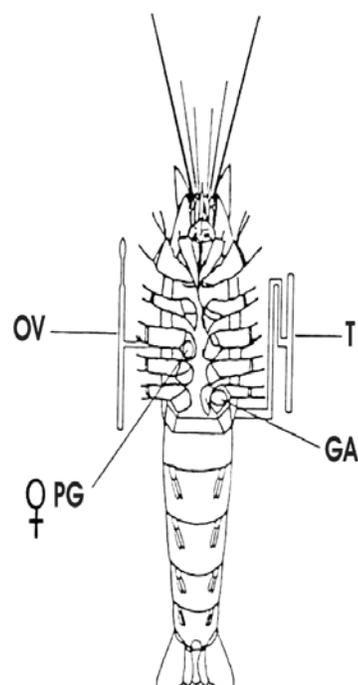


Figura 2. I) Morfología de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, tomada de Villarreal y Peláez, 1999. II) Organos reproductores femeninos y masculinos. OV= Ovario; T= Testículos; PG= Poro genital; GA= Glándula Androgénica, tomada de Sagi et al., 1996.

La langosta de agua dulce presenta un color azulado con manchas amarillas, siendo el color de las hembras un poco más tenue. Los machos presentan una ampolla membranosa de color rojo brillante irregular a cada costado de las quelas, siendo estas más largas y anchas que en las hembras a una misma talla abdominal, incrementándose esta diferencia a mayores tallas (Gu et al., 1994). La principal función de las quelas es la de defensa, permitiéndoles establecer jerarquía. Su rostrum presenta tres pares de pequeñas espinas (Gu et al., 1994).

Fisiología

La langosta de agua dulce es originaria de una región expuesta a cambios ambientales rigurosos, lo que le ha permitido evolucionar como una especie resistente que tolera casi cualquier clima. Presenta una elevada supervivencia y tasa de crecimiento en un amplio intervalo de condiciones ambientales. Soportan temperaturas desde 15° a 35° C, obteniendo el mejor crecimiento entre 24° a 30° C. Asimismo, toleran salinidades en un intervalo de 0.2-14.0 ppt (Austin, 1995). Soporta concentraciones de oxígeno disuelto por debajo de 1 mg/L, concentraciones de amonio arriba de 1 mg/L y concentraciones de nitritos hasta 1 mg/L por breves periodos de tiempo (Medley et al., 1994). A los dos años de edad alcanzan un peso entre 250-300g, alcanzando un máximo de 400-600g (Ackefors, 1994).

Reproducción

C. quadricarinatus presenta un alto potencial reproductivo. Desova de 3 a 5 veces por año en regiones tropicales (Rouse y Yeh, 1995; Sagi et al., 1996). Alcanza su madurez sexual entre los 7 y 9 meses de edad (Rouse et al., 1991) cuando alcanza un peso entre 70 y 100 gramos. La hembra presenta diferentes estadios de maduración ovárica, dividiendo el desarrollo ovárico en dos diferentes fases: Vitelogénesis primaria, que consta de 4 etapas: I. Etapa de la cromatina. II. Etapa de cromatina-nucleolo. III. Etapa perinuclear temprana y IV. Etapa perinuclear tardía. Y la fase de vitelogénesis secundaria que comprende los cuatro primeros

estadios, en adición de los 4 estadios restantes: V. Etapa lipídica. VI. Etapa del vitelo. VII Estado de premaduración y VIII. Estado de maduración (Abdu et al., 2000). Las hembras de primer desove presentan ovocitos pequeños relativamente uniformes y del mismo color (amarillo), en tanto que las hembras con anteriores desoves presentan ovocitos de dos diferentes tallas y colores (amarillo y verde) (Sagi et al., 1997).

Cuando la hembra está madura, el macho deposita un espermátforo en el primer segmento abdominal de la hembra. El fotoperiodo es el principal factor influyente en el desove. A una temperatura de 28°C y un fotoperiodo de 14 h luz se obtiene un mayor desove y un menor periodo de incubación (Yeh y Rouse, 1994). Al momento de ovopositar, los huevos son fertilizados y su cantidad por puesta varía desde 100 hasta 1000, dependiendo principalmente del tamaño de la hembra (Yeh y Rouse, 1994; Medley et al., 1994; García-Guerrero, 2003).

Presenta fecundación externa. No presenta estadios larvales libres y todo el desarrollo embrionario ocurre dentro del huevo (García-Guerrero, 2003), lo que lo hace más atractivo y ventajoso para la reproducción comercial. El proceso de la embriogénesis comienza con la diferenciación y formación de una blástula que origina a una gástrula donde se diferencian las capas celulares de acuerdo a los tejidos que han de originar (Anderson, 1982). A partir de estas capas, el desarrollo embrionario es continuo en el interior del huevo, y éste pasa por diversos estadios embrionarios (Huxley, 1896; Sammy, 1988; King, 1994; Jones, 1995; Hutchings y Villarreal, 1996; Sagi et al., 1997). Los huevos fecundados o post-embriones

permanecen adheridos a los pleópodos de la hembra hasta que se convierten en juveniles. Durante este tiempo son protegidos y mantenidos limpios por ésta. Al momento de eclosionar, se libera un pre-juvenil ya casi con todas las estructuras tanto internas como externas desarrolladas (Sandeman y Sandeman, 1991; García-Guerrero, 2003). El desarrollo embrionario tiene una duración de 6 a 8 semanas (Jones, 1990) dependiendo de la temperatura y el fotoperiodo (Jones 1990; Yeh y Rouse, 1994; King, 1994; Yeh y Rouse, 1995; Barki, et al., 1997). Existen 13 estadios de desarrollo embrionario basados en los cambios que ocurren en su morfología externa. Diez estadios ocurren antes de la eclosión y tres después de la eclosión (García-Guerrero, 2003). Todas las características morfológicas de las larvas zoeas en los decápodos de vida libre están ausentes, así como los estadios de incubación y los patrones de muda (Holdich, 2002).

Sistema endocrino

El sistema endocrino de la langosta de agua dulce consiste en diversos órganos con un origen neuronal y epitelial. Los órganos neuroendocrinos están compuestos de neuronas neurotransmisoras que sintetizan las hormonas (Holdich, 2002). Estas hormonas son liberadas a la hemolinfa. Los órganos neuroendocrinos incluyen el sistema órgano X–glándula sinusal localizados en el tallo ocular, el órgano postcomisural y el órgano pericardio. El órgano mandibular Y y la glándula androgénica son órganos epiteliales endocrinos típicos en crustáceos (Holdich, 2002)..

El órgano X es un conglomerado de 150-200 células neurosecretoras y los axones de estas neuronas se proyectan hasta la glándula sinusal (Holdich, 2002). Algunas de las hormonas relacionadas con el proceso reproductivo son sintetizadas en este sistema, encontrándose la hormona hiperglicemiante de los crustáceos (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis o de la gónada (VIH/GIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) (Holdich, 2002).

La técnica de la ablación del tallo ocular, se ha utilizado en las prácticas acuaculturales para acelerar el proceso de la síntesis de la Vg, así como el de la maduración ovárica; sin embargo, esta técnica no influye en el patrón general de la expresión de la Vg (Jayasankar et al., 2002).

Comportamiento

La langosta de agua dulce requiere de refugios para protegerse de depredadores. Son gregarios y pasivos (Holdich, 2002). En cautiverio pueden soportar altas densidades con comportamientos poco agresivos; sin embargo, durante la muda se puede presentar un severo canibalismo, aún cuando el alimento es abundante (Medley et al., 1994). En el comportamiento copular, casi siempre la hembra inicia el cortejo, induciendo al macho a que se coloque en decúbito dorsal debajo de ella para que se produzca el apareamiento (Barki et al., 1997).

Alimentación

La langosta de agua dulce es generalmente omnívora y presenta una serie de enzimas digestivas (proteasas, lipasa y carbohidrasas) que le permiten tener una buena digestión en un amplio intervalo de materia orgánica de origen animal y vegetal (Holdich, 2002).

Patología y parasitología

Han sido identificados en la langosta de agua dulce organismos patógenos como protozoarios epibiontes (*Zoothamnium* sp., *Vorticella* sp., *Lagenophrys* sp., *Rickettsia* sp.), hongos (*Thelohania* sp., *Epystilis* sp.), platelmintos ectocomensales, nemátodos comensales, bacterias y virus (Herbert, 1988; Romero y Jiménez 1997; Edgerton, 1999).

Cultivo en estanques

C. quadricarinatus presenta un ciclo de vida corto, lo que le permite tener una ventaja adaptativa significativa en relación con otros crustáceos y peces en su cultivo comercial. De los 14 géneros que conforman la Familia Parastacidea, *Cherax* presenta una gran adaptabilidad a condiciones de cultivo bajo un esquema controlado (Jones, 1990). El primero en realizar un estudio en estanques en pequeña escala fue Hutching (1990) mencionando que los estanques de lona de plástico dieron mejores resultados en comparación con los estanques con fondos de tierra. Du-Boulay et al., (1993) observaron que mediante diferentes tipos de refugios se puede evitar al canibalismo característico entre estos organismos. Por otro lado, Curtis y Jones (1995) realizando estudios monosexuales, encontraron que bajo estas condiciones los organismos obtienen mayores tallas bajo las mismas condiciones de alimentación y en el mismo periodo de tiempo que si se cultivan juntas. Asimismo, se han realizado estudios en diferentes densidades de siembra encontrándose que el peso es inversamente proporcional a la densidad de siembra (Pinto y Rouse, 1992; Jones y Ruscoe, 2000). Por otro lado, el cultivo de la langosta de agua dulce requiere agua con una saturación de oxígeno superior a 4 mg/L y agua con niveles de dureza superiores a 150 mg/L de CaCO₃ y un pH entre 7 y 8.5 (Villarreal y Peláez, 1999). Karplus et al., (1998) han estudiado el cultivo de esta especie a bajas temperaturas en invierno, encontrando que a 10°C se obtiene un bajo crecimiento y una supervivencia del 40% en un ciclo de 170 días. Asimismo, se han realizado estudios de policultivo con tilapia, encontrando que esta

combinación no es adecuada para la langosta de agua dulce dado que el crecimiento es muy bajo (Kotha y Rouse, 1997). Sin embargo, otros autores han observado que el crecimiento con esta especie es exitoso sin que se afecte la supervivencia de ninguna de las dos especies (Rouse y Kahn, 1998; Karplus et al., 1998). Salame y Rouse (2000) realizaron un estudio en cultivo semiintensivo comparando el alimento peletizado contra los forrajes, obteniendo que la combinación de ambos es benéfico ya que los organismos obtienen mejor crecimiento. Se han realizado diversos estudios en relación a la alimentación de estos organismos en cautiverio, encontrando que se obtiene un buen crecimiento alimentándolos tanto con caracoles de agua dulce (Thomas et al., 1993), nauplios de *Artemia* (Anson y Rouse, 1996), hojuelas de camarón, spirulina y krill congelado (Meade y Watts, 1997) y alimento peletizado entre otros (Jones, 1995).

HIPÓTESIS

Las hembras vitelogénicas de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* presentan un origen mixto (exógeno y endógeno) en la síntesis de la Vg. Esta síntesis se lleva a cabo en los tejidos del hepatopáncreas y el del ovario simultáneamente.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterización bioquímica de la Vt mediante la identificación y caracterización de las fracciones específicas de la vitelogénesis. La dinámica de esta molécula dentro del ovario y de los huevos, así como la determinación del lugar de síntesis de la Vg de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Objetivos Específicos

- ❖ Identificación de las fracciones proteínicas específicas de hembras en vitelogénesis primaria y secundaria en la hemolinfa, en el ovario y en los huevos en los estadios I, III y V.

- ❖ Determinar la composición bioquímica de la molécula de la Vt.

- ❖ Purificación y caracterización de las Vts de huevos en estadio V.

- ❖ Estudiar la dinámica de las Vts en el ovario y en los huevos en los estadios I, III y V durante el proceso de la vitelogénesis.

- ❖ Identidad inmunológica de las Vts presentes en los diferentes tejidos involucrados en la vitelogénesis.

- ❖ Determinar el sitio de expresión del ARNm de la Vg basado en su secuencia nucleotídica.

- ❖ Determinar si la expresión del ARNm varía en tres diferentes estadios de la maduración ovárica (hembras en primera maduración, hembras con desoves consecutivos y hembras ovígeras).

- ❖ Determinar la presencia de uno o más genes implicados en la síntesis de la Vg.

**CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA
VITELINA (Vt).**

Introducción

La vitelogénesis es un proceso fisiológico importante en la reproducción de los crustáceos como en otros animales ovíparos (Charniaux-Cotton, 1985). La Vg es el producto de la vitelogénesis y también la proteína específica en la hemolinfa de las hembras, transportada hasta los ovocitos donde es incorporada y transformada en Vt. Una gran cantidad de Vt, la principal proteína del vitelo, está presente en los ovocitos y es consumida como una importante fuente de nutrientes durante la embriogénesis y el desarrollo larval (Jayasankar et al., 2002).

El proceso de la vitelogénesis en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* no está muy claro. La caracterización bioquímica de la Vt no se ha estudiado, por lo que es preciso identificar, purificar y caracterizar las proteínas específicas de la vitelogénesis, así como determinar la dinámica de estas moléculas dentro de la hemolinfa, del ovario y de los huevos. Y de esta manera poder entender el proceso de la maduración de las hembras para poder controlarlo en condiciones de cautiverio.

Materiales y Métodos

Los organismos de *Cherax quadricarinatus* se obtuvieron de la población de reproductores del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S., México, y su mantenimiento en cautiverio se realizó en estanques supralitorales de 1000 m², con aireación continua. Los niveles de dureza del agua fueron superiores a 150 mg/L CaCO₃, saturación de oxígeno superior a 4mg/L y pH entre 7 y 8.5 (Villarreal y Peláez, 1999). El contenido de sales (4 ppm) e iones metálicos disueltos fue bajo. Se utilizó recambio de agua bajo y fertilizantes para fomentar la producción primaria (Naranjo, 1999).

Se extrajeron muestras de hemolinfa y ovarios de hembras en vitelogénesis primaria y secundaria, huevos de hembras en vitelogénesis secundaria y hemolinfa de machos maduros. Los diferentes estadios de madurez ovárica fueron determinados bajo la clasificación de Sagi et al., (1997).

Se muestrearon huevos en estadio I (color amarillo-cremoso, recién desovados), en estadio III (color khaki, 5-7 días después del desove) y en estadio V (color anaranjado, 15 días después del desove). Los estadios de maduración de los huevos se determinaron según la clasificación de Yeh y Rouse (1994).

Homogeneización de las muestras

La hemolinfa colectada en la base de los pereiópodos fue mezclada (1:10 v/v) con EDTA al 10%, 0.10 mM de fluoruro de sulfonil fenil metilo (PMSF), y centrifugado a 2,000 x g, 15 min a 4°C.

Los ovarios y los huevos se homogeneizaron en un Potter- Elvehjem de vidrio con un amortiguador Tris 0.05 M, 0.1 M NaCl, 5mM EDTA, pH 7.0 (3:1 v/v, amortiguador/ tejido) y una solución cocktail inhibidora de proteasas (0.003%, SIGMA, St. Louis MO, USA). Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y conservado a -20°C hasta su posterior análisis.

El contenido de proteínas extraídas solubles en las muestras totales fueron cuantificadas siguiendo el método de Bradford (1976), utilizando una curva estandar de BSA (10-50 µg).

Identificación y caracterización de las vitelinas de la hemolinfa, del ovario y de los huevos

Con el fin de identificar las fracciones específicas de las hembras en vitelogénesis primaria y secundaria, se efectuaron electroforesis (PAGE) con los extractos homogeneizados de la hemolinfa, del ovario y de los huevos bajo condiciones nativas en geles de poliacrilamida al 6% en presencia de amortiguador 1.5 M Tris-glicina (pH 8.8). Esta técnica se emplea para separar las moléculas en una matriz (agarosa o poliacrilamida) de acuerdo con su carga eléctrica.

Geles de poliacrilamida en gradiente al 4-20% fueron utilizados para determinar la masa molecular de las fracciones proteínicas correspondientes a las Vts. La cantidad utilizada de proteína en cada muestra fue de 1µg.

La determinación de las subunidades correspondientes a cada fracción y su masa molecular se realizó mediante electroforesis discontinua (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 7.5%, en presencia de 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 35% glicerol, 8 mM EDTA y 0.25% de azul de bromofenol.

La masa molecular de las proteínas identificadas fue determinada por comparación con dos series de marcadores de conocida masa molecular. Para PAGE nativa en gradiente, marcadores de tiroglobulina, 669 kDa; ferretina, 440 kDa; catalasa, 232 kDa; lactato deshidrogenasa, 140 kDa y albumina de suero bovino, 67 kDa (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sweden); para SDS-PAGE, marcadores de miosina, 200 kDa; galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa, 97 kDa; albúmina de suero bovino, 6 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa (Bio-Rad, California, USA). Los geles fueron teñidos con Azul brillante de Coomassie R-250 para proteínas, Negro de Sudán para lípidos y Reactivo de Schiff para carbohidratos. Las electroforesis PAGE nativas fueron realizadas a 50 Volts a 4°C, mientras que las electroforesis en SDS-PAGE a 100 Volts a temperatura ambiente.

Por otro lado, para conocer la composición polipeptídica de las Vts de los ovarios y de los huevos en estadio I, III, y V, se realizaron electroforesis PAGE preparativa al 6% con 160 µg de proteína total aplicada al gel, donde las fracciones de gel conteniendo las Vts fueron cortadas verticalmente en ambos extremos. Los extremos fueron teñidos con Azul brillante de Coomassie R-250 para revelar las Vts. Estas porciones fueron colocadas junto al resto del gel sin

teñir, y donde aparecieron las fracciones teñidas, el gel fue cortado horizontalmente al mismo nivel. Las fracciones proteínicas en el gel fueron centrifugadas a $10,000 \times g$ a 4°C por 15 min, con una solución amortiguadora de 1.5 M Tris-glicina (pH 8.8) y caracterizada electroforéticamente por SDS-PAGE (7.5%) con una solución amortiguadora de 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS; 1% mercaptoetanol, 10% glicerol y 0.05 % de azul de bromofenol.

Purificación de las Vts de huevos

La purificación de las Vts del los extractos de los huevos en el estadio V y de los ovarios de hembras en vitelogénesis secundaria de *Cherax quadricarinatus* se efectuaron mediante la metodología de Chang et al., (1993).

Los extractos de los huevos y de los ovarios dializados (40 mg de PT/mL) en amortiguador PPB 0.35M fueron fraccionados por cromatografía en gel de filtración (Sephacose CL-2B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden; 61.5 cm x 2 cm, 350 mL), (3.0 mL de muestra) equilibrado con amortiguador 0.01M Tris HCl, con 2 mM PMSF (pH 7.0) con el fin de separar las moléculas en función de su peso molecular. La elución se realizó con amortiguador 0.01M Tris HCl, (pH 7.0) a un flujo de 0.3 mL/min. Los eluyentes fueron colectados en fracciones de 2.5 mL y la absorbencia fue medida a 280 nm. Las fracciones fueron concentradas en tubos Sartorius-Centrisart-C4 y cada pico concentrado fue analizado en electroforesis PAGE nativa (6%) para identificar por medio de diferentes colorantes (azul de Coomassie, negro de Sudán y reactivo de Schiff) a las fracciones de la Vts.

El eluyente colectado correspondiente al pico en el que se detectó la presencia de la Vt del extracto de huevos en el estadio V (1 mL) en la columna de Sepharose CL-2B, fue fraccionado en una columna de hidroxilapatita (CHT-2, 5 mL Cartridge, Bio-Rad, CA, USA) para la separación de las moléculas en función de sus cargas. Equilibrada con amortiguador 0.01M de fosfato de potasio (PPB) con 2 mM PMSF, (pH 7.0). La elución se realizó con amortiguador 0.35M de fosfato de potasio (PPB) (pH 7.0) en un gradiente de concentración de PPB 0.01M, 0.10M, 0.20M, y 0.35M, a un flujo de 0.30 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 2.5 mL, y la absorbencia fue medida a 280 nm. Las fracciones fueron concentradas en tubos Sartorius-Centrisart-C4, y la presencia de la proteína purificada fue determinada mediante electroforesis PAGE nativa (6%).

El eluyente colectado correspondientes a los picos en los que se detectó la presencia de la Vt del extracto de ovarios de hembra vitelogénica en la columna de Sepharose-CL-2B, fue fraccionado en una columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B, 27 mL, Pharmacia) para la separación de las moléculas en función de sus cargas. Equilibrada con amortiguador (A) 25 mM Tris HCl, con 1 mM PMSF, pH, 7.5. La elución se realizó con amortiguador (B) 500 mM Cloruro de Sodio (NaCl) (pH 7.5) en un gradiente lineal en dos etapas: la primer etapa de 0% a 50% de amortiguador B en 150 mL y la segunda etapa de 50 a 100% de amortiguador B en 30 mL., a una tasa de 0.60 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 3.0 mL, y la absorbencia fue medida a 280 nm. Las fracciones fueron concentradas en tubos de microcentrífuga Eppendorf de 0.5 ml, NMWL 10,000 Da, PTGC (SIGMA, Aldrich, Germany). La muestra se centrifugó a 8,600 x *g*, por 20 min a 4°C y la presencia de la proteína purificada fue determinada mediante electroforesis PAGE nativa (6%).

El eluyente colectado correspondiente a los picos en los que se detectó la presencia de la Vt en la primer columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B, Pharmacia), fue fraccionado por segunda vez en otra columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B, Pharmacia), utilizando los mismos amortiguadores pero con un gradiente lineal en diversas etapas: de 0% a 7% de amortiguador B en 20 mL, de 7 a 10% de amortiguador B en 35 mL, de 10 a 13% de amortiguador B en 30 mL, de 13 a 16% de amortiguador B en 30 mL, de 16 a 20% de amortiguador B en 30 mL y de 20 a 100% de amortiguador B en 40 mL, a una tasa de 0.60 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 3.0 mL, y la absorbencia fue medida a 280 nm. Las fracciones fueron concentradas en tubos de microcentrifuga Amicon NMWL 100,000 Da, PTC (SIGMA, Aldrich, Germany). La muestra se centrifugo a 8,600 x g, por 20 min a 4°C y la presencia de la proteína purificada fue determinada mediante electroforesis PAGE nativa (6%).

Con las Vts purificadas de ovario, se realizó una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (7.5%) para separar las subunidades, mismas que fueron transferidas a una membrana absorbente de disulfuro de polivinildeno (PVDF, Bio-Rad, CA, USA) para su posterior secuenciación de aminoácidos .

Preparación de anticuerpos

Para la preparación de los anticuerpos policlonales antivitelina, fueron realizadas electroforesis PAGE preparativa al 6% con el extracto de huevos de *C. quadricarinatus* en el estadio V, identificados por electroforesis (PAGE nativa 6%) y

teñidas con azul de Coomassie (proteínas), negro de Sudán (lípidos) y reactivo de Schiff (carbohidratos). Las fracciones de gel conteniendo las lipo-glico-proteínas fueron cortadas verticalmente en ambos extremos y teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 para revelar las fracciones. Más tarde, estas porciones fueron colocadas junto al resto del gel sin teñir. Donde aparecieron las fracciones teñidas, el gel fue cortado horizontalmente al mismo nivel. Posteriormente, las fracciones fueron homogeneizadas con NaCl (0.85 %) por medio de dos jeringas conectadas entre si, e inyectado el homogeneizado a cuatro conejos macho New Zealand (dos por cada Vt).

Los anticuerpos antivitelina se obtuvieron con la finalidad de poder caracterizar la molécula de la Vt mediante técnicas inmunológicas estándares. Estos anticuerpos fueron inducidos en cuatro conejos machos New Zealand (dos por cada Vt). Cada Vt (Vt_1 y Vt_2) (50 μ g de proteína total) emulsificadas en adjuvante completo de Freund (1 mL) fueron inyectadas intramuscularmente en diferentes puntos en la región dorsal de los animales. Las Vts purificadas emulsificadas en adjuvante incompleto de Freund (1 mL) fueron inyectadas a los 10 y 30 días (120 μ g de proteína total). La sangre obtenida de los lóbulos de las orejas de los conejos (30 ml) fue colectada a los 40 y 50 días. La sangre extraída se dejó a temperatura ambiente en tubos de centrifuga (Beckman) tapados con papel aluminio, hasta que el coágulo se desprendió de las paredes del tubo. El antisuero fue centrifugado a 664 x g, 10 min a 4°C y almacenado a -70°C.

Especificidad de los anticuerpos

a) Transferencia electroforética de las proteínas sobre filtro (Western blotting, Burnette, 1981).

Mediante el método de Western blotting, se determinó la especificidad de los anticuerpos con cada subunidad de la molécula de la Vt. Los anticuerpos, moléculas de tamaño importante, no penetran fácilmente en los geles de poliacrilamida. Debido a esto fue necesario transferir transversalmente las proteínas a una membrana absorbente de disulfuro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad, CA, USA) con el fin de hacer reaccionar los anticuerpos. Luego de una electroforesis en medio disociante SDS-PAGE (7.5%) con las Vts obtenidas del extracto de huevos de *C. quadricarinatus* en el estadio V (5 µg PT), el gel fue replicado en la membrana utilizando un minitrans-blot de transferencia electroforética con celdas semi-secas (Bio-Rad, CA, USA), utilizando 25 mM de amortiguador de transferencia Dunn (10mM NaHCO₃, 3mM Na₂CO₃, pH 9.0) y metanol (20%). Las membranas fueron incubadas en amortiguador BSA (5%) por 1 hora para bloquear los espacios libres. Durante toda la noche, fueron incubadas a 4°C con los anticuerpos antivitelina diluidos 1:3000 (v/v) en un amortiguador TNT (10mM Tris, pH 8.0, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20). Las membranas fueron lavadas en amortiguador TNT al 0.2% (3 x 20 min) e incubadas durante 1 hora a 37°C en una solución conteniendo peroxidasa conjugada con IgG de conejo (Sigma, St. Louis, USA). Posteriormente las membranas se lavaron con amortiguador TNT al 0.2% (3 x 20 min) e incubadas durante algunos minutos a temperatura ambiente en

amortiguador TBS (1 ml) (0.15 M, pH 8.0) conteniendo 20 µg de diamino-benzidina y 20µl de H₂O₂ (10%). La presencia de antígeno se comprobó con la presencia de bandas con una coloración violeta.

b) La Doble Inmunoprecipitación Radial fue realizada de acuerdo con el método de Outchterlony (1948). Esta técnica permitió comparar las reacciones antigénicas de las proteínas en presencia de un mismo inmunosuero. Un gel de agar (1%) con orificios de 2 mm fue preparado en una placa de vidrio (10 x 10 cm). Los antisueros antivitelina de extracto de huevos en estadio V y los extractos de los diferentes tejidos fueron puestos en los orificios, cada uno separado del otro 0.9 cm. El gel se colocó en una cámara húmeda a (4°C) por 48 h. Se realizaron lavados (3 x 6h) en 0.9 % NaCl. El gel fue teñido con Azul de Coomassie R250.

c) Análisis inmunoenzimático competitivo (ELISA)

La titulación de los anticuerpos fue determinada mediante el análisis (ELISA), esta técnica permite determinar la afinidad de los anticuerpos preparados. Se seleccionaron siete diluciones (1/100, 1/500, 1/1,000, 1/5,000, 1/20,000, 1/50,000 y 1/100,000), según la metodología estandarizada de Vázquez-Boucard et al., (2002).

El antígeno presente en la muestra de huevos en estadio V se adhirió al soporte sólido (placas de microtitulación de 96 pozos) durante la primera incubación luego del lavado de las placas para retirar el exceso de antígeno. Los anticuerpos anti-vitelina de *C. quadricarinatus* se ligaron a los determinantes antigénicos fijados en el soporte sólido. El exceso de anticuerpos no ligados mediante incubación fue eliminado en el curso del segundo lavado con amortiguador PBS. En la tercera etapa, los anticuerpos conjugados a la enzima (fosfatasa alcalina) se ligaron a los complejos enzimáticos antígeno-anticuerpo anti-lipovitelina. Se determinó la actividad enzimática ligada bajo la acción del sustrato paranitrofenil-fosfato, luego del tercer lavado con amortiguador PBS. La intensidad de la coloración determinada espectrofotométricamente es proporcional a la concentración de antígeno. Se midió la absorbencia a 405 nm.

Secuenciación de aminoácidos de las subunidades de las Vts del ovario.

La secuenciación aminoacídica de las subunidades de las Vts del ovario, se realizó siguiendo el método de degradación de Edman (Edman y Begg, 1967) en un secuenciador automatizado (Beckman LF3000 Series Protein Sequencer).

RESULTADOS

Una posible fracción lipoproteínica fue encontrada en la hemolinfa de hembras en vitelogénesis secundaria tiñendo con azul de Coomassie y negro de Sudán (Fig. 3, I A y B). Esta fracción estuvo ausente en la hemolinfa de hembras previtelogénicas (Fig. 3 Ib). El peso molecular de esta fracción, obtenido mediante la electroforesis en gradiente (4-20%) fue de 500 kDa (Fig. 3, II y Tabla I).

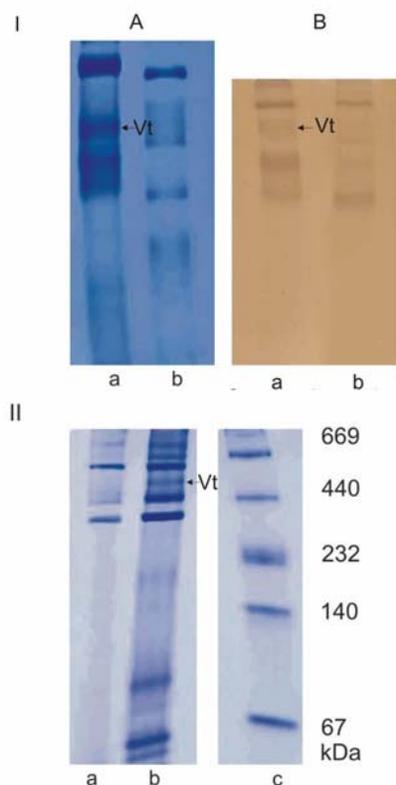


Figura 3. I. Electroforesis PAGE-nativa (6%) de *Cherax quadricarinatus*. A. Proteínas (azul de Coomassie). B. Lípidos (negro de Sudán). a) Extracto de hemolinfa de hembra en vitelogénesis secundaria, b) Extracto de hemolinfa de hembra previtelogénica. II. Electroforesis PAGE-nativa en gradiente (4-20%), teñida con azul de Coomassie. a) Extracto de hemolinfa de hembra en previtelogénesis; b) Extracto de hemolinfa de hembra en vitelogénesis secundaria; c) Marcadores de peso molecular (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sweden).

Dos fracciones proteínicas fueron identificadas (Vt_1 y Vt_2) en los ovarios de hembras en vitelogenénesis secundaria (Fig. 4, Ib). Estas moléculas estuvieron ausentes en los ovarios de hembras en previtelogenénesis (Fig. 4, Ia). La electroforesis realizada con extracto de huevos en estadio I, mostró también dos fracciones proteínicas (Fig. 4, Ic) y dos fracciones en huevos en estadio V (Fig. 4, Id). La naturaleza lipídica y glucídica en ambos tejidos también fue determinada (Fig. 4. II y III). Sin embargo, el ovario presentó solamente una fracción glicoproteínica (Fig. 4. IIIb).

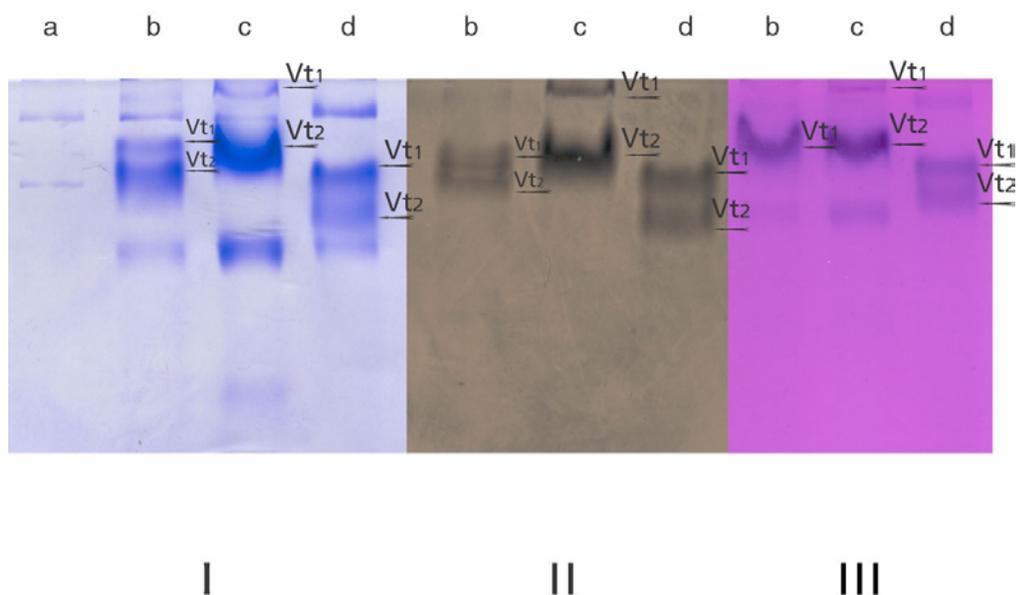


Figura 4. Electroforesis PAGE (6%) de *C. quadricarinatus*. I. Proteínas (azul de Coomassie). II. Lípidos (negro de Sudán). III. Carbohidratos (reactivo de Schiff). a) Extracto de ovario de hembra previtelogénica; b) Extracto de ovario de hembra en vitelogenénesis secundaria; c) Extracto de huevo en estadio I; d) Extracto de huevo en estadio V.

La masa molecular de las Vts del ovario de hembra en vitelogenesis secundaria y de los huevos en estadios I y V, se muestran en la Fig. 5 y en la Tabla I.

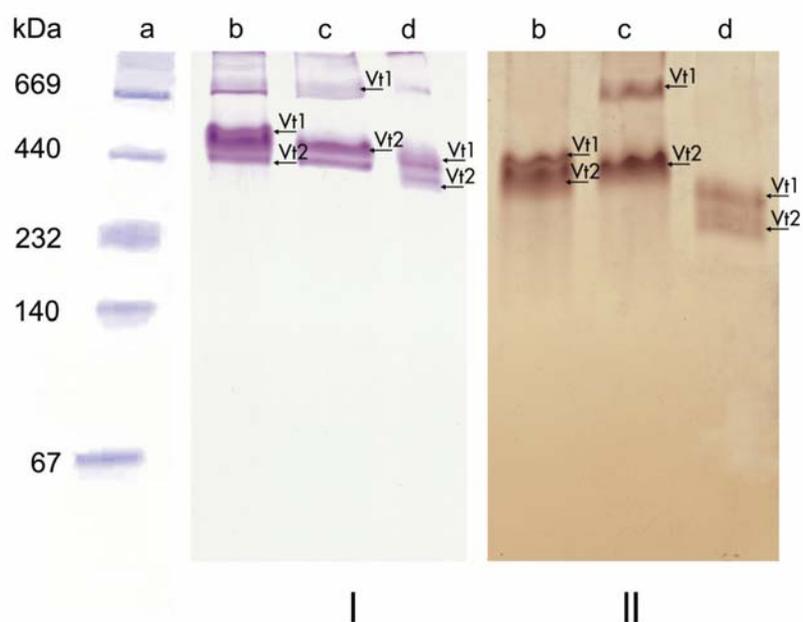


Figura 5. Electroforesis PAGE (4-20%) de *C. quadricarinatus*. I. Proteínas (azul de Coomassie). II. Lípidos (negro de Sudán). a) Marcadores (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sweden); b) Extracto de ovario de hembra en vitelogenesis secundaria; c) Extracto de huevos en estadio I; d) Extracto de huevos en estadio V.

Tabla I. Masas moleculares (kDa) de la Vg de la hemolinfa y de las Vts de los ovarios y de los huevos en los estadios I y V de hembra en vitelogénesis secundaria de *C. quadricarinatus* obtenidas por electroforesis PAGE–nativa en gradiente 4-20% .

TEJIDO	Vg (kDa)	Vt ₁ (kDa)	Vt ₂ (kDa)
Hemolinfa	500		
Ovario de hembras en vitelogénesis secundaria		470	440
Huevos en estadio I		650	440
Huevos en estadio V		390	340

El cromatograma del extracto de huevo en estadio V fraccionado en una columna de Sepharose-CI-2B mostró dos picos (Fig. 6A), el análisis electroforético PAGE (6%) realizado de los dos picos en presencia de los tres colorantes, revela dos lipo-glico-proteínas (Vt₁ y Vt₂) en el pico II (Fig. 7, I).

Las fracciones correspondientes al pico II, fueron separadas posteriormente en una columna de adsorción de hidroxilapatita, donde se muestra la presencia de seis picos (Fig. 6B). Las fracciones correspondientes a cada pico fueron colectadas y analizadas con PAGE (6%) (1.6 µg de PT) (Fig. 7, II), confirmando mediante los diferentes colorantes la presencia de dos lipo-glico-proteínas en el pico 6. Corroborando con esto, los resultados de la Fig. 4.

Estas fracciones son las mismas fracciones purificadas a través de PAGE preparativa e inyectadas a los conejos para la producción de los anticuerpos antivitelina (Ac₁ y Ac₂).

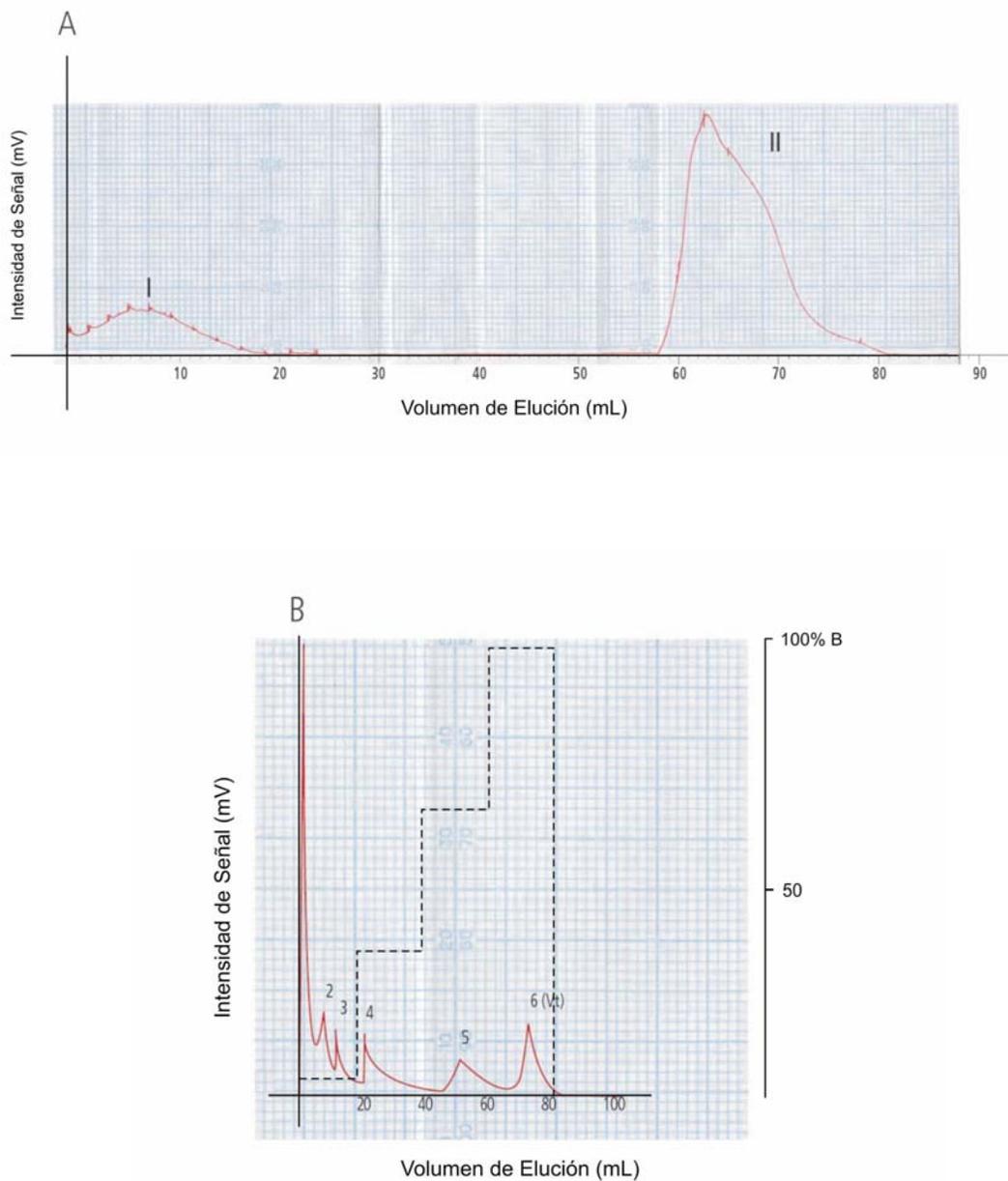


Figura 6. A) Perfil de elución de extracto de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus*, separado en cromatografía en gel de filtración en Sepharose CL-2B (61.5 cm x 2 cm diam.) equilibrada con amortiguador 0.01M Tris-HCl, con flujo de 0.3 mL/min y fracciones de 2.5 mL Pico I y II (Vitelinas en pico II). B) El pico II separado por cromatografía en columna de adsorción de hidroxilapatita equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio (PPB) (0.01M), con gradientes de concentración 0.01M, 0.10M, 0.20M y 0.35M; y un flujo de 0.3 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 2.5 mL. 1-6 picos de proteínas. Vitelinas (Vt_1 y Vt_2) pico 6.

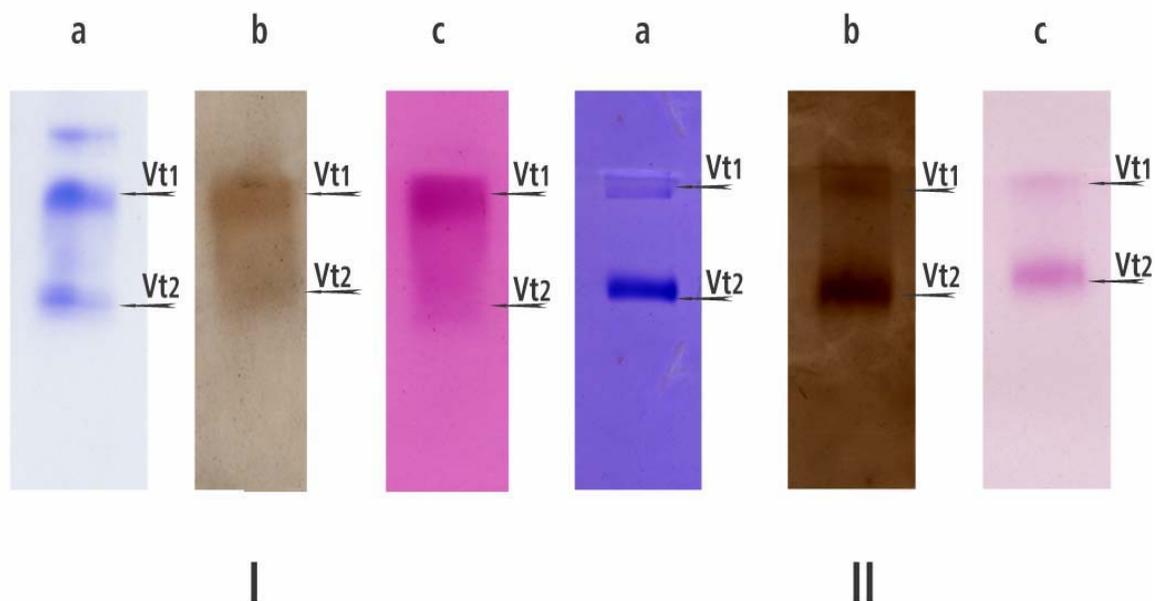


Figura 7. I) Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas (Vt_1 y Vt_2) de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* en cromatografía en gel de filtración en Sepharose CL-2B. II) Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas (Vt_1 y Vt_2) (1.6 μ g de PT), (Pico 6) de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* en cromatografía en columna de hidroxilapatita. a) Proteínas (azul de Coomassie); b) Lípidos (negro de Sudán); c) Carbohidratos (reactivo de Schiff). (Vt_1) Vitelina 1; (Vt_2) Vitelina. 2.

Las masas moleculares las dos Vts (Vt_1 y Vt_2) separadas por electroforesis preparativas en el ovario y en tres estadios de desarrollo de los huevos en estadios I, III y V, analizados por SDS-PAGE se muestran en la Fig. 8 y Tabla II.

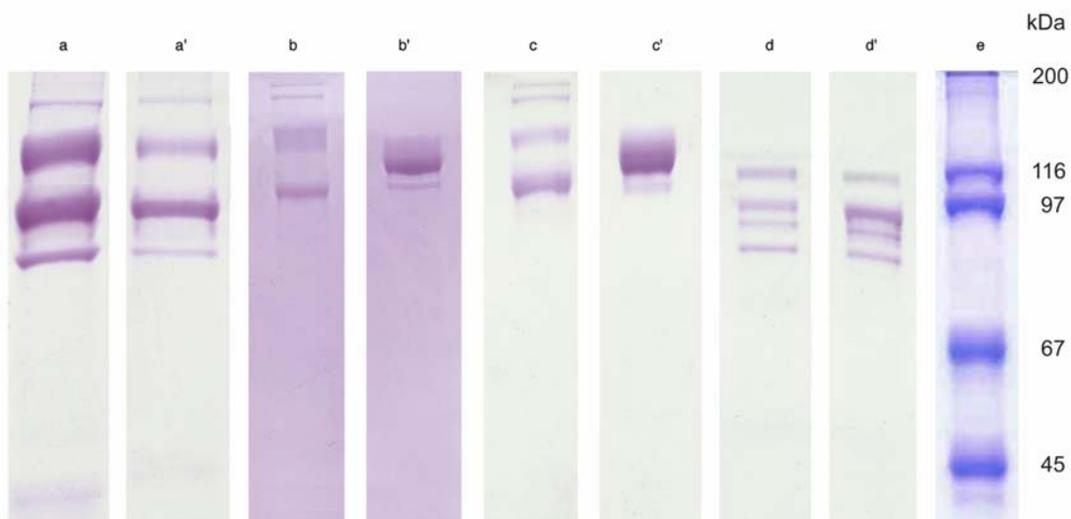


Figura 8. SDS-PAGE (7.5%) de las vitelinas teñidas con azul de Coomassie en: a) Ovario de hembra en vitelogénesis secundaria; a) Vt₁, a') Vt₂; b) Huevos en estadio I; b) Vt₁, b') Vt₂; c) Huevos en estadio III; c) Vt₁, c') Vt₂; d) Huevos en estadio V; d) Vt₁, d') Vt₂; Marcadores (Bio-Rad, California, USA).

Tabla II. Masas moleculares (kDa) de las subunidades de las vitelinas (Vt₁ y Vt₂) del ovario de hembra en vitelogénesis secundaria y de huevos en diferentes estadios de desarrollo de *C. quadricarinatus* obtenidas por electroforesis SDS-PAGE.

Ovarios		Huevos en estadio I		Huevos en estadio III		Huevos en estadio V	
Vt ₁ (kDa)	Vt ₂ (kDa)						
180	180	195		195		110	110
120	120	190		190		95	95
95	95	130	116	130	116	87	87
80	80	110	107	110	107	75	75

Las fracciones vitelínicas 1 y 2 de los huevos en estadio V separados por la columna de hidroxilapatita (pico 6) y analizados por SDS-PAGE (10 μ g de PT) mostraron cuatro subunidades con masas moleculares de 110, 95, 87 y 75 kDa en cada una de las Vt. (Fig. 9, II).

Para confirmar las subunidades de cada Vt, el análisis Western blot fue realizado en presencia de los dos anticuerpos antivitelina (Ac_1 y Ac_2) mostrando que ambas son moléculas compuestas de cuatro subunidades polipeptídicas principales y siete subunidades secundarias similares en ambas vitelinas (Fig. 9, III y IV), confirmando de esta manera la especificidad de los anticuerpos antivitelina.

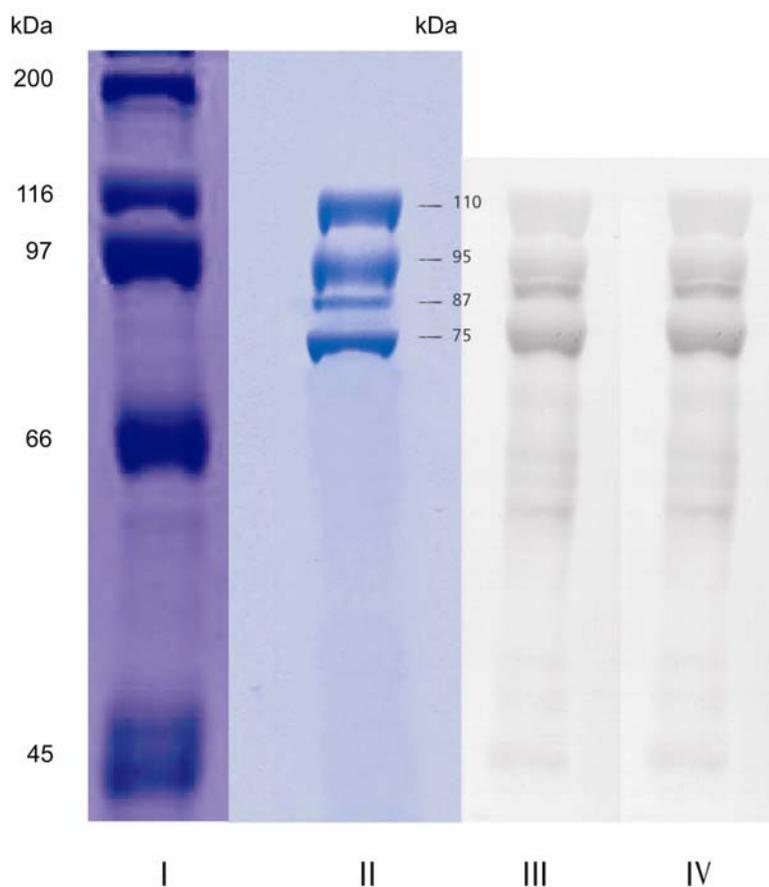


Figura 9. Western blotting de las Vts purificadas de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* obtenidas del pico 6 de la cromatografía de hidroxilapatita. I) Macdore (Bio-Rad, California, USA). II) SDS-PAGE (7.5%) teñidas con azul de Coomassie. III) Reacción de la transferencia con los anticuerpos antivitelina 1 (Ac₁). IV) Reacción de la transferencia con los anticuerpos antivitelina 2 (Ac₂).

La Figura 10 (I y II) muestra la inmunoprecipitación obtenida entre los diferentes extractos de los tejidos involucrados en la vitelogénesis y de las Vts de los huevos en estadio V purificadas en la columna de hidroxilapatita en presencia

de los 2 anticuerpos antivitelina (Ac_1 y Ac_2), mostrando una identidad inmunológica completa entre la Vg existente en el hepatopáncreas y en la hemolinfa así como la Vt de los ovarios y de los huevos en los estadios I y V de hembras en vitelogénesis secundaria.

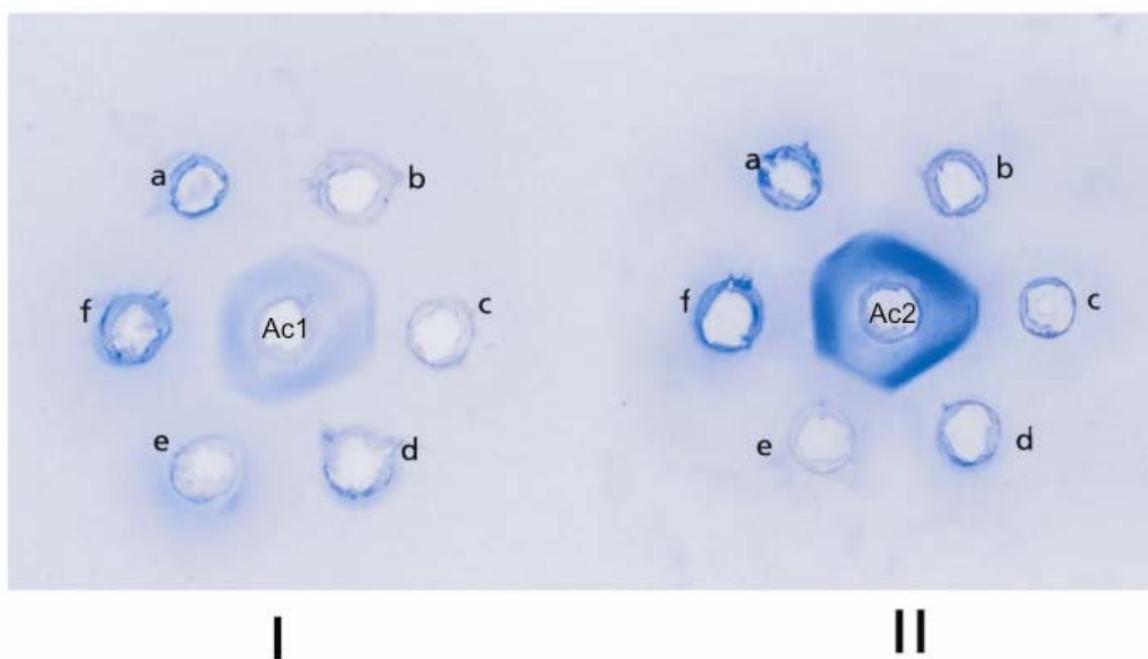


Figura 10. Doble inmunodifusión radial. I. Anticuerpo 1 (Ac_1). II. Anticuerpo 2 (Ac_2). a) Vitelinas purificadas de huevos en estadio V de *C. quadricarinatus*, (Pico 6); b) Extracto de huevos en estadio V; c) Extracto de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria; d) Extracto de hemolinfa de hembra en vitelogénesis secundaria; e) Extracto de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria; f) Extracto de huevo en estadio I.

La curva de dilución de los anticuerpos (Ac_1 y Ac_2) obtenida mediante el análisis inmunoenzimático no competitivo (ELISA), muestra una reacción positiva por arriba de la dilución 1/50,000 (Fig. 11 y 12).

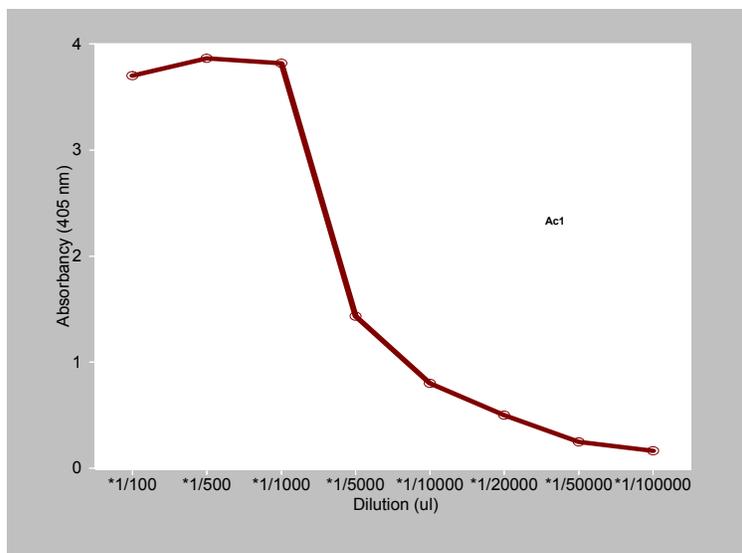


Figura 11. Curva de titulación del anticuerpo 1 (Ac_1) realizada por ELISA en siete diluciones (1/100, 1/500, 1/1,000, 1/5,000, 1/20,000, 1/50,000 y 1/100,000).

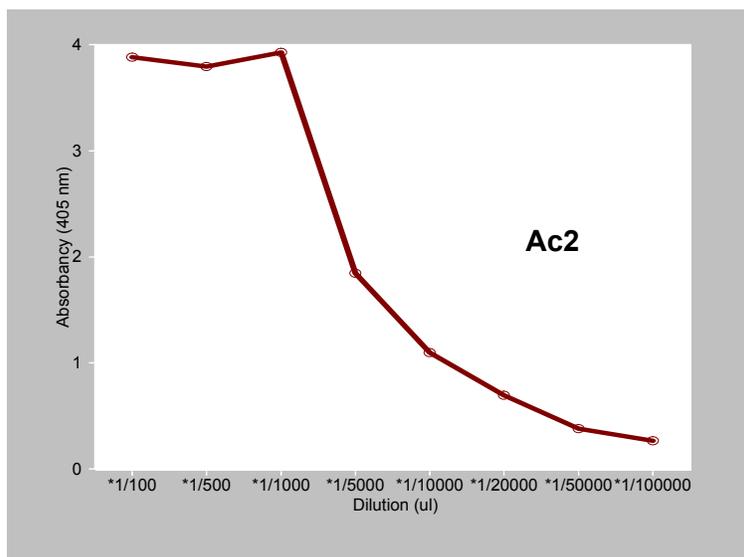


Figura 12. Curva de titulación del anticuerpo 2 (Ac₂) realizada por ELISA en siete diluciones (1/100, 1/500, 1/1,000, 1/5,000, 1/20,000, 1/50,000 y 1/100,000).

El cromatograma del extracto de ovario fraccionado en una columna de Sepharose-CI-2B mostró tres picos (Fig. 13). Las fracciones correspondientes a los picos fueron colectadas y analizadas con PAGE-nativa (6%), identificándose mediante los diferentes colorantes las Vt en el pico C.

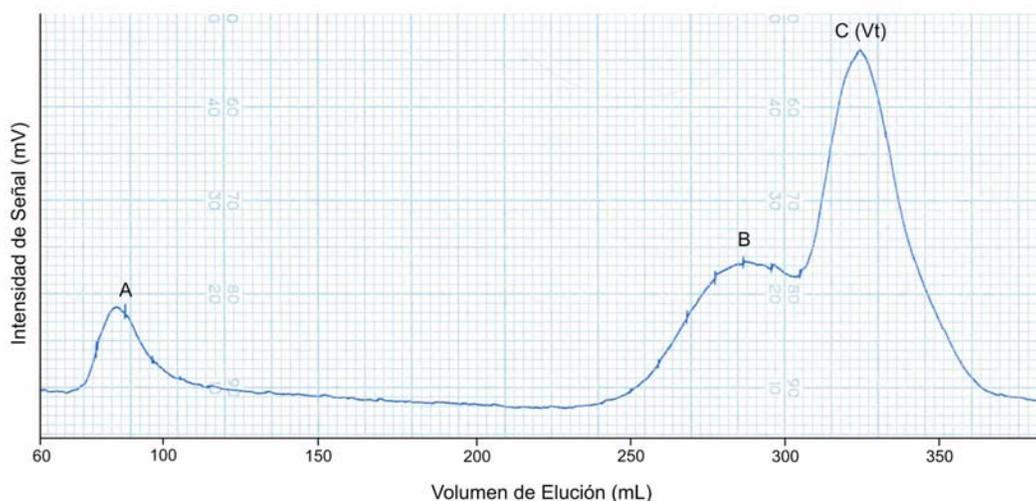


Figura 13. Perfil de elución de extracto de ovarios de hembra vitelogénica de *C. quadricarinatus*, separado en cromatografía en gel de filtración en Sepharose-CL-2B (61.5 cm x 2 cm diam.) equilibrada con amortiguador 0.01M Tris-HCl con 2 mM PMSF pH, 7.0, con flujo de 0.30 mL/min y fracciones de 2.5 mL. Picos A, B y C. (Vitelinas en pico C).

Las fracciones correspondientes al pico C de la columna de Sepharose-CL-2B, fueron separadas posteriormente en una columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B), donde se muestra la presencia de diferentes picos (Fig. 14).

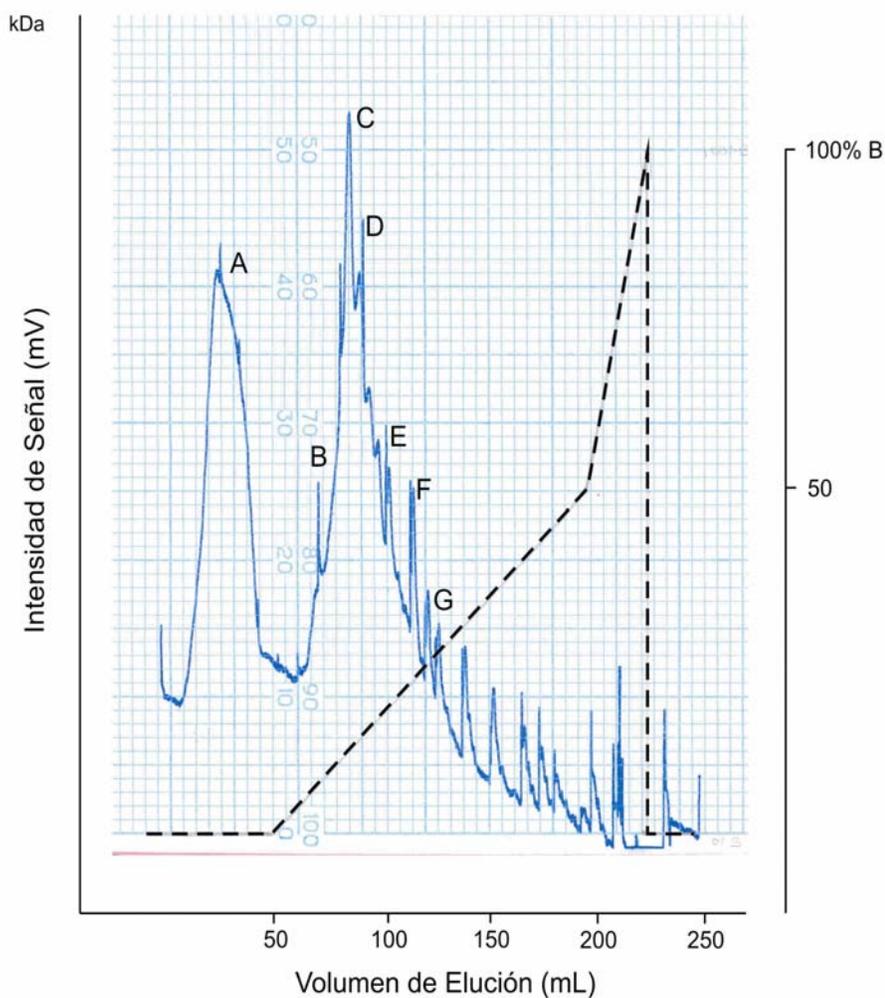


Figura 14. Perfil de elución de los picos A-G separados por cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B) equilibrada con amortiguador A (25 mM Tris HCl, con 1 mM PMSF, pH, 7.5). La elución se realizó con amortiguador B (500 mM NaCl, pH 7.5) en un gradiente lineal en dos etapas: la primera, de 0% a 50% de amortiguador B en 150 mL y la segunda de 50 a 100% de amortiguador B en 30 mL., en un flujo de 0.60 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 3.0 mL.

Las fracciones correspondientes a los picos A-G en la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B), fueron colectadas y analizadas con

PAGE (6%) (Fig. 15), confirmando con tinción de azul de Coomassie la presencia de las dos Vts en las fracciones E, F y G.

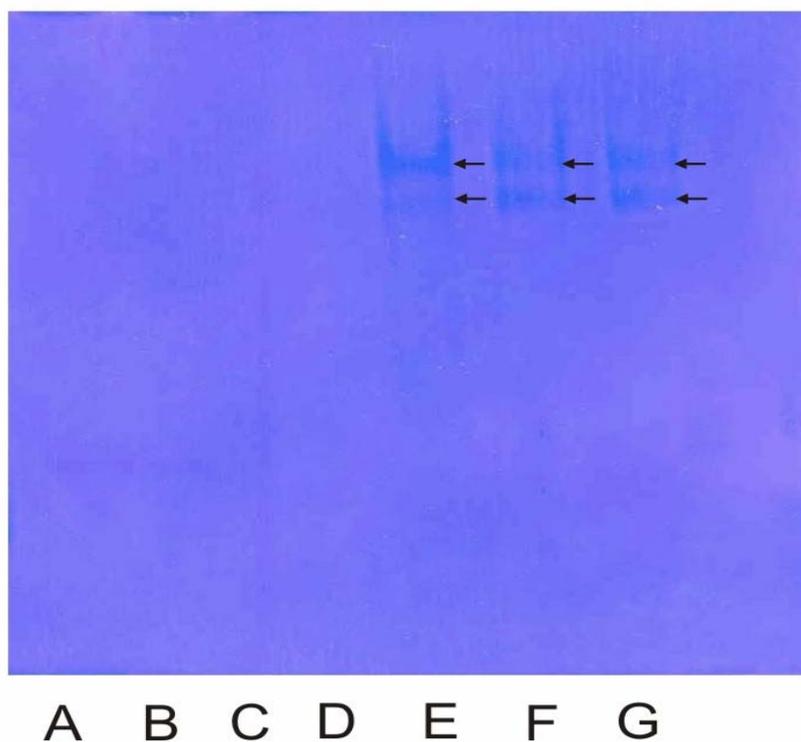


Figura 15. Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas de ovario de hembra vitelogénica de *C. quadricarinatus* en cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B). A-G) Fracciones de proteínas. Vitelinas en fracciones E, F y G (→).

Las fracciones correspondientes a los picos A-G de la primera columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B), fueron separadas en otra columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B) con amortiguador (B) 500 mM

NaCl (pH 7.5) en un gradiente lineal en diversas etapas, donde se muestra la presencia de diferentes picos (Fig. 16).

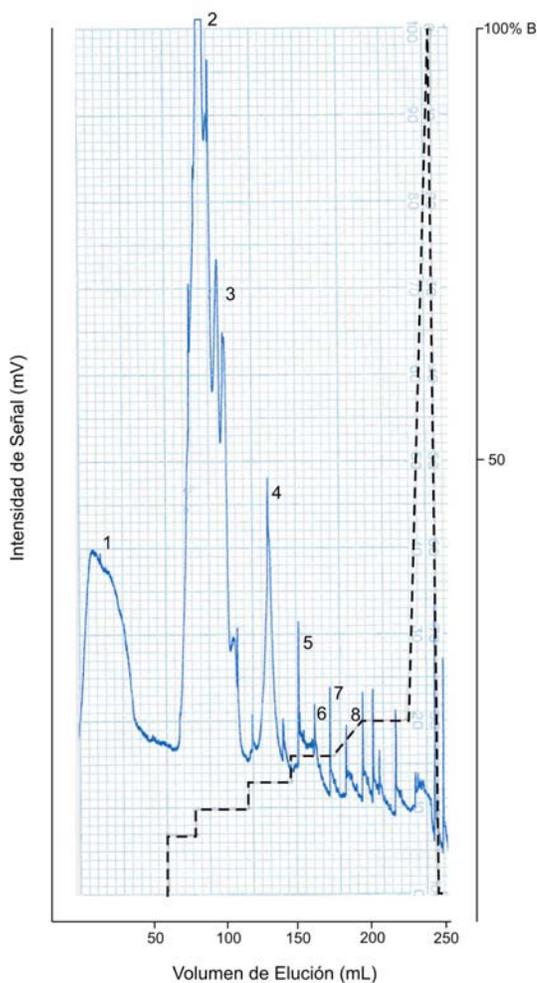


Figura 16. Perfil de elución de los picos 1-8 separados en la segunda cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B), equilibrada con amortiguador de 25 mM Tris HCl, con 1 mM PMSF, pH, 7.5. La elución se realizó con amortiguador B (500 mM NaCl, pH 7.5) en un gradiente lineal en diversas etapas: de 0% a 7% de amortiguador B en 20 mL, de 7 a 10% de amortiguador B en 35 mL, de 10 a 13% de amortiguador B en 30 mL, de 13 a 16% de amortiguador B en 30 mL, de 16 a 20% de amortiguador B en 30 mL y de 20 a 100% de amortiguador B en 40 mL, a una tasa de 0.60 mL/min. El eluyente fue colectado en fracciones de 3.0 mL..

Los picos fueron colectados y analizados con PAGE (6%) (Fig. 18), confirmando con tinción de azul de Coomassie la presencia de la Vt_1 en los picos 4, 5 y 6 y la Vt_2 en el pico 6.

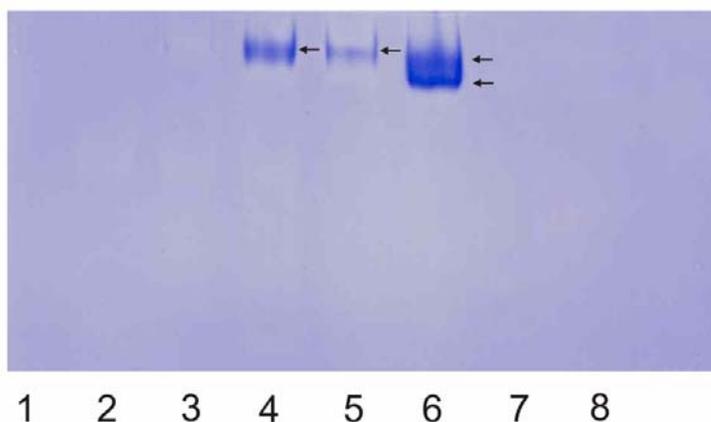


Figura 17. Electroforesis PAGE-nativa (6%) de vitelinas purificadas de ovario de hembra vitelogénica de *C. quadricarinatus* de la segunda cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharose-CL-6B) Vitelinas en picos 4, 5 y 6 (→).

El resultado de la secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa de la Vt_1 purificada de los huevos en estadio V se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa obtenida en la Vt_1 purificada de los huevos en estadio V de *C. quadricarinatus* mediante técnicas cromatográficas.

Subunidad	Secuencia de aminoácidos
75 kDa	SSDTEIFHAIKADIM

Esta secuencia parcial se localiza dentro de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc de la Vg de *C. quadricarinatus* obtenida por Abdu et al., (2002) (Fig. 18).

MTTSAALIVLPLVAGAGAPFFGGNTPVCSTECPIAGSPKLFYQPGKTYTYEYSGKSRI
 QLKGVEGGLTETDWSAQVELSWITPCDMVITMKDSKTDGATVPGASRFLERYPLVVAV
 TDGKVHHVCSHPDDTWSINLKKGVASAFQNSLPSNST INSGQNI TETDVVGKCPTRY
 EVQDHGDTVIMIKEKNHRQCKERYHTPAENPAPWLRGPFITDESTCMCKQETRNGIYS
 AITCEDKNVVKPSYGAYKYVEAKMMSTLKYLSSESSEHSSDILEGNMVRKSLLYDYHTP
 KKDPMSMTQLDRIMSQICRKRTRDNVERDVAALVARAIQFLRMVPEEAVEQTLNKIRSG
 QYCQDYKLEELFLDFVSFVDEPGAVKVMVKELLNSRFTGRYSLYTAAFYLI PRPCI
 HAMKALKPLFESTRPMYPPTLAASSMVNNYCNHNRCHEEEPVKSLAETLGNKLQRQC
 SASEDEQTVQAALTLKALGNMGVMTPAVATSVLRCMGTEGADNRIRVAAAQAFRKAK
 CHRASTGRLVGYALDSRKTTEVRIAS YIAAVRCAEKWDFEKIVEKISVGQNTQVRGFI
 LSHLRNVQQSDAPDKENLRNLLTNI VI PRNFKTDIRKYSRNLDSL YFSPSAGVGAGLE
 SNIIYAPGSFIPRSIDFNLTAALEGISMNIGEVGARFEGLDPFIEKLF GPESYFQKAS
 YKQIFSEMTSLFHEKKNKFLHFHFGDFKHKRSIDMSTLSNFFHNLYSDESRLAKADVF
 ARFMGQEI SFASLAGDLTDI SADR FIEAFFSYFNDIVDQMKHLNINSAHLNINSARTA
 QLHLDYFPTIQGTPFKLKMMDGTAVLGRQIEGNLNLVNMIANWKKGESILKLVPSLSV
 EVDGFGVDCHI SKTGPEMKNTISSNGVSMVVRPKNNNELELELDIPAKMDFIDIES
 KIHFIKEVKGKPKTTVSVSPSEDEVTHQSCSNSLESGIGIKLCYKFNFFDILRSNSF
 LQGT PFAKLFLEKVDPSVKGYIVKTAIQGDSNRKLIKMKLEVPGATTARDVETVVS Y
 TKEEDSYKISAE LGSFSDVSSKFGAHTNKVNQKGVQAFAYK **SSDTEIFHAIKADIMA**
 RSTTEDMEYHVTMYVSRSEDFSPQSQVI EWKSSKKNNGPEISLDILAKTKNAWKS YID
 LNLEGGVDLRYASHSRVPLPRKLRKFEFHTGLGGWKV ISFVRQTSESGDKVEFSSAFK
 IARNNE DFI SLEATHHTQGRLYTDFVCKTTAKVKMGRAEYKAASSIYYEHGKKGVS LQ
 VIRSEDNVKVADLEATR VCTIQSRIYAAMDMPGYMKVLKFECKEEEQGPGRYVVEAA
 IQHGDPVIFQAEGPVTAKISSDSAKLQTDIRFITISRQPFKLSN FVFAKNKQVLSLE
 LIKQREPVFVAEWNKSGSSQGTTIGIKFQLPALVDKLDAL IISNKLIHVSFDTQFLP
 KSSAPRRIKAFTDIDFENKKNMADFADWADRQSKKI I LD TNVISNPSNPGRVS IHGN
 VKCMNEMYHVKLDIEAENLRQYRYGENGFNLELTSPQRSLEWKLNTNVESRSKAVDMN
 LQCKFQDDREYRLTSVVDIEKLGSPYSYKLESEMSFTSPGGQETTVHAEAKHQVTSEE
 REIYYKASVRTPALRKPLVLEMSSVSQELSYSLKALTERDSPATMINWEMKLYPEGGV
 EK FVSSVDMNALRDFLKSAL EIVAIEGEEYSSGSGKYGKGKYGFHYHKPTSSYSMKI
 ESPSR TLEGEAEYSPSRSSFKFY PDSKSEAKYEITGESSHNYWDQVSKYEGRLSHPG
 MSKDIRVKVEHSYSGQTMRGSL ELDIFPDTEDKITGTLKSTMIANN TVRIEASLTTRI
 LRVHPKVTVMAAYSQNTTGIDVQFQKSPSSPVSFQVSALYDRI FTGDATMTFRVINEE
 DAVVDIAGVMGPEKDPECNGVNIKGVAYASPIGSYDIRSKLCRPF FEFELISKKQESQK
 EFITKLG LQCPNRAEISLSESNLDQPWRNAIAMARDKLP SPTVAEVHFVYESENHMTV
 KGALKEDWQRMESAHSWADSVSRYLEEQAQQQGTTFPNPEIETLLEEVKHDLDREIYH
 DLIYKEIIPHYEAFREFLRPPASYVIQFSSSILSGIAKIQRDLRSRLLEHVLAWQEE
 FKDITERI IELLVKATR WVETGEIPEPVRRLLEQLQETRI FRMFKR D VDAFIRRYPEE
 YEAIQEMVAKVKDTLQEDFENVLIRISKIKVVENTIKWILKDLSENMIANKVEEYIS
 EIQEAIWALGVETNESEMFKMHLKPVYSLIQLLQEVHLTP IYYLEKLALVHDLRI
 PFPINNV IWAYYTLLPRHMTLELPPYNRTAMVVS DTEILTFDGALLRAPRSPCHVLA
 VYANNKLTMTHPQPSAPPQITFSTGSTTVSVKPDFRVDVNGHEMNRQQLTAGDVFIQK
 TSREVNATSPFMTVRVFRQERVSVNVSGWTYGRIAGLLGTYDGEVGNDFWFTPSGRNA
 SSLQELV ASWQEDRQCPTPPISPFHDHTVPAERIIQCHS LLELRSKCFPVVNP KPFIK
 MCHAAHRPCDAAKAYRTMCARQGI RDMFPIPC

Figura 18. Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa obtenida en la Vt₁ purificada de huevos en estadio V localizada dentro de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc de la Vg de *C. quadricarinatus* obtenida por Abdu et al., (2002).

El resultado de la secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 120 kDa obtenida en la Vt_1 del ovario mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (7.5%), se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 120 kDa obtenida en la Vt_1 purificada de ovario de *C. quadricarinatus*, mediante técnicas cromatográficas.

Subunidad	Secuencia de aminoácidos
120 kDa	APFGGDLA

**CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA
VITELOGENINA (Vg).**

Introducción

Existe una gran controversia en relación al origen de la Vg en diferentes especies de invertebrados. Han sido propuestas tanto síntesis exógena en el hepatopáncreas y en el tejido adiposo, como síntesis endógena en el ovario para diversas especies de crustáceos marinos y dulceacuícolas (Fainzilber et al., 1992).

Algunos estudios apoyan la teoría de que la Vg penetra en el ovario por medio de endocitosis, aparentemente a través de receptores de la Vg (Paulus y Laufer, 1987, Yano y Chinzei, 1987). Asimismo, estudios moleculares señalan al hepatopáncreas, como el órgano que sintetiza la mayor cantidad de Vg en comparación con el ovario (Tsutsui, et al., 2000). Sin embargo, el papel que juega el ovario en la síntesis de la Vg, no ha sido estudiado en detalle a un nivel molecular. Resultados de estudios recientes en camarones peneidos, sugieren la presencia de múltiples genes que codifican a la Vg (Yang et al., 2000).

Con base en esto, el estudio a nivel molecular presentado en este capítulo, determinó los lugares de expresión del ARNm de la Vg de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* a partir de la secuencia nucleotídica de la molécula de la Vg en la región 3', la variación de la expresión del ARNm en tres diferentes etapas de la maduración ovárica, así como la presencia de uno o más genes implicados en la síntesis de la Vg.

Materiales y Métodos

Los organismos de *Cherax quadricarinatus* se obtuvieron de la población de reproductores del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, mantenidos bajo las condiciones expuestas en el Capítulo I (Materiales y Métodos).

Se extrajeron muestras de ovarios y de hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración, de desoves consecutivos y de hembras ovígeras, así como hepatopáncreas de machos maduros. Los diferentes estados de maduración ovárica fueron determinados por el método propuesto por Abdu et al., (2000).

Extracción de ADN (Ácido-desoxi- ribonucleico)

En el ADN se localiza la información genética de la célula y está constituido por dos cadenas de polideoxi-ribonucleotidos formados por la unión de dAMP, dGMP, dCMP y dTMP, unidades monoméricas que constituyen una sola tira de ADN mantenidas en forma de polímero por puentes 3', 5'-fosfodiéster.

El ADN total se extrajo siguiendo la metodología de Sambrook et al., (1989). Se disecaron trozos pequeños de músculo de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración. Se homogeneizaron con 500 µL de amortiguador de extracción (0.5% SDS, 100mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8.0). Se les adicionó 20 mg/ml de proteinasa K a las muestras. Se dejaron incubando a temperatura ambiente por una hora. Se les adicionó 10 mg/ml de ARNasa y se dejaron incubando 30 min a temperatura ambiente. Las

muestras se centrifugaron a $18 \times g$ por 2 min a temperatura ambiente. Se recuperó un mínimo de 500 μL y se pasó a un tubo limpio. Se realizó la extracción con fenol/cloroformo añadiendo un volumen equivalente (v/v) de una solución de fenol saturado. Se agitó 10 minutos manualmente de manera suave hasta obtener una emulsión completa. Se centrifugó a $18 \times g$, durante 2 min a temperatura ambiente. Se tomó la fase superior y se pasó a un tubo limpio. Se hizo una segunda extracción con fenol saturado de la misma manera, pasando la parte superior a un tubo limpio. Se realizaron dos extracciones con fenol/cloroformo (v/v) centrifugando a $17,949 \times g$, durante 2 min a temperatura ambiente, pasando la parte superior a un tubo limpio. La última extracción se realizó con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v). Se centrifugaron las muestras a $1,600 \times g$ durante 15 min a 4°C . Se pasó la parte superior a un tubo limpio, cuidando de no tocar la interfase.

Precipitación del ADN

Se preparó la mezcla con 1 volumen de muestra, 2 volúmenes de alcohol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (1/10). Las muestras se dejaron reposar a -20°C toda la noche. Se centrifugaron las muestras a $17,949 \times g$, 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó inmediatamente el residuo de alcohol con una pipeta cuidando de no desechar el botón de ADN. Se secó 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a $17,949 \times g$, 15 min a temperatura ambiente. Se resuspendió nuevamente con agua o amortiguador TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Cuantificación de ADN

Se preparó una dilución de 1:250 y se leyó la absorbencia en espectrofotómetro a una OD de 260nm. Se aplicó la fórmula: $OD_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 = \mu\text{g ADN/ml}$.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método del PCR es utilizado para la amplificación selectiva de una región elegida dentro de una molécula de ADN. Permite el copiado *in vitro* del ADN y del ADNc.

El ADN genómico preparado del músculo de hembras en vitelogenénesis secundaria en primera maduración de *Cherax quadricarinatus*, fue amplificado por PCR y secuenciado. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores a partir del ADNc de la Vg del hepatopáncreas de hembras de la misma especie reportada recientemente por Abdu et al., (2002), diseñados basándose en la región 3'. La amplificación fue iniciada con el par de oligonucleótidos (Vg F- 5' GTG CGT CGC CTA CTG GAA CA 3' y Vg R- 5' CTT GGC GGA ATA CTC GGA CTG 3') y un programa consistente en 3 pasos: desnaturalización a 94°C por 2 min, y 35 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 1 min y 72°C por 3 min. La elongación final fue realizada a 72°C por 10 min. La reacción de PCR se realizó en un Termociclador (ThermoJet, EquiBio) en un volumen de 50µL utilizando 0.5 U de *Pfu* ADN polimerasa (Promega, Corporation, WI), amortiguador 10X *Pfu* ADN, 20 nmol dNTP, 25 pmol de cada

cebador, 2.5 μ L de DMSO y 500 ng de DNA genómico como molde. Los productos de PCR fueron observados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x (Tris-acetato 0.04M, 0.002M EDTA). Una escalera de marcadores de peso molecular de 200 -10,000 pb (Eurogentec, EGT Group, France) fue utilizado.

Purificación del ADN

Se realizó una electroforesis preparativa en un gel de agarosa (1%) con el resultado del PCR a 75V por 1 hora. Se cortó la banda y se depositó en un tubo limpio para la posterior purificación del ADN con Gene Clean II Kit (Bio 101 System, Q-Biogen). Se cuantificó el volumen del gel. Se adicionó 3 volúmenes de NaI 6M al gel. Se incubó a 55°C 5 min y se mezcló vigorosamente para disolver el gel. Se adicionó una suspensión de Glassmilk (25 μ L) por 15 min, agitando cada minuto. Se centrifugó un pulso a 17,949 x *g*, eliminándose el sobrenadante. Se lavó con una solución de New Wash (500 μ L). Se centrifugó un pulso a 17,949 x *g* eliminándose el sobrenadante. Se lavó nuevamente con solución de New Wash (500 μ L). Se centrifugó 1 min a 17,949 x *g* eliminándose el sobrenadante con pipeta. Se secó el botón de ADN por 15 min. Se eluyó con agua o amortiguador TE (15 μ L). Se centrifugó 1 min a 17,949 x *g* recuperando el sobrenadante y eliminándose las esferas. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para cuantificar el ADN. Este se conservó a -20°C.

Marcaje de sonda con α ³²P

Se marcó la sonda con α ^{32}P radioactivo (Megaprime DNA Labelling Systems, Amersham, Pharmacia, Biotech). Se realizó una mezcla con: 200 ng de ADN, 5 μL de cebador marcado, 24 μL de agua destilada. Se desnaturalizó el ADN purificado a 95°C por 5 min. Se le agregó: 5 μL de amortiguador 10x, 4 μL cada dNTP (GTP, CTP, TTP), 5 μL de (α ^{32}P dATP), 2 U de enzima Klenow (ADN polimerasa). Se incubó a 37°C por 30 min. Para parar la reacción de la mezcla radioactiva se adicionó 2 μL de EDTA. Posteriormente se realizó la purificación de la sonda con columnas Clontech mayor de 15 oligos, una para cada cebador. Se centrifugó a 700 x g por 5 min a 4°C, con la intención de eliminar el amortiguador y dejar sólo la resina preparada para recibir la mezcla. Con cuidado, se cargó la mezcla en la columna (evitando tocar la resina) aprox. 50 μL (20 μL de mezcla y 30 μL de agua). Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se eliminó la columna y se conservó el tubo Eppendorf con el cebador radiactivo dentro de una caja de plomo en refrigeración a -20°C.

Técnica de Clonación (Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., & Helling, R., 1973).

La clonación de genes es la herramienta básica de la tecnología de ADN. Es el proceso de obtención de un conjunto de copias idénticas (clones) de un gen.

El ADN genómico amplificado por PCR con *Pfu* ADN Polimerasa y purificado, se le adicionaron las terminaciones AT con una mezcla de: 120 ng de ADN, 6 μL de amortiguador libre de MgCl_2 (10x), 1 μL de *Taq* Polimerasa, 2.5mM MgCl_2 , 2mM dATP. Se incubó a 70 °C 15-30 min.

Posteriormente fue clonado en el plásmido pGEM-T “Easy Vector System” (Promega, Corporation, WI). La ligación se realizó con una mezcla de 50 ng/ μ L del plásmido vector linearizado (2 μ L), 50-150 ng/ μ L del inserto (2 μ L), 2x amortiguador T4 ADN ligasa (5 μ L), 3 u/ μ L de T4 ADN ligasa (1 μ L), se aforó con agua destilada a 20 μ L. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se sacó la mezcla de ligación y se colocó inmediatamente en hielo.

La transformación (incorporación de un fragmento de ADN plasmídico a una bacteria) se realizó en la cepa (XL1-Blue) de la bacteria *Escherichia coli* utilizando el método estandar (Sambrook, et al., 1989). En condiciones de esterilidad se tomó 20 μ L de la solución de ligación y se adicionó a la bacteria competente previamente descongelada en hielo por 15 min, se mezcló bien. Se dejó 30 min en hielo. Se incubó a 37°C por 5 min (shock térmico). Se colocó en hielo inmediatamente después. En condiciones de esterilidad se tomaron 400 μ L del medio de cultivo LB y se colocó en la mezcla. Se incubó 45 min a 37°C en movimiento para permitir que las propiedades fenotípicas conferidas por el plásmido se expresen. Se centrifugó 1 min a 18,000 x g. Se eliminó el exceso de LB. Se dejó aprox. 50 μ L de medio de cultivo LB con las bacterias. Se resuspendió y mezcló con una micropipeta. Se sembró en una caja de petri con medio LB y antibiótico (ampicilina 25mg/mL). Alternativamente adicionada con 20 μ L de X Gal (50mg/mL) y 100 μ L de IPTG (0.1M) para distinguir las colonias con la presencia del inserto (colonias blancas) de las que no lo presentan (colonias azules). Con una pipeta Pasteur se extendió la mezcla por toda la caja hasta secarse. Se

incubó a 37°C boca abajo toda la noche.

Posteriormente se realizó la recuperación del plásmido mediante una miniprep, seleccionando ordenadamente 20 colonias aisladas. Se prepararon 20 tubos, uno para cada colonia. Se adicionó 1 µL de ampicilina (40 µg/mL) al medio LB y se mezcló bien. Se colocaron 2 mL de LB+ampicilina en cada tubo. En condiciones de esterilidad y la ayuda de palillos y una pinza, se picó cada una de las colonias seleccionadas y se colocó cada palillo en cada tubo. Se incubó a 37°C en movimiento durante toda la noche. Se colocó el contenido de cada tubo en un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 18,000 x g por 1 min. Se eliminó el medio LB y se dejó sólo el botón con las bacterias. La lisis alcalina se realizó adicionando 200 µL de amortiguador de resuspensión S1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg ARNasa/mL, pH 8.0) a cada tubo. Se mezcló perfectamente cada tubo hasta resuspender las bacterias. Se adicionó 200 µL de amortiguador de lisis S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) por 5 min mezclando anteriormente. Se adicionó 200 µL de amortiguador neutralizante S3 (280 M KAc, pH 5.0) y se mezcló por unos segundos. Se dejó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 18,000 x g por 15 min. Se tomó aprox. 500 µL del supernadante, se depositó en un tubo nuevo y se eliminó el botón. Se agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto y se realizó la precipitación. Se resuspendió con 30 µL de agua destilada en cada tubo. Se incubó a 65°C/ 30 min (desactivación de ADNasas).

Se realizó la digestión del plásmido con el inserto de ADN con la enzima de restricción *Eco* RI (Promega, Corporation, WI) (≈1/2 µL de 1U enzima/tubo). Se

puso la mezcla a baño maría a 37°C/2 horas. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se purificó y el inserto fue secuenciado en un sentido (MWG-BIOTECH, Germany).

Extracción de ARN (Ácido-ribonucleico)

El ARN forma parte del sistema que traduce la información genética en las proteínas que determinan la función y estructura celular. Es un poli-ribonucleótido formado por la unión 3', 5'- fosfodiéster de AMP, GMP, CMP y UMP.

La extracción del ARN total se realizó siguiendo la metodología de Sambrook et al., (1989). Las muestras de ovarios y de hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración, de desoves consecutivos y de hembras ovígeras, así como hepatopáncreas de machos maduros de *C. quadricarinatus* fueron homogeneizados con reactivo de Trizol (1 mL/5 x10⁶ células) (Gibco BRL, Life Technology, U.S.). Se incubaron a temperatura ambiente 10 min para lograr una mejor disociación de las nucleoproteínas. Se añadió a cada muestra 200 µL de cloroformo por cada mL de Trizol. Se mezclaron fuertemente durante 15 seg y se dejaron reposar 3 min en hielo. Se mezclaron en vortex. Las muestras se centrifugaron a 16,000 x g, durante 10 min a 4°C. Se transfirieron 3/4 partes de la fase acuosa a un tubo nuevo. Se realizó la precipitación de las muestras agregando 500 µL de isopropanol por cada mL de Trizol. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente, y posteriormente se dejaron precipitando a -20°C toda la noche. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron 15 min a

18,000 x *g* a 4°C. Se lavaron con etanol al 75% (1 mL de etanol/1 mL de Trizol). Se secaron las muestras al aire 15 min. Se resuspendieron en 30 µL de H₂O DEPC y se almacenaron a -80°C.

Cuantificación de ARN

Se preparó una dilución de 1:250 y se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm. Se aplicó la fórmula: OD₂₆₀ x factor de dilución x 40= µg ARN/mL.

Tratamiento con ADNasa

Se colocó en un tubo de microcentrifugadora de 500 µL: 15 µL de RNA, 5 µL de amortiguador 10X, 25 µL de H₂O DEPC, 5 µL de ADNasa libre de ARNasa 1U/µL. Se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadió v/v de fenol-cloroformo pH 4.5. Se centrifugó a 5000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo. Se agregó 5 µL de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol y se mezcló. Se dejó precipitando toda la noche. Se adicionó etanol al 75% y se centrifugó a 5000 x *g* durante 20 min a 4°C. Se resuspendió el ARN con 30 µL de H₂O DEPC y se almacenó a -80°C.

Preparación del ADNc por Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

El ARN total aislado de ovario y de hepatopáncreas de hembras en vitelogenénesis secundaria en primera maduración, de desoves consecutivos y de hembras ovígeras de *C. quadricarinatus* fue sujeto a transcripción reversa (Omniscript RT Random Primer Kit, QIAGEN, S.A., France) para sintetizar el ADNc. En los tubos de microcentrifuga de 500 µL se realizó la mezcla: Tubo 1; 1-2 µg de ARN, 250 ng de Random Primer (0.5 µL), 2 µL de amortiguador RT 10X, 2 µL de dNTP's 5 mM, 0.25 µL de inhibidor de ARNasa 10 U/µL, y 2 µL de RT 20 U/µL, aforar con H₂O DEPC a 20 µL. Tubo 2 (Control negativo); 1-2 µg de ARN, 250 ng de Random Primer (0.5 µL), 2 µL de amortiguador RT 10X, 2 µL de dNTP's 5 mM, 0.25 µL de inhibidor de ARNasa 10 U/µL, aforar con H₂O DEPC a 20 µL. Se incubó 60 min a 37°C.

El ADNc obtenido por RT se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *Pfu* polimerasa (Promega, Corporation, WI).

Northern Blot (Alwine, 1979)

Este método permite detectar el ARN, el cual se transfiere del gel hacia un soporte sólido (generalmente membranas de nylon o nitrocelulosa), donde es inmovilizado (unido covalentemente) y posteriormente utilizado como blanco en los experimentos de hibridación subsecuentes.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% desnaturalizado con tiocianato de guanidina, con 30 µg de ARN total de ovario y de

hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración y hepatopáncreas de macho maduro de *C. quadricarinatus*, desnaturalizados a 95°C por 10 min.

Se preparó la transferencia con filtros de papel Whatman, así como la membrana de nylon cargada positivamente (Roche, Germany). Se humedecieron previamente los filtros y la membrana en el amortiguador SSC 2x. Se formó el sandwich colocando un soporte dentro de un recipiente que sostuviera el sandwich. Se vertió el amortiguador SSC 20x en un recipiente. Se colocaron 2 capas de filtro de tamaño necesario para tocar el amortiguador, envolviendo el soporte. Se colocó la tercera capa de filtro del tamaño del gel. Se puso el gel encima del filtro y la membrana sobre el gel. Se colocaron 3 capas más de papel filtro del tamaño del gel. Se colocó encima un paquete de servilletas al tamaño del gel y un peso aproximado de x 500g por encima del sandwich, durante toda la noche a temperatura ambiente.

A la mañana siguiente se secó la membrana durante 20 min a temperatura ambiente. Se colocó la membrana en un tubo de vidrio grande poniendo la parte del ARN hacia el centro del tubo. Se enjuagó con SSC 2x. Se adicionó la solución prehibridadora (FPH) 50% formamida, 5X SSC, 1% SDS, 5X Denhardt's y 100µg/ml de ADN de timo de ternero desnaturalizado) (20 mL) que contiene reactivos que bloquean en la membrana los sitios de unión del ARN no específicos. Se incubó en horno a 42°C durante 4 horas.

Posteriormente, la membrana fue incubada con la sonda marcada

radioactivamente (α^{32} P) dATP (Amersham Megaprime Random Priming Kit, England) obtenida del ADN genómico de músculo de hembra en vitelogenesis secundaria de *Cherax quadricarinatus* en el extremo 5', para permitir que ambas se unan. La sonda marcada (1.1 Kb) corresponde a los nucleótidos 6574-6770 de la secuencia del ADNc de la Vg de hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* reportada por Abdu et al. (2002). La hibridación se realizó toda la noche a 42°C (Sambrook et al., 1989). La membrana fue fijada con rayos UV por 3 min.

Se eliminó la solución hibridadora y se realizaron diferentes lavados de la membrana; dos veces en 10 mL de solución SSC 2x, 0.1% SDS por 10 min cada lavado. Se lavó dos veces en 10 mL de solución SSC 0.5x, 0.1% SDS por 10 min cada lavado, y una sola vez en 10 mL de solución SSC 0.1x, 0.1% SDS por 10 min a temperatura ambiente, para eliminar gradualmente la sonda unida con baja especificidad, permaneciendo únicamente las dobles cadenas con alto grado de homología (100%). Por último la membrana fue autoradiografiada (Kodak Biomax-MS Film).

Secuenciación

Una vez obtenidos los productos de PCR y purificados, se secuenciaron por el método de Sanger (Sambrook et al., 1989), en un secuenciador automático ABI-PRISM 310 de Perkin Elmer, con ayuda de los mismos primers para PCR. Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas con el programa BLASTx en la página del Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> para compararlas con la secuencia del

ADNc de la Vg de hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* reportada por Abdu et al., (2002).

RESULTADOS

Un producto de PCR de 1.1 Kb fue obtenido a partir del ADN genómico utilizado como molde (Fig. 19).

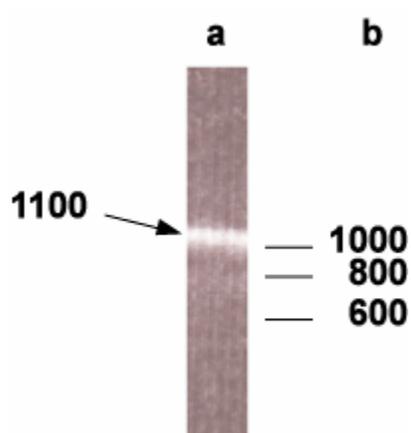


Figura 19. Producto de PCR de 1.1 Kb utilizado como molde del ADN genómico de una hembra de *Cherax quadricarinatus* en vitelogénesis secundaria de primera maduración. Los oligonucleótidos cebadores (VgF- 5' GTG CGT CGC CTA CTG GAA CA 3' y VgR- 5' CTT GGC GGA ATA CTC GGA CTG 3') fueron diseñados a partir del ADNc de la vitelogenina (Vg) de *C. quadricarinatus*. a) Electroforetograma realizado en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. b) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France).

El fragmento fue purificado y clonado en el plásmido pGEM-T “Easy Vector System” (Fig. 20).

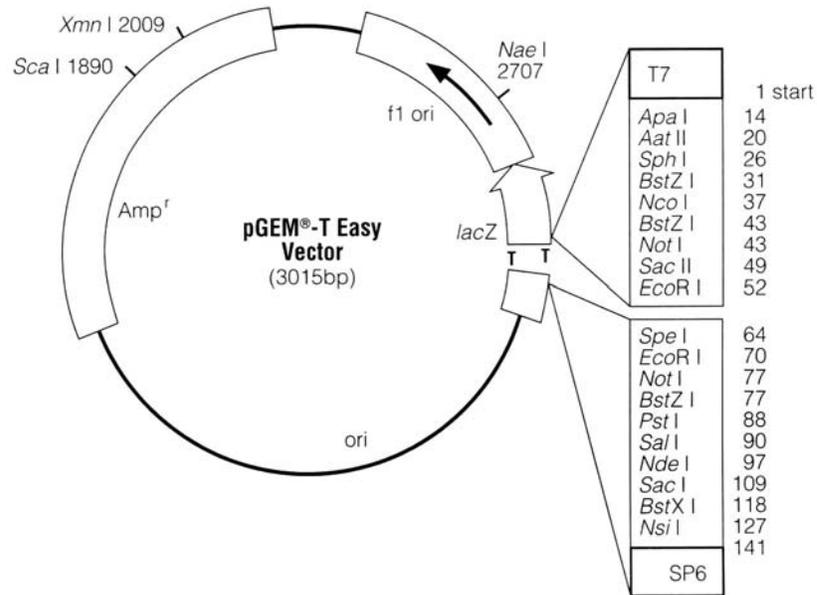


Figura 20. Plásmido pGEM-T “Easy Vector System” utilizado en la clonación del fragmento obtenido a partir del ADN genómico de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración de *C. quadricarinatus*.

La secuencia nucleotídica de la región 3' del ADNc de la Vg de *C.*

quadricarinatus (AF306784) reportada por Adbu et al., 2002 utilizada en este estudio, se observa en la Fig. 21.

```

5' 6541 ccaggtgcgtc gcctactgga acagctgcaa gaaactagga tcttcagaat gtttaagagg
6601 gacgctgacg cctttattcg gcgatacccg gaggagtacg aggccatcca ggagatggtg
6661 gccaaaggta aggataccct ccaggaagat tttgagaacg ttctcattag gatctcaaag
6721 attaaagtgg ttgaaaatac gatcaagtgg attcttaaag acctcagcaa tgaaaacatg
6781 attgccaata aggtggagga gtatattagt gaaatcattc aggaagctat ctgggctctt
6841 ggtgtggaaa caaatgaaag cgaaatgaaa ttcaaatgc atttgcataa gccagtttat
6901 tctttgattc agttactgca ggaggttcat ttaactcaa tctattatct tgaaaaactg
6961 gccttggttc atgaccgcct cattcccttc cccatcaaca acgtaatctg ggcatactac
7021 acgttgctgc cccgccatat gacagagttg ttgcctcctt acaaccgcac agccatgggt
7081 gtcagtgaca cagagatcct tacctttgat ggagctctac tccgtgcacc tcgttcaccg
7141 tgccatggtg tcttggtgtg atatgccaac aacaaactta ccatgaccca tccacaacc
7201 tcagctccac cacagatcac cttctctact ggctcacta cgtttctgt taagccagac
7261 ttccgtgtcg acgtcaacgg acatgagatg aacagacaac aattaactgc aggtgatgtc
7321 tttattcaaa agacctcccg agaagtcaat gcaacatcac ccttcatgac agtccgagta
7381 ttccgccaag 3'

```

Figura 21. Secuencia nucleotídica de la región 3' del ADNc de la Vg de *C. quadricarinatus* (AF306784). Par de oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar la región 3' (en negritas).

El esquema de la región 3' del ADNc de la Vg de *Cherax quadricarinatus* utilizada en este estudio, se observan en la Fig. 22.



Figura 22. Esquema del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de *C. quadricarinatus* (AF306784) (Banda negra gruesa). Región 3' del ADNc de la Vg amplificada por PCR en este estudio (Banda negra delgada). Fragmento de sonda (Recuadro blanco).

El fragmento de 1.1 Kb obtenido del ADN genómico amplificado por PCR fue utilizado como sonda para hibridar en el análisis de Northern blot (Fig. 23). Este fragmento fue alineado con con la secuencia nucleotídica del ADNc de la Vg de *C. quadricarinatus* obtenida por Abdu et al., (2002) (AF306784), obteniéndose una identidad de 96%.

```

5' aac tag gat att att cag cat gtt taa gag gga cgt cga ctc
aac tag gat att tt cag at gtt taa gag gga cgt cga c c
aac tag gat att ctt cag aat gtt taa gag gga cgt cga cgc

ctt tat tcg gcg ata ccc gga gaa gta cga ggc cat tca gga
ctt tat tcg gcg ata ccc gga g a gta cga ggc cat ca gga
ctt tat tcg gcg ata ccc gga gga gta cga ggc cat cca gga

gat ggt ggc caa ggt caa gga tac cct cca gga aga ttt tga
gat ggt ggc caa ggt caa gga tac cct cca gga aga ttt tga
gat ggt ggc caa ggt caa gga tac cct cca gga aga ttt tga

gaa cgt tct cat tag gat ctc aaa gat tca agt tgt tga aaa
gaa cgt tct cat tag gat ctc aaa gat t a agt tgt tga aaa
gaa cgt tct cat tag gat ctc aaa gat taa agt tgt tga aaa

tac gat cga gtg gat tct taa aga cct cag caa 3'
tac gat c a gtg gat tct taa aga cct cag caa
tac gat caa gtg gat tct taa aga cct cag caa

```

Figura 23. Alineación de la sonda utilizada en este estudio contra el ADNc del hepatopáncreas de la Vg obtenido por Abdu et al., 2002 (AF306784). Sonda obtenida del fragmento de 1.1 kb utilizada en este estudio (Letras negritas); ADNc del hepatopáncreas de la Vg obtenido por Abdu et al., 2002 (Letras en itálicas).

La señal de hibridación obtenida por medio del análisis del Northern blot fue detectada simultáneamente en el ovario y en el hepatopáncreas en hembras en

vitelogénesis secundaria en primera maduración. Este análisis muestra que la sonda hibrida con un fragmento aproximado de 8 Kb del ARNm en ambos tejidos (Fig. 24). Mientras que el ARNm obtenido del hepatopáncreas de macho maduro no mostró ninguna señal de hibridación.

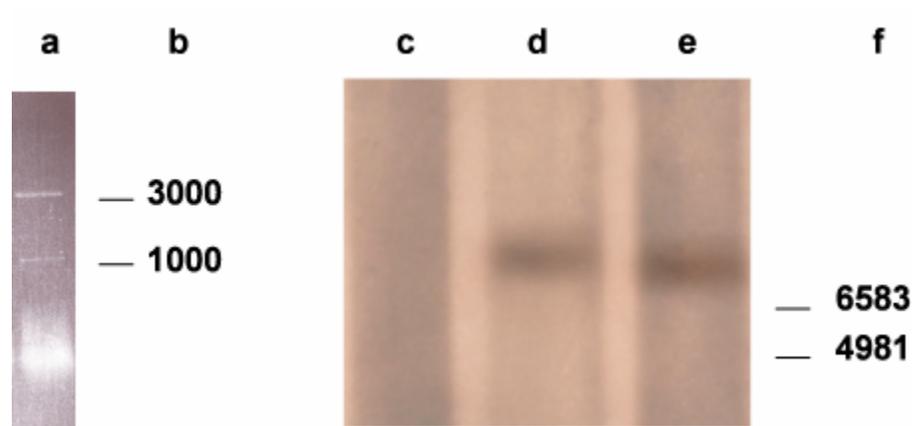


Figura 24. a) Digestión con *Eco* RI de la clonación del producto de PCR de 1.1 Kb con el plásmido pGEM-T Easy Vector System. b) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France). Análisis del Northern blot obtenido a partir de ARN total de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración de *C. quadricarinatus* c) hepatopáncreas de macho maduro; d) ovario de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración; e) hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración; f) Escalera de marcadores de peso molecular de ARN (281 - 6,583 pb) (RNA Marker-Promega, U.S.A.).

El resultado del análisis de RT-PCR muestran que el ARNm que codifica a la región C-terminal del ADNc de la Vg estuvo también presente simultáneamente

en el hepatopáncreas y en el ovario en hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración (Fig. 25). Las bandas presentaron aproximadamente 900 pb en ambos tejidos.

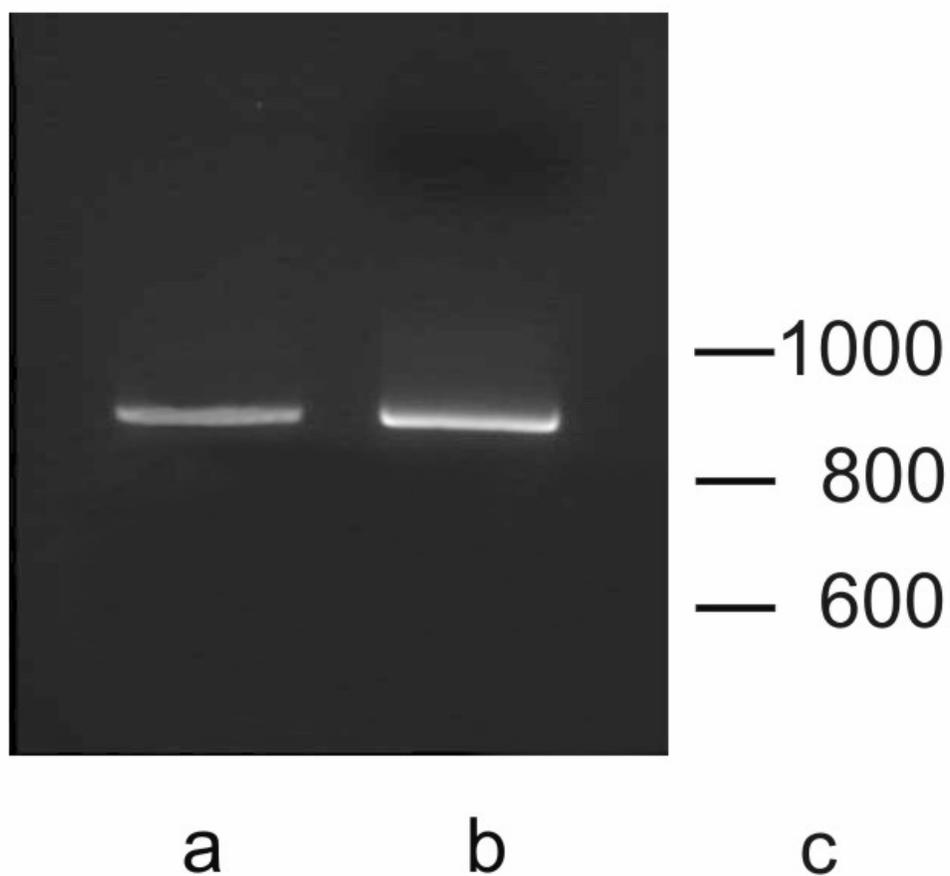


Figura 25. ADNc obtenidos en el análisis de RT-PCR a partir de ARN total de *C. quadricarinatus* de muestras de ovario y de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración. a) ovario; b) hepatopáncreas; c) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France).

Este mismo análisis fue realizado con muestras de ovario y de hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración,

de desoves consecutivos y de hembras ovígeras, mostrando la expresión del ARNm del hepatopáncreas en los tres diferentes estadios de desarrollo, sin embargo, el ARNm del ovario estuvo expresado solamente en el estadio de desarrollo de hembras en primera maduración, no expresándose ni en hembras con desoves consecutivos ni en hembras ovígeras, como lo muestra la Figura 26.

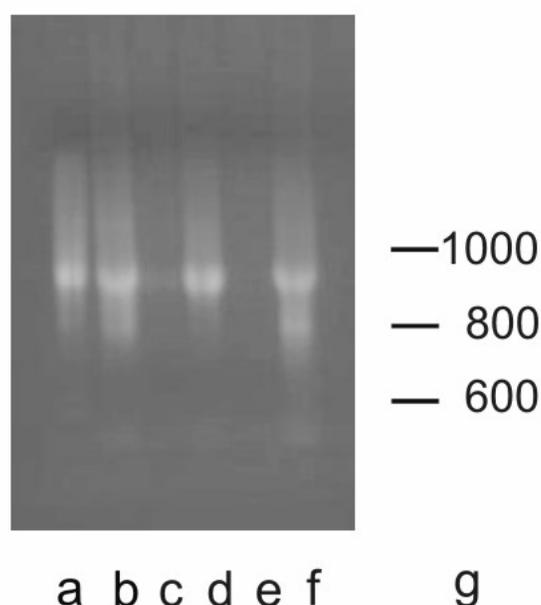


Figura 26. ADNc obtenidos en el análisis de RT-PCR a partir de RNA total de *C. quadricarinatus* de muestras de ovario y de hepatopáncreas. a) Ovario de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración; b) Hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración; c) Ovario de hembra en vitelogénesis secundaria de desoves consecutivos; d) Hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de desoves consecutivos; e) Ovario de hembra ovígera; f) Hepatopáncreas de hembra ovígera; g) Escalera de marcadores de peso molecular de ADN (200 -10,000 bp) (Eurogentec, EGT Group, France).

El ARNm del ovario y del hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración, fue clonado y secuenciado. Las secuencias nucleotídicas se muestran en la Figura 27.

a)

GTGCGTCGCCTACTGGAACCTCTGCAAGAACTAGCATCTTCACGATGCTCAAAAATTACGTCGACACCT	70
TAATTGAACGATACACGGAGGAGTTTGAGGCCATCCAGCAGGTCGTAACGAAGGTCAGACTAAATCTCTG	140
GCAAGATCTTGTGAAATTACGAAAACGGATCTCTCAGATGCCTGCTGTGGAGCGAGCCATTAACCTGGGTC	210
ATCAGCCAAAACATCTCCGATAACTGGATGGCCTTTGAAGCGAAGACATTAATTAGTCAACTTCTTCAGG	280
AACCTAATTTTCGTCTCAGCAGAAAAAGAACTAATCACATCAGTGCGAAAATACCGTTGCACACTCCAAT	350
GTACTCCTTAACCCAAGTTCTCAAATCATCAGTGCCACATCCATTATGATAGCTGAAAACCTGGTATGG	420
CGTTATGCATCTTTCATTCCCGTTCAGTAAGAGACTTAATTTGGGGGACTATTATTCTCTACCTCATC	490
GTATGACAGACTTGTTGCCTCCTTACAACCGCACAGCCATGGTTGTGAGTGACACAGAGATTGTCACCTT	560
TGATGGCGCCGTGCTTCGTGCTCCTCGTTCACCGTGTCAAGTTGTCTTGGTTGTCTATGGTACCAACAAG	630
ATTACCATGGCTCATCCACAAGCCATAGCCCATCACAGATCACATTTTCTACCAACTCCACTATCGTCA	700
CTGTTAAACCAGATTTCCGCATTGACGTCAACGGTCAAGAGATGAGCACACAACGACTAGCTGTAAGAGA	770
AATCATAATGAGAAAACCTCAAGAGAAGTTAATGTAACGTCGCCCTTTATCACAGTCCGAGTATTCGGC	840
CAAGAA	846

b)

GTGCGTCGCCTACTGGAACAGCTGCAAGAACTAGGATCTTCAGAATGTTTAAGAGGGACGTCGACGCCT	70
TTATTCGGCGATACCCGGAGGAGTACGAGGCCATCCAGGAGATGGTGGCCAAGGTCAAGGATACCCTCCA	140
GGAAGATTTTGAGAACGTTCTCATTAGGATCTCAAAGATTAAAGTTGTTGAAAATACGATCAAGTGGATT	210
CTTAAAGACCTCAGCAATGAAAACATGATTGCCAATAAGGTGGAGGAGTATATTAGTAAAATCATTTCAGG	280
AAGCTATCTGGGCTCTTGGTGTGGAAACAAATGAAAGCGAAATGAAATTCAAAATGCATTTGCATAAGCC	350
AGTTTATCTTTGATTTCAGTTACTGCAGGAGGTTTCATTTAACTCCAATCTATTATCTTGAAAACTGGCC	420
TTGGTTTCATGACCGCCTCATTCCCTTCCCCATCAACAACGTAATCTGGGCATACTACACGTTGCTGCCCC	490
GCCATATGACAGAGTTGTTGCCTCCTTACAACCGCACAGCCATGGTTGTCAGTGACACAGAGATCCTTAC	560
CTTTGATGGAGCTCTACTCCGTGCACCTCGTTCACCGTGTCAAGTTGTCTTGGCTGTATATGCCAACAAC	630
AAGCTTACCATGGCCATCCACAATCATCAGCCCCACCACAGATCACCTTCTCTACTGGCTCCACTAC	698

Figura 27. Secuencias nucleotídicas del ARNm de ovario y de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria de primera maduración de *C. quadricarinatus* obtenidas a partir de la clonación de los productos de RT-PCR. a) ovario; b) hepatopáncreas.

De estas secuencias nucleotídicas, se obtuvieron las secuencias deducidas de aminoácidos, las cuales fueron alineadas contra la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de la misma especie obtenida por Abdu et al., 2002 (AF306784) (Fig. 28 y 29). Donde se observa que la secuencia del ADNc del ovario obtenida en este estudio, presentó una identidad del 57% y una similitud del 69%, con la secuencia del ADNc del hepatopáncreas de la Vg obtenida por Abdu et al., 2002 (Fig. 28).

```

Query: 1      VRRLLELLQETSIFTMLKNYVDTLIERYTEEFEEAIQQVVTKVRLNLWQDLVKLRKRISQM 180
              VRRLLE LQET IF M K VD I RY EE+EAIQ++V KV+ L +D + RIS++
Sbjct: 2174  VRRLLEQLQETRIFRMFKRDVDAFIRRYPEEYEAIQEMVAKVKDTLQEDFENVLIRISKI 2233

Query: 181   PAVERAINWVISQNI SDNWMAFEAKTLISQLLQELNF-VSAEKETNHISAKIPLHTPMYS 357
              VE I W++ ++N +A + + IS+++QE + + E + + K+ LH P+YS
Sbjct: 2234  KVVENTIKWILKDLSNENMIANKVEEYISEI IQEAIWALGVETNESEMKFKMHLHKPVYS 2293

Query: 358   LTQVLKSSVPHPIAENLVWRYASFIPVVRDLIWDYYSLPHRMTDLLPPYNRTAMVV 537
              L Q+L+ PI E L + IP P+ ++IW Y LP MT+LLPPYNRTAMVV
Sbjct: 2294  LIQLLQEVHLTPIYYLEKLALVHDRLIPFPINNVIWAYYTLLPRHMTPELLPPYNRTAMVV 2353

Query: 538   SDTEIVTFDGAFLRAPSQCQVVLVYGTNKITMAHPQAIAPSQITFSTNSTIVTKPDF 717
              SDTEI+TFDGA+LRAPSQC VVL VY NK+TM HPQ AP QITFST ST V+VKPDF
Sbjct: 2354  SDTEILTFDGAFLRAPSQCCHVVLAVYANNKLTMTHPQPSAPPQITFSTGSTTVSVKPDF 2413

Query: 718   RIDVNGQEMSTQRLAVREIIIEKTSREVNVTSPFITVRVFRQE 846
              R+DVNG EM+ Q+L ++ I+KTSREVN TSPF+TVRVFRQE
Sbjct: 2414  RVDVNGHEMNRQQLTAGDVFIQKTSREVNATSPFMTVRVFRQE 2456

```

Figura 28. Secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración de *C. quadricarinatus*, alineada contra la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de la misma especie, obtenida por Abdu et al., 2002 (AF306784).

En tanto que la secuencia del ADNc del hepatopáncreas, presentó una identidad del 98% y una similitud del 98% comparándola con la secuencia del ADNc del hepatopáncreas de la Vg obtenida por Abdu et al., 2002 (Fig. 29).

```

Query: 1      VRRLLEQLQETRIFRMFKRDVDAFIRRYPEEYEAIQEMVAKVKDTLQEDFENVLIRISKI 180
              VRRLLEQLQETRIFRMFKRDVDAFIRRYPEEYEAIQEMVAKVKDTLQEDFENVLIRISKI
Sbjct: 2174  VRRLLEQLQETRIFRMFKRDVDAFIRRYPEEYEAIQEMVAKVKDTLQEDFENVLIRISKI 2233

Query: 181   KVVENTIKWILKDLSNENMIANKVEEYISEIIQEAIWALGVETNESEMFKMHLHKPVYS 360
              KVVENTIKWILKDLSNENMIANKVEEYISEIIQEAIWALGVETNESEMFKMHLHKPVYS
Sbjct: 2234  KVVENTIKWILKDLSNENMIANKVEEYISEIIQEAIWALGVETNESEMFKMHLHKPVYS 2293

Query: 361   LIQLLQEVHLTPIIYYLEKLALVHDRLIPFPINNVIWAYYTLLPRHMTELLPPYNRTAMVV 540
              LIQLLQEVHLTPIIYYLEKLALVHDRLIPFPINNVIWAYYTLLPRHMTELLPPYNRTAMVV
Sbjct: 2294  LIQLLQEVHLTPIIYYLEKLALVHDRLIPFPINNVIWAYYTLLPRHMTELLPPYNRTAMVV 2353

Query: 541   SDTEILTFDGALLRAPRSPCQVVLAVYANNKLTMAHPQSSAPPQITFSTGST 696
              SDTEILTFDGALLRAPRSPC VVLAVYANNKLTM HPQ SAPPQITFSTGST
Sbjct: 2354  SDTEILTFDGALLRAPRSPCHVVLAVYANNKLTMTHPQPSAPPQITFSTGST 2405

```

Figura 29. Secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración de *C. quadricarinatus*, alineada contra la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc del hepatopáncreas de la Vg de la misma especie, obtenida por Abdu et al., 2002 (AF306784).

DISCUSIÓN E INTEGRACIÓN

Identificación, purificación y caracterización de la Vt.

Los resultados obtenidos en este estudio en huevos en estadio I y V y en ovarios de hembras en vitelogénesis secundaria de *Cherax quadricarinatus*, muestran claramente la presencia de dos fracciones vitelínicas en cada uno de los tejidos. Estos resultados concuerdan con los criterios utilizados en la identificación de las Vts en crustáceos:

- 1) La naturaleza lipo-glico-proteínica de las bandas identificadas.
- 2) Las proteínas identificadas en ovarios están asociadas con la maduración, ya que estas no fueron identificadas en ovarios previtelogénicos.
- 3) El electroforegrama de los huevos presenta dos proteínas de baja movilidad electroforética bajo condiciones nativas, indicando que son Vts debido a que las mismas son el compuesto más abundante en el huevo.

Las proteínas, lípidos y carbohidratos son los principales componentes del huevo, de éstos, las proteínas son los elementos más abundantes utilizadas como sustrato para construir tejido y como combustible metabólico, pero los lípidos suelen ser los principales proveedores de energía (ante todo a partir de la combustión de los triglicéridos) (Biesiot y Perry 1995, García-Guerrero et al.,

2003). De esta manera el vitelo se transforma en biomasa por un lado y por el otro en combustible de energía.

Debido a que *C. quadricarinatus* es un organismo lecitotrófico y requiere de las reservas nutricionales presentes en el huevo para subsistir y desarrollarse, las cantidades de lípidos y proteínas presentes en los huevos recién desovados es muy alta en comparación con los niveles iniciales de otras especies que presentan un desarrollo embrionario con fases larvales planctónicas (e.g. *Penaeus indicus*, Cahu et al., 1988; *Macrobrachium rosenbergii*, Clarke et al., 1990, Roustaian y Kamarudin, 2001; *Penaeus vannamei*, Palacios et al., 1998).

En este estudio, la masa molecular obtenida en las dos Vts del ovario mediante electroforesis en condiciones nativas en gradiente (4-20%) fue de 470 kDa (Vt_1) y 440 kDa (Vt_2). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Chang et al., (1993b) en el langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, identificándose en el ovario tres Vts con masas moleculares de 780, 450 y 220 kDa; mientras que en crustáceos marinos una o dos Vts fueron identificadas en ovarios de hembras vitelogénicas, con masas moleculares que van desde 300 a 530 kDa, dependiendo de la especie y la metodología utilizada (Fyffe y O'Connor, 1974; Vázquez-Boucard et al., 1986; Qunitio et al., 1990, Chang et al., 1993a; 1996; Qiu et al., 1997 y Kawasoe et al., 2000).

Los resultados de la electroforesis SDS-PAGE de las Vts del ovario y de los huevos en diferentes estadios de desarrollo, muestran la dinámica de las moléculas a través del proceso de vitelogenénesis (Tabla 1). Las diferencias

existentes entre las masas moleculares de las Vts de los ovarios y de los huevos en este estudio, se deba posiblemente, a que las Vts del ovario son transformadas proteolíticamente en nuevos productos, que a su vez, pueden unirse a otras moléculas de aminoácidos libres ya presentes en el ovocito (Matsubara et al., 1999) formando moléculas con masas moleculares de mayor tamaño de las encontradas en el ovario. Este proceso de proteólisis se presenta también en las Vts nativas de los huevos del insecto *Carausius morosus*, las Vts están compuestas de dos proteínas multiméricas y algunos de estos polipéptidos sufren diversos cambios en el curso de la vitelogénesis (Giorgi et al., 1993; 1997). En peces marinos y de agua dulce, una significativa proteólisis en las Vts fue detectada al final de la maduración de los ovocitos (Greeley et al., 1986; Matsubara et al., 1999).

Dos anticuerpos antivitelina (Ac_1 y Ac_2) fueron producidos con las Vts de los huevos en estadio V utilizando electroforesis preparativas. En paralelo, estas mismas Vts fueron purificadas mediante técnicas cromatográficas (columnas de Sepharose-CL-2B e hidroxilapatita) e identificadas utilizando PAGE-nativa y técnicas de inmunodifusión.

Para obtener resultados satisfactorios en estudios inmunológicos, la calidad de los anticuerpos es muy importante, y estos deben de contar con una alta afinidad y una alta especificidad contra el antígeno. La técnica de electroforesis preparativa utilizada en este estudio, permitió separar las Vts que se inyectaron a los conejos para producir los anticuerpos antivitelina, los cuáles

tuvieron una alta calidad. Estos anticuerpos se obtuvieron con la finalidad de poder caracterizar la molécula de la Vt mediante técnicas inmunológicas estándares, además de que podrán servir como base para posteriores estudios bioquímicos y moleculares.

En la doble inmunodifusión radial, las fracciones vitelínicas (Vt₁ y Vt₂) dieron una reacción positiva con los anticuerpos antivitelina (Ac₁ y Ac₂) de *Cherax quadricarinatus*. La línea de precipitación obtenida, fue continua entre la Vg de la hemolinfa y del hepatopáncreas, así como las Vts de los ovarios y de los huevos en diferente estado de desarrollo (I y V), revelando así una identidad inmunológica completa entre los tejidos analizados. Esta identidad inmunológica ha sido demostrada anteriormente en diversos organismos: en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (Chang et al., 1993b; Lee y Chang, 1997; Chen y Kuo, 1998), en el estomatópodo *Squilla mantis* (Marzari et al., 1993), y en camarones peneidos (Vázquez-Boucard 1986, Chang et al., 1993a, Chen y Chen, 1993, Chang et al., 1994, Chang y Jeng, 1995; Chang et al., 1996).

La elución del pico 6 de la columna de hidroxilapatita conteniendo las dos Vts obtenidas del extracto de huevos en estadio V, fue fraccionado por SDS-PAGE observándose cuatro subunidades polipeptídicas en cada una de las dos Vts (75, 87, 95 y 110 kDa). Sin embargo, en el análisis del Western blot se observaron cuatro subunidades principales y siete subunidades secundarias iguales en cada una de las Vts. En el langostino *Macrobrachium rosenbergii*,

fueron identificadas tres Vts y cada una de ellas presentó dos subunidades polipeptídicas de 104 y 90 kDa (Chang et al., 1993b).

Por otro lado, la purificación de las Vts de ovario mediante la cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE- Sepharose-CL-6B), fraccionada por SDS-PAGE mostró 4 subunidades en ambas Vts (80, 95, 120 y 180 kDa), confirmando los resultados obtenidos anteriormente con las electroforesis preparativas de ovario. Resultados similares fueron encontrados por Sagi et al., (1996a) trabajando con la misma especie, encontrando en ovarios de organismos intersexos subunidades de 76 y 111 kDa. Subunidades de 73, 78 y 103 kDa en ovarios de hembras preovulatorias (Sagi et al., 1996b), y en ovarios de hembras en vitelogénesis secundaria, observaron subunidades de 106, 150 y 177 kDa (Khalaila, 1999; Sagi et al., 1999). Asimismo, Sagi et al., (1995) trabajando con *Marcobrachum rosenbergii* observaron subunidades de 64, 88, 92, 105 y 205 kDa en ovarios de hembras en vitelogénesis secundaria.

Es importante mencionar, que la secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa de la Vt_1 presente en huevos en estadio V, forma parte de la secuencia deducida de aminoácidos de la ADNc de la Vg del hepatopáncreas de hembras vitelogénicas obtenida por Abdu et al., (2002), demostrando con esto, que la síntesis de esta subunidad es de origen exógeno. Asimismo, se comprueba que las técnicas utilizadas en este estudio sí permitieron purificar y caracterizar las moléculas de las vitelinas.

Determinación del sitio de expresión del ARNm de la vitelogenina (Vg)

Diferentes y controversiales estudios han intentado esclarecer el sitio de síntesis de la Vg en crustáceos, y esta síntesis varía dependiendo de la especie, etapa de vitelogénesis y período de la muda (Tsutsui et al., 2000; Abdu et al., 2002; Avarre et al., 2003; Tsang et al, 2003).

La presencia del ARNm sugiere la expresión del gen precursor del vitelo, y es el criterio más confiable para detectar y cuantificar la síntesis de la Vg. Este es el primer estudio reportado en crustáceos de agua dulce, basado en dos diferentes análisis, RT-PCR y Northern blot que muestran la expresión de ARNm detectado simultáneamente en el ovario y en el hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración.

El fragmento obtenido a partir de la amplificación por PCR del ADN genómico de *Cherax quadricarinatus* fue recuperado del gel de agarosa, purificado, clonado y utilizado como sonda para hibridar con el ARN total preparado a partir de tejido de ovarios y de hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración y en hepatopáncreas de macho maduro de la misma especie.

Los resultados obtenidos en el análisis de Northern blot, indicaron la presencia de un ARNm en el ovario y en el hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria en primera maduración. Esta banda estuvo ausente en el hepatopáncreas de macho maduro.

El análisis por RT-PCR muestra la expresión del ARNm en ambos tejidos. Estos resultados son consistentes con nuestra previa investigación que demuestra una identidad inmunológica completa entre la Vg del hepatopáncreas y de la hemolinfa con las Vts del ovario y de los huevos (Serrano-Pinto et al., 2003).

La discrepancia existente entre nuestros resultados y los obtenidos por Abdu et al., (2002) trabajando con la misma especie, puede ser debida al estado de maduración de las hembras. Abdu et al., (2002) encontraron expresión de la Vg solamente en el hepatopáncreas de hembras en vitelogénesis secundaria, en tanto que en nuestra investigación, se estudiaron a hembras en diferentes estadios de maduración: hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración, hembras en vitelogénesis secundaria con desoves consecutivos y hembras ováricas, detectando expresión del ARNm que codifica a la Vg en el hepatopáncreas en las tres diferentes etapas de maduración, sin embargo, la expresión del ARNm en el ovario, se detectó solamente en hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración. Por lo que existe la posibilidad de que solamente durante esta etapa de desarrollo el ovario participe en la síntesis de la Vg, en tanto que el hepatopáncreas la va a sintetizar durante todo el ciclo vitelogénico.

Estos resultados son la primera evidencia que demuestra que no solamente el hepatopáncreas es el órgano en donde se realiza la síntesis de la Vg, también el ovario juega un papel muy importante en la producción de la

principal proteína del vitelo. Tsutsui et al., (2000) señalan que los niveles en la expresión del ARNm en el hepatopáncreas y en el ovario de *P. japonicus*, son variables en el desarrollo ovárico.

Esta no es la primera investigación que reporta la expresión del ARNm de la Vg en ambos tejidos. Tsang et al., (2003) han demostrado la expresión de la Vg en *Metapenaeus ensis* tanto en el ovario como en el hepatopáncreas. Ellos también encontraron que el ovario también contribuye significativamente en la producción de Vg a nivel transcripcional. Tsutsui et al., (2000), utilizando hibridaciones *in situ* en *Penaeus japonicus*, reportaron que el ARNm que codifica a la Vg estuvo expresado en las células foliculares del ovario y en las células parenquimales en el hepatopáncreas. Khayat et al., (1994) trabajando con *P. semisulcatus* encontraron *in vitro* una evidencia directa de la síntesis de la Vg en el ovario y en el hepatopáncreas. Posteriormente, Avarre et al., 2003 encontraron que el patrón de expresión del ARNm de la Vg de *P. semisulcatus*, está relacionado con el desarrollo ovárico y con el ciclo de muda utilizando PCR en tiempo real. En su afán de encontrar nueva información en lo referente a la relación que existe entre la Vg y la Vt, encontraron también expresión de la Vg en el ovario como en el hepatopáncreas. Chan, (2001) estudiando a *Metapenaeus ensis*, encontró que en el ovario se expresa el ARNm de la Vg. En *Macrobrachium rosenbergii*, Yang et al., (2000) encontraron mediante el análisis del Northern blot que el ARNm de la Vg está expresado en el

hepatopáncreas, sin embargo, mediante el análisis de RT-PCR, detectaron una débil señal en el ovario.

Muchas de las sondas de ADNc de la Vg utilizadas para hibridar, provienen del hepatopáncreas, por lo que la señal de hibridación con el ARNm del ovario es más débil, o en ocasiones imperceptibles, por lo que es prematuro excluir la posibilidad de que el ovario es uno de los principales lugares de síntesis de la Vg.

En este estudio, el tamaño del ARNm de la Vg obtenido del hepatopáncreas y del ovario mediante el análisis del Northern blot, fue aproximadamente de 8 kb en ambos tejidos. Estos resultados concuerdan con la estructura del ADNc de la Vg (7944 nt) de *C. quadricarinatus* reportada por Abdu et al., (2002). Tsutsui et al, (2000) encontraron mediante el análisis del Northern blot, el mismo tamaño del ARNm de la Vg en el hepatopáncreas y en el ovario en hembras vitelogénicas de *Penaeus japonicus*, indicando que la síntesis de la Vg se realiza en ambos tejidos de acuerdo con la maduración ovárica. Por su parte Avarre et al., 2003 trabajando con *P. semisulcatus*, detectaron mediante el análisis del Northern blot un transcrito de Vg de aprox. 7.8 kb tanto en el ovario como en el hepatopáncreas, estando ausente tanto en el músculo y en el corazón de hembras vitelogénicas así como en el hepatopáncreas de macho.

Las diferencias encontradas en las secuencias deducidas de aminoácidos obtenidas en este estudio, nos permite sugerir la presencia de más de un gen implicados en la síntesis de la Vg, debido a que la secuencia del ovario, no

obstante que presenta un porcentaje de identidad mayor del 50% comparada con la secuencia deducidas de aminoácidos del hepatopáncreas, no es completamente igual.

Los resultados obtenidos en este estudio, sólo se refieren a la región 3' del gen y no al gen completo, por lo que sólo podemos sugerir la presencia de más de un gen en la síntesis de la Vg en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*. No obstante esto, hay diversos estudios realizados con anterioridad en otras especies de crustáceos, que sugieren la presencia de diversos genes que codifican a la Vg. Yang et al. (2000) sugieren la presencia de múltiples genes que codifican a la Vg en *Macrobrachum rosenbergii*. Asimismo, Tsang et al. (2003) trabajando con *Metapenaeus ensis* señalan la existencia de al menos dos genes que codifican a la Vg. Sappington y Raikhel, (1998), mencionan que similarmente en varias especies de insectos, se han reportado la presencia de varios genes codificando a la Vg. Tsuitsui et al, (2000) trabajando con el peneido *P. japonicus*, estudiaron los niveles de ARNm en el hepatopáncrea y en el ovario, encontrando diferencias entre ellos a lo largo del desarrollo ovárico, por lo que asumen que la expresión del ARNm de la Vg es regulado por neuropéptidos de manera específica en cada tejido.

No obstante que en el más reciente reporte (Abdu et al., 2002) han demostrado que el hepatopáncreas es el sitio extraovárico de síntesis de la Vg, nosotros hemos mostrado fuerte evidencia que el ovario en la langosta de agua

dulce *C. quadricarinatus* también juega un importante papel en la síntesis endógena de la Vg.

CONCLUSIONES GENERALES

- La composición química de lipo-glico-proteínas permite la identificación de las vitelinas.
- Una posible fracción vitelogénica en condiciones nativas fue encontrada en la hemolinfa de hembras en vitelogénesis secundaria, con una masa molecular de 500 kDa.
- Dos formas de vitelinas (Vt_1 y Vt_2) fueron observadas en el ovario vitelogénicos y en los huevos en estadios I, III y V en condiciones nativas. En ovarios maduros, las vitelinas presentaron una masa molecular de 470 kDa (Vt_1) y 440 kDa (Vt_2).
- En huevos en estadio I, las vitelinas presentaron una masa molecular de 650 kDa (Vt_1) y 440 kDa (Vt_2).
- En huevos en estadio V, las vitelinas presentaron una masa molecular de 390 kDa (Vt_1) y 340 kDa (Vt_2).
- En el análisis del SDS-PAGE de huevos en estadio V, se observaron 4 subunidades con masas moleculares de 110, 95, 87 y 75 kDa en ambas vitelinas.
- El análisis de Western blot de huevos en estadio V, mostró 4 polipéptidos principales en cada una de las dos vitelinas.

- En el análisis del SDS-PAGE, el ovario presentó 4 subunidades con masas moleculares de 180, 120, 95 y 80 kDa en cada una de las dos vitelinas.
- En el análisis del SDS-PAGE, los huevos en estadio I y III presentaron 4 subunidades de 195, 190, 130 y 110 kDa en la Vt_1 y 2 subunidades con masas moleculares de 116, 107 kDa en la Vt_2 .
- En el análisis del SDS-PAGE, los huevos en estadio V presentaron 4 subunidades con masas moleculares de 110, 95, 87 y 75 kDa en ambas vitelinas.
- La inmunodifusión radial reveló una identidad inmunológica completa entre la vitelogenina y la vitelina presentes en los tejidos analizados (hepatopáncreas, hemolinfa, ovario, huevos y vitelina purificada) con los anticuerpos antivitelina (Ac_1 y Ac_2).
- La secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 75 kDa de la Vt_1 purificada de huevos en estadio V fue SSDTEIFHAIKADIM y forma parte de la secuencia deducida de aminoácidos de la ADNc de la Vg del hepatopáncreas de hembras vitelogénicas
- La secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad de 120 kDa de la Vt_1 purificada de ovario de hembra en vitelogénesis secundaria fue APFGGDLA.
- La señal de hibridación del ARNm que codifica a la región 3' del ADNc de la Vg obtenida por medio del análisis del Northern blot fue detectada

simultáneamente en el ovario y en el hepatopáncreas en hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración, no detectándose en hepatopáncreas de macho maduro.

- El resultado del análisis de RT-PCR muestra que el ARNm que codifica a la región 3' del ADNc de la Vg, estuvo presente simultáneamente en el hepatopáncreas y en el ovario en hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración. Las bandas presentaron aproximadamente 900 pb en ambos tejidos.
- Este mismo análisis, muestra la expresión del ARNm que codifica a la región 3' del ADNc de la Vg, en el hepatopáncreas en hembras en las tres diferentes etapas de maduración (hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración, hembras en vitelogénesis secundaria con desoves consecutivos y hembras ováricas), sin embargo, la expresión del ARNm que codifica a la región 3' del ADNc de la Vg en el ovario, solamente se presenta en hembras en vitelogénesis secundaria de primera maduración.
- Las secuencias deducidas de aminoácidos obtenidas del los ADNc del ovario y del hepatopáncreas de hembra en vitelogénesis secundaria en primera maduración, sugieren la presencia de dos genes que codifican la síntesis de la Vg.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se han identificado y caracterizado las moléculas vitelinas de ovarios y de huevos en diferentes estadios de desarrollo y la dinámica de estas moléculas a través del tiempo en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Asimismo, se han determinado los lugares de síntesis de la Vg y se sugirió la presencia de dos genes implicados en esta síntesis; sin embargo, para comprender mejor el proceso de la vitelogénesis de este organismo, se requieren realizar estudios más profundos enfocados a encontrar la relación que existe entre la Vg y la Vt con los promotores que regulan la síntesis de la Vg.

Es importante estudiar las hormonas que regulan la estimulación y la inhibición de este proceso (VIH, MIH, CHH, VSH, VSOH), debido a que el conocimiento de la regulación endocrina, permitirá seleccionar los estadios cruciales durante el ciclo de muda, en donde los organismos sean más susceptibles a la inducción hormonal, lo que permitirá manipular el proceso de la maduración de este organismo en cautiverio.

Asimismo, estudiar la fisiología de las dos Vts con el propósito específico de determinar el papel que juegan cada una de ellas en el desarrollo embrionario.

Por otro lado, se requieren realizar estudios de nutrición en las hembras vitelogénicas, en relación a los niveles de ácidos grasos y aminoácidos

esenciales que permitan generar una mayor cantidad y calidad del vitelo, para con esto, obtener huevos más resistentes y de mejor calidad.

Por otro lado, se requieren realizar estudios relacionados con las variables ambientales que permitan a las hembras vitelogénicas tener desoves continuos sin que esto vaya en decremento de la calidad de los huevos.

REFERENCIAS

- Abdu U., Yehezkel G. y Sagi A. (2000). Oocyte development and polipeptide dynamics during ovarian maturation in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invert. Reprod. Develop.* 37 (N1): 75-83.
- Abdu U., Yehezkel G., Weil S., Ziv T. y Sagi A. (2001). Is the unique negatively charged polypeptide of crayfish yolk HDL a component of crustacean vitellin? *J. Exp Zool.* (290): 218-226.
- Abdu U, Davis C, Khalaila I, Sagi A. 2002. The vitellogenin cDNA of *Cherax quadricarinatus* encodes a lipovitellin with calcium binding ability, and its expression is induced following the removal of the androgenic gland in a sexually plastic system. *Gen Comp Endocr* (127): 263-272.
- Ackefors H.1994. Recent progress in Australian crayfish culture. *World Aquaculture.* (25): 14-19.
- Adiyodi R. 1985. Reproduction and its control. *In: D.E. Bliss y L.H. Mantel (eds). The Biology of Crustacea.* Academic Press, New York. 9. pp. 147-217.
- Albanese Carmignani M.P., A. Bolognani y G. Saccone. 1973. Morphochemical study on the yolk globules in the growing oocytes of *Maja verrucosa*. *Acta Histochem.* 46 S: 195-201.
- Allen W.U. 1972. Lipid transport in the Dungeness Crab *Cancer magister* Dana. *Comp. Biochem. Physiol.* (43B): 193-207.

- Anderson D., Embriology , Bliss D. y Abele L. 1982. Embriol. Morphol. and Genetics. (1), 1-42. Academic Press. The Biology of Crustacea.
- Anson K.J. y D.B. Rouse. 1994. Effects of salinity on hatching and post-hatching survival of the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Journal of the World Aquaculture Society. 25(2): 277-280.
- Anson K.J. y D.B. Rouse. 1996. Evaluation of several commercial feeds and a crustacean reference diet for juvenil Autralian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Journal of Applied Aquaculture. (6): 65-73.
- Austin C.M. 1995. Effect of temperature and salinity on the survival and growth of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*). Freshwater Caryfish. (10): 419-426.
- Avarre J.C., Michelis R., Tietz A. y Lubzens E. 2003. The relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin cDNAs. BOR Paper in Press. Published on April 2, 2003 as DOI: 10.1095/biolreprod. 102.011627.
- Barky A., Levi T., Hulata G y Karplus I. 1997. Annual cycle of spawning and molting in the red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under laboratory conditions. Aquaculture. (157): 239-249.
- Beams H.W. y R.G. Kessel. 1963. Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origen of yolk. J. Cell. Biol. (18): 621-649.
- Biesiot B.M. y Perry H.M. 1995. Biochemical composition of the deep sea red crab

- Chaceon quinquedens* (Geryonidae): organic reserves of developing embryos and adults. *Marine Biology* (124): 407-416.
- Bonina M.T. 1974. Cytochemical observations on the vitellogenic oocytes of *Palaemon adspersus*. *Acta Histochem.* (50S): 116-123.
- Browdy C.L. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: Wyban, J. (eds). *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Soc. Baton Rouge. USA. pp. 22-51.
- Burnette W. 1981. Western Blotting. Electroforetic transfer of proteins from SDS. Polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.*, (112): 195-203.
- Carvalho F., Sousa M., Oliveira E., Carvalheiro J. y Baldaia L. 1998. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus*. *Journal of Submicroscopic Cyt. Path.* 30(4): 527-535.
- Cahu L., Severe A. y Quazaguel P. 1988. The variation of lipid content in *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* (112): 417-429.
- Ceccaldi H.J. y Martin J.L. 1969. Evolution des proteines de l'hémolymphe chez *Carcinus maenas* male et female durant le cycle d'intermue. *C.R. Soc. Biol.* 161 (11): 2362-2365.
- Chan S.M. 2001. Evidence for multiple vitellogenin genes expressions by the hepatopancreas and ovary of the shrimp *Metapenaeus ensis*. In: Fifth International Crustacean Congress. Melbourn Australia. Abstract, p.48.

- Chang C. F., Lee F. Y. y Huang Y. S. 1993. Purification and characterization of vitellin of the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. B. (105): 409-414.
- Chang C. F., Lee F. Y., Huang Y. S. y Hong T. H. 1994. Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn, *Penaeus monodon*. Invert. Reproduct. and Development. 25(3): 185-192.
- Chang C.F y Jeng S.R. 1995. Isolation and characterization of vitellin of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn *Penaeus chinensis*. Comp. Biochem. Physiol. B. (112): 257-263.
- Chang Ch. F., Jeng S.R., Lin M.N. y Tin Y.Y. 1996. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn *Penaeus chinensis*. Inv. Rep. Develop. 29 (2): 87-93.
- Chang-Hee H., Okumura T., Suzuki Y., Aida K. y Hanyu I. 1994. Immunocytochemical identification of the site of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. Fisheries Science. 60(2): 149-154.
- Charniaux Cotton H. 1978. L'ovogenese, la vitelogenine et leur controle chez le crustace amphipode *Orchestia gammarella*. Arch. Zool. Exp. Gen. (119): 365-397.

- Chen C.C. y Chen S. N. 1993. Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* (106): 141-146.
- Chen Y.N. y Kuo C. M. 1998. Purification and characterization from the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.
- Chen Y.N., Tseng D.Y., Ho P.Y. y Kuo C. M. 1999. Site of vitellogenin synthesis determined from a cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol. Reprod. Dev.* (54): 215-222.
- Clarke A., Brown J. y Holmes L. 1990. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.* (B96): 505-511.
- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., & Helling, R. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *PNAS, USA*, (70): 3240-3244
- Croissille Y. y Junera H. 1980. Recherche du lieu de synthese de la vitellogenine chez le crustace amphipode *Orchestia gammarella*. Demonstration a l'aide d'anticorps specifiques de la presence de vitellogenine dans le tissu adipeux sous epidermique des femelles en vitellognese secondaire. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 290d: 1487-1490.
- Curtis M.C. y Jones C. 1995. Overview of red crayfish, *Cherax quadricarinatus*, farming practices in northern Australia. 10 International Symposium on freshwater Crayfish, Adelaide, S.A. (Australia), 10-15, Apr 1995.

- Du-Boulay-A. J.H., Sayer-M. D.J., Holdich-D. M. 1993. Investigations into intensive culture of the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Freshwater Crayfish IX, Holdich-D. M. y Warner G.F. eds. Lafayette, LA, USA, University of South Western Louisiana. 70-78 pp.
- Eastman-Reks S.B. y Fingerman M. 1985. In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. J. Exp. Zool. (233): 111-116.
- Edgerton B.F. 1999. Diseases of the redclaw freshwater crayfish. Aquaculture Magazine. (25): 26-38.
- Fainzilber M., Browdy C.L., Tom M., Lubzens E. y Applebaum S.W. 1989. Protein synthesis in vitro in cultures of the subepidermal adipose tissue and the ovary of the shrimp *Penaeus semisulcatus*. Tissue & Cell. 21 (6) 911-916.
- Fainzilber M., Tom M., Shafir S., Applebaum S.W. y Lubzens E. 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? Biol. Bull. (183): 233-241.
- Fielder D.R., Rao K. y Fingerman M. 1971. A female-limited and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab *Uca pugilator* is revealed by disc-electrophoresis. Comp. Biochem. Physiol. (39B): 291-297.
- Frentz R. 1960. Contribution a l'etude biochimique du milieu interieur de *Carcinus maenas*. Bull Soc. Sci. Nancy. (19):1-176.
- Fyffe W.E. y O'Connor J.D. 1974. Characterization and quantification of crustacean lipovitelline. Comp. Biochem. Physiol. (47B): 851-867.

- Ganion L.R. y Kessel R.G. 1972. Intracellular synthesis, transport and packaging of proteinaceous yolk oocytes of *Orconectes immunis*. J. Cell. Biol. 52(2): 420-435.
- García-Guerrero M.U. 2002. Análisis bioquímico y morfológico del desarrollo embrionario y postembrionario del acocil *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868: Decapoda: Parastacidae). Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S., México. 62p.
- García-Guerrero M., Hendrickx M. y Villarreal C.H. 2003. Description of the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868 (Decapoda, Parastacidae), based on the staging method. Crustacean (Aceptado).
- Giorgi F., Masetti M, Igniacchiti V, Cecchettini A. y Bradley J.T. 1993. Postendocytic vitellin processing in ovarian follicles of the stick insect *Carausius morosus* (Br.) Archives of insect Biochemistry and Physiology. (24): 93-111.
- Giorgi F., Cecchettini A., Locci M.T. Masetti M. y Peccatori M. 1997. Native vitellins are modified during ovarian development in the stick insect *Carausius morosus* (Br.). Archives of insect Biochemistry and Physiology . (36): 335-348.
- Greeley M.S. Calder R. D. y Wallace R.A. 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: Correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. Comp. Biochem. Physiol. 84B (1):1-9.

- Gu H., Mather P.B., Capra M.F. 1994. Juvenile growth performance among stocks and families of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture* 134(1-2): 29-36.
- Han C.H., Okumura T., Suzuki Y., Aida K. y Hanyu I. 1994. Immunocytochemical identification of the site of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponenses*. *Fisheries Sci* (60):149-154.
- Herbert B. 1988. Infection of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) by the microsporidium *Thelohania* sp. (Microsporida: Nosematidae). *Journal of Fish Diseases*. 11(4): 301-308.
- Holdich D.M. 2002. *Biology of the freshwater crayfish*. Blackwell Sciences. Pp 702.
- Hutchings R. 1990. Backyard and small scale farming of red-claw. *Proceedings of the seminar farming the red claw fresh water crayfish*. Shelley C., Pearce MC. Eds. Northern Territory Department of Ports and Fisheries, Darwin, Australia. No.21, p. 41.
- Hutchings R.W. y Villarreal C.H. 1996. *Biología y Cultivo de la langosta de aguadulce Cherax quadricarinatus*. Manual de Producción. Navimar, S. A. 500 pp. Guayaquil, Ecuador.
- Huxley T.H. 1896. *The crayfish, an introduction to study of zoology*. New York, D. Appleton 1: 1-326.
- Jayasankar V, Tsutsui N, Jasmani S, Saido-Sakanaka H, Yang WJ, Okuno A, Hien TTT, Aida K, Wilder M. 2002. Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the

- giant freshwater prawn, *Machrobrachium rosenbergii*. J Exp Zool. (293):675-682.
- Jones C. 1988. Aquaculture potential of *Cherax quadricarinatus*: Research objectives and preliminary results. In: L. H. Evans and D. O'Sullivan (eds). Proceedings First Australian Shellfish Aquaculture Conference, 1988. Curtin University of Technology, Perth, Australia.
- Jones C. 1990. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, Queensland, Dept. of Primary Industries. Information Series Q190028, Brisbane. pp. 95-109.
- Jones C. 1995. Production of juvenile redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae) I: Development of the hatchery and nursery procedures. Aquaculture. (138): 221-238.
- Jones C. 1999. A Handbook for farmers and investors. Redclaw Crayfish. Inf-Ser-Dep-Prim-Ind Queensl Brisbane, Qld-Australia QDPI 2000 36 pp.
- Jones C. y Curtis M.C. 1994. Red claw farming. Proceedings of the redclaw farming workshops Feb. 12-17, 1994. Walkmain, Rockampton, Nambour. Queensland Department of Primary Industries. 69 pp.
- Jones J. y Ruscoe M, 2000. A review of genetic improvement in growth rate in redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) Decapoda Parastacidae. Aquaculture Research. (31): 61-67.

- Junera H., 1973. Recherches sur l'apparition de la fraction proteique femelle dans l'hémolymphe et les modalités de l'établissement de la puberté chez les femelles d'*Orchestia gammarella*. C.R. Acad. Sci. Paris. (227): 1231-1216.
- Karplus I., Zoran M., Milstein A., Sheenan H., Eran Y., Joseph D. Y Sagi A. 1998. Culture of the Australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel III. Survival in eathern ponds under ambient winter temperatures. Aquaculture. (166): 259-267.
- Kawazoe I., Jasmani S., Shih T.W., Suzuki Y. y Aida K. 2000. Purification and characterization of vitellin from the ovary of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Fisheries Science.(66): 390-396.
- Khalaila I., Weil S y Sagi A. 1999. Endocrine balance between male and female components of the reproductive system in intersex *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Prastacidea). Journal of Experimental Zoology. (283): 286-294.
- Khayat M, Lubzens E, Tietz A, Funkenstein B.1994. Cell-free synthesis of vitellin in the shrimp *Penaeus semisulcatus*. Gen Comp Endocr (93): 204-213.
- Khayat M., Yang W.J., Aida K., Nagasawa H., Tiez A., Funkenstein B. y Lubzens E. 1998. Hyperglycaemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated-ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. General Comp. Endocrinol. 110(3): 307-318.
- Kerr M.S. 1968. Protein synthesis by hemocytes of *Callinectes sapidus*. A study of in vitro incorporation of 14-C Leucine. J. Cell. Biol. 39: (72a-73a).

- Kerr M.S. 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*. II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitelline. *Dev. Biol.* (20): 1-17.
- King Ch.R. 1994. Growth and survival of red claw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture*. (122): 75-80.
- Kotha S.R. y Rouse D.B. 1997 Polyculture of red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) with Nile tilapia (*Sarotherodon niloticus*). Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, Fort Walton Beach, FL (USA). 20-24 Apr, 1997.
- Lee R.F. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. *In*: R. Gilles (ed). *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. 7: 187-207.
- Lee C.Y. y Watson R.D. 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab *Callinectes sapidus*: site and control of vitellin synthesis. *J Exp Zool* (271): 364-372.
- Lee F.Y. y Chang Ch.F. 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem Physiol.* 11 (724): 433-439.
- Lee F.Y., Shih T.W. y Chang C.F. 1997. Isolation and characterization of the female specific protein (Vitellogenin) in mature female hemolymph of the

- freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Comparison with ovarian vitellin. Gen. Comp. Endocrinol. 108(3): 406-415.
- Lee F.Y. y Chang C.F. 1999. Hepatopancreas is the likely organ of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Exp.Zool. 284(7): 798-806.
- Lubzens E., Khayat M., Ravid T., Funkennstein B. y Tietz A. 1995. Lipoproteins and lipid accumulation within the ovaries of penaeid shrimp. Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh. 47(3-4): 185-195.
- Lubzens E., Ravid T., Khayat M., Daube N. y Tietz A. 1997. Isolation and characterization of the high-density lipovitellins from the hemolymph and ovary of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* J. Exp. Zool. (278): 339-348.
- Lui C.W., Sage B.A. y O'Connor J.D. 1974. Biosynthesis of lipovitellin, by the crustacean ovary. J. Exp. Zool. (188): 289-296.
- Lui C.W. y O'Connor J.D. 1976. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. Characterization of and in vitro incorporation of amino acids into the purified subunits. J. Exp. Zool. (195): 41-52.
- Lui C.W. y O'Connor J.D. 1977. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. The incorporation of labeled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *Pachygrapsus crassipes*. J. Exp. Zool. (199): 105-108.
- Marzari R., Mosco A y Ferrero E. 1993. Different immunoelectrophoretic forms of yolk proteins marking different stages of the maturity cycle in female *Squilla mantis* (Stomatopoda). Journal of Crustacean Biology, 13(1), 17-24.

- Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C.V. y Hara A. 1999. Two forms of vitellogenin, yield two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Experimental Biology*. (213): 18-32.
- Meade M. y Watts S. 1997. Patterns of growth in juvenile Australian crayfish, *Cherax quadricarinatus*, during nutrient deprivation and recovery. *Freshwater Crayfish*. 11 A. *Journal of Astacology*, International Association of Astacology. Pp. 403-416.
- Medina A., Vila Y., Mourente G. y Rodríguez A. 1996. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775). *Aquaculture* (148): 63-75.
- Medley P. B., Jones C.M. y Avault J.W. 1994. A global perspective of the culture of Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*: production, economics and marketing. *World Aquaculture*. 25(4): 6-19.
- Meusy J.J., Junera H., Cledon P. y Martin M. 1983. La vitellognine chez un crustace decapode natantia *Palaemon serratus*. Mise en evidence, comparaison immunologique avec les vitellines, site de synthese et role des pedoncules oculaires. *Reprod. Nutri. Develop.* (23): 625-640.
- Munn E.A. 1963. The value and the metabolism of carbohydrates and lipids of *Carcinus maenas*. Ph. D. The Univ. Southampton.
- Naranjo J. 1999. Efecto de la densidad de siembra durante las fases de precría y la engorda monosexual de *Cherax quadricarinatus* en istemas de producción

- comercial. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigaciones de Graduados del Mar, Instituto Tecnológico del Mar, México 90p.
- Ouchterlony O. 1948. Antigen antibody reactions in gels. *Arkiv Kemi. Mineral Geol.* 26B: 14.
- Okuno. A, Yang W.J., Jayasankar V., Saido-Sakanaka H., Huong D.T.T., Jasmani S., Atmomarsono M., Subramoniam T., Tsutsui N., Ohira T., Kawasoe I., Aida K., Guilder M. 2002. Deduced primary structure of vitellogenin in the giant freshwater prawn, *Machrobrachium rosenbergii*, and yolk processing during ovarian maturation. *J Exp Zool.* (292): 417-429.
- Palacios E., Ibarra A., Ramírez J., Portillo G. y Racotta I. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii on white pacific shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) in relation to the physiological condition of spawners in the commercial hatchery. *Aquaculture Research.* (29): 183-189.
- Paulus J.E. y Laufer J. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata*. *Intern. J. Invertebr. Rep. Develop.* (11): 29-44.
- Picaud J. L. y Besse G. 1973. Les protéines de l'hémolymphe et de l'ovaire de *Porcellio dilatatus*, leurs variations en fonction de la vitellogenese. *C.E. Acad. Sci. Paris.* (276d): 2207.
- Picaud J. L y Souty. 1981. La synthèse de la vitelogenine par le tissu adipeux au cours de la vitellogenese chez un crustace isopode marin *Idotea balthica basteri*. *Oceanis* 7(6): 755-762.

- Pinto F. y Rouse D. 1992. Growth and survival of the Australian red claw crayfish in earthen ponds at the three densities. Aquaculture'92. Orlando, FL (USA), 21-25 May 187p.
- Quackenbush L.S. 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp. *In*: Deloach P.F., Dongherty W.J., Davidson M.A. (eds). Frontiers in Shrimp Research. Elsevier, Amsterdam. Pp. 125-140.
- Quinitio E.T., Hara A., Yamauchi K. y Fuji A. 1990. Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. Invert. Reprod. Dev. (17): 221-227.
- Rankin S.M., Bradfield J.Y. y Keeley L.L. 1989. Ovarian protein synthesis in the South American white shrimp, *Penaeus vannamei*, during the reproductive cycle. Int. J. Invert. Reprod. Develop. (15): 27-33.
- Romero X. y Jiménez R. 1997. Epistylis sp. (Ciliata:Peritrichida) infestation on the eggs of berried red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* females in Ecuador. Journal of the World Aquaculture Society. (28): 432-435.
- Rouse D.B., Austin C.M. y Medley P.B. 1991. Progress towards profits? Information on the Australian crayfish. Aquaculture. (17): 46-56.
- Rouse D.B. y Yeh H.S. 1995. Factors influencing spawning of *Cherax quadricarinatus* in indoor hatcheries. Freshwater Crayfish. (10): 605-610.
- Rouse D. y Kahn B. 1998. Production of Australian redclaw *Cherax quadricarinatus* in polyculture with Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of the World Aquaculture Society. 29(3): 340-344.

- Roustaian P. y Kamarudin M. 2001. Biochemical changes in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) during larval development. Journal of the World Aquaculture Society. (31): 53-59.
- Sagi A., Soroka Y., Snir E., Chomsky O., Calderon J. y Milner Y. 1995. Ovarian protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Does ovarian vitellin synthesis exist?. Invertebrate Reproduction and Development. 27(1): 41-47.
- Sagi A., Khalaila I., Barki A., Hulata G. y Karplus I. 1996. Intersex red claw crayfish, Salame y Rouse (2000) (von Martens): functional males with pre-vitellogenin ovaries. Biol. Bull. (190): 16-23.
- Sagi A., Shoukrun R., Khalaila I. y Rise M. 1996. Gonad maturation, morphological and physiological changes during the first reproductive cycle of the crayfish *Cherax quadricarinatus* female. Invertebrate Reproduction and Development. 29(3): 235-242.
- Sagi A., Shoukrun R., Levy T., Barki A., Hulata G. y Karplus I. 1997. Reproduction and molt in previously spawned redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* females following eyestalk ablation during the winter reproductive-arrest period. Aquaculture, (156): 101-11.
- Sagi A., Khalaila I., Abdu U., Shoukrum R. y Weil S. 1999. A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenin specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gen. Comp. Endocrinol. (115): 37-45.

- Salame M. y Rouse D. 2000. Forage-based feeding in commercial red claw ponds in Ecuador. *Journal of Applied Aquaculture*. 10(3): 83-89.
- Sammy N. 1988. Breeding biology of *Cherax quadricarinatus* in the Northern Territory. Pp. 79-88 *In*: L.H. Evans y D. O'Sullivan (eds). Proceedings of the first Australian Shellfish Aquaculture Conference, Perth, 1988. Curtin University of Technology, Perth, Western Australia.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sandeman R. y Sandeman D. 1991. Stages in the development of the embryo of the fresh water crayfish *Cherax destructor*. *Roux Archives of Development Biology*. (200): 27-37.
- Sappington T.W. y Raikhel A.S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptor. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* (28): 277-300.
- Serrano-Pinto V., Vázquez-Boucard C. y Villarreal-Colmenares H. 2003. Characterization of yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Journal. Part A*, (134): 33-43.
- Shafir S., Tom M., Ovadia M. y Lubzens E. 1992. Protein, vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biol. Bull.* (183): 394-400.

- Soroka Y., Milner Y., Sagi A. 2000. The hepatopancreas as a site of yolk protein synthesis in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebr Reprod Dev* 37(1): 61-68.
- Tom M., Goren M. y Ovadia M. 1987. Localization of the vitellin and its possible precursors in varios organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Int. J. Invert. Reprod. Develop.* (12):1-12.
- Tom M., Fingerman M., Hayes T.K., Johnson V., Kerner B. y Lubzen E. 1992. A comparative study of the ovarian proteins from two penaeid shrimps, *Penaeus semisulcatus* de Hann and *Penaeus vannamei* (Boone). *Comp. Biochem. Physiol. B.* (102): 483-490.
- Thomas D.L., Meade M.E., Watts S.A. 1993. Polyculture of pulmonate gastropod *Physella cubensis* and the Australian crayfish *Cherax quadricarinatus* in a closed, indoor recirculating system. 70 Annu. Meeting of the Alabama Academy of Sciences, Huntsville, AL (USA), 24-27.
- Tsang W.S, Quackenbush S., Chow B.K.C., Tiu S.H.K., He J.G., Chan S.M. 2003. Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of múltiple genes and tissue specific expresión by the ovary and hepatopancreas. *Gene.* (300): 99-109.
- Tseng D.Y., Cheng Y.N., Kuo G.H., Lo C.F., Kuo C.M. 2001. Hepatopancreas is the extraovarian site of the vitellogenin synthesis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Phys. A.* (129): 909-917.

- Tsutsui N., Kawasoe I., Ohira T., Jasmani S., Yang W.J., Wilder M., Aida K. 2000. Molecular characterization of the cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Zool. Sci. (17): 651-660.
- Vázquez-Boucard C.G., Ceccaldi H.J., Benyamin Y. y Rousteau C. 1986. Identification, purification et caractérisation de la lipovitelline chez un crustacé décapode natantia *Penaeus japonicus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 97: 37-50.
- Vázquez-Boucard C.G. 1990. Etude de la reproduction chez les crevettes pénéides. Nature et devenir de la masse vitelline. Aspects fondamentaux et appliqués. Theses sciences. Université de Caen. Francia. 171 pp.
- Vázquez Boucard C.G., Levy P., Ceccaldi H.J. y Brogen C.H. 2002. Development changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. (281): 63-75.
- Villarreal H. y Peláez A. 1999. Biología y cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda Parastacidae). 1 (Manual), 1-150p. Publicación especial del CIBNOR y Acuacultivos Santo Domingo.
- Wolin E.M., Laufer H. y Albertini D. 1973. Uptake of the yolk protein, lipovitelline by developing crustacean oocytes. Develop. Biol. (35): 160-170.
- Yang W.J., Ohira T., Tsutsui N., Subramoniam T., Huong D.T.T., Aida K., Wilder M. 2000. Determination of the amino acid sequence and site of

- mRNA expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J Exp Zool (287):413-422.
- Yano I. y Chinzei Y. 1987. Effect of 17-hydroxyprogesterone on vitellogenine secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Bull. Nat. Res. Ins. Aquac. (10): 9-14.
- Yano I., Tsukimura B., Sweeney J.N. y Wyban J.A. 1988. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. J. World Aquaculture Society. (19): 204-209.
- Yano I. y Chinzei Y. 1992. Effect of thoracic ganglion on vitellogenin secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture. (61): 49-57.
- Yeh H.S. y Rouse D.B. 1994. Effects of water temperature, density, and sex ratio on the spawning rate of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Journal of the World Aquaculture Society. 26(2): 160-164.
- Yeh H.S. y Rouse D.B. 1995. Indoor spawning and egg development of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Journal of the World Aquaculture Society. 25(2): 297-302.
- Yehezkel G., Chayorth R., Abdu U., Khalaila I. y Sagi A. (2000). High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Vol. 127 (3): 411-421.
- Zimmermann S. y Fielder D.R. 1994. Studies on androgenic gland ablation in the Australian redclaw (*Cherax quadricarinatus*), taking as a model the freshwater

prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Proceedings of the 4th Rio Grande Meeting Aquaculture Experts. Zimmermann S., ed. pp. 1-5.

ANEXO I**Análisis Bioquímico****Condiciones Nativas**

Gel de poliacrilamida 6%

Gel de poliacrilamida 3.5%

Acrilamida	2.0 ml
ml	

Acrilamida	0.60
------------	------

Amortiguador pH 8.8	2.5 ml
---------------------	--------

Amortiguador pH 8.8	-
---------------------	---

PSA	100 μ l
-----	-------------

PSA	50 μ l
-----	------------

TEMED	20 μ l
-------	------------

TEMED	10 μ l
-------	------------

Amortiguador pH 6.8	-
---------------------	---

Amortiguador pH 6.8	1.25 μ l
---------------------	--------------

SDS	100 μ l
-----	-------------

SDS	50 μ l
-----	------------

Agua destilada	5.3 ml
----------------	--------

Agua destilada	3.0 ml
----------------	--------

Condiciones Desnaturalizantes

Gel de poliacrilamida 7.5%

Gel de poliacrilamida 3.5%

Acrilamida	2.33 ml
ml	

Acrilamida	0.60
------------	------

Amortiguador pH 8.8	1.46 ml	Amortiguador pH 8.8	-
PSA	94 μ l	PSA	50 μ l
TEMED	94 μ l	TEMED	10 μ l
Amortiguador pH 6.8	-	Amortiguador pH 6.8	1.25 μ l
SDS	94 μ l	SDS	50 μ l
Agua destilada	5.45 ml	Agua destilada	3.0 ml

Acrilamida (100 ml)

Acrilamida 30%

Bisacrilamida 0.8%

Filtrar en papel Whatman #1

Almacenar a 4°C en botella ambar

Azul de Coomassie

0.25 % Azul de Coomasie R-250

Metano 45%

Ác. acético 10%

Agua destilada 45%

Azul de Bromofenol

Azul de Bromofenol 0.25%

Glicerol 40 ml

Agua destilada 60ml

Negro de Sudán

- 500 mg de negro de Sudán se disuelven en 20 ml de acetona durante una hora,
- Se agrega una mezcla de 100 ml de agua y 15 ml de Ác, acético
- Se agita una hora a temperatura ambiente
- Se centrifuga 2 veces a 3,000 rpm/20 min c/u.

Reactivo de Shiff

- Fijar el gel en 7.5% de Ác. acético, por 1 hora a temperatura ambiente
- Aforar a 100 ml con agua destilada
- Incubar en 0.2% de Ác. periódico a 4°C durante 45 min
- Poner el gel en el reactivo de Shiff sin enjuagar
- Refrigerar durante 45 min
- Desteñir el gel a temperatura ambiente de 2 a 3 cambios en 10% de Ác. acético
y afora a 100 ml
- Empaquetar en Ác. acético.

ANEXO II**Análisis Molecular****Amortiguador TAE 50x (1L)**

Tris base	242g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA, 0.5M, pH 8.0	100 ml

Azul de Bromofenol (10 ml)

Azul de Bromofenol	4 mg
Glicerol	5.4 ml
EDTA 0.5M, pH 8.0	2 ml
TAE 50X	200 µl
SDS 10%	200 µl
Agua destilada	1.4ml

Medio LB líquido (1L)

Bacto-triptone	10g
Bacto yeast extract	5g
NaCl	10g
pH	7.5

Esterilizar

Medio LB-agarosa

A la preparación del medio LB líquido (250 ml) añadir 3.75g de LB BactoAgar

Esterilizar

Agitar las muestras bien

A 55°C adicionar el antibiótico (si es necesario)

Vetir el gel en cajas petri

Conservar las cajas a 4°C

Northern blot

Solución desnaturalizante: 1.5 M NaCl, 0.5 NaOH.

Solución de prehibridación: 50% Formamida, SSC 5x, Denhardt 5x, SDS 1%, 100 µg/ml de DNA de esperma de timo de ternero (desnaturalizada 10 min antes y puesta en hielo por 10 min).

Solución hibridadora (Sonda): A la mitad de la solución prehibridadora se le adiciona la sonda y se mezcla).

Solución Denhardt: 50x; Ficoll 1%, PVP (Polivinil pirrolidona) 1%, BSA (Albumina serosa bovina) 1%. Amortiguador SSC 20x: NaCl 3M, Citrato de Na 0.3M, pH 7.0.