



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**METABOLISMO DE LA QUITINA DEL CAMARÓN  
BLANCO *Penaeus vannamei*: ARNm DE QUITÍN  
SINTASA Y QUITINASA CUTICULARES, DURANTE  
EL CICLO DE MUDA**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

p r e s e n t a

**Jorge Gustavo Rocha Estrada**

La Paz, B.C.S. Noviembre de 2008

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 17 del Mes de Noviembre del 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### **"Metabolismo de la quitina del camarón blanco *Penaeus vannamei*: ARNm de quitín sintasa y quitinasa cuticulares, durante el ciclo de muda"**

Presentada por el alumno:

**Jorge Gustavo Rocha Estrada**

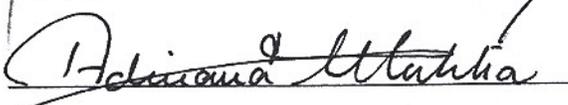
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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.

LA COMISION REVISORA

  
Dr. Julio H. Córdova Murueta  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. Fernando L. García Carreño  
CO-TUTOR

  
Dra. Adriana Muhlia Almazán  
CO-TUTOR

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

### **Comité tutorial**

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta (CIBNOR)

Dr. Fernando Luis García Carreño (CIBNOR)

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán (CIAD)

### **Comité revisor de la tesis**

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta (CIBNOR)

Dr. Fernando Luis García Carreño (CIBNOR)

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán (CIAD)

### **Jurado del examen de grado**

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta (CIBNOR)

Dr. Fernando Luis García Carreño (CIBNOR)

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán (CIAD)

Suplente: Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara (CIBNOR)

## Resumen

Para crecer, los crustáceos deben deshacerse del exoesqueleto y generar uno nuevo adaptado a la nueva dimensión del organismo. La quitina es un importante componente estructural del exoesqueleto, por lo tanto el estudio de su síntesis e hidrólisis necesario para el entendimiento del crecimiento de los crustáceos. Se identificaron los ARN mensajeros (ARNm) de las enzimas quitín sintasa (*LvChS*) y de tres isoenzimas de quitinasa (*LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3*) en el integumento y la glándula digestiva del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Se definió la función de cada uno de los transcritos, así como el papel de *LvChS* y *LvChi2* en el ciclo de muda. *LvChS* está encargada de la síntesis de la quitina tanto del exoesqueleto como de la membrana peritrófica del camarón. *LvChi1* y *LvChi3* están codificados exclusivamente en la glándula digestiva, con una posible función en la digestión de quitina del alimento; *LvChi2* se encontró en todos los tejidos que están en contacto con quitina, y parece estar encargada de la hidrólisis de la quitina del exoesqueleto y membrana peritrófica. La cuantificación de los transcritos de quitín sintasa y quitinasa cuticulares en urópodos de camarón, por RT-PCR en tiempo real, mostraron que durante el ciclo de muda, la expresión de *LvChS* parece ser inducida en los estadios de post-muda, cuando los organismos sintetizan el nuevo exoesqueleto; la concentración del transcrito *LvChi2* aumenta en la pre-muda temprana, indicando la necesidad de hidrolizar parcialmente la quitina del exoesqueleto que se va a desechar. Se han publicado secuencias parciales de ADN complementario (ADNc) de *LvChS* (340 pb) y *LvChi2* (1219 pb). Los números de acceso en Genbank para estas secuencias son FJ229468 y EU861222, respectivamente.

Palabras clave: *Penaeus vannamei*; quitín sintasa, quitinasa.

## **Abstract**

The study of chitin synthesis and hydrolysis in crustaceans is an issue for understanding the growing process of these organisms, as chitin is a major component of exoskeleton which has to be discarded during the growing process. We identified mRNAs encoding for a Chitin Synthase (*LvChS*) and three Chitinase isoenzymes (*LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3*) from the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. The function of the enzymes codified by these mRNAs was investigated, and the role of *LvChS* and *LvChi2*, was studied during the molt cycle. *LvChS* synthesizes chitin for exoskeleton and peritrophic membrane. *LvChi1* and *LvChi3* mRNAs are synthesized only in the digestive gland of the whiteleg shrimp, and they are more likely to be involved in digestion of food chitin. *LvChi2* was found in all tissues synthesizing chitin, and seems to be involved in the hydrolysis of chitin from exoskeleton and peritrophic membrane. In the integument, *LvChS* and *LvChi2* present a temporal exclusive pattern of abundance, according with the necessity of synthesizing or degrading exoskeleton chitin, as shown by real-time-RT-PCR analysis. Partial sequences of *LvChS* (340 bp) and *LvChi2* (1219 bp) cDNA have been published (Genbank accession No. FJ229468 and EU861222, respectively).

Keywords: *Penaeus vannamei*; Chitin Synthase, Chitinase.

## **Dedicatoria**

A Dios, por permitirme continuar mis estudios profesionales.

A mis padres, que me siguen apoyando a lo largo de mi carrera.

A quienes por su presencia, facilitaron el desarrollo de este proyecto.

## **Agradecimientos**

A CONACYT por la beca número 206327, otorgada durante el desarrollo del trabajo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto 45964 de CONACYT.

### **Al comité tutorial de tesis:**

Dr. Julio H. Córdova Murueta.

Dr. Fernando García Carreño.

Dra. Adriana Muhlia Almazán.

### **A las personas que estuvieron involucradas directamente con los resultados experimentales y crecimiento académico logrados en este trabajo:**

M. C. Alma B. Peregrino Uriarte.

Dra. Gloria Yépiz Plascencia.

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro.

Dra. Carmen Contreras Vergara.

### **A las personas que contribuyeron directa o indirectamente con el trabajo:**

Técnico María de los Ángeles Navarrete (Ann), por su apoyo y asesorías.

Dra. Patricia Hernández Cortés, por su disponibilidad, consejos y buena vibra.

M. C. Elmo Pérez Hernández, por su ayuda durante el muestreo de camarones.

Amigos y compañeros del laboratorio de Bioquímica, en el CIBNOR, laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, en el CIAD y de generación de la Maestría, en el CIBNOR.

Personal de Posgrado del CIBNOR.

Academia de Biotecnología, por sus críticas y sugerencias para mejorar el trabajo.

Personal técnico del laboratorio de Biología Molecular, en el CIBNOR.

B. M. Patricia Vázquez Correa, técnico del laboratorio de Microbiología Ambiental.

## Contenido

<b>Introducción</b> .....	1
<b>Marco teórico</b> .....	3
El camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> como modelo de estudio en investigaciones de fisiología .....	3
Muda y crecimiento de los crustáceos .....	5
Estadios de muda .....	7
Crecimiento .....	10
Control endocrino de la muda .....	12
Exoesqueleto e integumento de los crustáceos .....	14
Quitina .....	15
Enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de la quitina .....	18
Quitín Sintasa .....	19
Quitinasa .....	22
<b>Antecedentes</b> .....	25
<b>Hipótesis</b> .....	32
<b>Objetivos</b> .....	33
Objetivo general .....	33
Objetivos específicos .....	33
<b>Materiales y Métodos</b> .....	34
Organismos y obtención de las muestras .....	34
Preparación de las muestras .....	34
Amplificación de <i>LvChS</i> , <i>LvChi1</i> , <i>LvChi2</i> y <i>LvChi3</i> .....	35
Función Biológica de <i>LvChS</i> , <i>LvChi1</i> , <i>LvChi2</i> y <i>LvChi3</i> .....	37
Cuantificación de los transcritos de <i>LvChS</i> y <i>LvChi2</i> en el ciclo de muda .....	38
Obtención y Análisis de la secuencia del ARNm de <i>LvChS</i> y <i>LvChi2</i> .....	39
Análisis estadístico de los datos .....	40
<b>Resultados</b> .....	41
Amplificación e identificación de <i>LvChS</i> , <i>LvChi1</i> , <i>LvChi2</i> y <i>LvChi3</i> .....	41
Presencia tejido-específica de <i>LvChS</i> , <i>LvChi1</i> , <i>LvChi2</i> y <i>LvChi3</i> .....	45
ARNm de <i>LvChS</i> y <i>LvChi2</i> durante el ciclo de muda .....	47
Secuencia del ARNm de <i>LvChS</i> y <i>LvChi2</i> .....	51
<b>Discusión</b> .....	54
Función biológica de <i>LvChS</i> , <i>LvChi1</i> , <i>LvChi2</i> y <i>LvChi3</i> .....	56
Quitín Sintasa .....	56
Quitinasas .....	58
<i>LvChS</i> y <i>LvChi2</i> durante el ciclo de muda .....	61
Secuencia del ARNm de <i>LvChS</i> y <i>LvChi2</i> .....	67
<i>LvChS</i> .....	67
<i>LvChi2</i> .....	68
<b>Conclusiones</b> .....	70
<b>Literatura citada</b> .....	71

## Lista de figuras

Figura 1. Anatomía general del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> .....	5
Figura 2. Identificación de los estadios de muda en crustáceos por observación del desarrollo setal y epidermis .....	9
Figura 3. Estructura molecular de la MH, 20-hidroxicdisona.....	13
Figura 4. Unidad estructural de la quitina.....	17
Figura 5. Estructura molecular de UDP-N-Acetilglucosamina, sustrato de la enzima quitín sintasa.....	19
Figura 6. Unidad catalítica de la quitín sintasa.....	20
Figura 7. Especificidad de las enzimas quitinolíticas.....	23
Figura 8. Actividad de A) quitinasas y B) N-acetil-glucosaminidasas en el integumento del krill del atlántico <i>Euphausia superba</i> durante el ciclo de muda.....	27
Figura 9. Análisis por RT-PCR del ARNm de la quitinasa de <i>Penaeus monodon</i> ( <i>PmChi1</i> ), a lo largo del ciclo de muda, comparado con el ARNm de otras proteínas en la glándula digestiva.....	29
Figura 10. Análisis por RT-PCR del ARNm de quitín sintasa ( <i>SfCHSB</i> ), quitinasa ( <i>SfCHI</i> ) y un gen constitutivo ( <i>RpS6</i> ), en los estadios de larva 3 (L3) y 5 (L5), indeterminados (W), pre-pupa (PP) y pupa (P) del gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	30
Figura 11. Geles de agarosa (1%) mostrando bandas de <i>LvChi1</i> (254 pb), <i>LvChi3</i> (178 pb), <i>LvChi2</i> (536 pb) y <i>LvChS</i> (340 pb).....	42
Figura 12. Comparación entre las secuencias de <i>LvChS</i> , <i>SeChSA</i> y <i>EoCS1b</i> .....	44
Figura 13. Comparación entre las secuencias de <i>LvChi1</i> , <i>PmChi1</i> , <i>FcChi1</i> y <i>MpChi1</i> .....	44
Figura 14. Comparación entre las secuencias de <i>LvChi2</i> , <i>MjChi2</i> y <i>TcChi10</i> .....	45
Figura 15. Comparación entre las secuencias de <i>LvChi3</i> , <i>FcChi3</i> y <i>MjChi3</i> .....	45
Figura 16. Análisis cualitativo de la presencia de los transcritos de <i>L8</i> , <i>LvChS</i> , <i>LvChi1</i> , <i>LvChi2</i> y <i>LvChi3</i> en pleópodos, urópodos, branquias, tallo ocular, glándula digestiva, músculo, hemocitos, tubo digestivo y sistema nervioso del camarón blanco. Gel de agarosa al 1%.....	47
Figura 17. Curva de disociación de los productos generados por PCR para su cuantificación.....	49
Figura 18. Cantidad del transcrito <i>L8</i> , a lo largo del ciclo de muda, en los urópodos del camarón blanco.....	50
Figura 19. Medianas de la cuantificación de <i>LvChS</i> (—△—) y <i>LvChi2</i> (—■—), normalizada contra la cantidad del transcrito <i>L8</i> , y la abundancia en el estadio C, en urópodos de camarón blanco <i>P. vannamei</i> .....	50
Figura 20. Secuencia parcial de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la quitín sintasa del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> ( <i>LvChS</i> ).....	52
Figura 21. Secuencia parcial de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoenzima 2 de la quitinasa del camarón blanco <i>P. vannamei</i> ( <i>LvChi2</i> ).....	54
Figura 22. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de las isoenzimas de quitinasas de camarón blanco <i>P. vannamei</i> .....	55

## **Lista de tablas**

Tabla I. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación por PCR de fragmentos de transcritos utilizados en este estudio.....	37
---	----

## **Introducción**

Los crustáceos crecen discontinuamente debido a que sus cuerpos se encuentran limitados por un exoesqueleto rígido, el cual deben desechar, para posteriormente crecer y generar uno nuevo. Este acontecimiento, llamado muda, se repite de forma cíclica a lo largo de su vida e implica una serie de fenómenos que incluyen una compleja cascada de señales hormonales, cambios en la síntesis de diversos ARN mensajeros (ARNm), en la actividad de diferentes enzimas, cambios en la cantidad de reservas energéticas como proteínas, lípidos y carbohidratos en hemolinfa y también cambios en la conducta de los organismos (Mikami, 2005). Debido a esto, la muda es un proceso endógeno importante en el desarrollo de cualquier organismo que la lleva a cabo a lo largo de su ciclo de vida y de gran interés para estudios de fisiología comparada.

La quitina es un homopolímero de N-Acetilglucosamina (NAc-Glc), que forma parte estructural del exoesqueleto de los artrópodos interactuando con algunas proteínas estructurales y sales de calcio (Roer y Dillaman, 1984). Estos componentes se encuentran esclerotizados para conferir las características mecánicas del exoesqueleto. Cuando los organismos requieren desechar el exoesqueleto y sintetizar uno nuevo, necesitan de enzimas que lleven a cabo la hidrólisis y síntesis de los componentes, entre ellos la quitina. La quitín sintasa (ChS) (E.C. 2.4.1.16, UDP-N-acetil-D-glucosamina: quitina 4-β-N-acetilglucosaminil transferasa) es la enzima encargada de transferir NAc-Glc a las cadenas crecientes de quitina (Merzendorfer, 2006). En los crustáceos, el conocimiento acerca de

esta enzima y su funcionamiento a lo largo del ciclo de muda es nulo; sin embargo, la información generada en diversas especies de insectos acerca de esta enzima permite sustentar un estudio en el camarón blanco. La quitinasa (Chi) (E.C. 3.2.1.14, poli [1,4-(N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina)] glicanohidrolasa), es la enzima encargada de hidrolizar a las cadenas de quitina en regiones intermedias produciendo oligómeros de NAc-Glc (Horn *et al.*, 2006). Se ha caracterizado el ARNm de algunas isoenzimas de quitinasa en diferentes especies de crustáceos, a partir de secuencias de ADNc, las cuales cumplen diferentes funciones dentro de los organismos (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe y Kono, 1997; Watanabe *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2000). También se han descrito las variaciones de la actividad quitinolítica y presencia de ARNm de quitinasas en especies de camarones y krill a lo largo del ciclo de muda (Buchholz, 1989; Spindler-Barth *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 2000). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios en los que se detalle una coordinación de estas dos enzimas (ChS y Chi) con función fisiológica opuesta.

En este trabajo se propone estudiar la función de las quitinasas y quitín sintasas, a partir de la identificación y cuantificación de ARNm de ChS y Chi expresados en el integumento del camarón blanco *P. vannamei*, para ampliar el conocimiento acerca de las funciones específicas de las enzimas ChS y Chi, así como de la coordinación de la síntesis de ambas enzimas, la fisiología de la muda y el crecimiento de los crustáceos.

## **Marco teórico**

### *El camarón blanco *Penaeus vannamei* como modelo de estudio en investigaciones de fisiología*

Todo fenómeno fisiológico puede ser explicado a través del estudio de organismos que son modelos ideales para el análisis de dicho fenómeno problema. Los crustáceos no son la excepción ya que comúnmente sirven como modelo para explicar fenómenos biológicos como osmorregulación, depresión metabólica, entre otros (Truchot, 1993). Sin embargo, además de ser un modelo de estudio útil, la fisiología de los crustáceos es digna de estudio *per se*, debido a que llevan a cabo procesos complejos que se traslapan y se afectan unos a otros. Estos procesos endógenos del camarón incluyen cambios muy importantes a lo largo del ciclo de vida del organismo a diferentes niveles como son los cambios ontogenéticos, los relacionados con el ciclo de muda (cíclicos durante el periodo de crecimiento), o el ciclo reproductivo (Chang *et al.*, 2001).

El ciclo de la muda, uno de los procesos más estudiados en los crustáceos, ocurre en un grupo zoológico muy bien caracterizado que tiene la particularidad de que el cuerpo está limitado por una cutícula calcificada e inextensible (Truchot, 1993). Los fenómenos que se llevan a cabo para que ocurra la muda, abarcan desde las señales endocrinas, que modifican

la presencia de ARNm y la actividad de algunas enzimas, provocando cambios morfológicos y hasta de comportamiento (Kuballa y Elizur, 2007).

El sujeto de estudio de este trabajo, el camarón blanco *Penaeus vannamei* (Figura 1), es de gran importancia económica en México por ser la especie más producida por la industria acuícola (Juárez, 2008). Debido a esto, muchos de los trabajos disponibles sobre aspectos biológicos o fisiológicos del camarón blanco *P. vannamei* abordan la problemática de producción en acuicultura y miden parámetros como crecimiento y mortalidad, o en algunos casos evalúan la actividad de enzimas digestivas, utilizando variables exógenas como los componentes de los alimentos o la salinidad del agua (Atwood *et al.*, 2003; Gamboa-Delgado *et al.*, 2003; Amaya *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Wang, 2007; Hernández *et al.*, 2008). Generalmente, estos trabajos son poco reproducibles a escala mayor y no resuelven ningún problema científico al no explicar las relaciones causa efecto de los fenómenos fisiológicos que llevan a los resultados observados. Sin embargo, algunos de los estudios en los que se utilizan crustáceos como organismos modelo, sí abordan temas de fisiología, enzimología, ecotoxicología (Sowers *et al.*, 2004), endocrinología (Devaraj y Natarajan, 2006), metabolismo (Rosas *et al.*, 2000) e inmunología (Robalino *et al.*, 2006), observando el efecto que tienen algunos estímulos exógenos como la concentración de oxígeno en el agua (Burgents *et al.*, 2005), la producción de dióxido de carbono, la exposición a agentes químicos, o fenómenos fisiológicos endógenos como el ciclo de muda (Chan *et al.*, 1988), sobre variables de respuesta como la actividad de algunas enzimas (Buchholz, 1989), la abundancia del ARN mensajero (Sánchez-Paz *et al.*, 2007), etc. En

este tipo de estudios se puede comprobar que el camarón es un modelo de estudio con ventajas para obtener conocimiento que se puede extrapolar a otras especies.

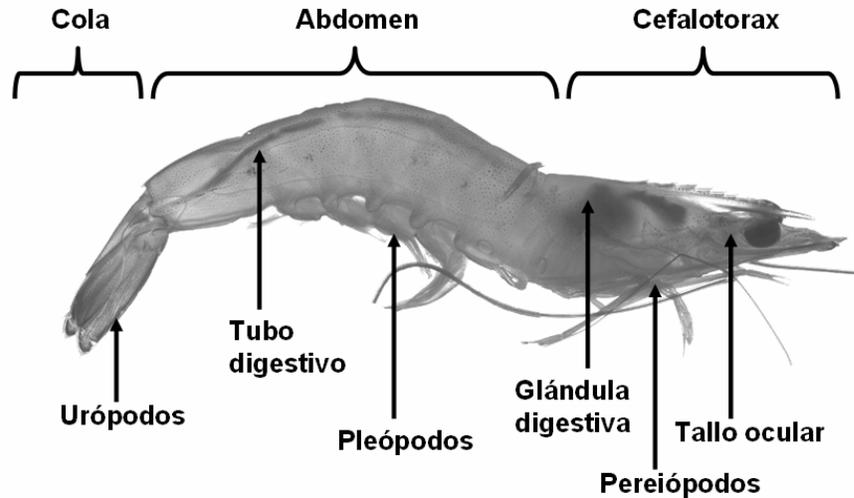


Figura 1. Anatomía general del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

#### *Muda y crecimiento de los crustáceos*

La muda, un fenómeno que consiste en la pérdida de la cutícula y la regeneración de una nueva, ocurre en todos los artrópodos, incluyendo a los crustáceos. Este fenómeno es un proceso cíclico y se divide en cinco estadios (A-E) y varios sub-estadios (Drach, 1939; Smith y Dall, 1985). Para los crustáceos, la muda es esencial en el desarrollo post-larval y un organismo saludable repite varias veces el ciclo de muda para lograr crecer (Promwikorn *et al.*, 2004b); además es útil para otras funciones como la reparación de órganos dañados y la remoción de metabolitos y metales contaminantes (McLay, 1985; Bergey y Weis, 2007). La muda va acompañada de dramáticos cambios bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento (Mikami, 2005), los cuales están regulados

hormonalmente, e incluyen cambios en la concentración de algunos ARNm, actividad mitótica y muerte celular. (Kuballa y Elizur, 2007).

En 2007, Kuballa *et al.* localizaron 21 ARNm regulados positiva o negativamente en la cutícula del cangrejo nadador del pacífico *Portunus pelagicus*, durante el ciclo de muda. Aunque la mayoría de los ARNm no fueron identificados, dichos transcritos contienen sitios de unión a quitina (CBD; Chitin binding domain) y dominios de Cutícula 1, encontrando similitud con algunas proteínas estructurales de otros crustáceos. Chan *et al.* (1988) caracterizaron los estadios de muda del camarón blanco *P. vannamei*, midiendo la concentración de proteína, ecdisona y glucosa en hemolinfa, las que variaron a lo largo del ciclo de muda. Las enzimas quitinasa, N-acetilglucosaminidasa y proteasas presentes en la cutícula de otros crustáceos, también presentan cambios de actividad a lo largo del ciclo de muda, como lo demostró Buchholz (1989), utilizando krill *Euphausia superba* como modelo de estudio.

La identificación del estadio de muda en el que se encuentra un organismo en un tiempo determinado es un paso crucial en cualquier estudio relacionado al ciclo de muda, por lo cual, muchos autores han descrito metodologías para la clasificación por estadios de muda de diversas especies de crustáceos. De esta manera se pueden realizar estudios acerca de fenómenos más complejos que están íntimamente relacionados con el ciclo de muda, como el crecimiento.

## Estadios de muda

La primera clasificación de los estadios de muda fue publicada por Drach (1939). Esta clasificación incluye cinco estadios de muda básicos: post-muda inmediata (A), en el que el exoesqueleto es suave; post-muda tardía (B), en el cual el exoesqueleto aún es suave, pero lo suficientemente rígido para soportar al animal; intermuda (C), estadio en el que el exoesqueleto ha sido completamente formado; pre-muda o pro-ecdysis temprana ( $D_0 - D_1$ ) y tardía ( $D_2 - D_3$ ), en el cual suceden cambios morfológicos y fisiológicos en preparación a la muda; y un estadio final de ecdysis (E), en el que se desecha la cutícula. Los cinco estadios comprenden un ciclo de muda completo. Las características generales de los estadios de muda descritas anteriormente aún son aceptadas, sin embargo, ya han sido actualizadas en trabajos posteriores (Smith y Dall, 1985; Dall *et al.*, 1990). Para identificar los estadios de muda en determinado tiempo, se puede utilizar tanto el nombre escrito del estadio (pre-muda, post-muda, intermuda), como la clave de letras (A, B, C,  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ).

Existen diversos métodos para determinar el estadio de muda de los crustáceos. Estos métodos incluyen el análisis histológico del integumento, la medición gastrolitos en órganos digestivos o de pereiópodos en regeneración, y la determinación del desarrollo setal en los apéndices (Chan *et al.*, 1988). La observación del desarrollo setal y epidermis (Figura 2) es reconocido como el método menos invasivo para los animales, ya que no es necesario remover los urópodos para observarlos al microscopio. Debido a esto, esta metodología ha sido utilizada en estudios para caracterizar los estadios de muda de *P.*

*vannamei* (Chan *et al.*, 1988), *P. monodon* (Promwikorn *et al.*, 2004b) y *Palaemonetes argentinus* (Felix y Petriella, 2003), entre otros.

La determinación de los estadios de muda es necesaria en los estudios que buscan el efecto del ciclo de muda sobre alguna sustancia o fenómeno propio o ajeno al organismo. Algunos procesos fisiológicos se ven afectados durante el desarrollo de la muda, por lo que muchos de ellos se han estudiado y se han relacionado con este proceso, tales como la producción y actividad de enzimas quitinolíticas (Buchholz, 1989), la atrofia muscular por enzimas proteolíticas (Mykles, 1999), la secreción de hormonas o péptidos con funciones específicas (Phlippen *et al.*, 2000), la regeneración de órganos (Mykles, 2001), el tipo de hemocitos presentes en la hemolinfa (Sequeira *et al.*, 1995) y la espermatogénesis (Shyla Suganthi y Anilkumar, 1999) entre muchos otros.

Finalmente, debido a que ya se sabe que el ciclo de muda afecta a un gran número de procesos en los organismos, diversos estudios realizados en crustáceos deben tomar en cuenta el ciclo de muda para minimizar las variaciones que puedan ocurrir como consecuencia de este fenómeno. Normalmente los organismos en intermuda, son elegidos para diseños experimentales en los que se busca el efecto de una variable ambiental, debido a que en este estadio el organismo realiza sus funciones normales y no está llevando a cabo ninguna de las actividades específicas de post-muda o pre-muda (Kuballa y Elizur, 2007).

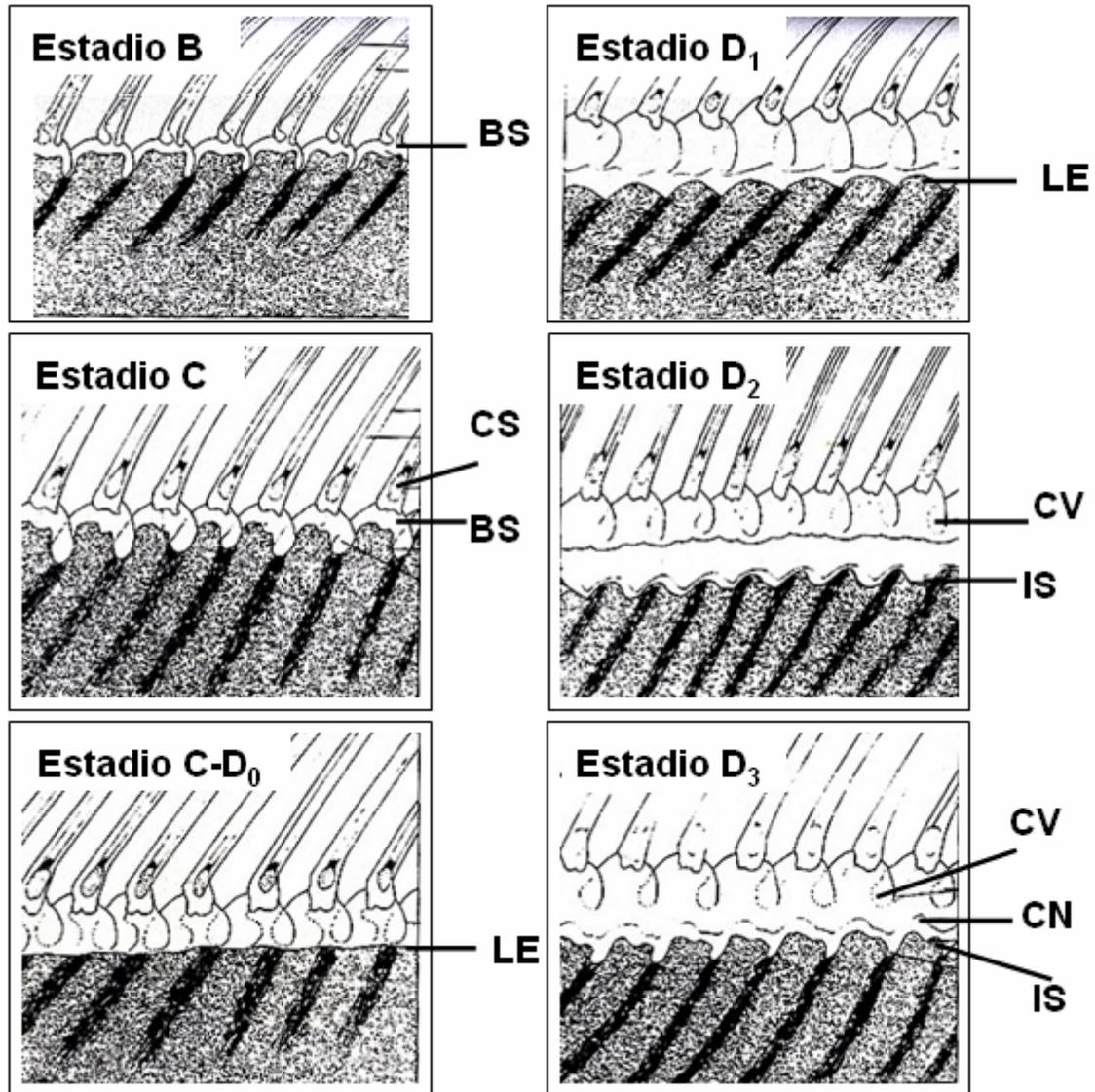


Figura 2. Identificación de los estadios de muda en crustáceos por observación del desarrollo setal y epidermis. BS, base setal; CS, Cono setal; LE, línea de la epidermis; CV, cutícula vieja; IS, invaginación setal; CN, cutícula nueva. Modificado de Smith y Dall (1985).

## Crecimiento

Al inicio del ciclo de vida, la muda en los crustáceos permite la metamorfosis a través de la ontogenia. La ontogenia de los camarones peneidos esta conformada por nauplios (I-VI), zoea (I-III), mysis (I a III), post-larva, juveniles y adultos. Posteriormente, la muda permite el crecimiento de los organismos, presentándose periódicamente a una frecuencia determinada (Martínez Córdova, 1993). La duración del ciclo de muda es especie-dependiente. En adultos, la muda puede presentarse con diferentes frecuencias, por ejemplo una vez por semana, en el caso del krill *Nyctiphanes australis* (Nicol *et al.*, 1992); cada mes, como en el caso de juveniles de *P. vannamei* (Chan *et al.*, 1988); o cada varios meses, como ocurre en la langosta *Jasus edwardsii* (Musgrove, 2000). Durante este ciclo, ocurre el crecimiento o incremento de peso de los animales, el cual está dado por la absorción de agua antes y después del momento de la ecdisis. Previo a la ecdisis, el crecimiento por absorción de agua permite la ruptura del viejo exoesqueleto (Kuballa y Elizur, 2007) y continúa después de la ecdisis, cuando los organismos no se encuentran limitados por un exoesqueleto rígido (Promwikorn *et al.*, 2004b). Las proteínas musculares también presentan cambios para lograr el crecimiento. El crecimiento muscular es logrado gracias a la regulación positiva de los ARNm codificantes de proteínas que componen las fibras musculares en pre- y post-muda que permiten la adición de sarcómeros después de la ecdisis (El Haj, 1999).

Algunos factores tanto endógenos como exógenos al organismo, pueden afectar de diversas maneras a la muda, repercutiendo indirectamente en el crecimiento de los organismos. McLay (1985) estudió dos especies de cangrejos ermitaños, *Pagurus traversii* y *Pagurus novizealandiae*, encontrando que los individuos *P. traversii* aislados mudan más frecuentemente que los que se mantienen en grupos; esta diferencia fue atribuida específicamente a las hembras, incorporando una influencia de género. Este fenómeno no ocurrió en *P. novizealandiae*, sin embargo en ambas especies sí se encontró un efecto de la talla de los organismos en la frecuencia de la muda. En este mismo estudio se reportó que el incremento de talla corporal variaba desde 29% en los animales pequeños hasta 2.9 % en el más grande, no habiendo diferencias significativas en el incremento de tamaño del organismo antes y después de la muda. Por otro lado, en el camarón *Palaemonetes argentinus* (Díaz *et al.*, 2003) se observó un efecto del ciclo circadiano sobre la muda y el crecimiento de los organismos durante 80 días de experimento; aunque no se encontraron diferencias significativas en los incrementos de peso en la ecdisis entre tratamientos, sí se observó un aumento en la frecuencia de la muda en los organismos expuestos a un fotoperíodo de días largos, comparados con organismos en fotoperíodos de días cortos o noche continua. En otro estudio donde se utilizó a la langosta *Thenus orientalis* como modelo, se observaron algunas variaciones en el comportamiento durante la muda debido a cambios ambientales, se observó que el incremento de talla desde una muda hasta la siguiente fue de 54%, localizando un aumento único agudo de tamaño en la etapa inmediata posterior a muda (post-muda). También en este trabajo se observó una notable influencia del fotoperíodo en una etapa de 2 días previos a la muda, lo cual afectó la duración de la etapa de ecdisis (Mikami, 2005).

### *Control endocrino de la muda*

Existen al menos 6 factores endocrinos que regulan los procesos que se llevan a cabo en un ciclo de muda. Primero, la hormona de la muda (MH), aislada inicialmente de insectos, llamada ecdisona (Butemamdt y Karlson, 1954), ha sido ampliamente estudiada. La forma química predominante de la ecdisona fue identificada como 20-hidroxiecdisona (Figura 3). Además se han descrito, una hormona inhibidora de la muda (MIH), un factor autónomo de los miembros en intermuda ( $LAF_{an}$ ), un factor autónomo de los miembros en pre-muda ( $LAF_{pro}$ ), un factor inhibitorio del crecimiento de los miembros (LGIF) y factor de exuviación (Skinner, 1985). De las hormonas mencionadas, las más estudiadas son MH y MIH. La MH desencadena los procesos que dan lugar a la muda, mientras que la MIH, de origen peptídico, inhibe la producción de MH. A la fecha se han reportado 2 de MIH en el camarón blanco (GenBank LivMIH1, No. de acceso AY425615 y LivMIH2, No. de acceso AY425616) y se estudió la cantidad de ARNm durante el ciclo de muda, encontrando que permanecen constantes durante post-muda e intermuda, hasta el estadio  $D_1$ , y disminuyen significativamente en los estadios  $D_2$  y  $D_3$  (Chen *et al.*, 2007). Este patrón corresponde inversamente con las cuantificaciones de ecdisona determinadas por Chan (1988) en hemolinfa del camarón blanco, que permanecen bajas durante los estadios A-D0 y aumentan pronunciadamente en el estadio  $D_1$ , para disminuir antes de la ecdisis. El mecanismo por el cual se rigen estas dos hormonas durante el ciclo de muda se explica a continuación. La ecdisona es sintetizada en el Órgano Y, localizado en la parte anterior del cefalotórax, mientras que la MIH se produce en el complejo del órgano X-glándula del seno

(XO-SG), que se encuentra en el tallo ocular (Skinner, 1985; Chang, 1993; Watson *et al.*, 2001). La MIH regula negativamente la producción de ecdisona, dictando la duración de la intermuda y por lo tanto la duración total del ciclo de muda, como se demostró en el camarón *Marsupenaeus japonicus in vivo* utilizando MIH recombinante (Okumura *et al.*, 2005). Un decremento en la cantidad de ARNm de la MIH en los estadios de pre-muda, permite el aumento de las concentraciones de ecdisona en la hemolinfa (Chan *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2007), que a su vez tiene un efecto de retroalimentación sobre la MIH (Mattson y Spaziani, 1986), disminuyendo aún más su concentración y permitiendo un aumento muy pronunciado de ecdisona en estos estadios.

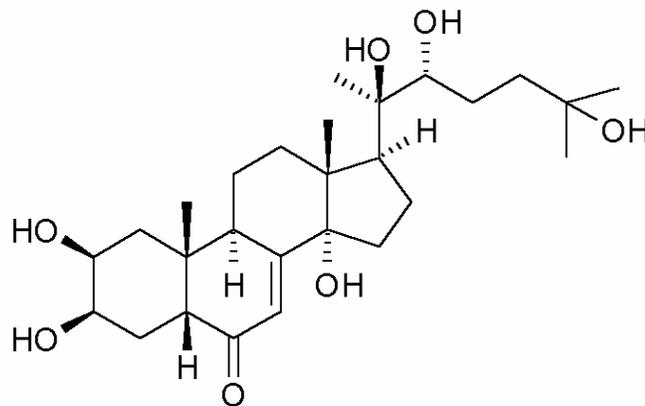


Figura 3. Estructura molecular de la MH, 20-hidroxiectdisona.

El sistema neuroendocrino de la muda de crustáceos se encuentra bajo intensa investigación ya que ha probado ser un modelo útil desde el punto de vista de fisiología comparada, de la regulación de la síntesis de esteroides, y la estructura y función de sistemas neurosecretores (Watson *et al.*, 2001).

### *Exoesqueleto e integumento de los crustáceos*

Del exterior hacia el interior, el exoesqueleto de un crustáceo decápodo consiste en epicutícula, exocutícula, endocutícula y capa membranosa. La epicutícula esta formada de proteínas, lípidos y sales de calcio, y sirve para otorgarle impermeabilidad a los organismos. Las otras tres capas están compuestas por proteínas, quitina y sales de calcio. En la exocutícula y endocutícula, los componentes se encuentran esclerotizados. La epicutícula y exocutícula (capas externas) son las que forman el suave exoesqueleto de un organismo en la post-muda temprana (estadio A), mientras que la endocutícula se forma en los estadios B y C. La esclerotización (endurecimiento) del exoesqueleto, se completa en el estadio C (intermuda). La capa membranosa es sintetizada durante el estadio C, y se considera que este estadio da inicio cuando la capa membranosa ha sido formada en su totalidad (O'Brien *et al.*, 1991). Durante los estadios de pre-muda (D0- D3), la epidermis de estos organismos sufre cambios estructurales profundos debido a la necesidad de sintetizar un nuevo exoesqueleto que sostenga al organismo, ahora de mayor tamaño (Skinner, 1962). Los cambios en la estructura de la cutícula durante cada estadio de muda sirvieron como base para la clasificación de los estadios de muda en los crustáceos (Drach, 1939). En los estadios de post-muda, el exoesqueleto es flexible, mientras que la intermuda esta caracterizada por la rigidez del exoesqueleto. La pre-muda comprende el periodo donde se forman las capas exteriores de la nueva exocutícula. La esclerotización es un proceso complejo por el cual se endurece la quitina, proteínas y el calcio en la exocutícula y endocutícula recién sintetizadas. Este fenómeno sucede por un entrecruzamiento de las

proteínas y la quitina, en el cual se encuentran involucrados específicamente los residuos de tirosina y glicina, y ocasiona la disminución de la solubilidad en agua de las proteínas del exoesqueleto, mientras los organismos avanzan de post-muda a intermuda (O'Brien *et al.*, 1991; Suderman *et al.*, 2006).

Previo a la muda, la epidermis hidroliza el 75% de los componentes del exoesqueleto, los cuales son reabsorbidos para reutilizarse en la generación de la nueva cutícula (Skinner, 1985). El resto es desechado en la exuvia durante la ecdisis (O'Brien *et al.*, 1991). Las proteínas y enzimas y demás componentes encargados del metabolismo de la cutícula son sintetizados y procesados en las células del integumento. El integumento consiste en dos capas de células separadas por tejido conectivo y localizadas debajo del exoesqueleto (Skinner, 1962), llamadas epidermis y sub-epidermis; durante el ciclo de muda, el integumento presenta cambios histológicos, así como de presencia de proteínas y almacenamiento de carbohidratos, proteínas, etc. (Promwikorn *et al.*, 2007). Las células del integumento están relacionadas directamente con la síntesis y degradación del exoesqueleto y otros procesos llevados a cabo en la muda, por lo cual el estudio de estas células puede dar información acerca de dichos fenómenos.

### *Quitina*

La quitina es un homopolímero lineal de N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosamina (NAcGlc), presente naturalmente como un componente estructural de la pared celular de hongos (Roncero,

2002), la cutícula, y la membrana peritrófica de los crustáceos e insectos (Roer y Dillaman, 1984; Merzendorfer y Zimoch, 2003), la cubierta de huevos de los nemátodos (Brydon *et al.*, 1987) y el integumento de artrópodos y moluscos (Zheng *et al.*, 2002). Su estructura molecular fue descrita por Carlstrom (1957) y se muestra en la Figura 4. En la membrana peritrófica de los insectos y crustáceos, la quitina funciona como una barrera impermeable entre el bolo alimenticio y el epitelio de la glándula digestiva, favoreciendo el proceso digestivo y protegiendo al tejido tanto de daño mecánico como del ataque de toxinas y patógenos (Merzendorfer y Zimoch, 2003). La membrana peritrófica se extiende a través de todo tracto digestivo (Ceccaldi, 1989), por lo cual la síntesis y degradación de quitina es importante en este tejido.

Se conocen 3 conformaciones poliméricas de la estructura cristalina de quitina. La  $\alpha$ -quitina, compuesta por cadenas antiparalelas;  $\beta$ -quitina, de cadenas paralelas; y  $\gamma$ -quitina, compuesta por una mezcla de cadenas paralelas y antiparalelas (Saito *et al.*, 1994) . La  $\alpha$ -quitina, es la conformación más estable y común entre organismos. Los insectos y crustáceos utilizan este tipo de quitina en el exoesqueleto. La  $\beta$ -quitina, tiene mayor solubilidad y por lo tanto menor estabilidad. Este tipo de quitina es sintetizada por los moluscos. La  $\gamma$ -quitina, se encuentra solamente en los capullos de insectos (Majtán *et al.*, 2007).

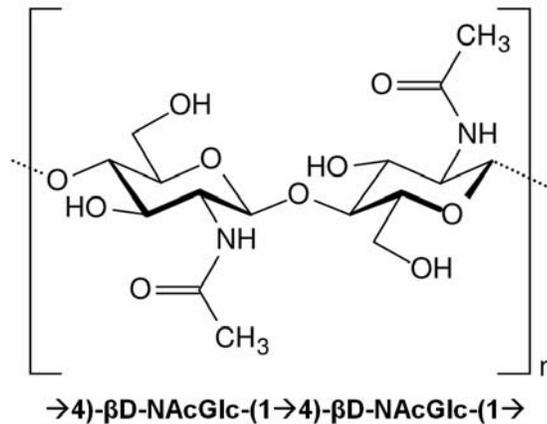


Figura 4. Unidad estructural de la quitina.

Debido a su amplia distribución en varios Phyla, la quitina es la macromolécula más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Harish-Prashanth y Tharanathan, 2007). Su producción total anual estimada es de  $10^{11}$  Ton, mientras que sólo en la hidrosfera se producen  $1.4 \times 10^9$  Ton; por esto, la quitina es de gran importancia ecológica como fuente de carbono de bacterias heterotróficas (Cauchie, 2002; Tharanathan y Kittur, 2003). Además, por su gran disponibilidad, tanto la quitina como el quitosano (forma deacetilada de la quitina), pueden ser obtenidos a partir del exoesqueleto de los crustáceos y aprovechados para fines biotecnológicos, siendo biopolímeros novedosos, benignos con el ambiente y con aplicaciones en farmacéutica, tecnología de empaques, etc. (Kurita, 2006; Harish-Prashanth y Tharanathan, 2007).

El metabolismo de la quitina ha sido ampliamente estudiado en insectos. La síntesis de quitina es el proceso que requiere más abastecimiento de carbohidratos en organismos que mudan. Un aumento del contenido de glicógeno en estadios de pre-muda, y variaciones en los azúcares de la hemolinfa, podrían estar relacionados con el alto requerimiento de

bloques monoméricos que van a constituir la quitina del nuevo exoesqueleto (Parvathy, 1970; Parvathy, 1971), además de las necesidades metabólicas generales. Finalmente, debido a su presencia en el exoesqueleto de crustáceos, su síntesis y degradación son dos procesos de gran importancia durante el ciclo de muda de cualquier crustáceo. En los siguientes apartados se describen las enzimas encargadas de dichos procesos.

### *Enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de la quitina*

Al ser la quitina un componente estructural importante del exoesqueleto de los crustáceos, el estudio de los procesos de síntesis y degradación de la misma son de interés para conocer la fisiología de la muda y el crecimiento. La coordinación de la síntesis y degradación de la quitina requiere de un control estricto durante el desarrollo de los organismos que mudan. La enzima quitín sintasa (ChS) es la enzima que se encarga de la síntesis de la quitina, mientras que su degradación es llevada a cabo por las quitinasas (Chi) y las  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas (NGAsas) (Cohen, 1987; Merzendorfer y Zimoch, 2003). Las quitinasas degradan las cadenas de quitina produciendo oligómeros, mientras que la enzima  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa utiliza oligómeros como sustrato para producir monómeros de N-acetil-glucosamina.

## Quitín Sintasa

El proceso de síntesis de la quitina incluye una secuencia ordenada de reacciones celulares complejas que inician desde el disacárido trealosa o desde glucosa, e implican hidrólisis de trealosa, fosforilación de la glucosa, transmutación para formar fructosa fosforilada, aminación, acetilación y conversión a un nucleótido amino-azúcar fosfatada y acetilada, UDP-N-acetil-glucosamina (Figura 5), sustrato de la enzima quitín sintasa (ChS) [UDP-2-acetoamido-2-deoxi-D-glucosa: quitina 4-β-acetoamido-deoxi-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.16)] (Figura 6) (Jaworski *et al.*, 1963). En crustáceos como el cangrejo *Emerita asiatica*, la síntesis de quitina ha sido relacionada directamente con el contenido de azúcares en la hemolinfa a lo largo del ciclo de muda (Parvathy, 1970); cuya acumulación está relacionada con la preparación a la muda, aunque no necesariamente con la síntesis de quitina.

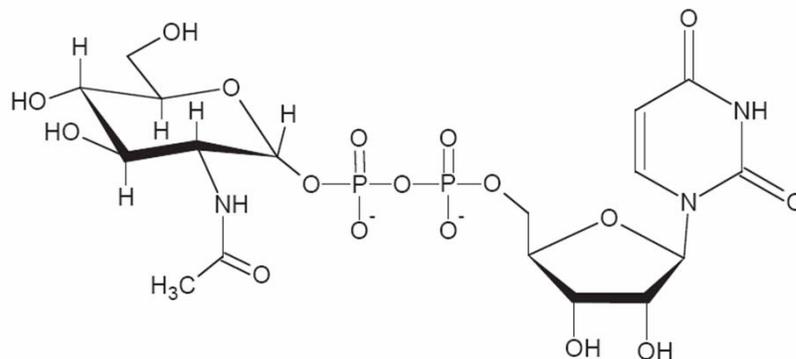


Figura 5. Estructura molecular de UDP-N-Acetilglucosamina, sustrato de la enzima quitín sintasa. Tomado de Merzendorfer y Zimoch (2003).

Las unidades catalíticas de ChS se encuentran embebidas en las membranas celulares y polimerizan N-acetilglucosamina para producir cadenas de quitina extracelulares (Figura 6) (Cohen, 1987). Las investigaciones acerca de la estructura y el mecanismo de ChS se han realizado utilizando especies de hongos, levaduras e insectos como modelo, encontrando características similares en esos grupos.

La ChS es una transferasa “procesiva”, lo cual significa que debe tener un mecanismo para “acomodar” a los monómeros de NAcG que en las cadenas de quitina se encuentran orientados de manera opuesta unos a otros (Figura 4). La utilización de un sustrato dimérico (UDP-quitobiosa) eliminaría este problema de configuración, pero esta posibilidad ha sido descartada (Chang *et al.*, 2003).

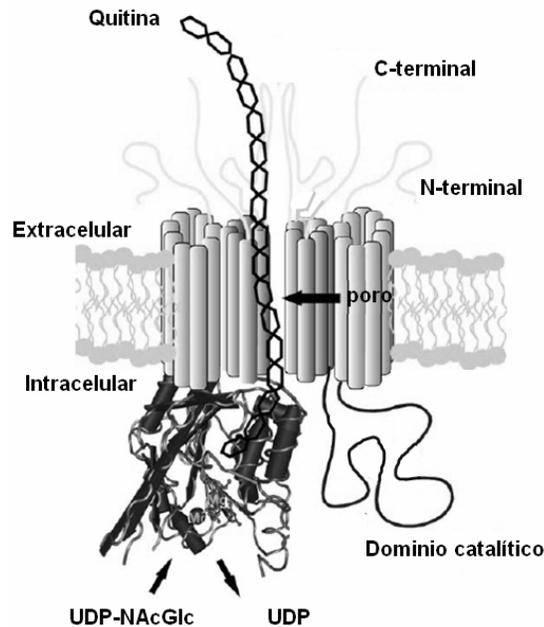


Figura 6. Unidad catalítica de la quitina sintasa. Dos moléculas de ChS se encuentran embebidas en la membrana. La cadena de quitina emerge al exterior de las células a través de un poro formado entre las dos moléculas. Tomado de Merzendorfer (2006).

El mecanismo por el cual la enzima ChS polimeriza cadenas de quitina no ha sido totalmente resuelto, pero existen dos teorías propuestas. En la primera, las unidades se encuentran en la membrana citoplasmática y el sitio catalítico está orientado al citoplasma; las cadenas de quitina se sintetizan y se depositan directamente en el espacio extracelular. En la segunda se sugiere que la quitina se sintetiza en vesículas enriquecidas por debajo de la membrana celular, que después se fusionan con la membrana, liberando la quitina (Merzendorfer y Zimoch, 2003). En cualquiera de los casos, la enzima ChS debe estar embebida en una membrana, por lo cual debe tener regiones trans-membranales, las cuales han sido identificadas en las secuencias de ADNc descritas a la fecha (Merzendorfer, 2006). La ChS es una enzima con múltiples dominios, incluyendo 16 regiones trans-membranales, y regiones N-terminal y C-terminal las cuales se encuentran en la parte extracelular, y el dominio catalítico, localizado en la parte intracelular con las secuencias conservadas de ChS: “EDR” y “QRRRW” (Tellam *et al.*, 2000). Una unidad catalítica de ChS incluye a dos moléculas (enzima dimérica, Figura 6), es decir, una ChS esta compuesta por dos monómeros iguales. La hélice trans-membranal más próxima al C-terminal de ambas moléculas forman un poro por el cual la quitina se polimeriza al exterior de la célula (Merzendorfer, 2006).

A través de la caracterización del ADNc de ChS (*ChS*), se han elucidado la función y regulación de dicha enzima. La complejidad genética de ChS en hongos se ha descrito gracias a la manipulación de células de levaduras; en estos organismos se encontró la regulación de las ChS a través de isoformas de la enzima (en algunos organismos se han descrito hasta 7) (Roncero, 2002). En varias especies de insectos el ADN complementario

(ADNc) ya ha sido secuenciado y tiene un tamaño que varía entre 5 y 6 kb. Algunas especies de insectos cuentan con varias isoformas de *ChS*, las cuales sirven para sintetizar la quitina ya sea del exoesqueleto, o de la membrana peritrófica (Arakane *et al.*, 2005; Zimoch *et al.*, 2005). En cuanto a la regulación de la síntesis de las diferentes isoformas, se describió en el escarabajo *Tribolium castaneum* y la oruga *Manduca sexta* (Arakane *et al.*, 2004; Hogenkamp *et al.*, 2005) un mecanismo de *splicing* alternativo del ARNm, dando lugar a diferentes isoformas de ChS.

La ChS es de interés biotecnológico en investigaciones sobre control de plagas de cultivos agrícolas. Al ser un mecanismo utilizado por insectos, se han identificado compuestos como el diflubenzuron, un inhibidor de la ChS, que interfiere con etapas del metabolismo de la quitina, como la actividad ChS (Merzendorfer y Zimoch, 2003).

### **Quitinasa**

A pesar de ser un biopolímero insoluble y abundante, la quitina no se acumula en la naturaleza debido a que los organismos tienen una batería de enzimas quitinolíticas que se complementan eficientemente. Las enzimas quitinolíticas pueden ser divididas en dos grandes grupos: endo-quitinasas y exo-quitinasas. Las endo-quitinasas, llamadas comúnmente quitinasas (E.C. 3.2.1.14, poli [1,4-(*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina)] glicanohidrolasa) son las enzimas encargadas de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos en regiones intermedias de las cadenas de la quitina, y producen oligómeros de quitina (Figura

7). Las exo-quitinasas, que degradan la quitina a partir de su extremo no-reductor, están divididas en quitobiosidasas (3.2.1.29), que producen diacetilquitobiosa; y las N-acetil glucosaminidasas o quitobiasas (3.2.1.30 y 3.2.1.52), que degradan diacetilquitobiosa o cadenas más largas de quitina produciendo monómeros de N-acetil glucosamina (Figura 7) (Merzendorfer y Zimoch, 2003; Duo-Chan, 2006). Todos los organismos que producen quitina producen quitinasas; además la enzima se ha encontrado en organismos que no producen quitina, como plantas y mamíferos, en donde tienen funciones de defensa contra pestes o patógenos (Flach *et al.*, 1992; Hahn *et al.*, 2000; Kawada *et al.*, 2007).

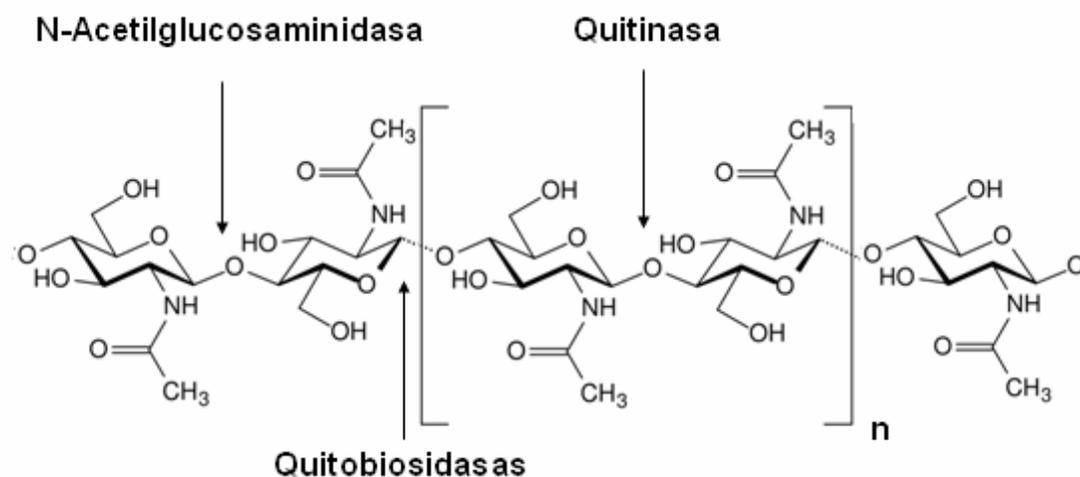


Figura 7. Especificidad de las enzimas quitinolíticas. Sitios de hidrólisis de N-acetilglucosaminidasas, quitobiosidasas y quitinasas dentro de una cadena de quitina.

Las quitinasas pertenecen a las familias 18 y 19 de las glicosil hidrolasas, que difieren en secuencia de aminoácidos, estructura y mecanismo. Aunque las quitinasas de la familia 19 normalmente se describen como exclusivas de plantas, también se han encontrado en *Aeromonas Sp.* (Ueda *et al.*, 2003); las quitinasas de la familia 18 se encuentran en

mamíferos, insectos, plantas, fungi, nemátodos, bacterias y crustáceos (Kramer y Muthukrishnan, 1997; Watanabe y Kono, 1997; Hahn *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2005). Por el estudio de ADNc de quitinasas de la familia 18, se sabe que estas enzimas tienen una estructura de multi-dominios, incluyendo un péptido señal altamente hidrofóbico que permite la secreción de las enzimas fuera de las células, un sitio de unión a la quitina (CBD, Chitin binding domain), una región rica en pro/glu/ser/thr y un dominio catalítico en la mitad C-terminal, con la secuencia de aminoácidos conservada del sitio catalítico “FDxxDxDxE” (Royer *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Arakane *et al.*, 2003; Merzendorfer y Zimoch, 2003). El tamaño de la secuencia codificante de ADNc de quitinasas es muy variable entre especies, pero las secuencias de quitinasas de camarones peneidos reportadas en Genbank varían entre 1.4 y 2.1 kb.

En los organismos que producen quitina, las enzimas quitinolíticas son esenciales para mantener un ciclo de vida normal, como la morfogénesis de artrópodos o división celular y esporulación en levaduras y otros hongos. En insectos, se sabe que las quitinasas tienen un papel crucial en el desarrollo post-embriónico, especialmente durante la muda en los estadios larvarios, ya que es secretada junto con enzimas proteolíticas en el fluido de la muda entre la epidermis y la vieja cutícula. Las quitinasas son de interés para la industria química y farmacéutica por que pueden ser utilizadas para convertir material que contiene quitina en componentes utilizables biotecnológicamente. Además, las quitinasas y sus inhibidores pueden ser adoptados como insecticidas o fungicidas (Merzendorfer y Zimoch, 2003).

## **Antecedentes**

Existen un par de trabajos en los que se estudia directamente el ciclo de muda del camarón blanco *P. vannamei*. Chan *et al.* (1988) hicieron una caracterización completa del ciclo de muda que incluyó el estudio de la setogénesis, así como la cuantificación y contenido de proteínas por SDS-PAGE, glucosa y ecdisona en hemolinfa. También se estudiaron características generales de comportamiento, alimentación y morfología del exoesqueleto y la epidermis. Todos los parámetros investigados en dicho estudio presentaron variaciones durante el ciclo de muda en juveniles de *P. vannamei*. Por otro lado, existe un estudio de cuantificación del ARNm de MIH1 y MIH2 en el tallo ocular de *P. vannamei*, en el que se encontró la presencia de dichos ARNm durante todo el ciclo, y una disminución en los estadios de pre-muda, en preparación a la ecdisis (Chen *et al.*, 2007).

Existen pocos estudios que se refieren a la síntesis de quitina en los crustáceos (Parvathy, 1970; Horst, 1981; Horst, 1983). A la fecha no se han publicado secuencias de proteínas, ARNm o genes en el Genbank, correspondientes a la ChS de alguna especie de crustáceo. Tampoco hay reportes disponibles sobre mediciones de su actividad enzimática o localización inmunológica. Sin embargo, al igual que otros mecanismos, la muda es un proceso que tiene bases moleculares compartidas entre grupos de organismos. Los múltiples reportes de la enzima ChS en insectos, indican que los crustáceos deben poseer una maquinaria similar para sintetizar la quitina que constituye su exoesqueleto y membrana peritrófica. Tellam *et al.* (2000), fueron los primeros en secuenciar un ADNc

completo de una ChS en artrópodos (*LcCHS-1*) utilizando la mosca de la oveja *Lucilia cuprina* (No. de acceso Genbank AF221067). Desde entonces se han publicado diversos trabajos sobre ChS y secuencias de ADNc de ChS en insectos, en organismos como la plaga de tabaco *Manduca sexta* (Zimoch y Merzendorfer, 2002), el mosquito *Aedes aegypti* (Ibrahim *et al.*, 2000), la mosca *Drosophila melanogaster* (Gagou *et al.*, 2002) y el gorgojo *Tribolium castaneum* (Arakane *et al.*, 2004), entre otros. La información generada sobre su función y las secuencias depositadas en el Genbank, permiten iniciar un trabajo sobre dicha enzima, a través de su ADNc en el camarón blanco *P. vannamei*.

Al igual que en el caso de ChS, existen muchos trabajos sobre las quitinasas (Chi) en especies de insectos, tales como los realizados con el mosquito *Aedes aegypti* (Filho *et al.*, 2002), el gusano del tabaco *Manduca sexta* (Arakane *et al.*, 2003) y el gusano de seda *Bombyx mori* (Daimon *et al.*, 2005), entre muchos otros. Sin embargo, en el caso de Chi, si existen trabajos en crustáceos, de los cuales se ha generado interesante información acerca de la función y su presencia a lo largo del ciclo de muda. Buchholz (1989) midió actividad quitinolítica a lo largo de ciclo de muda en el integumento del krill del Atlántico *Euphausia superba*, encontrando cambios en diferentes temporadas y durante el ciclo de muda tanto de Quitinasas, como de N-acetil-glucosaminidasas (Figura 8).

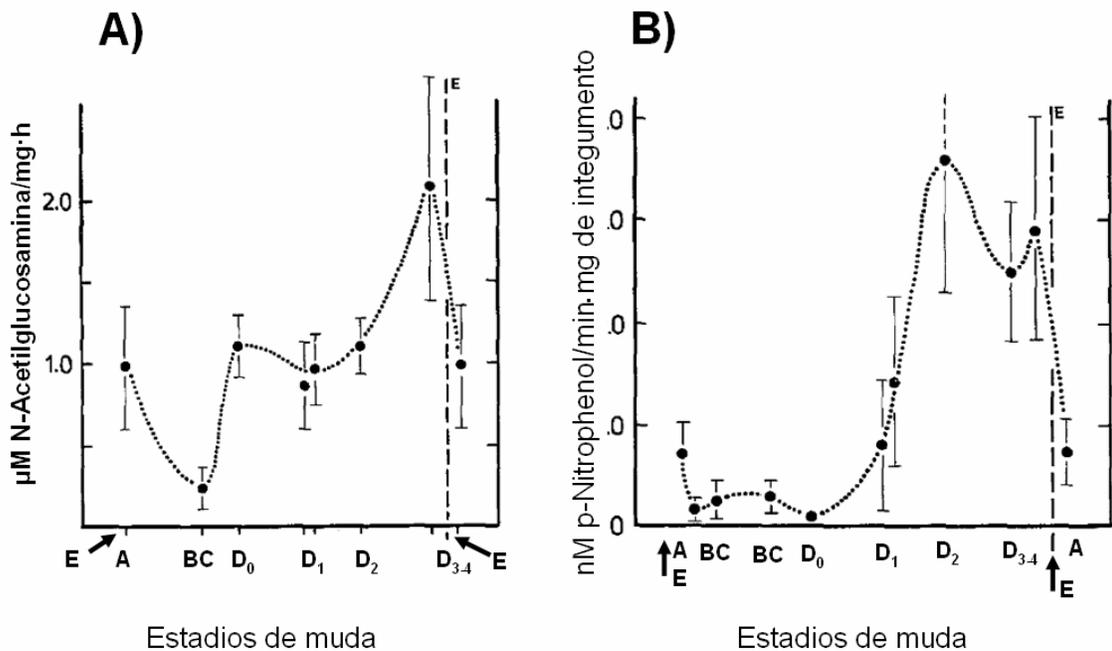


Figura 8. Actividad de A) quitinasas y B) N-acetil-glucosaminidasas en el integumento del krill del atlántico *Euphausia superba* durante el ciclo de muda. E= ecdisis. Modificado de Buchholz (1989).

En los camarones peneidos, existen al menos 3 isoenzimas de quitinasas que son codificadas por los transcritos *Chi1*, *Chi2* y *Chi3* (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe y Kono, 1997; Watanabe *et al.*, 1998). Estos transcritos fueron estudiados en el camarón *Marsupenaeus japonicus*, y las secuencias completas de ADNc están publicadas en la base de datos Genbank (No. de acceso *PjChi1*, D84250; *PjChi2*, D89751; *PjChi3*, AB008027). También fue secuenciado un gen similar a *PjChi1* en el camarón *Penaeus monodon*, *PmChi1* (No. de acceso AF157503) y *Fenneropenaeus chinensis*, *FcChi1* (No. de acceso DQ277710). Dichos estudios buscan relacionar la presencia o ausencia del ARNm de estos genes, con el ciclo de muda. Sin embargo, la localización de los transcritos en uno u otro órgano es un factor fundamental para definir su función.

Además de degradar la quitina del exoesqueleto previo a la ecdisis, las enzimas quitinolíticas tienen una importante función en la degradación de la membrana peritrófica en el tracto digestivo y de la quitina de alimentos. Por lo tanto, la presencia de un transcrito de un gen de quitinasa en la glándula digestiva de los crustáceos, puede indicar que la enzima codificada por este transcrito tiene función digestiva. Los ARNm de *PjChi1*, *PjChi3*, *PmChi1* y *FcChi1* están localizados en la glándula digestiva. Para llegar a comprobar que las enzimas codificadas por estos genes, llevan a cabo funciones relacionadas con la muda, se requieren algunas evidencias adicionales a sólo la identificación del gen; por ejemplo, en el trabajo de Tan *et al.* (2000), se compara el patrón de expresión de quitinasa de *Penaeus monodon* (*PmChi1*) con el de algunas enzimas digestivas a lo largo del ciclo de muda (Figura 9). En dicho trabajo se concluyó que el transcrito *PmChi1* tiene un papel importante en la muda, por que su patrón difiere de las variaciones observadas en las enzimas digestivas incluidas en el estudio, presentando un aumento pronunciado que esta relacionado con el aumento de concentración de ecdisona en el estadio de premuda D<sub>2</sub>. Por otro lado, *PjChi2* fue localizado en el integumento del camarón *M. japonicus*. La presencia de este transcrito, y por lo tanto de la enzima quitinolítica en el integumento del camarón, es evidencia de que la función más probable de la enzima es hidrolizar la quitina del exoesqueleto, previo a la muda y su rol digestivo es menos probable, debido a que el transcrito no se detectó en la glándula digestiva. Existen secuencias reportadas de quitinasas del camarón blanco *P. vannamei*: *LvChi1* (No. de acceso EU883591) y *LvChi3* (No. de acceso AF315689), que son similares a *PjChi1* y *PjChi3*, respectivamente. Ambos transcritos se encuentran en la glándula digestiva, pero no se ha hecho ningún estudio para

comprobar o descartar la participación de esas isoenzimas de quitinasa en la muda del camarón blanco *P. vannamei*.

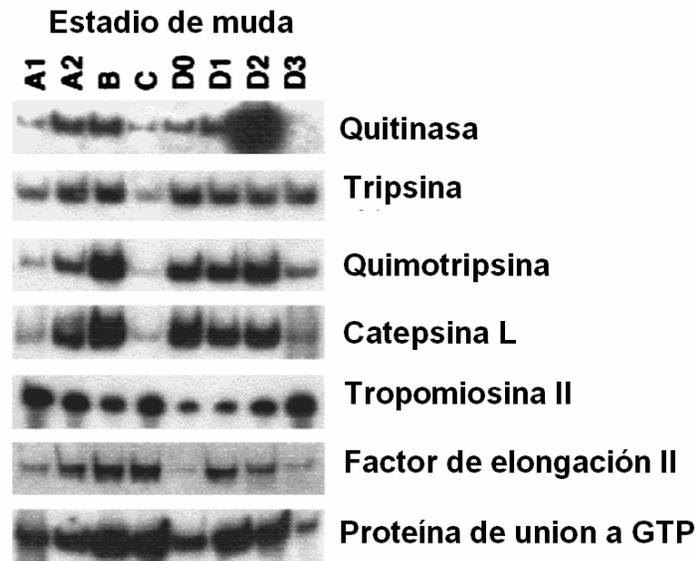


Figura 9. Análisis por RT-PCR del ARNm de la quitinasa de *Penaeus monodon* (*PmChi1*), a lo largo del ciclo de muda, comparado con el ARNm de otras proteínas en la glándula digestiva. Modificado de Tan *et al.*, (2000).

Hasta ahora, existe solamente un estudio en el que se relaciona la funcionalidad opuesta de la quitín sintasa y la quitinasa. Bolognesi *et al.* (2005), relacionaron la presencia o ausencia de transcritos de quitín sintasa y quitinasa durante los estadios de desarrollo del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*. Al estudiar la presencia de los transcritos en el intestino y la epidermis, observaron que el ARNm de quitín sintasa se expresa solamente en el intestino durante los estadios larvarios, mientras que el transcrito de la quitinasa fue detectado en ambos tejidos y en los estadios posteriores (Figura 10). En dicho trabajo se concluyó que la coordinación de ambos esta regulada a nivel transcripcional, y que la expresión excluyente de ambos genes obedece a su función opuesta y a la necesidad del

organismo por sintetizar y degradar la membrana peritrófica y el exoesqueleto, que están compuestos parcialmente de quitina.

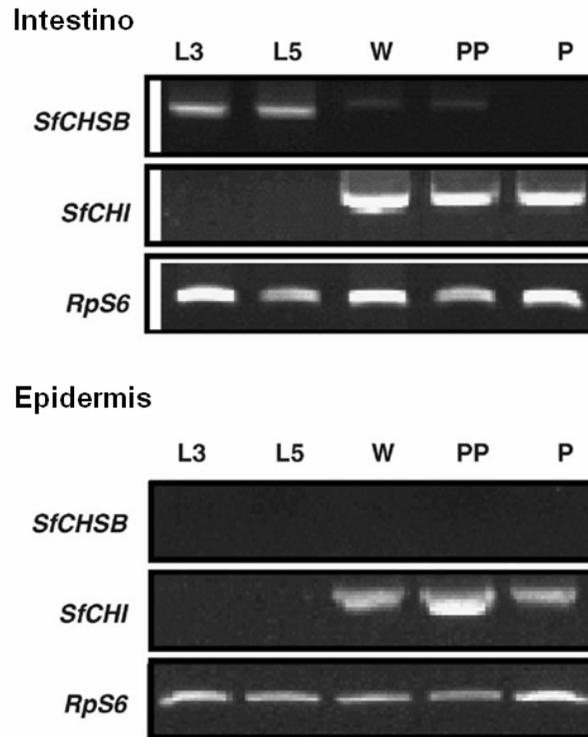


Figura 10. Análisis por RT-PCR del ARNm de quitín sintasa (*SfCHSB*), quitinasa (*SfCHI*) y un gen constitutivo (*RpS6*), en los estadios de larva 3 (L3) y 5 (L5), indeterminados (W), pre-pupa (PP) y pupa (P) del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*. Modificado de Bolognesi *et al.* (2005).

En el caso del camarón blanco *P. vannamei*, no existen trabajos en los que se determine actividad quitinolítica ante algún estímulo o condición. Además, no se ha encontrado ningún transcrito de la quitinasa en el integumento, el cual pueda ser relacionado con la degradación del exoesqueleto antes de la ecdisis. Finalmente, no existe ningún reporte de las secuencias, ni de la cuantificación de los transcritos o actividad enzimática de la quitín sintasa. Por lo tanto, un posible acercamiento al entendimiento del proceso de muda en el

camarón blanco, es la identificación a los ARNm que codifican a las enzimas encargadas de la síntesis y degradación de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto. En los siguientes apartados se presenta el trabajo realizado como acercamiento al proceso de muda, a través del estudio de los transcritos que codifican a las enzimas encargadas de la síntesis y la degradación de la quitina del exoesqueleto, utilizando al camarón blanco *Penaeus vannamei* como modelo.

## **Hipótesis**

Si durante el ciclo de muda los organismos necesitan sintetizar o degradar la quitina que constituye su exoesqueleto, entonces la abundancia del ARN mensajero de la quitín sintasa y la quitinasa en las células del integumento del camarón blanco *Penaeus vannamei*, presentará un patrón de variación excluyente temporal.

## **Objetivos**

### *Objetivo general*

Evaluar la expresión de los genes de quitín sintasa y quitinasa del integumento, relacionados con la muda del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

### *Objetivos específicos*

- Identificar los genes de quitín sintasa y quitinasa del camarón blanco *P. vannamei*.
- Definir la función biológica de cada uno de los transcritos de estudio a través de su detección en diferentes tejidos del camarón blanco.
- Cuantificar el (los) ARN mensajero(s) de los genes de quitín sintasa y quitinasa a lo largo del ciclo de muda.
- Obtener y analizar las secuencias de ADNc de los genes evaluados.

## **Materiales y Métodos**

### *Organismos y obtención de las muestras*

Organismos adultos de la especie *Penaeus vannamei* fueron mantenidos en el laboratorio de bioensayos en las instalaciones del CIBNOR, bajo condiciones controladas constantes (28 °C). Los camarones se sometieron a ayuno durante 48 h durante las cuales se sifonearon las heces, exoesqueletos y organismos muertos, una vez al día durante este período, para evitar una influencia de las variaciones en la actividad de alimentación que ocurren en los diferentes estadios de muda. Posteriormente, se seleccionaron organismos que se encontraran en cada estadio de muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) por medio de observación del desarrollo setal y epidermis al estereoscopio y utilizando los criterios descritos por Smith y Dall (1985) (Figura 2). Una vez separados por estadio de muda, se disectaron 4 organismos de cada estadio para obtener tejidos de glándula digestiva, pleópodos y urópodos. Todas las muestras fueron almacenadas en TRIzol® (Invitrogen) a -80 °C, para su uso posterior.

### *Preparación de las muestras*

Se extrajo el ARN total de las muestras almacenadas con el método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987), utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). Se incubaron

10 µg del ARN total obtenido con 4 ó 6 U de la enzima ADNasa I (Sigma) a 37 °C durante 10 min., para eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg), y finalmente se utilizaron 4 µg de ARN total libre de ADNg para sintetizar el ADN complementario (ADNc), utilizando la enzima SuperScript III (Invitrogen), oligo dT como iniciador y siguiendo el protocolo del fabricante (desnaturalización de 5 min. a 65 °C, reacción de 20 µl a 50 °C durante 1 h e inactivación a 70 °C durante 15 min.), con un volumen final de reacción de 21 µl. El ADNc (1 µl, 190 ng) fue utilizado como templado para las reacciones de PCR para los análisis posteriores.

#### *Amplificación de LvChS, LvChi1, LvChi2 y LvChi3*

Con el objetivo de identificar la presencia de los transcritos de los genes *LvChS*, *LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3* en la glándula digestiva y en el integumento, se amplificaron fragmentos de cada uno de estos usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Para detectar el ARNm de quitín sintasa (*LvChS*), se diseñaron iniciadores degenerados partiendo de las secuencias de genes de quitín sintasa reportadas para diferentes especies de insectos. Los iniciadores utilizados fueron LvChSD Fwd y Rev (Tabla 1) y se utilizó ADNc tanto de la glándula digestiva como del integumento (pleópodos o urópodos) para su amplificación. En el caso de la quitinasa, se diseñaron iniciadores específicos para *LvChi3*, y degenerados para *LvChi1* y *LvChi2*, utilizando las secuencias previamente reportadas para los camarones *M. japonicus* y *P. monodon*. Los iniciadores utilizados fueron: para *LvChi1*, LvChi1 Fwd y Rev; para *LvChi2*, LvChi2D Fwd

y Rev; para *LvChi3*, LvChi3 Fwd y Rev (Tabla 1). Las secuencias de los iniciadores y las temperatura de alineación ( $T_a$ ) utilizada para cada par de iniciadores se muestra en la tabla 1. En todos los casos, las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 95 °C, 3 min.; 35 ciclos de 95 °C 30 s,  $T_a$  °C ( según Tabla 1) 30 s, y 68 °C durante 1 min. por cada 1000 bases del producto amplificado. Para *LvChi1* y *LvChi3* se utilizo como templado ADNc de la glándula digestiva, mientras que *LvChi2* se amplifico a partir de ADNc del integumento. Para la amplificación de los diferentes fragmentos se utilizaron reacciones de 15  $\mu$ l, con 190 ng de ADNc, 1.3  $\mu$ M de cada iniciador , 7.5  $\mu$ l de la mezcla 2x Go Taq Green Master M7122 que contiene ADN polimerasa, buffer de reacción Green Go Taq 2x (pH 8.5), 400  $\mu$ M dATP, 400 $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP y 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison Wi, EUA), un termociclador (DNA Engine, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Los productos fueron observados por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, utilizando una fuente de poder VWR 105 Scientific (EC apparatus Corporation, St. Petersburg, FL, EUA), y un sistema de digitalización de imágenes (UVP Bio Doc-H TM System UV transilluminator Model -20, Upland, CA, EUA). Los fragmentos fueron clonados en un vector PGEM-T Easy (Promega) y transformados en células competentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Se extrajo ADN plasmídico (ADNp) de las células crecidas en caldo LB, utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001), y su secuencia fue determinada (Macrogen Inc., Seúl, Corea). Se comprobó la identidad de los fragmentos amplificados por análisis bioinformático usando la base de datos de la NCBI, y el algoritmo de BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

Tabla I. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación por PCR de fragmentos de transcritos utilizados en este estudio.

<b>Nombre</b>	<b>Dirección de iniciadores</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Temperatura de alineamiento (°C)</b>	<b>Tamaño de producto (pb)</b>
<b>LvChSD</b>	Forward	TAC GAT CAA GGG GAA GAT CG	55	340
	Reverse	CGC AAT GGG ATA GAG GTT GT		
<b>LvChi2D</b>	Forward	GCT ATC GGC GGA TGG AAC G	55	528
	Reverse	GCC AGG GAG AAG GAC TGK		
<b>L8</b>	Forward	TAG GCA ATG TCA TCC CCA TT	58	167
	Reverse	TCC TGA AGG AAG CTT TAC ACG		
<b>LvChS*</b>	Forward	GGA AGA TCG ATG GCT GTG C	57	291
	Reverse	AAG GCA CCC ACC AAC ATA AG		
<b>LvChi1</b>	Forward	AAG TAT CCC GAC ATG AAG AC	61	259
	Reverse	CYA CCG TGT CGA AGG CCT C		
<b>LvChi2*</b>	Forward	CAG TCG CCT TGT GAA CAA C	57	375
	Reverse	TCA GGG TGG ACA TAC ATA GG		
<b>LvChi3</b>	Forward	AGT TCG ACG TGG AGG ACA TC	61	178
	Reverse	TTC AAG TTG GCA TTC TGC TG		

### *Función Biológica de LvChS, LvChi1, LvChi2 y LvChi3*

Para el análisis de la función biológica de las enzimas codificadas por los transcritos de estudio, se aisló el ARN total (Chomczynski y Sacchi, 1987) de los pleópodos, urópodos, branquias, tallo ocular, glándula digestiva, músculo, hemocitos, tubo digestivo y sistema nervioso de camarones de la especie *P. vannamei* elegidos al azar. Se realizó una incubación con 4 U de ADNasa I (Invitrogen) a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN total aislado usando el sistema Reverse Transcription System (Promega), utilizando Oligo dt como iniciador y reacciones a 42 °C

durante 60 min. Se realizó un análisis cualitativo de la presencia de los transcritos en los diferentes órganos del camarón usando la amplificación por PCR de cada transcrito de interés, incluyendo al gen que codifica a la proteína ribosomal L8 de *P. vannamei* como control (Genbank, No. de acceso DQ316258). Los iniciadores utilizados fueron: para L8, L8 Fwd y Rev; para *LvChS*, LvChS Fwd y Rev; para *LvChi1*, LvChi1 Fwd y Rev; para *LvChi2*, LvChi2 Fwd y Rev; y para *LvChi3*, LvChi3 Fwd y Rev (ver secuencias en Tabla 1). Para todas las amplificaciones se utilizó la mezcla de ADN polimerasa (Gotaq® Green Master Mix, Promega), 47 ng de ADNc como molde para la reacción y 35 ciclos con las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Los productos fueron observados en geles de agarosa y se tomaron fotografías digitales, como se describió en la sección anterior.

#### *Cuantificación de los transcritos de LvChS y LvChi2 en el ciclo de muda*

Se cuantificaron los ARNm de L8 (control), *LvChS* y *LvChi2* por RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR), utilizando un equipo IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA). Para la amplificación se utilizó la mezcla iQ SYBR Green Supermix, BioRad 2x, que contiene KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM a pH 8.4, mezcla de dNTP 1.6 mM, iTaq ADN polimerasa 50 U/ml, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, SYBR- Green I, fluoresceína 20 nM y agua estéril para la detección de cadenas dobles de ADN por fluorescencia en cada uno de 40 ciclos. Se utilizó ARN total de urópodos de 4 camarones por estadio de muda (A, B, C, D0, D1, D2 y D3), duplicados de ADNc de cada ARN total (190 ng) y triplicados de las reacciones

individuales. Se prepararon reacciones de 20  $\mu$ l, utilizando los siguientes juegos de iniciadores: para *L8*, *L8 Fwd* y *Rev*; para *LvChS*, *LvChS Fwd* y *Rev*; y para *LvChi2*, *LvChi2 Fwd* y *Rev* (Tabla 1). La amplificación se llevo a cabo utilizando el siguiente programa: 95 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 3 min., 57 °C durante 30 s y 68 °C durante 1 min. La curva de disociación se obtuvo con un aumento de temperatura desde 60 °C hasta 95 °C, con aumentos de 0.3 °C cada 20 s. Se obtuvieron valores de Ct (threshold cycle), ciclo en el que se registra amplificación en cada muestra, utilizando el software IQ5 Optical System Software (Biorad) y se procesaron utilizando la siguiente fórmula:

Ecuación [1] 
$$E = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Ecuación [2] 
$$(\Delta\Delta Ct) = (Ct_B - Ct_{L8})_{estadio X} - (Ct_B - Ct_{L8})_{estadio C}$$

donde E, es el valor reportado de cantidad de transcritos, expresado en n-veces la cantidad del transcrito X en estadio C, y normalizados con la cantidad del transcrito de L8 en cada estadio;  $Ct_B$ , es el Ct del gen blanco (*LvChS* o *LvChi2*);  $Ct_{L8}$ , el Ct del gen L8; y estadio X, es el estadio de muda correspondiente (Livak y Schmittgen, 2001).

#### *Obtención y Análisis de la secuencia del ARNm de LvChS y LvChi2*

La secuencia nucleotídica de los ARNm de *LvChS* fue obtenida con iniciadores diseñados a partir de secuencias de ChS de insectos. Para la secuencia de *LvChi2*, las estrategias utilizadas fueron las siguientes: La región central fue obtenida por PCR y clonación (Vector p-GEM, Promega y células competentes DH5 $\alpha$ ) utilizando iniciadores diseñados a partir de

la secuencia de *PjChi2*, Fwd 5'- GCT ATC GGC GGA TGG AAC G -3' Y Rev 5'- GCC AGG GAG AAG GAC TGK C – 3' (nucleótidos 1-531). La siguiente región hacia el extremo 3' (nucleótidos 532-836), fue obtenida utilizando el iniciador Fwd 5'-ACG AGC ACG TTA TTG AGT TC- 3' y un iniciador reverso diseñado a partir de la secuencia *PjChi2*: 5'- GAT GGC TCC TCA GGA CTC TG -3'. El extremo 3' (nucleótidos 837-1,219) fue obtenido utilizando un ADNc sintetizado con un sistema comercial (GeneRacer® Kit, Invitrogen) por el método de amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE), utilizando los iniciadores *LvChi2* Fwd 5'-CGA GTG TCT CTT CGG CAA GC-3' y el iniciador 3' del mismo paquete (3'primer). Las secuencias obtenidas de nucleótidos y deducida de aminoácidos fueron analizadas usando herramientas de bioinformática como Clustal W, el BLAST X, BLAST 2 y BLAST P (Zhang *et al.*, 2000).

#### *Análisis estadístico de los datos*

Debido a la falta de normalidad de los datos y a la heterogeneidad de las varianzas, los logaritmos de los resultados de la cuantificación de *LvChS* y *LvChi2* por el método de  $E=2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  fueron analizados por el método de Kruskal-Wallis (nivel de significancia  $P\leq 0.05$ ) y las diferencias entre las medianas de la cantidad de los transcritos por estadios de muda fueron evaluadas por medio de gráficas de caja con muesca y bigote, utilizando el programa computacional Stat-Graphics Plus 5.1 (2001).

## Resultados

### *Amplificación e identificación de los transcritos LvChS, LvChi1, LvChi2 y, LvChi3.*

Las amplificaciones realizadas utilizando los iniciadores diseñados para los transcritos de las 3 isoenzimas de quitinasa (Tabla 1) de camarones peneidos, y regiones de quitín sintasa en insectos, generaron bandas que fueron visualizadas en geles de agarosa (1%) (Figura 11). La primera amplificación de las isoenzimas de quitinasa se realizó utilizando ADNc del tejido del que fueron obtenidos los ADNc homólogos en *M. japonicus*: Chi1 y Chi3 de la glándula digestiva y Chi2 del integumento (pleópodos). El transcrito de ChS fue amplificado de la glándula digestiva y el integumento. Todas las bandas tuvieron un tamaño aproximado al esperado según el diseño de los iniciadores; los productos fueron clonados y se determinó su secuencia.

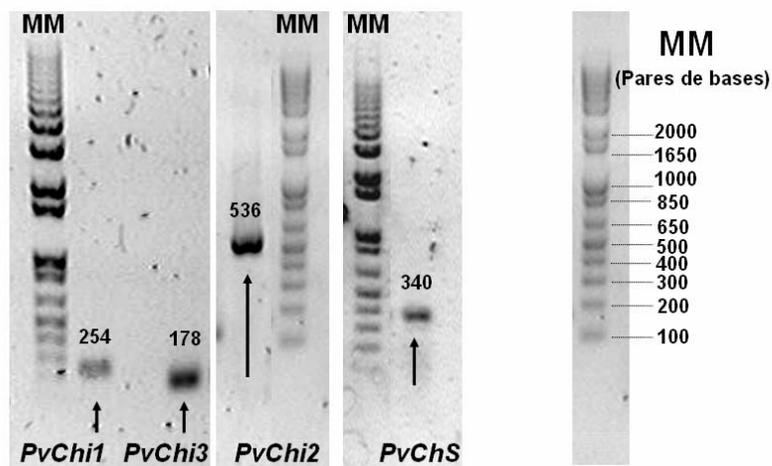


Figura 11. Geles de agarosa (1%) mostrando bandas de *LvChi1* (254 pb), *LvChi3* (178 pb), *LvChi2* (536 pb) y *LvChS* (340 pb). MM= marcador molecular (1 Kb Plus, Invitogen).

Se obtuvieron las secuencias de cada uno de los fragmentos amplificados y se identificaron con base en la similitud respecto a las secuencias ya reportadas en el Genbank, para otros organismos, o bien a la identidad de las secuencias con las ya reportadas para el camarón blanco *P. vannamei*. La secuencia de quitín sintasa (*LvChS*) resultó idéntica independientemente del tejido del cual se obtuvo la amplificación (glándula digestiva o integumento). El tamaño del fragmento obtenido fue 340 pb y mediante el análisis bioinformático (BLAST) se confirmó la identidad de la secuencia, por ser similar a la quitín sintasa de la oruga *Spodoptera exigua* (*SeChSA*, 80% similar en nucleótidos; No. de acceso DQ062153.1) y de la palomilla *Ectropis oblicua* (*EoChSIB*, 79% similar; No. de acceso EU644450.1). En la figura 12 se muestran las diferencias entre las secuencias de *LvChS* (quitín sintasa de *P. vannamei*), *SeChSA* y *EoChSIB*.

Respecto a las secuencias obtenidas de quitinasa, la secuencia obtenida a partir de los fragmentos amplificados con iniciadores diseñados para la isoenzima de quitinasa homóloga a *MjChi1*, presento un tamaño de 254 pb, y resultó ser muy similar (99%) a la secuencia reportada como quitinasa 1 de *P. vannamei* (No. de acceso Genbank EU883591.1), confirmando así su identidad; además esta secuencia es similar a la de la quitinasa 1 de *Penaeus monodon* (*PmChi1*, 93%; No. de acceso AF157503.1), quitinasa 1 de *Fenneropenaeus chinensis* (*FcChi1*, 92%; No de acceso DQ277710.1) y quitinasa 1 de *M. japonicus* (*MpChi1*, 91% similar; No. de acceso D84250.1) (Figura 13).

En el caso de la isoenzima 2, el fragmento de 536 pb, obtenido a partir de ARNm de integumento de *P. vannamei* fue identificado como *LvChi2* y resultó similar al de la quitinasa 2 de *M. japonicus* (*MjChi2*, 88% similar; No. de acceso D89751.1) y a la quitinasa 10 de *Tribolium castaneum* (*TcChi10*, 74% similar; No. de acceso NM\_001042602). La comparación de la quitinasa 2 de *P. vannamei*, con las de *M. japonicus* y *T. castaneum* se muestra en la Figura 14. Un transcrito que codifica para la isoenzima 3 de quitinasa fue obtenida de la glándula digestiva de *P. vannamei*. La secuencia de este fragmento de 178 pb es idéntica a una quitinasa obtenida de la glándula digestiva de *P. vannamei* (No. de acceso AF315689.1). Ésta fue identificada como la isoenzima 3 de quitinasa, por ser similar a la quitinasa 3 de *M. japonicus* (*MjChi3*, 93% similar; No. de acceso AB008027.1) y quitinasa 3 de *F. chinensis* (*FcChi3*, 92% similar; No. de acceso DQ000159.1 (Figura 15).

```

LvChS      1 TACGATCAGGGGAAGATCGATGGCTGTGCACGCTCCTTCTGCAGCGAGGCTACCGCGTC
SeChSA    2607 .....A.....T.A..T.....GT.A..T..A.....T.....T..A
EoCS1B    2600 .....C.....G.....T.A....A..GT.G..C.....T..T.....A..A

LvChS      61 GAGTACTCGGCCGCTCCGACGCTACACCCACGTCCCCGAAGGCTTCAGCGAGTTCTAC
SeChSA    2667 .....A..T.....T.....T...TGT.....T..T.A.....
EoCS1B    2660 ..A....A..T.....T..G....G...TG.....T...A...A.....

LvChS     121 AACGAGCGCCGTCGGTGGGTGCCCTCGACCATGGCTAACATCATGGATCTGCTCCAGGAC
SeChSA    2727 .....A..T.....T.....T..C.....C..C.....T.....CT...TGCC..T
EoCS1B    2720 .....A..T.....C.....T..C.....C..C.....T.....CT.A...GCA..T

LvChS     181 TCCAGGAAGACGATCGAAGTCAACGACAACATCTCCCTTCCGTATATTTCTTACCAGACT
SeChSA    2787 .G..AAC.C..C...A.GA.T....T.....AG...T....CG.A.....TG
EoCS1B    2780 .A..AAC.C....AA.GA.....A..GTC...T..C..AG.A.....TG

LvChS     241 ATGTTGATGGCCGTTACCATCCTTGGCCCAGGAACCATCTTCCCTTATGTTGGTGGGTGCC
SeChSA    2847 .....GT.....A...T.G..T..C.....T..A.....
EoCS1B    2840 .....GT.....G.....G..T..C.....T..A..T.....

LvChS     301 TTCGTGGCTGCCTTCCGAGTGAGTAACTGGCTTTCCTTCC
SeChSA    2907 .....C..T.....TA.TGAC.....AC...T...G
EoCS1B    2900 .....T.....A.CGA...T...AC...A..TG

```

Figura 12. Comparación entre las secuencias de *LvChS*, *SeChSA* y *EoCS1b*. Los puntos indican coincidencias con *LvChS*, las letras indican nucleótidos diferentes.

```

LvChi1      1 AAGTATCCCGACATGAAGACCAACGTCGCTGTGGGCGGCTGGGCCGAGGGCGGCAGGAAG
PmChi1     355 .....C..T.....A...A...C.....A.....
FcChi1     343 .....C.....A..A...C.....T..G..
MpChi1     355 .....G...A.T..C..C..G.....

LvChi1      61 TACTCGCAGATGGTGATGGTCCCCGAGAGGAGGGCGTCCTTCATCAGGAGCGTCGTGCAG
PmChi1     415 .....G....A.....T.....C...
FcChi1     403 .....G.....T.....C...
MpChi1     355 .....G.....A.....C...

LvChi1     121 TTGCTCACCGACTACGGCTTCGACGGGCTGGACTTGGACTGGGAGTACCCTGGCGGACC
PmChi1     475 C.....T.....A.....C..A
FcChi1     463 C.....G.....AT.....A.....C..A
MpChi1     475 C.....T.....C.....A.....C..A

LvChi1     181 GACCGCGGAGGCCAATATGCCGATAAGGACAACCTTCCTTAACTGGTGCAGGAGCTGCGC
PmChi1     535 ....A.....
FcChi1     523 ....A.....A.A.....
MpChi1     535 .....G.....C.....GT.C.....CG....

LvChi1     241 GAGGCCTTCGACAC
PmChi1     595 ..A.....
FcChi1     583 ..A.....
MpChi1     595 .....

```

Figura 13. Comparación entre las secuencias de *LvChi1*, *PmChi1*, *FcChi1* y *MpChi1*. Los puntos indican coincidencias con *LvChi1*, las letras indican nucleótidos diferentes.

```

LvChi2      1 GCTATCGGCGGATGGAACGACTCTGCCGAGACAAGTACAGTCGCCTTGTGAACAACCCC
Pjchi2     673 .....A.....T.....G.....
TcChi10    5635 ..A....A..C.....G..A..T.....TCG..T..G.....A

LvChi2      61 GAAGCTCGCAGGAGGTTCAACGAGCACGTTATTGAGTTCATCAAGACACACAACCTTCGAC
Pjchi2     733 .....A...A.....T.....GG..T...T..T
TcChi10    5695 TCG..C....AC.T...TA.CC.....G.C..T.....G.A..CA.....T...

LvChi2     121 GGTCTCGATTTGGACTGGGAATATCCCGTCTGCTGGCAGGTGAACTGCAAGAAGGGCCCC
Pjchi2     793 .....CC...T.....C.....T..G
TcChi10    5755 ..T.G..CC.A.....G..C...AAG..T...A..CG.T..T..C..A....G

LvChi2     181 GCCTCCGACAAGGCCCGCTTTGCCGAATGGATCAAGGAACTGCACTACGCCTTCAAGCCC
Pjchi2     863 .....T.....T..T...T.....GG.T.....T.....T
TcChi10    5815 ..G..T.....T.A..G.....C.TTG...A...T...G.A.....A...

LvChi2     241 CACGGCTCCTCCTCTCCGCCGCTCTCTCCGAGCAACAAGGTCATCGACGCAGGCTAC
Pjchi2     913 ..T..T..T..T...T..T...T.....TT.....
TcChi10    5875 A.A..GTGG....A..A..T..A..T..G..A..TCGGCGC..GG.A..T...G...

LvChi2     301 GATGTCCCCGCTCTGAACCGGTACCTGGACTGGATCGCCGTCATGACCTACGATTACCAC
Pjchi2     973 ..C..T..T.....T.....A.....C.....G.....T.....

```

```

TcChi10      5935  . . . . . A . . AA . CT . . TC . AA . . . . . T . . . . . TG . . . . . T
LvChi2       361  GGCCACTGGGACAAGAAGACAGGTCACGTCGCTCCTATGTATGTCCACCCTGACGACGAG
Pjchi2       1033  . . T . . . . . C . . C . . . . . T . . . . . C . . T . . . . . A
TcChi10      5995  . . G . . A . . . . . TT . . G . . G . . . . . G . . C . . . . . C . . C . . T . . C . . G . . C . .
LvChi2       421  AACATATACTTCAATTC-TAACTTCACCATCCACTACTGGATGGAGAAGGGCGCCGACCG
Pjchi2       1093  . . . . . CA . AC . . . . . A - . . . . . A . . . . . A . . . . .
TcChi10      6055  G . . GCCACT . . . . . A - . . . . T . . . . . T . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . T . .
LvChi2       481  CAAGAAGCTGATCATGGGCATGCCCTCTACGGCCAGTCCTTCTCCCTGGCA
Pjchi2       1153  . . . . . TG . . C . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . . C
TcChi10      6115  G . G . . . . . A . . CG . G . . . . . A . G . . T . . A . . . . . G . . T . . AT . . . . . T

```

Figura 14. Comparación entre las secuencias de *LvChi2*, *MjChi2* y *TcChi10*. Los puntos indican coincidencias con *LvChi2*, las letras indican nucleótidos diferentes.

```

LvChi3       1  AGTTCGACGTGGAGGACATCGACCCCAAGATCTGCACCCACATCATCTTCGGTTTCGCTG
FcChi3       55  . . . . . A . . . . . C . . . . . C . . . . .
MjChi3       55  . . . . . T . . . . . G . . . . . C . . . . .
LvChi3       61  GACTGGCGCATGATTCCTCGATTAGAGTCCTGGACCCCTGGAACGAGCTGTGCGACAAC
FcChi3       115  . T . . . . . A . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . T . . . . .
MjChi3       115  . C . . . . . GC . . C . . . . . C . . C . . G . . . . .
LvChi3       121  ACGGCAAGTGC GCCTACGACAGGTTACGGCTCTCAAGCAGCAGAATGCCAACTTGAA
FcChi3       175  . . . . . C . . . . . A . . C . . T . . C . . . . .
MjChi3       175  . . . . . C . . . . . C . . . . .

```

Figura 15. Comparación entre las secuencias de *LvChi3*, *FcChi3* y *MjChi3*. Los puntos indican coincidencias con *LvChi3*, las letras indican nucleótidos diferentes.

*Expresión tejido-específica de los transcritos de LvChS, LvChi1, LvChi2 y, LvChi3.*

Una vez identificado un transcrito que codifica para quitín sintasa (*LvChS*) y tres transcritos que codifican para tres isoenzimas de quitinasa (*LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3*), se buscó explicar la función que lleva a cabo cada una de ellas en los diferentes tejidos del camarón blanco, a través del análisis cualitativo de la presencia o ausencia de su ARNm. Los fragmentos amplificados por PCR usando iniciadores específicos para *L8*, *LvChS*, *LvChi1*,

*LvChi2* y *LvChi3* y ADNc proveniente de pleópodos, urópodos, branquias, tallo ocular, glándula digestiva, músculo, hemocitos, tubo digestivo y sistema nervioso, se muestran en la figura 16. L8 es una proteína ribosomal, por lo tanto su ARNm debe encontrarse en las células de todos los tejidos del camarón, como se muestra en la figura 16. Sin embargo, los ARNm de quitín sintasa y las isoenzimas de quitinasa solo se encontraron en algunos tejidos incluidos en el análisis. El transcrito *LvChS* fue encontrado en pleópodos, urópodos, branquias, glándula digestiva y tubo digestivo (banda muy tenue). Los transcritos *LvChi1* y *LvChi3*, se encontraron exclusivamente en la glándula digestiva. Finalmente, el transcrito *LvChi2* fue encontrado en pleópodos, urópodos, branquias, tallo ocular, y tubo digestivo (banda muy tenue). La amplificación de *LvChS* y *LvChi2* del ADNc del tubo digestivo fue comprobada por PCR de 40 ciclos. El ARNm de músculo, hemocitos y sistema nervioso no contiene el transcrito de *LvChS*, así como ninguna de las isoenzimas de quitinasa incluidas en el estudio.

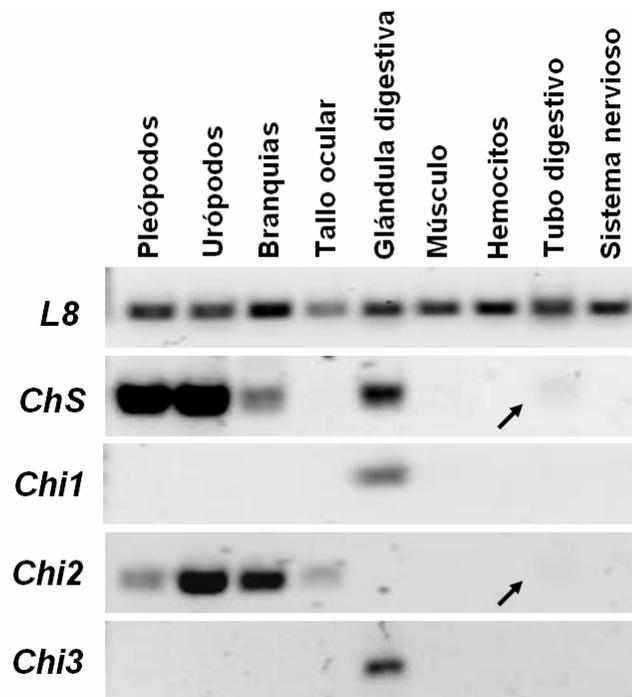


Figura 16. Análisis cualitativo de la presencia de los transcritos de *L8*, *LvChS*, *LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3* en pleópodos, urópodos, branquias, tallo ocular, glándula digestiva, músculo, hemocitos, tubo digestivo y sistema nervioso del camarón blanco. Gel de agarosa al 1%. Las flechas muestran bandas tenues.

#### *Cuantificación de los transcritos de LvChS y LvChi2 en el ciclo de muda*

El análisis de datos de la cantidad de transcritos de *LvChS* y *LvChi2*, incluye la evaluación de un transcrito cuya función sea constitutiva (“*housekeeping*”) y se encuentre en las células de estudio, en niveles constantes ante los estímulos o estresores que se están evaluando. En este estudio se utilizó el gen de la proteína ribosomal *L8* para normalizar los datos de la cantidad de *LvChS* y *LvChi2*. Primeramente, se muestra una curva de disociación de los productos de la amplificación de *L8*, *LvChS* y *LvChi2* a partir de ADNc de urópodos (Figura 17). La presencia de un solo pico por par de iniciadores es necesaria

para asegurar que las mediciones obtenidas corresponden únicamente a un producto, evitando sobreestimaciones. La cantidad del transcrito *L8* presentó variaciones a lo largo del ciclo de muda ( $P \leq 0.05$ ). La cantidad más baja ( $E=1$ ), fue detectada en el estadio C (Figura 18). La cantidad de *L8* en los estadios A, B y  $D_0$  es igual a la cantidad en estadio C. Sin embargo, en los estadios de pre-muda  $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_3$ , se observó un aumento en la cantidad de este transcrito, de hasta 5.3, 3 y 8.6 veces la cantidad en estadio C, respectivamente (Figura 18). Los valores obtenidos de la cuantificación de *L8* fueron utilizados para normalizar a los valores de cantidad de *LvChS* y *LvChi2*. En la figura 19, se muestra la gráfica de la cuantificación de *LvChS* y *LvChi2*. Ambos transcritos presentaron variaciones significativas ( $P \leq 0.05$ ) a lo largo del ciclo de muda. Se observó que en el estadio de post-muda temprana (A), *LvChS* se encuentra 260 veces más abundante que en intermuda (estadio C), cantidad significativamente mayor que en el resto del ciclo de muda. En el estadio de post-muda tardía (B), la cantidad de *LvChS* disminuye a 81 veces la cantidad en el estadio C. Al llegar a la intermuda (estadio C), este transcrito disminuyó a una cantidad basal que se mantuvo constante el resto del ciclo, exceptuando un aumento de 9 veces en el estadio de pre-muda tardía  $D_2$ .

*LvChi2* también presentó cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) a lo largo del ciclo de muda (Figura 19). En la post-muda temprana (estadio A), el transcrito se encontró 9.6 veces más abundante que en la intermuda (estadio C). Posteriormente, se presentó una disminución en su abundancia en el estadio B, hasta 2 veces la cantidad en intermuda. En el estadio  $D_0$ , el transcrito se encontró 15 veces más abundante que en la intermuda, pero esta diferencia no fue significativa, debido a la amplia distribución de los datos de expresión en este punto. En

los siguientes estadios, no se presentaron aumentos significativos en la cantidad de *LvChi2*. la cantidad en pre-muda ( $D_0$ ) es igual ( $P > 0.05$ ) a la cantidad en el estadio A, y la cantidad en el estadio  $D_1$ , es igual a la del estadio  $D_0$ . En los estadios de pre-muda tardía ( $D_2$ - $D_3$ ), se presento una disminución ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad de transcritos con respecto al resto del ciclo (Figura 19).

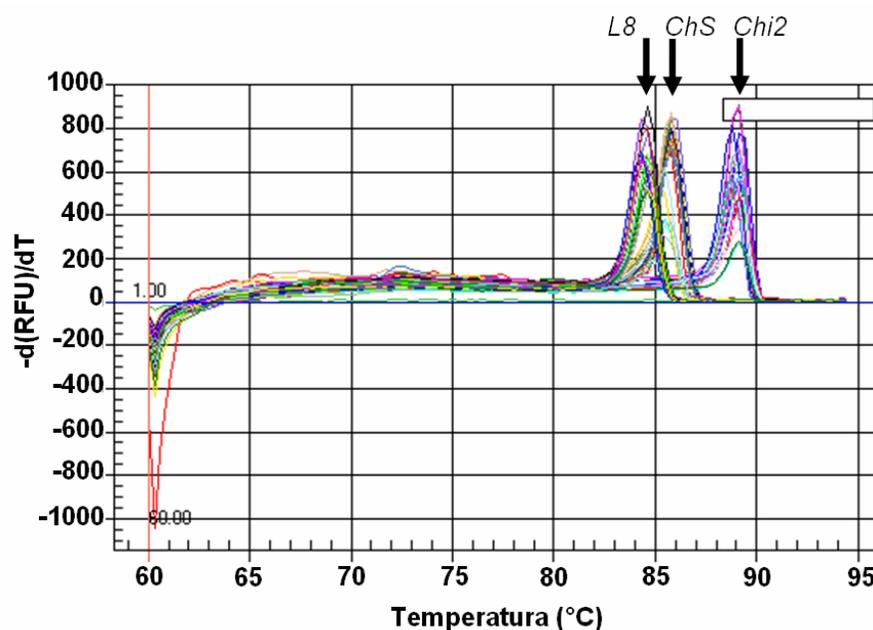


Figura 17. Curva de disociación de los productos generados por PCR para su cuantificación.  $-d(RFU)/dt$  es inversa de la derivada del valor de fluorescencia calculada por el software IQ5 Optical System Software(BioRad). Los picos corresponden a la temperatura de desnaturalización de cada producto.

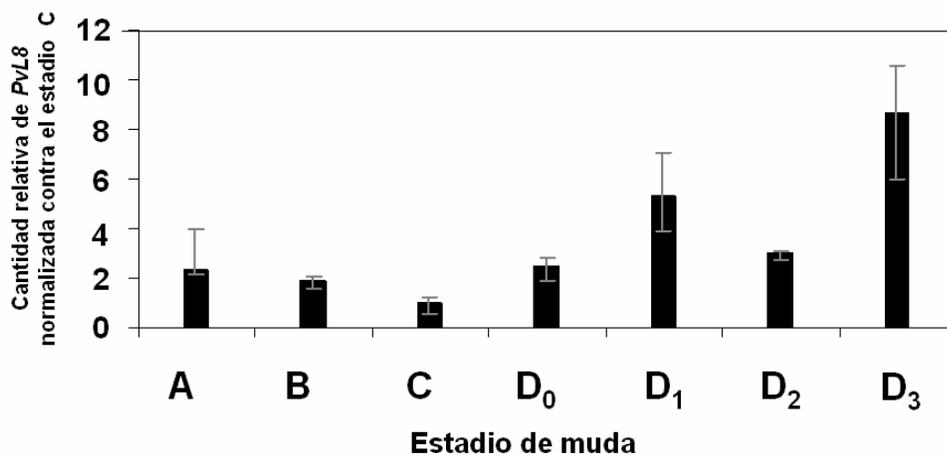


Figura 18. Cantidad del transcrito *L8* a lo largo del ciclo de muda, en los urópodos del camarón blanco.

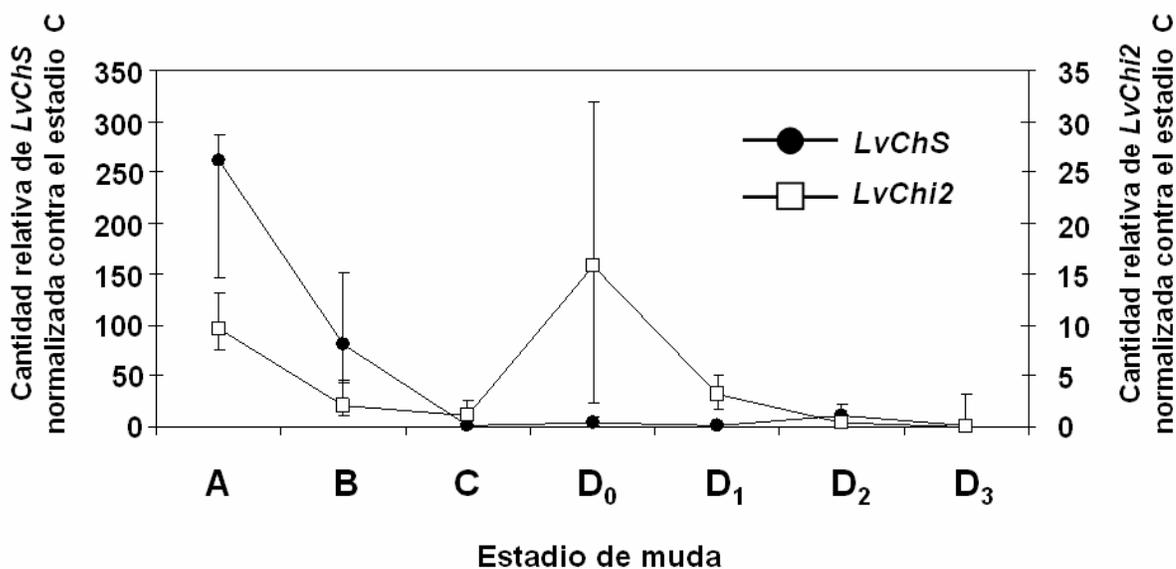


Figura 19. Medianas de la cuantificación de *LvChS* ( $\triangle$ ) y *LvChi2* ( $\square$ ), normalizada contra la cantidad del transcrito *L8* y la abundancia en el estadio C, en los urópodos del camarón blanco *P. vannamei*.

### *Secuencia del ARNm de LvChS y LvChi2.*

Secuencias parciales correspondientes a *LvChS* y *LvChi2* obtenidas en este estudio, fueron publicadas en el Genbank y sus números de acceso son FJ229468 y EU861222, respectivamente. El fragmento obtenido para *LvChS*, es de 340 pb y codifica para un fragmento de la enzima de 113 aminoácidos (Figura 20). La secuencia de aminoácidos es 85 % similar a la de quitín sintasa *ChS1* del gorgojo *Tribolium castaneum*. Para el caso de la secuencia *LvChi2*, se obtuvo un fragmento de 1,219 pb, que incluye una región codificante carboxilo terminal de 303 aminoácidos y una región no transcrita del extremo 3' (3' UTR) de 307 nucleótidos, delimitados por un codón de terminación (TAA), en la base 910-912 de la secuencia. La secuencia de aminoácidos es 92 % similar a la de quitinasa 2 de *P. japonicus*. Se observó la señal de poli-adenilación y posteriormente la cola de poli adeninas. Se comprobó por análisis bioinformático que esta enzima pertenece a la familia 18 de las glycosil hidrolasas, por contener dicho dominio en las posiciones 1-810 de aminoácidos (Figura 21). En la figura 22 se muestra una comparación del ARNm que codifica para la isoenzima 2 de quitinasa (*Lvhi2*) con los ARNm de las isoenzimas 1 y 3 de quitinasa, reportadas anteriormente en Genbank. Se comprobó que existe una similitud más alta de *LvChi2* con el ARNm de la quitinasa 2 de *M. japonicus* (88 %, calculado en BLASTn), que con las isoenzimas 1 y 3 del mismo camarón blanco (sin similitud significativa en BLAST2, y con puntaje de 54 con *LvChi1* y 47 con *LvChi3* en Clustal W2).

```
1   Y D Q G E D R W L C T L L L Q R G Y R V
1   TACGATCAGGGGAAGATCGATGGCTGTGCACGCTCCTTCTGCAGCGAGGCTACCGCGTC
```

21 E Y S A A S D A Y T H V P E G F S E F Y  
 61 GAGTACTCGGCCGCTCCGACGCCTACACCCACGTCCCCGAAGGCTTCAGCGAGTTCTAC  
  
 41 N Q R R R W V P S T M A N I M D L L Q D  
 121 AACCAGCGCCGTCGGTGGGTGCCCTCGACCATGGCTAACATCATGGATCTGCTCCAGGAC  
  
 61 S R K T I E V N D N I S L P Y I S Y Q T  
 181 TCCAGGAAGACGATCGAAGTCAACGACAACATCTCCCTTCCGTATATTTCTTACCAGACT  
  
 81 M L M A G T I L G P G T I F L M L V G A  
 241 ATGTTGATGGCCGTTACCATCCTTGGCCCAGGAACCATCTTCCTTATGTTGGTGGGTGCC  
  
 101 F V A A F R V S N W L S F  
 301 TTCGTGGCTGCCTTCCGAGTGAGTAACTGGCTTTCCTTCC

Figura 20. Secuencia parcial de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la quitín sintasa del camarón blanco *Penaeus vannamei* (*LvChS*). Se muestran en sombreado las secuencias conservadas de quitín sintasa.

1 A I G G W N D S A G D K Y S R L V N N P  
 1 GCTATCGGCGGATGGAACGACTCTGCCGGAGACAAGTACAGTCGCCTTGTGAACAACCCC  
  
 21 E A R R R F N E H V I E F I K T H N F D  
 61 GAAGCTCGCAGGAGGTTCAACGAGCACGTTATTGAGTTCATCAAGACACACAACCTTCGAC  
  
 41 G L D L D W E Y P V C W Q V N C K K G P  
 121 GGTCTCGATTTGGACTGGGAATATCCCGTCTGCTGGCAGGTGAACTGCAAGAAGGGCCCC  
  
 61 A S D K A A F A E W I K E L H Y A F K P  
 181 GCCTCCGACAAGGCCGCTTTGCCGAATGGATCAAGGAACTGCACTACGCCTTCAAGCCC  
  
 81 H G L L L S A A V S P S N K V I D A G Y  
 241 CACGGCCTCCTCCTCTCCGCCGCCGTCCTCTCCGAGCAACAAGGTCATCGACGCGAGGCTAC  
  
 101 D V P A L N R Y L D W I A V M T Y D Y H  
 301 GATGTCCCGCTCTGAACCGGTACCTGGACTGGATCGCCGTCATGACCTACGATTACCAC  
  
 121 G H W D K K T G H V A P M Y V H P D D E  
 361 GGCCACTGGGACAAGAAGACAGGTCACGTCGCTCCTATGTATGTCCACCCTGACGACGAG  
  
 141 N I Y F N S N F T I H Y W M E K G A D R  
 421 AACATATACTTCAATTCTAACTTCACCATCCACTACTGGATGGAGAAGGGCGCCGACCGC  
  
 161 K K L I M G M P L Y G Q S F S L A S A S  
 481 AAGAAGCTGATCATGGGCATGCCCTCTACGGCCAGTCCTTCTCCCTGGCATCAGCCTCC  
  
 181 D N G L N Q K A Y G R G T A G E Y T R A  
 541 GACAACGGACTCAACCAGAAGGCGTACGGACGCGGCACTGCAGGAGAATACACGAGGGCC  
  
 201 G G F L A Y Y E I C D R V L N R G F T V  
 601 GGCGGCTTCCGCGCTACTACGAGATCTGCGACCGCGTCTTGAACCGTGGCTTACCGTT  
  
 221 V K D P E G R M G P Y A Y N G N Q W F G  
 661 GTCAAAGATCCCGAAGGCAGAATGGGTCTTATGCCTACAATGGAAACCAGTGGTTCGGA  
  
 241 Y D D I A M I R Y K S E W V K K M G L G  
 721 TACGATGACATCGCTATGATTGATAACAAGTCCGAATGGGTCAAGAAGATGGGTCTCGGC  
  
 261 G G M I W A L D L D D F S N R C G C E P  
 781 GGCGGCATGATCTGGGCCCTCGACCTCGACGACTTCAGCAACCGCTGCGGCTGCGAACCC  
  
 281 H P L L R T I N R V L R S H P D P D P R  
 841 CACCGCTCCTCCGCACTATCAACAGAGTCTGAGGAGCCATCCCGACCCAGATCCAGG  
  
 301 C N M STOP  
 901 TGCAACATGTAAAGGAGGAGGAAAAAAAAAGCGAGGGAGGGAAGCGAGCCCGAAGGAGGGAC  
 961 GCAGACATCCGATTTTCGCCGAATGTTCTCGCTCGATCGGACATGCGGCGGCCGATGCTGA  
 1021 TCTGCTATATCGGATCCTGAGATGCTAGATAAAGTGCTTATCTGCTGCGTCTTAGGGAAT  
 1081 TGTGGAGATGCTGGGAATATCAGTCGAAATGAAATGAAATGTGTTGGTTCTGCGGACTCG  
 1141 CGCCTTGTAGTTTTTCATAATGTGGAGGCGAGCAAGGTGACCATAAATGTAAAGATTCTCT  
 1201 CAATGACAATATCAAAATTTAAAAAAAAA

Figura 21. Secuencia parcial de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoenzima 2 de la quitinasa del camarón blanco *P. vannamei* (*LvChi2*). Se muestran en sombreado claro las regiones conservadas de quitinasas. En sombreado oscuro se muestra el codón de terminación. La señal de poli-adenilación se muestra subrayada. Nucleótidos 1-810, pertenecen al dominio de las glycosil hidrolasas familia 18, y se muestran encerrados en el cuadro.(No. de acceso Genbank EU861222).

```

LvChi2    1  ---GCTATCGGCGGATGGAACGACTCTGCCGGAGACAAGTACAGTCGCCTTGTGAACAAC
LvChi1   292  GTC...G.G....C...GC...G---.G...CAGG.....TCG.AGA.G...TGGT.
LvChi3   259  TTG..CG....A..C.....G---.GGTC.CCT.....TCCAAGA.G.CAGC.G.T

LvChi2    58  CCCGAAGCTCGCAGGAGGTTCAACGAGCACGTTATTGAGTTCATCAAGACACACAAACTTC
LvChi1   349  ....GAGGA.GGC.TCC....T.AG.AG...CG.GC....GC...CCGACT..GG....
LvChi3   316  ..A.T.CTGA.G.ACC.A...T.ACCTC.TCA..C...C..C.G....A....GG...T

LvChi2   118  GACGGTCTCGATTTGGACTGGGAATATCCCGTCTGCTGGCAGGTGAACTGCAAGAAGGGC
LvChi1   409  .....G..G..C.....G..C..T.G.-----..C..C.GA.CGCGGA...
LvChi3   376  .....C.....CA.....G..C..-----..CACAGCGAGGC..G

LvChi2   178  CCCGCCTCCGACAAGGCCGCTTTGCCGAATGGATCAAGGAACTGCACTACGCCTTCAAG
LvChi1   460  .AATATG....T....A.AA...CCTTA..CT.G.GCR...G....G.G.G.....G.C
LvChi3   421  AG.C..GAT...T.T.A.AA...C.T.ATCCTC..GGCT..G..CA..C.A...C.GC.C

LvChi2   238  CCCCACGGCCTCCTCC-----TCTCCGCCGCGTCTCTCCGAGCAACAAGGTCATCGAC
LvChi1   520  A.GGTG..GT.GGG.TGGGAGA..A.GTG.....GC.CGT.GC...GTTCCG.C.GC.G
LvChi3   481  G.GG.G..GA.G..G.-----.GA.G.....G..CG..G....GGCCAC.....

LvChi2   292  GCAGGCTACGATGTCCCCGCTCTGAACCGGTACCTGGACTGGATCGCCGTCATGACCTAC
LvChi1   580  .AG.....C....G..TCAG..CTG.A.CCTG.....GCC...CA.C.G....G...
LvChi3   535  C.G.C....A.C..G..A.AGT..TCTAA..C...C...CT....AA...G.....

LvChi2   352  GATTACCACGGCCACTGGGACAAGAAGACAGGTCACGTCGCTCCTATGTATGTCCACCCT
LvChi1   640  ..CCTG.GG...A.....TTGGCTTCG.G.ACGT.CA.T.CATGC...CAGG.GG..C
LvChi3   595  ...CTG.....GC.....G.CT.C..TCAC..TCAGT..GG.C.C..C.CT..T...

LvChi2   412  GAC---GACGAGAACATATAC-----TTCAATTCTAACTTCACCATCCACTACTGGATG
LvChi1   700  .G.CTGS....TGGGCC...GAGAAGC.G..CGTG...GA.GG.GCT.T.CTG...G..
LvChi3   655  CT.---.....GGAGATA.TGCCCTC..G...GTGG....TG.A...AGT..T....C

LvChi2   463  GAGAA-GGGCGCCGACC GCAAGAAGCTGATCATGGGCATGCCCTCTACGGCCAGTCCTT
LvChi1   760  ..ATTC...T.T.CG.-.TG.T.....G.GG.C..G.C...AT.T....G.GCA...A
LvChi3   712  .....-...A..TCG..C.GGCC..A.CGC.C.....C..G.....T.GA.G..G

LvChi2   522  CTCCCTGG-----CATCAGCCTCCGACAACGGACTCAACCAGAAGGCGTACGGAC
LvChi1   819  .A.G....GTGACCCTAA..A..A.GA..TG..-..CG.C..T.ARR...TG.G.G...G
LvChi3   771  GA....-----..GC....AG.AGG..ACCGGCT.TTAC.CTCCCT.CG.ACCA

LvChi2   572  GC--GGCACTGCAGGAGAATACACGAGGGCCGGCGGCTTCCTGGCCTACTACGAGATCTG
LvChi1   878  ..--...CTGC.C..CCCC..T..C.AC...ACA...ACTA...T...T.....T..
LvChi3   819  ..CG..TG....T..G..C.GG..C...AG.CCT...A.G..T.G....A.T.....

```

```

LvChi2 630 CGACCGCGTCTTGAACCGTGGCTTCACCGTTGTCAAAGATCCCGAAGGCA----GAATGG
LvChi1 936 .---.T.A.GA...GGAG.A..CGGAGTGG...G.TCGCTA...T.A..TCG-.CC.C.
LvChi3 879 TT..ATGCGGACT.CT.AG.A..GG.....A..GG.T..C..T.CCATG.ACGA.CCCTA

LvChi2 686 GTCCTTATGCC--TACAATGGAAACCAGTGGTTCGGATACGATGACATCGCTATGATTCCG
LvChi1 992 TC..C.TCA.T--C....A..CG.....G.G..C.....G...CC..AC.GCC.CAA
LvChi3 939 CA...AC.A.TTCCC..TGAAC...ATC....G.TCG.....CC..GCA..CTCCG.CGC

LvChi2 744 ATACAAGTCCGAATGGGTCAAGAAGATGGGTCTCGGCGGCGGCATGATCTGGGCCCTCGA
LvChi1 1050 GAT....ATG..C.TCA..CGCG..CA....TATCT.....C.....C.....A....
LvChi3 999 TATT...G.A..G.AT.CG...TCT.AA..CT.G.CT...AC....G.....AGTG.G..

LvChi2 804 CCTCGACGACTTCAGCAACCGCTGCGGCTGCGAACCCACCCGCTCCTCCGCACTATCAA
LvChi1 1110 T.AG.....C.G...T.G..T..AA.G.G..AAA.....A.GA.GAA...C..TT.
LvChi3 1059 GAC.....C.TGGATTA..TCA.AA.CGCAAAT...AT...A.AAAG..C..GGT

LvChi2 864 CAGAGTCCTGAGGAGCCATCCCGACCCAGAT-CCCAGGTGCAACATG
LvChi1 1170 ..AT.G.A...A.GA.T.CGTA.T...T.T.G.T.CCACT.TT.C.C
LvChi3 1119 TGAG..GT.TG.TG.TGGCAG.AT.A.C..AC.T.CACC..TC.CCA

```

Figura 22. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de las isoenzimas de quitinasas de camarón blanco *P. vannamei*. *LvChi2* fue obtenida en este trabajo. *LvChi1* (no. de acceso Genbank EU883591.1) y *LvChi3* (no. de acceso Genbank AF315689) habían sido reportados anteriormente. La parte sombreada corresponde a los nucleótidos conservados, mostrados en la figura 21.

## **Discusión**

*Función biológica de LvChS, LvChi1, LvChi2 y LvChi3.*

### **Quitín Sintasa**

Aunque los procesos de síntesis de quitina en los crustáceos han sido vagamente descritos en la literatura, y no existe ninguna secuencia del gen, ADNc ó proteína reportada en el Genbank, la presencia de una enzima encargada de la síntesis de quitina ya había sido comprobada a través del aislamiento de microsomas con características catalíticas de este grupo de enzimas, además de ensayos de inhibición (diflubenzuron y UDP), utilizando como modelo una especie de artemia (Horst, 1981; Horst, 1983). Además, anteriormente se habían cuantificado fluctuaciones en los azúcares de la hemolinfa de cangrejo *Emerita asiatica*, en las que se observó que a pesar de la dilución de la hemolinfa por el agua absorbida en los estadios de pre-muda, hay un aumento en la concentración de azúcares precursores de la quitina en los estadios en los que se forma la nueva cutícula, previo a la muda (Parvathy, 1970).

En este trabajo se demostró la presencia de un ADNc que se encuentra transcrita tanto en las células tanto del integumento, como en la glándula digestiva del camarón blanco *P. vannamei*, y que codifica a una proteína similar a algunas quitín sintasas de insectos (Figura 12). El fragmento de 340 pb presentado en este estudio (No. de acceso Genbank FJ229468) es el primer reporte de una secuencia de nucleótidos que codifica para una quitín sintasa en

el subphylum Crustacea, confirmando que los crustáceos utilizan una enzima similar a la utilizada por los insectos para la síntesis de quitina. Al analizar las secuencias de *LvChS* obtenidas a partir del integumento y la glándula digestiva, se observó que ambas secuencias son idénticas. Aunque este hecho podría sugerir que una sola isoforma de la enzima esta encargada de la síntesis de la quitina del exoesqueleto y de la membrana peritrófica, no se puede descartar la posibilidad de que las bandas amplificadas pertenezcan a distintos ADNc, o incluso la presencia de distintas isoformas que no fueron amplificadas en este estudio. Esta sugerencia está apoyada por las observaciones descritas para insectos en la literatura. Diferentes isoformas de la enzima han sido detectadas participando de manera tejido-específica (Arakane *et al.*, 2005), estadio-específicas (Gagou *et al.*, 2002) e incluso se sabe de la generación de isoformas por *splicing* alternativo, lo cual significa que dos o más isoformas comparten regiones de un gen para formar el ADNc (Arakane *et al.*, 2004; Hogenkamp *et al.*, 2005). Para comprobar que dichos fenómenos ocurren en el caso del camarón blanco *P. vannamei*, es necesario obtener la secuencia de ADNc de quitín sintasa de cada uno de los tejidos en los cuales se encuentra el transcrito, así como la secuencia a partir de ADNg, lo que permitiría definir la presencia de intrones/exones. El fragmento secuenciado en este trabajo puede ser útil para iniciar dichos estudios en organismos crustáceos.

Como se muestra en la figura 16, *LvChS* fue detectada en los pleópodos, los urópodos, las branquias, la glándula digestiva y muy ligeramente en el tubo digestivo. No se determinó la secuencia del fragmento amplificado en cada uno de estos tejidos, sin embargo se utilizaron iniciadores específicos para la secuencia obtenida del integumento y la glándula digestiva,

y todas las bandas tuvieron el mismo tamaño, por lo cual se sugiere que la secuencia del fragmento amplificado de las branquias y el tubo digestivo, debe tener la misma secuencia obtenida de integumento y la glándula digestiva, sin descartar la posibilidad de isoformas, discutida anteriormente. Aunque la única función bioquímica de la quitín sintasa es la de polimerizar quitina, en los organismos, la quitina lleva a cabo diferentes funciones; además de formar parte del exoesqueleto, esta presente en la membrana peritrófica, la cual se encuentra a lo largo del tracto digestivo, es desechada en la muda y debe regenerarse (Ceccaldi, 1989; Merzendorfer y Zimoch, 2003); esto explica la presencia de *LvChS* en la glándula digestiva y el tubo digestivo, demostrada en este estudio.

### **Quitinasas**

En los camarones peneidos se han identificado tres ADNc que codifican a tres isoenzimas de quitinasas. En este trabajo se ha seguido la nomenclatura propuesta para los transcritos que codifican a las tres quitinasas encontradas en *M. japonicus*, *MjChi1*, *MjChi2* y *MjChi3* (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe y Kono, 1997; Watanabe *et al.*, 1998). En los transcritos de quitinasa identificados de las especies *Fenneropenaeus chinensis* (*FcChi1* y *FcChi3*), *Penaeus monodon* (*PmChi1*) (Tan *et al.*, 2000) y la quitinasa 1 de *P. vannamei* publicada en el Genbank, se respetó dicha numeración; sin embargo, la secuencia de quitinasa del camarón blanco similar a la isoenzima *MjChi3*, no ha sido identificada con esta nomenclatura en Genbank. En las siguientes secciones, el fragmento amplificado de *LvChi3* será nombrado así para facilitar la comprensión y estructura de la discusión. Según los fragmentos encontrados en este estudio, el camarón blanco *P. vannamei* sintetiza al menos

las 3 isoenzimas de quitinasas previamente descritas en camarones peneidos: *LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3*. *LvChi2* es el primer reporte de una quitinasa cuticular en el camarón blanco.

Aunque la función de todas las quitinasas es la de hidrolizar los enlaces glicosídicos internos de las cadenas de quitina, las diferentes isoenzimas de quitinasas tienen funciones fisiológicas diferentes. Para el caso de las quitinasas 1 y 3 de *M. japonicus*, que fueron obtenidas de la glándula digestiva y están ausentes en el integumento, se presume que su función es de digerir la quitina contenida en el alimento y de la membrana peritrófica (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1998). En este trabajo se ha extendido el estudio hacia otros tejidos. Los transcritos de *LvChi1* y *LvChi3* se encontraron exclusivamente en ADNc de glándula digestiva (Figura 12). La glándula digestiva está encargada de secretar todas las enzimas que en conjunto hidrolizan los componentes de los alimentos (Ceccaldi, 1989), por lo tanto la función más probable de las enzimas codificadas por estos transcritos es la de digestión. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la enzima se transporte hacia otros tejidos, como la cutícula, y llevar a cabo la hidrólisis de la quitina del exoesqueleto previo a la muda, ya que las Quitinasas son secretadas al exterior de las células que las sintetizan (Arakane *et al.*, 2003). Además, Tan *et al.* (2000) encontraron que la Quitinasa 1 sintetizada en células de la glándula digestiva, presenta variaciones durante el ciclo de muda, indicando una posible función relacionada con este proceso. Para definir la función de estas enzimas, se debe hacer un análisis de la abundancia de los transcritos a lo largo del ciclo de muda, o bien, trabajar con la localización de la enzima en la hemolinfa o el exoesqueleto del camarón.

De las quitinasas encontradas en este estudio, el transcrito *LvChi2* es el único que se encontró en células del integumento (pleópodos y urópodos). Esta enzima es homóloga a *MjChi2*, que fue descrita como encargada de hidrolizar la quitina del exoesqueleto previo a la muda (Watanabe y Kono, 1997). En dicho estudio, se describió la secuencia de *MjChi2*, sin embargo no se llevó a cabo ningún estudio para probar su funcionamiento a lo largo del ciclo de muda. Por lo tanto, en este estudio, el fragmento amplificado de 536 pb (Figura 14) corresponde a una quitinasa que por su presencia en la cutícula, probablemente esta relacionada con la muda. De los tejidos estudiados, el transcrito *LvChi2* está presente en todos los tejidos que están en contacto con el exoesqueleto: pleópodos, urópodos, branquias y tallo ocular (Figura 12). Esta característica es similar a la descrita para la quitinasa de *Bombix mori* (*BmChi-h*), que esta presente en todos los tejidos que contienen quitina en el organismo (Daimon *et al.*, 2005). También se observó una banda muy tenue en tubo digestivo, que debe estar relacionada con la banda tenue de *LvChS* en el mismo tejido. Aunque en trabajos anteriores se infiere que las quitinasas codificadas en la glándula digestiva degradan la quitina de la membrana peritrófica (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1998), en este trabajo la quitinasa cuticular *PvChi2* también se encontró en el tubo digestivo, lo que sugiere que además de sintetizar la quitina del exoesqueleto, *LvChi2* debe estar encargada de la degradación de la quitina de la membrana peritrófica en el tubo digestivo, sintetizada por *PvChS*.

En resumen, se pueden separar a las quitinasas encontradas en camarón blanco en dos tipos, las digestivas, producidas en la glándula digestiva y encargadas de degradar la quitina del

alimento (*LvChi1* y *LvChi3*); y la relacionada con muda (*LvChi2*), presente en el integumento y tubo digestivo, y que al parecer, degrada la quitina sintetizada por la *LvChS* del organismo (del exoesqueleto y membrana peritrófica). Esta explicación contrasta con las características de quitinasas presentes en insectos, la cuales son tejido y estadio dependientes y sus isoenzimas están especializadas para hidrolizar la quitina del exoesqueleto o la membrana peritrófica (Arakane *et al.*, 2005). A partir de estos hallazgos, se pudo plantear la hipótesis de que *LvChi2* seguramente presenta cambios de acuerdo al ciclo de muda de los organismos, por lo cual este transcrito fue elegido para un análisis cuantitativo detallado en cada estadio de muda, esperando que al ser comparado con la evaluación de *LvChS*, se pueda aceptar o rechazar la hipótesis planteada originalmente.

#### *LvChS y LvChi2 durante el ciclo de muda.*

Debido a que el análisis de la abundancia de los transcritos de estudio, debe ser normalizada utilizando una condición basal o estándar, y un gen constitutivo, cuya abundancia no debe variar a lo largo del estudio, las cuantificaciones de los transcritos fueron normalizadas contra la cuantificación en el estadio de intermuda (estadio C) y la cuantificación del transcrito de la proteína ribosomal L8. En el estadio C, los organismos presentan mínimas actividades relacionadas con la muda (Kuballa y Elizur, 2007). Primeramente se evaluó la cantidad de ARNm de *L8* durante el ciclo de muda de *P. vannamei* (Figura 18). Si bien la abundancia de *L8* presentó variaciones a lo largo del ciclo ( $P \leq 0.05$ ) de hasta un aumento de 9 veces en estadio D<sub>3</sub>, este gen fue el que presentó

menos variaciones a lo largo de los estadios, comparado con *LvChS* y *LvChi2*. Estas variaciones pueden ser atribuidas a dos razones. La primera, puede ser que los organismos verdaderamente varían la cantidad de *L8* durante el ciclo de muda; la segunda, que las variaciones son atribuibles a las reacciones de transcripción reversa (ARNm  $\rightarrow$  ADNc). Este paso de la preparación de las muestras es el menos controlado del proceso. Para utilizar al gen *L8* como estándar para normalizar la cuantificación de los otros transcritos, asumimos que la segunda explicación es válida, y que los organismos mantienen constante la cantidad de *L8* durante todo el ciclo de muda. De esta manera, el valor presentado de la cuantificación de los transcritos de *LvChS* y *LvChi2*, está normalizado contra el valor obtenido para *L8* en las mismas condiciones, así como el valor obtenido para el mismo transcrito en el estadio de intermuda.

En la figura 19 se muestra la abundancia de ARNm de *LvChS* y *LvChi2* en los estadios de muda del camarón blanco *P. vannamei*. *LvChS* presenta una tendencia muy clara a lo largo del ciclo de muda, debido a que la máxima cantidad del transcrito fue detectada en la post-muda (estadio A), y la mínima cantidad en los estadios de intermuda y posteriores, con un ligero aumento en el estadio D<sub>2</sub>. En el estadio A, la cantidad de *LvChS* es más de 260 veces mayor a la del estadio D<sub>3</sub>, indicando una regulación positiva muy pronunciada después de la ecdisis. La abundancia de este transcrito disminuye en el estadio B siendo 81 veces más abundante con respecto al estadio C ( $P \leq 0.05$ ). Se sabe que el exoesqueleto es completado y se encuentra totalmente rígido hasta el estadio C, por lo cual se esperaba que la máxima cantidad de *LvChS* fuera detectada en la post-muda, cuando los organismos aun tienen la necesidad de sintetizar quitina que formará parte de la endocutícula (Skinner, 1962; O'Brien

*et al.*, 1991). El acelerado proceso de síntesis de quitina en la post-muda, además de requerir grandes cantidades de la enzima que lleva a cabo la polimerización, deberá incluir una producción del sustrato (UDP-NAc-Glc, Figura 5) de similares proporciones. Esta observación apoya a Parvathy (1970), que describió un aumento en las concentraciones de azúcares en hemolinfa en los estadios de pre-muda, utilizando un cangrejo como modelo de estudio; asimismo, en camarón blanco *P. vannamei*, se describió un aumento en las concentraciones de glucosa en la pre-muda (Chan *et al.*, 1988). Estos azúcares son precursores de la NAc-Glc. En la intermuda, la cantidad de *LvChS*, ajustada a un valor numérico de 1, se considera basal por que en este estadio no existe ninguna actividad relacionada con la muda (Kuballa y Elizur, 2007). Aunque en los estadios posteriores a la intermuda no se registraron diferencias significativas con respecto a dicho estadio, sí se registra un ligero aumento en la cantidad del transcrito en el estadio D<sub>2</sub>, con respecto al estadio D<sub>3</sub> ( $P \leq 0.05$ ). La cantidad del transcrito en D<sub>2</sub>, es 10 veces mayor a la cantidad en D<sub>3</sub> y D<sub>1</sub>. Este aumento en el estadio D<sub>2</sub> puede estar relacionado con la necesidad de los organismos a partir de la pre-muda temprana (D<sub>0</sub>-D<sub>1</sub>) para sintetizar la epicutícula y exocutícula nuevas. La aparición de *LvChS* en la pre-muda tardía (D<sub>2</sub>) puede deberse a que la capa más exterior del exoesqueleto (epicutícula), no contiene quitina, por lo cual solo se necesita quitina para formar la segunda capa, la exocutícula, que sí contiene quitina (O'Brien *et al.*, 1991; Promwikorn *et al.*, 2004a). De esta manera, todas las variaciones de *LvChS* observadas durante el ciclo de muda, pueden ser explicadas por los fenómenos biológicos que los organismos llevan a cabo.

Por otro lado, se cuantificó el transcrito de *LvChi2* durante el ciclo de muda. El patrón de expresión de este transcrito a lo largo del ciclo de muda es más complejo (Figura 19). Aunque la cantidad de *LvChi2* en intermuda (estadio C), se considera basal y fue ajustada a un valor numérico de 1, se observó que el transcrito se encuentra en menores cantidades en los estadios de pre-muda D<sub>2</sub> (E = 0.45) y D<sub>3</sub> (E = 0.03). Aunque después de la ecdisis, los organismos deben sintetizar la quitina del exoesqueleto, se encontró que en el estadio A, *LvChi2* se encuentra 10 veces más abundante que en el estadio C ( $P \leq 0.05$ ). Posteriormente hay una disminución ( $P \leq 0.05$ ) y en el estadio B, la cantidad de *LvChi2* es solamente 2 veces mayor a la del estadio C ( $P > 0.05$ ). En la pre-muda temprana (D<sub>0</sub>-D<sub>1</sub>) se registró un aumento en la cantidad de *LvChi2* de 15 veces en D<sub>0</sub> y 3 veces en D<sub>1</sub>, con respecto a la cantidad en el estadio C. Un patrón muy similar fue descrito por Tan *et al.* (2000) (Figura 9), quienes también describieron un aumento en la cantidad de transcritos en los estadios A y B, cantidades basales en el estadio C, un aumento muy pronunciado en la pre-muda (D<sub>2</sub>) y una supresión del transcrito antes de la ecdisis (D<sub>3</sub>). No encontramos explicación biológica para el aumento en la cantidad de transcritos en los estadios de post-muda, pero también fueron registrados cuando se midió actividad de enzimas quitinolíticas a lo largo de los estadios de muda en el krill del atlántico *Euphausia superba* (Figura 8) (Buchholz, 1989). En cuanto al aumento de la concentración de los transcritos de quitinasa en la pre-muda, este efecto ha sido descrito anteriormente (Watanabe y Kono, 1997), pero normalmente es identificado anteriormente en estadio D<sub>2</sub> (Tan *et al.*, 2000). El aumento del título de ecdisona en camarón blanco fue encontrado en el estadio D<sub>1</sub> (Chan *et al.*, 1988), mientras que la disminución de MIH se observó en los estadios D<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> (Chen *et al.*, 2007) y el aumento de la concentración de proteína en la hemolinfa se encontró en D<sub>0</sub> (Chan *et al.*,

1988). Por otra parte, el incremento en la actividad quitinolítica en el krill del atlántico se encontró entre los estadios D<sub>0</sub> y D<sub>1</sub> (Buchholz, 1989). Por lo tanto, aunque es un hecho que este aumento de *LvChi2* es pronunciado y está relacionado con la necesidad de degradar la quitina del viejo exoesqueleto para poder reabsorber la NAc-Glc, existen ligeras discrepancias en la definición del estadio en el que se enciende este proceso. Estas diferencias podrían deberse a tres razones: la primera, la correcta identificación de los estadios de muda y las posibles variaciones en la micro-estructura de las setas y epidermis entre especies, estadios de desarrollo, técnicas de identificación, equipo utilizado, e incluso del técnico que realiza la identificación. La segunda explicación es que los organismos encienden los diversos procesos relacionados con la muda en estadios diferentes, y no simultáneamente, lo cual también podría depender del estadio de desarrollo o tejido utilizado; y además, que dichos procesos se ven afectados (inducidos o inhibidos) por el estrés que ocasiona la manipulación. Este último factor es el más probable, debido a que se sabe diversos tipos de estrés pueden inducir a la muda prematuramente en los organismos (Mikami, 2005). Para contrarrestar esta fuente de error, todos los organismos de este estudio fueron manipulados de la misma manera.

En la hipótesis planteada, se sugirió que por su función fisiológica opuesta, la presencia de *LvChS* y *LvChi2* sería de manera excluyente temporal a lo largo del ciclo de muda. Se observó que mientras *LvChS* es abundante en la post-muda, el aumento más pronunciado de *LvChi2* se da en la pre-muda temprana, confirmando parcialmente la hipótesis. Para confirmar definitivamente esta hipótesis, en futuros estudios se deberá tomar en cuenta los transcritos de otras enzimas quitinolíticas, así como de isoformas de ChS, y sus variaciones

a lo largo del ciclo de muda. Asimismo, la medición de actividad enzimática, y no de ARNm, es una variable que tiene un valor biológico mayor para realizar estudios de fisiología. Una patrón excluyente temporal entre transcritos de ChS y Chi ya había sido descrito a lo largo de los estadios de desarrollo del gusano colloguero *Spodoptera frugiperda*. Este es el primer trabajo en el que se describe detalladamente los procesos de síntesis y degradación de la quitina en el exoesqueleto, utilizando un crustáceo como modelo. La cantidad de transcritos de *LvChS* y *LvChi2* en intermuda es igual ( $P > 0.05$ ), por lo tanto se puede hacer una comparación directa entre la presencia de los transcritos de ambas enzimas. A pesar de que teóricamente la quitina sintetizada por *LvChS* debe ser degradada por *LvChi2*, el valor máximo de la cantidad de transcrito de la primera, supera por más de 15 veces la cantidad de la segunda (E = 260 de *LvChS* en estadio A, contra E = 15 de *LvChi2* en estadio D<sub>0</sub>). Esto puede deberse a tres razones. Primero, los antecedentes sugieren que debe haber al menos una enzima mas que colabore con la degradación de la quitina, que deberá ser una N-Acetilglucosaminidasa (Buchholz, 1989; Merzendorfer y Zimoch, 2003). Segundo, el mecanismo de acción y las características de la catálisis de cada una de las enzimas: una molécula de quitinasa, puede realizar su reacción de hidrólisis probablemente varias veces sobre varias cadenas diferentes de quitina (Horn *et al.*, 2006), mientras que una quitín sintasa activa, está conformada por 2 moléculas (provenientes de un transcrito cada una) y pueden sintetizar una cadena de quitina a la vez (Merzendorfer, 2006) (Figura 6). Finalmente, las quitinasas no degradan toda la quitina sintetizada por la quitín sintasa, sino que solo degradan una fracción (75% aproximadamente), y el resto es desechado intacto en la exuvia (Skinner, 1985). La combinación de estos tres factores podría ser la causa de la necesidad de una cantidad tan alta de *LvChS* en la post-muda.

Los crustáceos están limitados por un exoesqueleto rígido, por lo cual crecen discontinuamente a través del desecho de su exoesqueleto y la síntesis de uno nuevo. Sin embargo, los procesos bioquímicos y fisiológicos que rigen el complejo proceso de la muda no son discontinuos, sino que presentan variaciones dinámicas a lo largo de cada estadio, y al interactuar unos con otros forman un mecanismo coordinado que resulta en cambios de comportamiento del organismo, la ecdisis y el crecimiento. De esta manera, el metabolismo de la quitina del exoesqueleto, que está regido por una cascada de señales hormonales y eventos bioquímicos, es ejemplo de un proceso continuo y coordinado, en el cual participan al menos dos enzimas, una quitín sintasa y una quitinasa. Este hecho ha sido confirmado por la presencia de ARNm de dichas enzimas, en células del integumento del camarón blanco que varían a lo largo del ciclo de muda.

*Secuencia del ARNm de LvChS y LvChi2.*

### ***LvChS***

Se ha publicado una secuencia parcial correspondiente a LvChS (No. de acceso Genbank FJ229468). Esta secuencia corresponde a 340 pb de un transcrito que codifica para una enzima encargada de sintetizar la quitina del exoesqueleto y la membrana peritrófica del camarón blanco *P. vannamei*. Las ChS que presentaron mayor similitud a *LvChS* son las

de *Spodoptera exigua* y *Ectropis obliqua*, que tienen un tamaño total de ADNc de 5207 y 5496 pb, respectivamente. Este dato es útil para inferir un valor aproximado de la secuencia desconocida de *LvChS*. Aunque la secuencia es corta, puede ser identificada como una ChS debido a que presenta las regiones conservadas que son la huella digital de las ChS: “EDR” y “QRRRW” (Tellam *et al.*, 2000), que se muestran sombreadas en la figura 20.

### ***LvChi2***

Se ha publicado una secuencia parcial de *LvChi2* (No. de acceso EU861222) de 1219 pb, que incluye una región codificante de 909 pb, y una 3' UTR de 307 pb. Además de presentar alta similaridad con la secuencia codificante de *MjChi2*, la longitud de la 3' UTR entre las dos secuencias también es similar (3'UTR de *MjChi2* de 397 pb) (Figura 21). La identidad de la proteína codificada por este transcrito, fue deducida por análisis de dominios (BLAST), encontrando que los nucleótidos 1-810 pertenecen al dominio de la familia 18 de las glycosil hidrolasas, el cual se encuentra en las quitinasas de artrópodos (Kramer y Muthukrishnan, 1997). La secuencia “FDGLDLWE”, fue identificada como la huella digital de las quitinasas, correspondiente a “FDxxDxDxE”, descrito en quitinasas de insectos (Merzendorfer y Zimoch, 2003). El codón de terminación es la señal del final de la traducción de la proteína, y también fue localizado en la secuencia de *LvChi2* (Figura 21). En la figura 22 se muestra un alineamiento de la secuencia nucleotídica de *LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3*. Se encontró que las secuencias de nucleótidos de las isoenzimas de quitinasa, son

más similares entre especies, que entre ellas dentro de la misma especie, como había sido descrito para el caso de las quitinasas de *M. japonicus* (Watanabe et al., 1998).

## Conclusiones

Se ha identificado un ADNc codificante para una ChS de camarón blanco *P. vannamei* (*LvChS*), la cual representa el primer reporte de una secuencia y función de esta enzima en crustáceos. *LvChS* se encarga de sintetizar la quitina que forma parte del exoesqueleto y la membrana peritrófica del camarón. Después de la ecdisis, *LvChS* es regulada positivamente de manera muy aguda, para cumplir con los requerimientos de los organismos de sintetizar la quitina del nuevo exoesqueleto.

La batería de enzimas quitinolíticas del camarón blanco incluye al menos 3 isoenzimas, codificadas por los ARNm *LvChi1*, *LvChi2* y *LvChi3*. Las isoenzimas 1 y 3, están encargadas de la hidrólisis de la quitina que proviene en los alimentos, mientras que la isoenzima 2, parece estar encargada de la hidrólisis de la quitina tanto del exoesqueleto como de la membrana peritrófica. Debido a esto, *LvChi2* presenta variaciones a lo largo del ciclo de muda, siendo regulada positivamente en la pre-muda para llevar a cabo la degradación del exoesqueleto que está por ser desechado. Estas variaciones deben estar coordinadas con las de *LvChS*, que tiene una función fisiológica opuesta.

## Literatura citada

- Amaya, E., Davis, D. A., Rouse, D. B. 2007. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 262:419-425.
- Andersen, O. A., Dixon, M. J., Eggleston, I. M., van Aalten, D. M. F. 2005. Natural product family 18 chitinase inhibitors. *The Royal Society of Chemistry*<sup>o</sup>. 22:563-569.
- Arakane, Y., Hogenkamp, D. G., Zhu, Y. C., Kramer, K. J., Specht, C. A., Beeman, R. W., Kanost, M. R., Muthukrishnan, S. 2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:291-304.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., Kanost, M., Beeman, R. W. 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Ins. Mol. Biol.* 14.(5):453–463.
- Arakane, Y., Zhu, Q., Matsumiya, M., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J. 2003. Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:631–648.
- Atwood, H. L., Young, S. P., Tomasso, J. R. 2003. Survival and growth of pacific white shrimp *Litopenaes vannamei* postlarvae in low-salinity and mixed-salt environments. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34.(4):518-523.
- Bergey, L., Weis, J. 2007. Molting as a mechanism of depuration of metals in the fiddler crab, *Uca pugnax*. *Marine Environmental Research*. 64.(5):556-562.

- Bolognesi, R., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Terra, W. R., Ferreira, C. 2005. Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:1249-1259.
- Brydon, L. J., Gooday, G. W., Chapbell, L. H., King, T. P. 1987. Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25.(3):267-272.
- Buchholz, F. 1989. Moulting Cycle and Seasonal Activities of Chitinolytic Enzymes in the Integument and Digestive Tract of the Antarctic Krill, *Euphausia superba*. *Polar Biol.* 9:311-317.
- Burgents, J. E., Burnett, K. G., Burnett, L. E. 2005. Effects of hypoxia and hypercapnic hypoxia on the localization and the elimination of *Vibrio campbellii* in *Litopenaeus vannamei*, the Pacific white shrimp. *Biol. Bull.* 208:159-168.
- Butemamdt, A., Karlson, P. 1954. Über die Isolierung eines metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z. Naturforsch.* 9B:389-391.
- Carlstrom, D. 1957. The crystal structure of  $\alpha$ -chitin. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.* 3.(5):669-683.
- Cauchie, H. M. 2002. Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiologia.* 470:63-96.
- Ceccaldi, H. J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture*, pp. 243-259 Tahiti (French Polynesia).

- Chan, S. M., Rankin, S. M., Keeley, L. L. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biol. Bull. 175:185-192.
- Chang, E. S. 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction. Ann. Rev. Entomol. 38:161-180.
- Chang, E. S., Chang, S. A., Mudler, E. P. 2001. Hormones in the lives of crustaceans: an overview. Amer. Zool. 41:1090-1097.
- Chang, R., Yeager, A. R., Nathaniel, S. F. 2003. Probing the mechanism of a fungal glycosyltransferase essential for cell wall biosynthesis. UDP-Chitobiose is not a substrate for chitin synthase. Organic Biomolecular Chemistry. 1:39-41.
- Chen, H. Y., Watson, R. D., Chen, J. C., Liu, H. F., Lee, C. Y. 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. Gen. Comp. Endocrinol. 151.(1):72-81.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
- Cohen, E. 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. Ann. Rev. Entomol. 32:71-93.
- Daimon, T., Katsuma, S., Iwanaga, M., Kang, W., Shimada, T. 2005. The BmChi-h gene, a bacterial-type chitinase gene of *Bombyx mori*, encodes a functional exochitinase that plays a role in the chitin degradation during the molting process. Insect Biochem. Mol. Biol. 35:1112-1123.

- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, P. C., Sharples, D. J. 1990. The biology of the Penaeidae. San Diego, CA. Academic Press
- Devaraj, H., Natarajan, A. 2006. Molecular mechanisms regulating molting in a crustacean. FEBS Journal. 273:839-846.
- Díaz, A. C., Sousa, L. G., Cuartas, E. I., Petriella, A. M. 2003. Growth, molt and survival of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea) under different light-dark conditions. Iheringia, Sér. Zool. 93.(3):249-254.
- Drach, P. 1939. Mue et cycle d' intermue chez les Crustaces Decapodes. Annales de L Institut Oceanographique. 19.(103-391).
- Duo-Chan, L. 2006. Review of fungal chitinases. Mycopathologia. 161:345-360.
- El Haj, A. J. 1999. Regulation of muscle growth and sarcomeric protein gene expression over the intermoult cycle. Amer. Zool. 39:570-579.
- Felix, M. M. L., Petriella, A. M. 2003. Molt cycle of the natural population of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, palaemonidae) from Los Padres lagoon (Buenos Aires, Argentina). Iheringia, Sér. Zool. 93.(4):399-411.
- Filho, B. P. D., Lemos, F. J. A., Secundino, N. F. C., Pascoa, V., Pereira, S. T., Pimenta, P. F. P. 2002. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti* A chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. Insect Biochem. Mol. Biol. 32:1723-1729.
- Flach, J., Pilet, P. E., Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research? Experientia. 48:701-716.

- Gagou, M. E., Kapsetaki, M., Turberg, A., Kafetzopoulos, D. 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:141-146.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, C. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research.* 34.(15):1403-1411.
- Hahn, M., Hennig, M., Schlesier, B., Höhne, W. 2000. Structure of jack bean chitinase. *Acta Cryst.* D56:1096±1099.
- Harish-Prashanth, K. V., Tharanathan, R. N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science and Technology.* 18:117-131.
- Hernández, C., Olvera-Novoa, M. A., Aguilar-Vejar, K., González-Rodríguez, B., Abdo de la Parra, I. 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture.* In press.
- Hogenkamp, D. G., Arakane, Y., Zimocho, L., Merzendorfer, H., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Kanost, M. R., Specht, C. A., Muthukrishnann, S. 2005. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:529-540.
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, Morten Sørli, P., Varum, K. M., Eijsink, V. G. H. 2006. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal.* 273:491–503.

- Horst, M. N. 1981. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp. *J. Biol. Chem.* 256.(3):1412-1419.
- Horst, M. N. 1983. The biosynthesis of crustacean chitin. Isolation and characterization of polyprenol-linked intermediates from brine shrimp microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 223.(1):254-263.
- Ibrahim, G. H., Smartt, C. T., Kiley, L. M., Christensen, B. M. 2000. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:1213-1222.
- Jaworski, E., Wang, L., Marco, G. 1963. Synthesis of Chitin in Cell-free Extracts of *Prodenia eridania*. *Nature.* 198:790.
- Juárez, L. M. 2008. Current status of shrimp aquaculture in Mexico. *Panorama Acuícola Magazine.*48-53.
- Kawada, M., Hachiya, Y., Arihiro, A., Mizoguchi, E. 2007. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Kieo J. Med.* 56.(1):21-27.
- Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23:691-701.
- Kuballa, A., Elizur, A. 2007. Novel molecular approach to study moulting in crustaceans. *Bull. Fish. Res. Agen.* 20:53-57.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.* 8:203-226.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Chen, X., Yu, N., Lai, Q., Qin, J. G. 2007. Growth, body composition, respiration and ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimps, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture.* 265:385-390.

- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods*. 25:402-408.
- Majtán, J., Bíliková, K., Markovic, O., Gróf, J., Kogan, G., Simúth, J. 2007. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 40:237-241.
- Martínez Córdova, L. R. 1993. Camaronicultura. Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. Mexico, D. F. A. G. T. editor
- Mattson, M. P., Spaziani, E. 1986. Evidence for ecdysteroid feedback on release of molt-inhibiting hormone from crab eyestalk ganglia. *Biol. Bull.* 171:264-273.
- McLay, C. L. 1985. Moulting and growth in *Pagurus travesi* and *P. novizealandiae* (Decapoda: Anomura: Paguridae): the effects of neighbors. *New Zealand Journal of Marine and freshwater Research*. 19:327-337.
- Merzendorfer, H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol.* 176:1-15.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206:4393-4412.
- Mikami, S. 2005. Moulting behavior responses of Bay lobster, *Thenus orientalis*, to environmental manipulation. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 39:287-292.
- Musgrove, R. J. B. 2000. Molt staging in the Southern Rock Lobster *Jasus edwardsii*. *Journal of Crustacean Biology*. 20.(1):44-53.
- Mykles, D. L. 1999. Proteolytic processes underlying molt-Induced claw muscle atrophy in Decapod Crustaceans. *Amer. Zool.* 39:541-551.
- Mykles, D. L. 2001. Interactions between limb regeneration and molting in Decapod Crustaceans. *Amer. Zool.* 41:399-406.

- Nicol, S., Stolp, M., Nordstrom, O. 1992. Change in the gross biochemistry and mineral content accompanying the moult cycle in the Antarctic krill *Euphausia superba*. *Mar. Biol.* 113:201-209.
- O'Brien, J. J., Sindhu-Kumari, S., Skinner, D. M. 1991. Proteins of crustacean exoskeleton: I. Similarities and differences among proteins of the four exoskeletal layers of four Branchyurans. *Biol. Bull.* 181:427-441.
- Okumura, T., Ohira, T., Katayama, H., Nagasawa, H. 2005. *In vivo* effects of a recombinant molt-inhibiting hormone on molt interval and hemolymph ecdysteroid level in the Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 22:317-320.
- Parvathy, K. 1970. Blood sugars in relation to chitin synthesis during cuticle formation in *Emerita asiatica*. *Mar. Biol.* 5:108-112.
- Parvathy, K. 1971. Glycogen storage in relation to the moult cycle in the two crustaceans *Emerita asiatica* and *Ligia exotica*. *Mar. Biol.* 10:82-86.
- Phlippen, M. K., Webster, S. G., Chung, J. S., Dirksen, H. 2000. Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph. *The Journal of Experimental Biology.* 203:521-536.
- Promwikorn, W., Boonyoung, P., Kirirat, P. 2004a. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27.(3):499-509.
- Promwikorn, W., Kirirat, P., Intasaro, P., Withyachumnarnkul, B. 2007. Changes in the integument histology and protein expression related to the moulting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.* 148.(1):20-31.

- Promwikorn, W., Kirirat, P., Thaweethamseewee, P. 2004b. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26.(5):765-772.
- Robalino, J., Almeida, J. S., McKillen, D., Colglazier, J., Trent, H. F., Chen, Y. A., Peck, M. E. T., Browdy, C. L., Chapman, R. W., Warr, G. W., Gross, P. S. 2006. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological Genomics.* 29:44-56.
- Roer, R., Dillaman, R. 1984. The structure and calcification of the crustacean cuticle. *Amer. Zool.* 24.(4):893-909.
- Roncero, C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41:367-378.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M., Van Wormhoudt, A. 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *L. vannamei* y *L. stylirostris*. En Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M., Van Wormhoudt, A. eds. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*, pp. 19-22 Merida, Yucatán.
- Royer, V., Fraichard, S., Bouhin, H. 2002. A novel putative insect chitinase with multiple catalytic domains: hormonal regulation during metamorphosis. *Biochem. J.* 366:921-928.
- Saito, Y., Sugiyama, J., Okano, T. 1994. Space group of highly crystalline chitin in the Grasping spines from Arrow Worms (*Sagitta spp.*). *Wood Research.* 81:19-21.

- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory Manual. New York, NY, USA Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yépez-Plascencia, G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 340:184-193.
- Sequeira, T., Vilanova, M., Lobo-Da-Cunha, A., Baldai, L., Arala-Chaves, M. 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changes in hemocyte type in male and female *Penaeus japonicus*. Biol. Bull. 189:376-380.
- Shyla Suganthi, A., Anilkumar, G. 1999. Molt-related fluctation in ecdysteroid titre and spermatogenesis in the crab, *Metopograpsus messor* (Branchyura: Decapoda). Zoological Studies. 38.(3):314-321.
- Skinner, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. Biol. Bull. 123.(3):635-647.
- Skinner, D. M. 1985. Interacting factors in the control of the crustacean Molt cycle. Amer. Zool. 25:275-284.
- Smith, D., Dall, W. 1985. Molt staging the tiger prawn *Penaeus esculentus*. In: Rothlisberg, P. C., Hill, B., Staple, D. eds. Second Australian National Seminar, NPS2, pp. 85-93 Cleveland, Queensland, Australia.
- Sowers, A., Young, S. P., Isely, J. J., Browdy, C. L., Tomasso, J. R. 2004. Nitrite toxicity to *Litopenaeus vannamei* in water containing low concentrations of sea salt or mixed salts. Journal of the World Aquaculture Society. 35.(4).

- Spindler-Barth, M., Van Wormhoudt, A., Spindler, K. D. 1990. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. *Mar. Biol.* 106:49-52.
- Suderman, R. J., Dittmer, N. T., Kanost, M. R., Kramer, K. J. 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:353-365.
- Takahashi, M., Kiuchi, M., Kamimura, M. 2002. A new chitinase-related gene, BmChiR1, is induced in the *Bombyx mori* anterior silk gland at molt and metamorphosis by ecdysteroid. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:147-151.
- Tan, S. H., Degnan, B. M., Lehnert, S. A. 2000. The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. *Mar. Biotechnol.* 2:126-135.
- Tellam, R. L., Vuocolo, T., Johnson, S. E., Jarmey, J., Pearson, R. D. 2000. Insect chitin synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur. J. Biochem.* 267:6025-6042.
- Tharanathan, R. N., Kittur, F. S. 2003. Chitin: The undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 43.(1).
- Truchot, J. P. 1993. Crustaceans as experimental animals for metabolic and transport physiology. *Aquatic Living Resources.* 6:343-349.
- Ueda, M., Kojima, M., Yoshikawa, T., Mitsuda, N., Araki, K., Kawaguchi, T., Miyatake, K., Arai, M., Fukamizo, T. 2003. A novel type of family 19 chitinase from

- Aeromonas sp. No.10S-24 Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.* 270:2513-2520.
- Wang, Y. B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 269:259-264.
- Watanabe, T., Kono, M. 1997. Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 14:65-68.
- Watanabe, T., Kono, M., Aida, K., Nagasawa, H. 1996. Isolation of a cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5:299-303.
- Watanabe, T., Kono, M., Aida, K., Nagasawa, H. 1998. Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1382:181-185.
- Watson, R. D., Lee, K. J., Qiu, S., Luo, M., Umphrey, H. R., Roer, R. D., Spaziani, E. 2001. Molecular cloning, expression and tissue distribution of crustacean molt-inhibiting hormone. *Amer. Zool.* 41:407-417.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology.* 7.(1-2):203-214.
- Zheng, Y., Zheng, S., Cheng, X., Ladd, T., Lingohr, E. J., Krell, P. J., Arif, B. M., Retnakaran, A., Feng, Q. 2002. A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1813-1823.
- Zimoch, L., Hogenkamp, D. G., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H. 2005. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:515-527.

Zimoch, L., Merzendorfer, H. 2002. Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. *Cell Tissue Res.* 308:287-297.