



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA
REPRODUCCIÓN EN *Litopenaeus vannamei*,
OBTENIDOS A PARTIR DE LIBRERÍAS DE TALLO
OCULAR Y OVARIO.

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales
(Orientación: Acuicultura)

Presenta

Claudia Ventura López

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 22 del Mes de FEBRERO del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Identificación y evaluación de la expresión de genes relacionados con la reproducción en *Litopenaeus vannamei*, obtenidos a partir de librerías de tallo ocular y ovario"

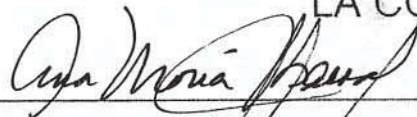
Presentada por el alumno:

CLAUDIA VENTURA LÓPEZ

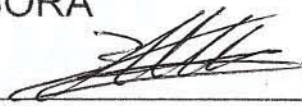
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA

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

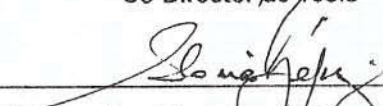
LA COMISIÓN REVISORA




Dra. Ana María Ibarra Humphries
Co-Director de Tesis



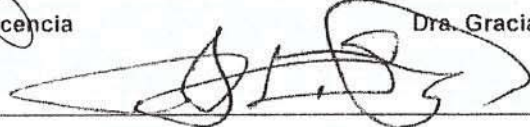
Dr. Ilie Sava Răcotta Dimitrov
Co-Director de Tesis



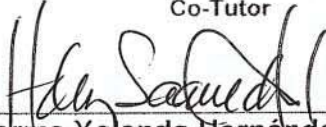
Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Tutor



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Ana María Ibarra Humphries- CIBNOR
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov- CIBNOR
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro- CIBNOR
Dra. Gloria Yepiz Plascencia- CIAD
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas- CIBNOR

COMITÉ EVALUADOR DE TESIS

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

JURADO DE EXÁMEN

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dr. Pedro Cruz Hernández (Suplente)
Dr. Ricardo Vázquez Juárez (Suplente)

RESUMEN

La elevada demanda del camarón de cultivo ha llevado a los laboratorios de reproducción al empleo de técnicas como la ablación del tallo ocular con la finalidad de acelerar la maduración de los reproductores. Se sabe actualmente que es en este tejido donde se localiza el principal centro neurosecretor de los crustáceos, conocido como complejo Órgano X-Glándula sinusal, y es aquí donde se sintetizan un grupo de hormonas relacionadas con la inhibición y/o maduración gonádica. Dentro de las hormonas más comúnmente estudiadas y principalmente relacionadas a estos procesos reproductivos, se encuentran las denominadas hormonas hiperglucemiantes de crustáceos (CHH). Si bien se han logrado avances en la caracterización de la estructura de genes de la familia de las CHH, y su participación en los procesos reproductivos, a menudo la presencia de las diversas isoformas y su distribución diferencial pone de manifiesto la complejidad en la interacción de estos neuropéptidos para la regulación de los procesos asociados a la reproducción en crustáceos. En este sentido, el creciente uso de técnicas de secuenciación masiva ha permitido la identificación de diversos genes que hasta ahora solo han sido estudiados en otras especies de vertebrados e invertebrados, pero que se sabe participan en diferentes fases de los mecanismos asociados a la reproducción. Como una aproximación para determinar los genes asociados a procesos reproductivos en *L. vannamei*, se generaron librerías transcriptómicas de tallo ocular y ovario en el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola, las cuales permitieron la identificación de varios transcritos potencialmente involucrados en la regulación de la maduración gonádica, y cuyo análisis de expresión puede ser un primer paso para la identificación de genes antes no conocidos, y de marcadores moleculares que a largo plazo puedan ser utilizados en programas de selección y mejoramiento genético. En el presente estudio, se logró la identificación y clonación parcial de diferentes transcritos involucrados en la reproducción. Algunos de los transcritos encontrados fueron analizados con fines de establecer su perfil de expresión tisular en diferentes etapas del desarrollo reproductivo del camarón así como conocer si la expresión de los mismos se asocia con la maduración gonádica evaluada a través de la expresión de vitelogenina. Adicionalmente, se logró caracterizar un gen nuevo de la familia de las CHHs, el cual se encontró que codifica para dos transcritos de diferente longitud en la región UTR 3' como resultado de dos señales alternas de poliadenilación. Estos fueron aislados de tallo ocular y órgano pericárdico de hembras y machos mediante RACE. Ambos transcritos presentan un 100% de identidad y codifican para una misma proteína cuya conformación de la estructura primaria la clasifica como perteneciente a la familia de las CHHs tipo I, aunque con algunas características particulares, como es la inserción de un residuo de glicina en la posición 32 del péptido maduro. Mediante PCR punto final e hibridación *in situ* se logró demostrar que este gen se expresa en tejidos como tallo ocular, cerebro, corazón, branquia e intestino en organismos de ambos sexos, y adicionalmente en vaso deferente y ámpula terminal de machos. Se demostró que la expresión del gen *Lvchh* varía en dependencia del estadio de muda, ya que se observó un incremento de premuda temprana a premuda tardía en todos los tejidos evaluados. La alta expresión en intestino sugiere una participación en la absorción de agua durante la muda, mientras que la expresión en branquia sugiere un papel en la osmoregulación.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, reproducción, expresión diferencial

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Co-directores

ABSTRACT

Due to the growing demand for shrimp, eyestalk ablation used to be one of the main techniques for broodstock maturation acceleration in commercial hatcheries. That is because the main neurosecretory organ in crustaceans is the X organ- sinus gland complex located in the eyestalk, and this is where a group of hormones related to the inhibition and / or induction of gonadal maturation are presumably synthesized. Those hormones belong to the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) family, an important group of neuropeptides involved in controlling growth and reproduction in decapods species. However, while progress has been made in the characterization of the structure of CHH family members, the presence of multiple isoforms and differential tissue expression suggests there are more complex functions and interactions among these neuropeptides than what it has been elucidated for control the reproductive processes. The increased use of massive sequencing techniques has enabled the identification of several genes known to be involved in different mechanisms associated with reproduction that so far have only been studied in vertebrates and other invertebrates species. In order to further investigate the genes involved in *L. vannamei* reproduction, cDNA and SSH libraries derived from female eyestalk and gonads were produced, allowing the identification of expressed sequences tags (ESTs) potentially involved in the regulation of gonadal maturation. Understanding the expression pattern of the newly found genes can be a first step to identify novel genes and molecular markers, which can be used in selection programs. In the present study, different transcripts involved in reproduction were identifying and partially cloned. These transcripts were analyzed in males and females in order to establish their tissue expression profile on different reproductive developmental stages and, in the case of females, their possible association with gonadal maturation assessed through expression analysis of vitellogenin. Additionally a novel CHH gene was characterized. Two full length transcripts of this CHH were isolated from eyestalk and pericardial tissue of males and females. The differences in transcripts length is a result of two polyadenylation sites present in the 3'UTR resulting in two transcription termination signals. Transcript sequences encoded one unique protein that can be classified as CHH type I, although with some particular characteristics as a glycine insertion in the mature peptide at position 32. We demonstrated by endpoint-PCR, qPCR, and *in situ* hybridization (ISH), that this gene is expressed in eyestalk, brain, gill, gut, and heart, as well as in terminal ampoule or spermatophore and *vas deferens* of males, suggesting a role in sperm maturation and capacitation. The expression of *Lvchh* increased from early to late pre-molt in all evaluated tissues, and the higher expression in gut further suggest a role in water uptake during molting, whereas expression on gill suggests a possible role in osmoregulation.

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Co-directores

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realización del doctorado con número de registro 217457, así como la Beca Mixtas 2012-2013 para Movilidad Nacional. Al Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste y el departamento de Estudios de Posgrado por las facilidades otorgadas a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

A los proyectos que financiaron y/o facilitaron la realización de éste trabajo:

- PROYECTO SAGARPA-CONACYT 126427 (2010-2012): “Aplicación de la genómica funcional como estrategia para la mejora continua de la industria del camarón – Módulo Reproducción”
- PROYECTO CONACyT CIENCIA BASICA 157584

A mis co-directores, Dra. Ana María Ibarra Humphries por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por el apoyo y atención constante, por la paciencia y enseñanzas. La admiración y respeto tanto en lo académico como en el aspecto personal no podrían describirse en unas cuantas líneas. Al Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov, por su valiosa colaboración en el presente trabajo, por el apoyo sobre todo en la parte final de la realización de la tesis y por la accesibilidad e interés otorgado constantemente.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, por sus valiosos comentarios que contribuyeron en gran medida al desarrollo del presente trabajo, por la dedicación y constante disponibilidad. Dra. Gloria Yepiz Plascencia por su asesoría y comentarios durante el tiempo de realización del trabajo, por recibirme en su laboratorio y estar siempre al pendiente del trabajo. Al Dr. Francisco Javier Magallón Barajas, por acceder a la conformación del comité evaluador y sus observaciones siempre útiles, por la disponibilidad y amabilidad constante. Mi admiración y respeto a cada uno de ustedes.

Al personal técnico responsable del Laboratorio de Genética Acuícola, M. en C. Susana Ávila-Álvarez y M. en C. Jose Luis Ramirez Arce, por su constante apoyo y disponibilidad tanto en lo administrativo como en la realización de los experimentos, a quienes además les tengo un enorme cariño, más que compañeros de trabajo fueron mi familia durante estos 4 años.

A la Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega y el Dr. Raúl Antonio Llera Herrera quienes formaron parte importante para la obtención de información y realización de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Pérez Enriquez, Mayra de Fátima Vargas Mendieta, Jesús Antonio Aguilar Villavicencio; Carlos Ernesto Ceseña y a la empresa Acuicultura Mahr, por su valiosa ayuda en la obtención y mantenimiento de organismos, sin duda importantes para la realización del presente trabajo.

Al personal técnico de los diferentes laboratorios por las facilidades otorgadas en el uso de equipos, materiales y realización de técnicas: Dra. Maria del Carmen Rodriguez Jaramillo,

María Eulalia Meza Chávez–Laboratorio de Histología e Histoquímica; Roberto Hernández Herrera-Laboratorio de Bioquímica Fisiológica; M.C. Roxana Bertha Inohuye Rivera-Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico; Julio Hernández González-Laboratorio de Biología Molecular de plantas; Dr. Rodolfo Garza Torres. Delia Irene Rojas Posadas-Laboratorio de Genética Molecular; Alma Beatriz Peregrino Uriarte—CIAD Hermosillo.

Al Dr. Pedro Cruz Hernández, por las facilidades otorgadas con los materiales de trabajo, y sobre todo por los consejos y la amistad brindada durante todo este tiempo.

A la Dra. Cristina Escobedo Fregoso y Dr. Ricardo Vázquez Juárez por las facilidades otorgadas en el uso del Laboratorio de Genómica Funcional. Al Dr. Dariel Tovar Ramírez por la accesibilidad en el préstamo de reactivos.

A Pavel Eduardo Galindo Torres, por los consejos, la retroalimentación constante, la valiosa ayuda durante el trabajo de laboratorio, muestreos, análisis bioinformáticos que sin duda fueron de valiosa ayuda, pero sobre todo por la gran amistad durante todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio Rosy por gran ayuda y consejos durante la realización de las técnicas, Itzia por el apoyo durante los muestreos. A todos los chicos que forman y formaron parte del laboratorio húmedo de mejoramiento animal en acuicultura: Octavio, Betsa, Will, Luis, Samuel, Gabriel por su valiosa ayuda durante el mantenimiento de los organismos, la realización de los experimentos y muestreos, por su amistad y hacer más ameno el trabajo cada día. Y especialmente a Víctor por su maravillosa amistad desde que llegue al CIBNOR, por su compañía, por las risas, por siempre estar ahí.

A la maestra Diana Leticia Dorantes Salas por valiosa ayuda durante mi preparación para el examen de inglés y por su ayuda en la edición del primer manuscrito. A los responsables del laboratorio de cómputo Horacio Sandoval Gómez y José Manuel Melero Astorga. A Edgar Yuen Salas –Área de Informática, por el soporte técnico y las facilidades otorgadas para la instalación de software.

Finalmente un agradecimiento especial a mis padres y hermanos por todo el cariño y motivación constantes, siempre mi mejor y más valioso apoyo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Aspectos citológicos y moleculares de la reproducción en crustáceos	4
2.1.1 Ovogénesis y vitelogénesis	4
2.2 Control hormonal de la reproducción	6
2.2.1 Hormonas Hiperglucemiantes de Crustáceos y mecanismos moleculares involucrados en el control de la reproducción y crecimiento	8
2.2.2 Receptores de membrana asociados a hormonas esteroideas y procesos reproductivos	14
3. JUSTIFICACION	15
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 GENERALES	18
5.2 PARTICULARES	18
6. MATERIALES Y METODOS	19
6.1 Anotación de los transcritos de las librerías de cDNA y SSH de gónada y tallo ocular de hembras de camarón blanco	19
6.2 Conocimiento y cuantificación de la distribución tisular de genes asociados al proceso reproductivo e identificados en las librerías de SSH y de cDNA obtenidas de gónada, evaluando la expresión a lo largo de la ontogenia (juveniles, subadultos y adultos) y en ambos sexos	22
6.2.1 Diseño de oligonucleótidos	22
6.2.2 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	23
6.2.3 Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos	24
6.2.4 Cuantificación de la expresión en diferentes tejidos y edades durante el estadio de intermuda.	26
6.2.4.1 Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) 26	
6.3 Aislamiento y caracterización de el o los transcritos del gen tipo CHH (mRNA- cDNA) en tallo ocular y gónada/órgano pericárdico de hembra y macho así como el gen codificante en organismos de <i>Litopenaeus vannamei</i>.	27
6.3.1 Material biológico.....	28
6.3.2 Amplificación del fragmento de la hormona CHH obtenido de las librerías.....	29
6.3.3 Caracterización del transcrito de la hormona hiperglucemiente mediante RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	30
6.3.4 Caracterización parcial del gen de la hormona hiperglicemiente en <i>L. vannamei</i>	32
6.3.5 Análisis bioinformático y filogenético de la proteína codificada por el transcrito de la hormona hiperglucemiente de <i>L. vannamei</i>	33

6.4 Patrones de expresión tisular y localización celular del transcrito de la hormona hiperglucemiente en <i>L. vannamei</i>	33
6.4.1. Expresión en tejidos mediante PCR en punto final	34
6.4.2 Cuantificación de la expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiente de <i>L. vannamei</i> mediante qPCR.....	35
6.4.3 Localización de sitios de expresión mediante hibridación in situ (ISH)	36
6.4.4. Localización de transcritos de diferente tamaño en diferentes tejidos mediante RACE 3'	37
6.5 Cuantificación de la expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiente de <i>L. vannamei</i> a lo largo del ciclo de muda	38
6.6. Análisis de la función in vivo del gen tipo CHH mediante el bloqueo del transcrito por RNA de interferencia.	39
6.6.1 Síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA).....	39
6.6.2 Silenciamiento del transcrito <i>Lvchh</i>	42
6.6.3. Validación del silenciamiento del transcrito <i>Lvchh</i> mediante qPCR	42
7. RESULTADOS	43
7.1 Transcriptoma de <i>L. vannamei</i> asociado a la reproducción	43
7.1.1 Anotación funcional de las librerías de tallo ocular y gónada de <i>L. vannamei</i>	43
7.1.2 Expresión tisular por sexo y a diferentes edades para transcritos de genes potencialmente asociados con la reproducción	47
7.2 Caracterización del transcrito de la hormona hiperglucemiente de <i>L. vannamei</i> y su gen codificante	61
7.3 Patrones de expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiente de <i>L. vannamei</i> (<i>Lvchh</i>)	67
7.3.1 Expresión por tejidos mediante PCR de punto final.....	67
7.3.2 Cuantificación de la expresión en diferentes tejidos	67
7.3.3 Localización de las células de expresión del transcrito <i>Lvchh</i>	69
7.3.4. Localización de los transcritos <i>Lvchh</i> en diferentes tejidos mediante RACE 3'.....	73
7.3.5. <i>Expresión del transcrito <i>Lvchh</i> a lo largo del ciclo de muda</i>	73
7.4. Inhibición del transcrito mediante RNA de interferencia	75
8. DISCUSION	76
8.1. Genes encontrados en la anotación asociados con la reproducción	76
8.2. Patrones de expresión de genes encontrados en las librerías de gónada y tallo ocular	77
8.3. Un nuevo gen CHH en <i>Litopenaeus vannamei</i>	86
8.4. Distribución espacial del transcrito <i>Lvchh</i>	89
9. CONCLUSIONES	93
10. REFERENCIAS	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación esquemática de la ruta de entrada de vitelogenina al ovocito mediada por receptores en *A. aegyptii*. **FC**; células foliculares, **CP**; invaginaciones cubiertas de clatrina, **CV**; vesículas recubiertas, **EE**; endosomas tempranos, **TYB**; cuerpos transitorios de vitelo o endosomas tardíos, **MYB**; gránulos de vitelo. Tomado de Snigirevskaya *et al.* (1997). 5
- Figura 2.** Representación esquemática de la organización estructural del receptor de vitelogenina (VgR) en *P. monodon*. **A**; regiones ricas en cisteína, **B**; repeticiones clase B; **LBD** (dominios de unión de ligandos). Tomado de Tiu *et al.* (2008). 6
- Figura 3.** Representación esquemática del gen y estructura peptídica de las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos (*CHH family*) tipo I (abajo) y tipo II (arriba). Tomado de Böcking (2001). 9
- Figura 4.** Representación esquemática del gen y transcritos generados por mecanismos de *splicing* en neuropéptidos CHH tipo I. Tomado de Jeon *et al.* (2012). 10
- Figura 5.** Genotecas de cDNA producidas para cada uno de los tejidos (gónada y tallo-ocular) donde se indica los estadios del ciclo de vida y de desarrollo gonádico en que se encontraban las hembras utilizadas. Tomado de Ibarra-Humphries *et al.* (2012). 20
- Figura 6.** Proceso de construcción de librerías sustractivas obtenidas de gónada y tallo ocular (Tomado de Ibarra-Humphries *et al.*, 2012). 21
- Figura 7.** Distribución por especies del análisis de similitud mediante BLASTp, obtenido de la anotación de librerías de gónada y tallo ocular. 43
- Figura 8.** Número de secuencias clasificadas por términos ontológicos de acuerdo al mecanismo molecular (A) y procesos biológico (B) al que pertenecen las secuencias anotadas de las librerías de tallo ocular y gónada de *L. vannamei*. 44

Figura 9. Verificación de la inserción de fragmentos de genes de interés mediante PCR punto final.	45
Figura 22. (A) Secuencia nucleotídica y traducción conceptual del transcrito <i>Lvchh</i> (GenBank No. KJ660842, KU174947) y gen (GenBank No. KJ660843). El marco abierto de lectura (ORF) se muestra en minúsculas y los aminoácidos correspondientes se localizan debajo. Las regiones exónicas se indican en negro y las regiones intrónicas en gris. Las señales de poliadenilación se muestran resaltadas y la localización de los oligonucleótidos se muestra subrayada. (B) Traducción conceptual de la proteína LvCHH.	63
Figura 23. Árbol filogenético resultante del análisis de secuencias proteicas pertenecientes a la familia CHH reportadas en GenBank. El valor de iteración (<i>bootstrapping</i>) basado en 1000 réplicas se muestra en cada nodo. El número de acceso y nombre de la especie se incluye en cada rama	64
Figura 24. Árbol filogenético resultante del análisis de secuencias proteicas pertenecientes a la familia CHH reportadas para peneidos. El valor de iteración (<i>bootstrapping</i>) basado en 1000 réplicas se muestra en cada nodo. El número de acceso a la proteína en GenBank y nombre de la especie se incluye en cada rama. La flecha señala la posición de LvCHH en el árbol	65
Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias peptídicas tipo CHH reportadas para <i>L. vannamei</i> . El número de acceso en GenBank y nombre de la proteína se indican en cada secuencia, la proteína LvCHH se señala con una flecha. Las regiones marcadas en verde indican el sitio de la inserción del aminoácido glicina en las CHHs tipo II y en la proteína LvCHH aislada en este trabajo. Los residuos altamente conservados se muestran en rojo. La región CPRP conservada para la secuencia ITP se muestra en un recuadro negro.....	66
Figura 26. Expresión del transcrito <i>Lvchh</i> en diferentes tejidos de machos (A) y hembras (B) de organismos adultos de <i>L. vannamei</i> . Los productos de amplificación se obtuvieron a partir del RNA total de tallo ocular (E), cerebro (B), corazón (H), branquia (G), hepatopáncreas (Hp), intestino (Gt), músculo (M), testículo (T), vaso deferente (VD), ámpula terminal/espermatóforo (S) y gónada de hembra (Gn). El control negativo se denota como NC. Como control interno se utilizó el gen ribosomal18S.	67

Figura 27. Expresión relativa del transcrito *Lvchh* en diferentes tejidos de organismos adultos de *L. vannamei*. Los valores se representan como medias con intervalos de confianza..... 68

Figura 28. Órgano X, nervio óptico (OPTN) y ganglio supraesofágico (SoG) de *L. vannamei*. (A) Vista longitudinal del tallo ocular teñido con hematoxilina y eosina (H&E) donde se observa el órgano de Hanström (Han), Órgano de Bellonci (Bel), medula externa (ME) y medula interna (MI). (A1). Vista a mayor aumento del Órgano X donde se observa señal positiva del transcrito *Lvchh* en células neurosecretoras (flechas). (B) Vista longitudinal del nervio óptico (OPTN) teñido con H&E. (B1) Señal de hibridación positiva de la sonda antisentido de *Lvchh* en neuronas internas (flechas), (C) Vista dorsal del SoG teñido con H&E. (C1) Detalle celular del tracto del protocerebro (PT) señal de hibridación positiva en neuronas internas (flechas). (A2, B2, C2) Sonda sentido, usada como control negativo de hibridación..... 70

Figura 29. Cavidad pericárdica de *L. vannamei*. Vista dorsal de hembra (A) y macho (B) de la región ventral de la cavidad pericárdica, teñida con hematoxilina y eosina, donde se observan las células del miocardio (Myo), hepatopáncreas (Hep), ovarios (Ova) y lóbulo testicular (Tes). (A1, B1) Vista a mayor aumento del epicardio (recuadro en A y B) donde se observa señal positiva de hibridación de la sonda antisentido de *Lvchh* (flechas). (A2, B2) sonda sentido, utilizada como control negativo de hibridación. 71

Figura 30. Vaso deferente (A) y cámara gástrica anterior (B) de *L. vannamei*, teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). En vaso deferente se muestra el lumen (Lu) y masa espermática (SM); en la cámara gástrica se observa la cutícula (Cut), epitelio cuticular (Cep), lumen del estómago (Lu) y tejido conectivo (Cns). A1&B1 señal positiva de hibridación con sonda antisentido en tejido conectivo (flechas). A2&B2 control negativo de hibridación..... 72

Figura 31. Expresión de transcritos *Lvchh* en diferentes tejidos de *L. vannamei*. 1. cerebro hembra; 2. Corazón hembra; 3. Branquia hembra; 4. Intestino hembra; 5. Cerebro macho; 6. Corazón macho; 7. Branquia macho; 8. Intestino macho; 9. Vaso deferente; 10. Espermátforo. El control positivo corresponde al cDNA 3' de gónada/órgano pericárdico de hembra empleado en la caracterización original del transcrito. 73

Figura 32. Expresión relativa del transcrito *Lvchh* en diferentes tejidos y estadios de muda en organismos subadultos de *L. vannamei*. Los valores de las medias se muestran en barras, y las diferencias entre medias se indican con letras ($P > 0.05$). 74

Figura 33. Expresión relativa del gen *Lvchh* en tallo ocular a 24 horas, 48 horas y 5 días posteriores a la inducción del silenciamiento mediante la inyección de RNA de doble cadena. Los valores se representan como medias con intervalos de confianza al 95%. .. 75

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Secuencias nucleotídicas de oligonucleótidos empleados para la clonación de transcritos asociados a reproducción	25
Tabla II. Secuencias nucleotídicas de oligonucleótidos empleados en la caracterización del transcrito y gen codificante de la hormona hiperglucemiente encontrada en <i>L. vannamei</i>	28
Tabla III. Secuencias nucleotídicas de oligonucleótidos empleados en la determinación de los patrones de expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiente en <i>L. vannamei</i>	34
Tabla IV. Secuencias de oligonucleótidos usados para la amplificación mediante <i>RACE</i> 3' de los transcritos <i>Lvchh</i> en diferentes tejidos.....	38
Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos usados en la determinación de los patrones de expresión del transcrito <i>Lvchh</i> durante el ciclo de muda.....	39
Tabla VI. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la transcripción de la doble cadena de RNA de los genes de la hormona hiperglucemiente de <i>L. vannamei</i> y el promotor del gen eGFP en el constructo pKGWFS7.	41
Tabla VII. Secuencias de interés seleccionadas por contener en su nombre o términos ontológicos “ en las librerías de gónada y tallo ocular de <i>L. vannamei</i>	46

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura representa una de las actividades de mayor importancia para el suministro de alimento, además de ser junto con la actividad pesquera, el medio de subsistencia del 10 a 12% de la población mundial. Dentro de las especies de mayor importancia se encuentra el camarón, el cual representa el 15% del valor total de los productos pesqueros comercializados internacionalmente (FAO, 2014). En México, el camarón es la especie con mayor valor en la producción pesquera nacional con 40% de participación. De acuerdo con datos oficiales, en 2014 la producción en peso vivo fue de 97,237.4 toneladas, de las cuales el 88.6% se debe al aporte que tiene la actividad acuícola (SAGARPA, 2014).

El alto valor comercial del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, ha generado un diverso número de investigaciones en áreas como nutrición, patología, bioquímica, genética y endocrinología, todas ellas encaminadas a mejorar la calidad de las postlarvas y contrarrestar las principales problemáticas del cultivo, además del desarrollo de nuevas tecnologías que permitan incrementar la producción en términos de reproducción y crecimiento. En este sentido, una de las prácticas comunes en los laboratorios de reproducción ha sido la ablación del tallo ocular, la cual permite acelerar el proceso de maduración de la gónada, poniendo de manifiesto la presencia de factores hormonales encargados de regular tanto la reproducción, como diversos procesos fisiológicos (Fingerman, 1987; Quackenbush, 1991; Tsukimura, 2001). Actualmente, se sabe que uno de los principales centros neurosecretores, el complejo denominado como órgano X- glándula sinusal (XO-SG-X *Organ-Sinus Gland*) se localiza en el tallo ocular (Van Herp y Soyez, 1997), y es en este tejido donde se sintetizan y almacenan distintos compuestos como aminas biogénicas, péptidos, esteroides y terpenoides.

Si bien el análisis bioquímico, molecular y funcional de los diferentes compuestos liberados por el XOSG ha generado información importante para comprender de manera general el sistema neuroendocrino de ciertas especies, en el caso de la fisiología reproductiva existen pocos estudios que incluyan análisis bioquímicos, moleculares y/o funcionales de los

procesos en la gónada que darán lugar a la producción de gametos maduros. Hoy en día, mientras que el estudio de gen por gen puede proveer con información de estos procesos, el empleo de herramientas como la genómica funcional puede proporcionar una visión más amplia e integrada de cómo se regulan determinados procesos. Para el caso específico de camarones peneidos, Ibarra *et al.* (2007) sugieren el desarrollo de microarreglos como una aproximación para investigar la participación de determinados genes en la reproducción. En el año 2011, en un esfuerzo por complementar el desarrollo de un microarreglo para la investigación en *L. vannamei*, se generaron librerías tipo cDNA y SSH derivadas de tallo ocular y gónada de hembras a distintas edades mediante la pirosecuenciación por Roche 454 Life Sciences (Ibarra-Humphries *et al.*, 2012). Como resultado de un primer análisis del transcriptoma de ovario obtenido de hembras subadultas y adultas, se logró la identificación de múltiples transcritos, entre ellos algunos para los cuales se sabe que en otras especies de vertebrados e invertebrados regulan diversas fases de los mecanismos asociados a los procesos reproductivos, pero para los cuales no se cuenta con información detallada para *L. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

En México, la producción de camarón cultivado ha superado a la que se genera por pesca, siendo la región del Pacífico Norte la más productiva en este sentido (Magallón *et al.*, 2007). El éxito del cultivo de camarón depende en gran medida de la disponibilidad y calidad de reproductores y postlarvas, por lo que se han realizado un diverso número de investigaciones para evaluar la capacidad reproductiva de las hembras y la calidad de su progenie (para revisión ver Racotta *et al.*, 2003a; Ibarra *et al.*, 2007). El rendimiento en el cultivo de larva y postlarva en términos de supervivencia está determinada por su composición bioquímica (Palacios *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2003b). En este sentido, se ha comprobado que el número de desoves por hembra está positivamente relacionado con la calidad de la progenie, y que por tanto puede ser empleado para la implementación en programas de selección ya que permitirá tener una mayor producción de nauplios sin comprometer la calidad de los mismos (Palacios *et al.*, 1999a, 2000; Palacios y Racotta, 2003; Arcos *et al.*, 2004). En la búsqueda de implementar el número de desoves como un posible criterio de selección, Ibarra *et al.* (2005) analizaron la heredabilidad de éste en hembras ablacionadas, y encontraron que existe un componente genético-aditivo para este carácter, el cual se propuso que debe de estar influenciado por diversos factores fisiológicos como por ejemplo, la regulación hormonal de la maduración, la cantidad de vitelogenina que es expresada y transportada a la gónada, así como la cantidad de sus receptores.

Los compuestos responsables de inhibir y/o estimular la reproducción son sintetizados y almacenados en el complejo órgano X- glándula sinusal (Landau, *et al.*, 1997; Van Herp y Soyez, 1997; Huberman, 2000); su relación con la reproducción se ha evidenciado mediante el efecto de la ablación del tallo ocular sobre la síntesis de vitelogenina en gónada y hepatopáncreas en hembras de *L. vannamei* y *Marsupenaeus japonicus* (Quackenbush, 2001; Okumura, 2007). La ablación del tallo ocular en *L. vannamei* tiene también repercusión en otros procesos fisiológicos asociados a la reproducción. Esto es, se ha observado que la ablación genera un incremento en la demanda energética y por tanto, puede afectar la supervivencia y el crecimiento de las hembras, dando lugar a un

agotamiento reproductivo que se ve reflejado en las reservas energéticas de los huevos y la viabilidad de los mismos (Palacios *et al.*, 1999b,c).

2.1 Aspectos citológicos y moleculares de la reproducción en crustáceos

2.1.1 Ovogénesis y vitelogénesis

El desarrollo de la gónada en las hembras comienza con el proceso de ovogénesis, que se caracteriza por continuas divisiones mitóticas en la zona germinal. Cuando las ovogonias dejan esta zona entran a la profase I de la división meiótica, etapa durante la cual se presenta una condensación de los cromosomas, la posterior descondensación marca el inicio de la etapa previtelogénica y está acompañada de cambios citoplasmáticos como el incremento de ribosomas y retículo endoplásmico rugoso, lo cual prepara al ovocito para la acumulación endógena de vitelo durante la siguiente fase del desarrollo gonadal. De manera simultánea los ovocitos comienzan a rodearse de células foliculares provenientes de la zona germinal y son denominados ovocitos previtelogénicos (Charniaux-Cotton, 1985; Van Herp y Soyez, 1997; Meusy y Payen, 1998). La siguiente fase de la maduración gonádica es la vitelogénesis, durante la cual inicia la síntesis y acumulación de reservas como proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos carotenoides (Quackenbush, 1991). En una primera etapa (vitelogénesis primaria o endógena) los ovocitos comienzan a aumentar de tamaño como resultado de un incremento en la síntesis de proteínas endógenas, y comienzan a desarrollar microvellosidades hacia las células foliculares mismas que desarrollan conexiones a manera de red que intensifican la entrada de vitelogenina a los ovocitos (VanHerp y Soyez, 1997). La vitelogénesis secundaria o exógena, se caracteriza por un crecimiento sincrónico de los ovocitos como resultado de la transferencia de vitelogenina proveniente de fuentes externas al ovario mediante mecanismos de endocitosis dependiente de receptores (Charniaux-Cotton, 1985; Warriier y Subramoniam, 2002).

De acuerdo a lo descrito para otras especies de invertebrados como el mosquito *Aedes aegyptii* (Snigirevskaya *et al.*, 1997), la entrada de la vitelogenina al ovocito se lleva a cabo mediante la unión de la vitelogenina a los diferentes microdominios de unión en los cuales está dividida la membrana plasmática del ovocito. Estos microdominios están localizados

entre las microvellosidades de la membrana plasmática. Una vez realizada la unión de la vitelogenina (Vtg) con el receptor (VgR), se forma un complejo que va a unirse a vesículas pre-existentes recubiertas de clatrina. Al perder la cobertura, las vesículas se transforman en endosomas tempranos que al fusionarse entre sí dan lugar a los endosomas tardíos o cuerpos de vitelo transitorios, donde simultáneamente se lleva a cabo la disociación del complejo Vtg/VgR. Posterior a la disociación del complejo, el receptor regresa a la membrana plasmática para ser reutilizado (Fig. 1).

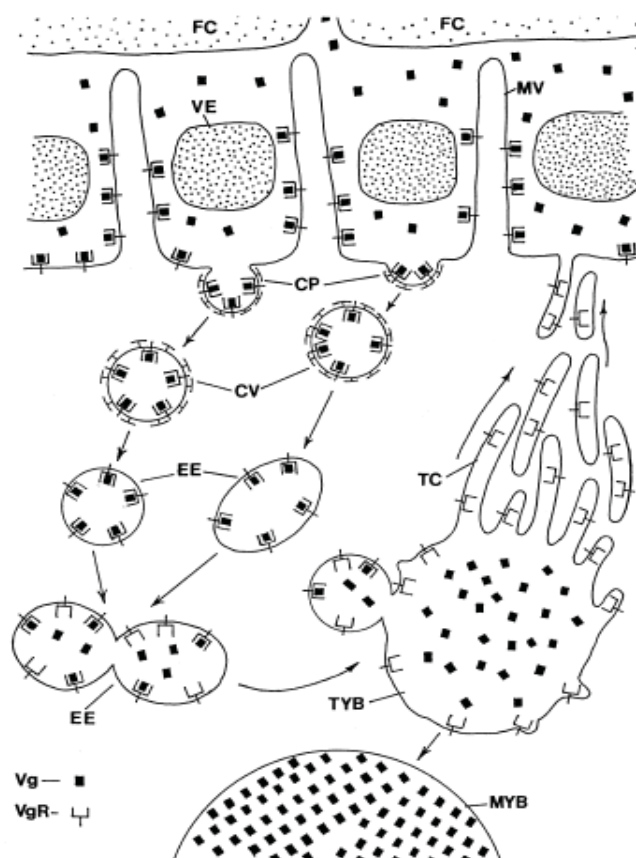


Figura 1. Representación esquemática de la ruta de entrada de vitelogenina al ovocito mediada por receptores en *A. aegyptii*. FC; células foliculares, CP; invaginaciones cubiertas de clatrina, CV; vesículas recubiertas, EE; endosomas tempranos, TYB; cuerpos transitorios de vitelo o endosomas tardíos, MYB; gránulos de vitelo. Tomado de Snigirevskaya *et al.* (1997).

En el caso de peneidos, el receptor VgR es una proteína de 211 KDa, la cual posee dos señales de internalización (FANPGFG y FENPFF) que controlan la entrada del complejo Vgt/VgR a las vesículas internas del ovocito (Tiu *et al.*, 2008; Mekuchi *et al.*, 2008). La estructura primaria posee elementos característicos de la superfamilia LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*). Dichos elementos incluyen la presencia de dos dominios de unión a ligandos (LBDs-*ligand-binding domain*), cada uno conformado por cinco u ocho repeticiones ricas-en-cisteína clase-A (*class-A cysteine-rich repeats*). Cada LBD es seguido por un dominio homólogo al dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF-*epidermal growth factor*) conformado por los motivos YWXD y repeticiones de clase-B con seis residuos de cisteína (Fig. 2).

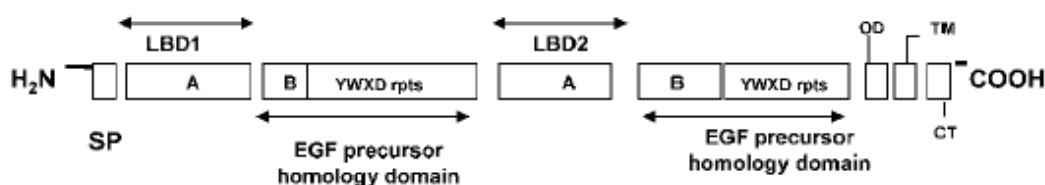


Figura 2. Representación esquemática de la organización estructural del receptor de vitelogenina (VgR) en *P. monodon*. **A**; regiones ricas en cisteína, **B**; repeticiones clase B; **LBD** (dominios de unión de ligandos). Tomado de Tiu *et al.* (2008).

La expresión de VgR ocurre exclusivamente en el ovario, y su expresión varía dependiendo del grado de madurez de las hembras, y alcanza su máxima expresión en las primeras etapas del proceso de vitelogénesis, para finalmente disminuir al final del ciclo de maduración (Tiu *et al.*, 2008; Mekuchi *et al.*, 2008; Rotllant *et al.*, 2015).

2.2 Control hormonal de la reproducción

El comienzo del ciclo reproductivo está relacionado con una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que dan lugar al desarrollo de las estructuras gonadales. Los factores externos como fotoperiodo, temperatura, nutrición, concentración de iones y estrés, están relacionados con el ciclo reproductivo, ya que mediante el estímulo sobre diversas estructuras neuronales dará lugar a la transducción de señales en órganos endócrinos, los

cuales a su vez sintetizan y liberan compuestos que van a modular la actividad de los diferentes órganos involucrados en procesos fisiológicos como la reproducción, crecimiento y comportamiento (Fingerman, 1987; Van Herp y Soyez, 1997; Meusy y Payen, 1998).

La presencia de factores hormonales comenzó a manifestarse mediante el uso de técnicas como la ablación del tallo ocular en diferentes especies de crustáceos (Panouse, 1943 citado en Huberman, 2000; Kulkarni *et al.*, 1984), ya que se ha observado que al eliminar este tejido, entre varios efectos resultantes está el aceleramiento del proceso de maduración de la gónada. En el caso de las hembras, el efecto de la ablación del tallo ocular sobre los procesos reproductivos se ha atribuido a la acción de la hormona inhibidora de la gónada (VIH/GIH - *Vitellogenin/Gonad Inhibiting Hormone*). Si bien el efecto de esta hormona en las hembras es aparentemente directo sobre la gónada, en el caso de los machos esta hormona parece ejercer una función indirecta sobre la glándula androgénica, la cual de acuerdo a diversos autores, está encargada de regular la diferenciación de caracteres sexuales secundarios mediante procesos hormonales (Kulkarni *et al.*, 1984; Charniaux-Cotton, 1985; Fingerman, 1987; Sagi *et al.*, 1997; Khalaila *et al.*, 2002, Alfaro *et al.*, 2015). Lo anterior indica que se puede asumir que el control de la reproducción en crustáceos está modulado por un sistema complejo, en el cual, compuestos de diferente naturaleza y origen (aminas biogénicas, proteínas, esteroides y terpenoides) juegan un papel directo o indirecto sobre el desarrollo gonadal, y los procesos fisiológicos asociados.

Existen varios órganos o tejidos involucrados en la síntesis de compuestos que regulan los procesos fisiológicos. El principal es el denominado complejo Órgano X- Glándula Sinusal (XO-SG, *X Organ - Sinus Gland*) el cual se ubica en el tallo ocular. La glándula sinusal es un agregado de terminaciones axónicas provenientes del órgano X, cerebro y ganglio torácico. Por otra parte, el órgano X está conformado por un agregado de células con actividad neurosecretora (órgano de Hanstrom y órgano de Bellonci), situados entre la médula externa e interna del tallo ocular (Smith y Naylor, 1971; Bell y Lightner, 1988). Los principales compuestos secretados por el complejo XOSG incluyen a los miembros de la familia de las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos (CHH - *family*) y

neurotransmisores como serotonina, dopamina, encefalinas y melatonina (Swetha *et al.*, 2011). La síntesis de compuestos se lleva a cabo en el órgano X y estos son almacenados en la glándula sinusal para ser liberados bajo determinados estímulos. Dentro de los neurotransmisores antes mencionados, la función de la serotonina sobre la maduración ha quedado demostrada en especies como *P. monodon* (Wongprasert *et al.*, 2006) y *L. vannamei* (Vaca y Alfaro, 2000). Por ejemplo, en hembras de *L. vannamei*, se ha observado un incremento gradual de serotonina en cerebro y ganglio torácico durante la vitelogénesis temprana (Tinikul *et al.*, 2011).

2.2.1 Hormonas Hiperglucemiantes de Crustáceos y mecanismos moleculares involucrados en el control de la reproducción y crecimiento

La familia de las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos está conformada por neuropéptidos multifuncionales que se caracterizan por presentar enlaces disulfuro formados entre seis cisteínas presentes en el péptido maduro, las cuales permiten mantener la estructura terciaria del péptido (Fanjul-Moles, 2006; Webster *et al.*, 2012). Los genes que codifican estas hormonas a menudo presentan varias isoformas como resultado de *splicing* alternativo a partir de un solo transcrito (Chen *et al.*, 2004) o modificaciones post-traduccionales como estereoisomerización de aminoácidos (Ollivaux *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2012). Sin embargo, no todos los genes CHH han sido demostrados para formar isoformas como resultado de *splicing* alternativo, y de hecho las diferencias en la estructura de los genes y la estructura primaria de los péptidos (Fig. 3) permiten la separación de esta familia en dos grupos: el tipo CHH-I, donde se encuentran las hormonas hiperglucemiantes *sensu stricto*; y el tipo CHH-II, donde se agrupan la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH); la Hormona Inhibidora de la Gónada o Vitelogénesis (GIH-VIH), y la Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular (MOIH) (Huberman, 2000; Chan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2012).

Las proteínas CHH-I están conformadas por el péptido señal, una región CPRP (*CHH precursor related peptide*) y la región del péptido maduro conformado por 72 – 73 aminoácidos con la región carboxilo terminal amidada (Fanjul-Moles, 2006; Hopkins,

2012). Algunas funcionan como moléculas pleiotrópicas asociadas al incremento intracelular de glucosa mediante la activación de la enzima fosforilasa (Fanjul-Moles, 2006). Este incremento en los niveles de glucosa se lleva a cabo como respuesta a condiciones ambientales adversas como hipoxia o estrés térmico (Nagai *et al.*, 2011; Shinji, *et al.*, 2012; Webster *et al.*, 2012). Otras isoformas han sido asociadas a procesos como muda (Chang *et al.*, 1990) y estimulación del crecimiento de ovocitos (Tensen *et al.*, 1989). Por otro lado, las hormonas pertenecientes al tipo II (GIH/VIH, MIH, MOIH) se han asociado frecuentemente a procesos reproductivos, y se componen de la región del péptido señal seguida del péptido maduro conformado por 72 a 78 aminoácidos (Böcking *et al.*, 2002).

El péptido maduro de estas hormonas presenta una inserción de glicina en la posición 12, la cual se ha demostrado que reduce el efecto de hiperglucemia cuando es insertada en hormonas CHH tipo I de *M. japonicus* (Katayama y Nagasawa, 2004).

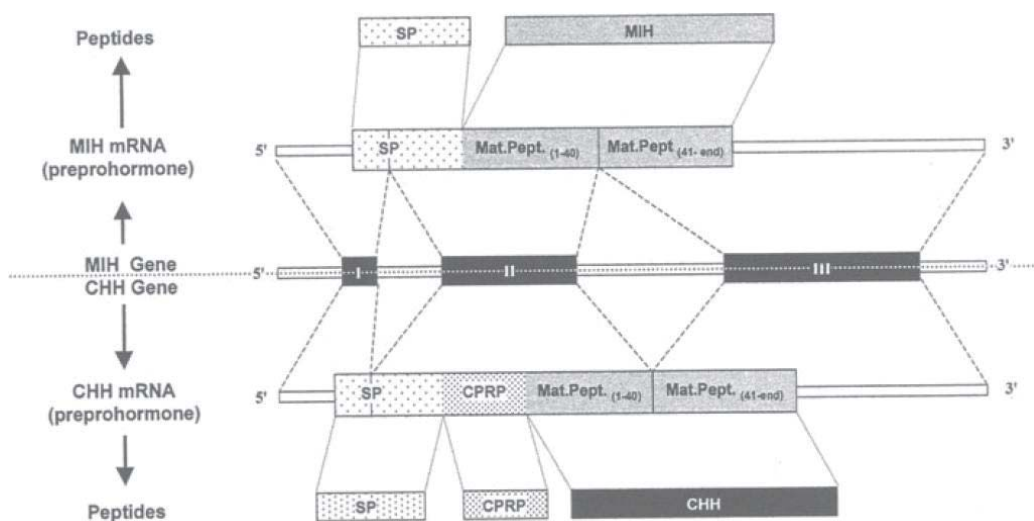


Figura 3. Representación esquemática del gen y estructura peptídica de las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos (CHH *family*) tipo I (abajo) y tipo II (arriba). Tomado de Böcking (2001).

Los genes CHH tipo I descubiertos hasta ahora se conforman por 4 exones y 3 intrones, los cuales mediante mecanismos de *splicing* dan lugar a dos transcritos. Cada isoforma

presenta una distribución espacial específica (Dircksen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Toullec *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2006; Montagné *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2012), teniendo que los transcritos compuestos por 3 exones están presentes en tallo ocular, mientras que los transcritos de 4 exones se localizan en tejidos extra oculares como órgano pericárdico y ganglio torácico (Fig.4). Los genes CHH tipo II identificados hasta ahora se conforman por 3 exones y 2 intrones, y la presencia de múltiples transcritos con alta homología entre ellos se ha asociado principalmente a eventos de duplicación de genes (Lu *et al.*, 2000).

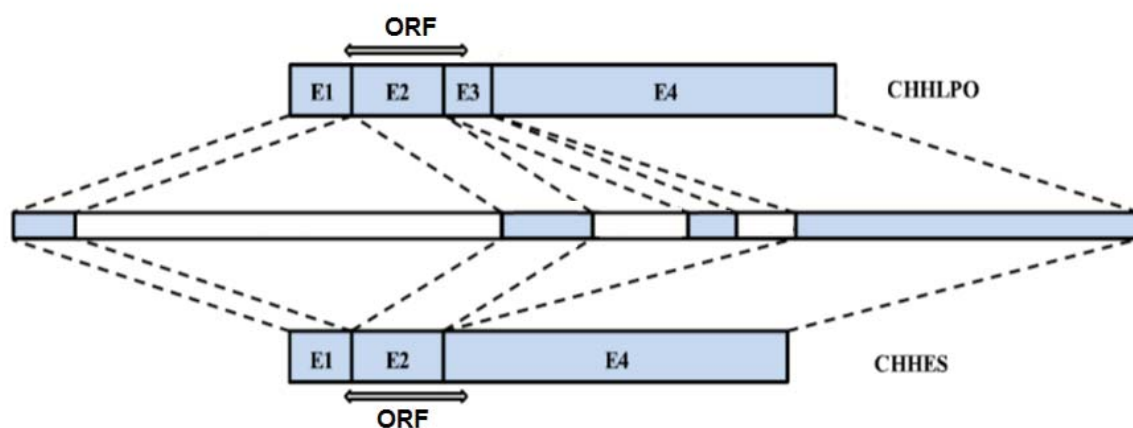


Figura 4. Representación esquemática del gen y transcritos generados por mecanismos de *splicing* en neuropéptidos CHH tipo I. Tomado de Jeon *et al.* (2012).

Las hormonas CHH-I son hasta el momento las más estudiadas en diferentes especies de crustáceos, y se han realizado un número diverso de investigaciones relacionadas con expresión, localización y análisis funcional (Fanjul-Moles *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2012). La principal función que se le atribuye a este tipo de neuropéptidos es el efecto de hiperglucemia. En *Orchonectes limosus*, se ha demostrado que esta hormona activa a proteínas cinasas mediante la elevación en los niveles de AMPc y GMPc en hepatopáncreas y músculo abdominal. Como resultado, estas proteínas cinasas inhiben la acción de la enzima glucógeno sintasa mediante fosforilación (Sedlmeier, 1985). Esta respuesta de hiperglucemia se ha hecho evidente en diversas especies de crustáceos sometidos a episodios de estrés térmico, de salinidad y de hipoxia, donde se ha observado que como

respuesta a las condiciones adversas se presenta un rápido incremento en la concentración de la hormona CHH y de glucosa en hemolinfa (Chang *et al.*, 1998; Chung y Webster, 2005). Por otro lado, se ha demostrado que las isoformas localizadas en tejidos extra-oculares como órgano pericárdico, presentan una respuesta distinta a las mismas condiciones de estrés, sugiriendo que la expresión de cada una de ellas es regulada por mecanismos diferentes (Chung y Zmora, 2008), y que por tanto, poseen funciones distintas probablemente en respuesta a señales tejido específicas (Hsu *et al.*, 2006). Diferentes isoformas y transcritos se han detectado también en corazón, nervio abdominal, branquia, intestino y ganglio torácico (Tiu *et al.*, 2007).

La función de las hormonas encontradas en diversos tejidos por otro lado, no es conocida para la mayor parte de estas hormonas, aunque la osmoregulación es otra de las funciones atribuidas a este grupo de hormonas, ya que se ha observado que extractos de glándula sinusal en hemolinfa incrementan la entrada de sodio (Na^+) en branquias (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000) y disminuye la presencia de partículas osmóticamente activas en hemolinfa (Serrano *et al.*, 2003). En *L. vannamei*, la sobre-expresión de una CHH incrementa la actividad de la enzima Na^+/K^+ ATPasa en branquias (Liu *et al.*, 2014), un tejido donde también se ha reportado la expresión de transcritos codificantes para hormonas CHH-I.

Dentro de las hormonas tipo II de CHHs se encuentra la hormona inhibidora de la gónada (GIH). El efecto de esta hormona sobre la síntesis de vitelogenina se ha evidenciado indirectamente mediante la ablación del tallo ocular en diversas especies (Raviv *et al.*, 2006; Okumura, 2007). El trabajo realizado por Treeratrakool *et al.* (2008) es uno de los primeros en conjuntar aspectos moleculares y biológicos para comprobar la función inhibidora de esta hormona sobre la expresión del mRNA-*vtg* en *P. monodon*, donde se demostró que el silenciamiento del gen *Pem-GIH* mediante RNA de interferencia incrementa la expresión de *vtg* en ovario. Se ha propuesto que la GIH actúa en la membrana de los ovocitos mediante el incremento en los niveles de AMPc, e impide la entrada de vitelogenina por endocitosis (Landau *et al.*, 1997). En *L. vannamei*, se ha caracterizado el transcrito de *GIH/VIH* expresado en tallo ocular y cerebro, donde se ha demostrado a través de estudios *in vitro*, que ambos tejidos están relacionados con el incremento en la síntesis

de mRNA-*vgt* en hepatopáncreas (Chen *et al.*, 2014). Recientemente, se ha detectado la presencia de esta hormona en diferentes estadios de desarrollo (huevos fertilizados, nauplio, zoea, mysis y juveniles tempranos) donde se observó un incremento en la expresión a lo largo del crecimiento hasta juveniles, aunque estos autores también detectaron la expresión del transcrito en tallo ocular y cerebro de machos y hembras adultos, no analizan si hay diferencias en la expresión de los primeros estadios de desarrollo respecto a adultos (Li *et al.*, 2015).

Una segunda hormona dentro de las CHH tipo II es la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH por sus siglas en inglés). A partir de su liberación en el complejo XOSG, la MIH inhibe la síntesis de ecdisteroides en el órgano 'Y' durante una parte del ciclo de muda, principalmente durante el estadio de intermuda, una vez que la presencia de este neuropéptido disminuye, aumentan los niveles de ecdisteroides y se reinicia el ciclo de muda (Lee *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2007). Se ha sugerido que otros compuestos pueden estar implicados ya sea directa o indirectamente en la regulación del órgano Y, ya que se ha observado que factores externos como temperaturas extremas, fotoperiodo y estrés, pueden inhibir la muda mediante la activación de receptores sensoriales, los cuales están comunicados con células neurosecretoras e inducen la liberación de compuestos que generan la inhibición del proceso de muda (Bliss y Boyer, 1964; Chang y Mykles, 2011). Si bien el mecanismo de acción de la MIH no ha sido completamente descrito, algunas investigaciones han detectado la presencia de receptores para MIH en la membrana del órgano Y a través del marcaje de la proteína y su posterior cuantificación mediante inmunoensayos de unión a ligandos, sin embargo estos no han sido caracterizados (Webster, 1993; Nakatsuji *et al.*, 2009). Diversas investigaciones proponen al AMPc y GMPc como segundos mensajeros involucrados en la regulación de la síntesis de ecdisteroides (Webster *et al.*, 2012).

Finalmente, la tercera hormona dentro de las CHH tipo II es la Hormona Inhibidora del Órgano Mandibular (MOIH por sus siglas en inglés). A esta hormona se le atribuye la función de reprimir la síntesis del farnesoato de metilo (FM) en el órgano mandibular (Liu *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1999). Lo anterior es debido a que se ha observado que la ablación

del tallo ocular ocasiona hipertrofia y cambios estructurales en el órgano mandibular de algunos cangrejos y eleva los niveles de FM en la hemolinfa de hembras y machos (Laufer *et al.*, 1992, 1993; Liu *et al.*, 1997; Lu, *et al.*, 2000; Borst *et al.*, 2001). Se sabe que el transporte del FM en la hemolinfa hacia los tejidos blanco está mediado por su unión con lipoproteínas denominadas proteínas de unión a FM (MFBP-*methyl farnesoate binding protein*), las cuales se han detectado en hemolinfa y gónada de hembras y machos de *Libinia emarginata* (Laufer *et al.*, 1986,1987). Los estudios de caracterización, localización y bioensayos enfocados en determinar la participación tanto del FM como de la enzima que cataliza su síntesis (ácido farnesoico *O*-metiltransferasa), han sugerido que el FM es una hormona multifuncional que está involucrada en la regulación de procesos como reproducción, muda, osmoregulación, morfogénesis y comportamiento (Nagaraju *et al.*, 2007).

La ruta metabólica para la síntesis de FM se compone de dos etapas. La primera involucra la obtención del pirofosfato de metilo (FPP- *farnesyl pyrophosphate*), el cual es un intermediario en la síntesis de colesterol y otros compuestos terpenoides. Durante la segunda etapa, el FPP es hidrolizado a farnesol mediante la acción de la pirofosfatasa, y posteriormente oxidado hasta ácido farnesoico (FA-*farnesoic acid*) mediante la acción de una alcohol deshidrogenasa (ADH) y una aldehído deshidrogenasa (ALDH). Finalmente, la metilación del ácido farnesoico mediada por la actividad de la enzima ácido farnesoico *O*-metiltransferasa (FAMeT-*Farnesoic acid O-methyltransferase*), da lugar a la formación del farnesoato de metilo (Laufer *et al.*, 1986; Nagaraju *et al.*, 2007).

Una de las principales funciones asociadas al FM es la reproducción, ya que el incremento en la concentración en hemolinfa, o el suministro de esta hormona puede acelerar la maduración en algunas especies como *L. emarginata* y *M. ensis*, donde se ha observado un incremento en el índice gonadosomático (Jo *et al.*, 1999) así como un incremento en la expresión *in vitro* de la vitelogenina en hepatopáncreas y ovario (Tiu *et al.*, 2006). Para *L. vannamei*, el suministro de FM en la dieta incrementa el tamaño de los ovocitos, la frecuencia de desove y la supervivencia larvaria (Tsukimura y Kamemoto, 1991; Laufer, 1992). Interesantemente, el farnesoato de metilo es similar en estructura a la hormona

juvenil III de insectos, la cual se sabe está involucrada en la regulación de la entrada de vitelogenina a los ovocitos (Raikhel y Dhadialla, 1992). La similitud estructural del FM con la hormona juvenil de insectos, sugiere que puede tener una participación similar en los procesos de desarrollo y reproducción de los crustáceos (Laufer *et al.*, 1992).

2.2.2 Receptores de membrana asociados a hormonas esteroideas y procesos reproductivos

El efecto de hormonas esteroideas como la progesterona sobre la estimulación de la vitelogénesis y el crecimiento gonadal ha sido ampliamente reportado en diversas especies de crustáceos (Quackenbush, 1991; Subramonian *et al.*, 2011; Swetha *et al.*, 2011). La existencia de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-Gonadotropin releasing hormone) en la región cerebral, sugiere que la reproducción en crustáceos puede ser regulada de manera similar a lo que se ha observado en vertebrados (Ngersoungern *et al.*, 2007). En *M. japonicus* se ha demostrado que, tanto el ovario como el hepatopáncreas, poseen la maquinaria enzimática capaz de metabolizar esteroides como progesterona y testosterona. Mediante la detección de actividad enzimática, se observó que el ovario es capaz de sintetizar 17β -estradiol, el cual es un metabolito activo de la testosterona generado por la acción de la enzima aromatasa (Summavielle *et al.*, 2003). En *L. vannamei* no se conocen receptores de este tipo a la fecha que nos permitan estudiar la participación de estos genes en la reproducción.

3. JUSTIFICACION

En la búsqueda de tecnologías que permitan optimizar la producción de camarón, se ha puesto de manifiesto la importancia de conocer a fondo cómo se regula una de las etapas críticas de la maduración gonádica, la vitelogénesis, la cual se sabe está mediada por procesos neuroendocrinos. Dicho control se ha comprobado mediante la ablación del tallo ocular y la identificación de secuencias codificantes para las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos. En este sentido, como parte del proyecto Genómica de Camarón del CIBNOR, se comenzó con la búsqueda de secuencias expresadas relacionadas con la reproducción, lo que permitió generar una serie de fragmentos de genes (cDNA) asociados al control neuroendocrino y los mecanismos celulares implicados en la vitelogénesis. En este trabajo se analizó la información transcriptómica obtenida como parte del proyecto mencionado (Ibarra-Humphries *et al.*, 2012), buscando iniciar con la identificación de genes asociados a procesos reproductivos y con el estudio de su función a través de metodologías de RNA de interferencia (RNAi).

Adicionalmente a evaluar la expresión tisular de algunos transcritos seleccionados por su posible papel en la reproducción, de las anotaciones obtenidas del transcriptoma de tallo ocular y gónada de *L. vannamei*, un transcrito no reportado previamente para esta especie, cuya traducción conceptual la ubicó dentro de la familia de las hormonas hiperglucemiantes de crustáceos (CHH por sus siglas en inglés), fue seleccionado para su caracterización. Los neuropéptidos que conforman esta familia de CHHs se sintetizan principalmente en el tallo ocular y presentan una multifuncionalidad asociada a una distribución tejido-específica, en algunos casos como resultado de mecanismos de *splicing* alternativo (Webster *et al.*, 2012). Se ha demostrado que tienen una participación esencial en la reproducción tanto por su participación en la vitelogénesis, como en la regulación de procesos asociados a la misma y que resultan necesarios para que esta pueda llevarse a cabo apropiadamente (Fanjul-Moles 2006; Treerattrakool *et al.*, 2008, Webster *et al.*, 2012). Por tal motivo, se realizó la caracterización completa del transcrito de la hormona hiperglucemiante encontrada en las librerías de pedúnculo de hembras juveniles y de gónada/órgano pericárdico de hembras

adultas, incluyendo su perfil de expresión en diferentes edades y estadios del ciclo de muda, con la finalidad de generar información relacionada con los aspectos moleculares del control neuroendocrino de los principales procesos reproductivos en crustáceos, lo cual puede ser un primer paso para la identificación de marcadores moleculares, que a largo plazo puedan ser implementados en programas de selección y mejoramiento genético.

4. HIPÓTESIS

1. Si genes selectos e identificados por homología y función ontológica en las librerías de tallo ocular y gónada están involucrados en la reproducción, entonces su mayor expresión ocurrirá en gónada y hepatopáncreas, tejidos conocidos por su participación en la maduración.

2. Si la secuencia parcial tipo CHH encontrada en las librerías de *L. vannamei* representa un gen nuevo asociado directamente con la reproducción de la especie, esto podrá ser definido mediante su caracterización, análisis de filogenia, cuantificación de expresión, e inhibición parcial por interferencia de su transcrito

5. OBJETIVOS

5.1 GENERALES

Evaluar los perfiles de expresión de genes identificados en librerías de cDNA y tipo sustractivas de gónada femenina y tallo ocular, seleccionados a partir de homología y función ontológica asociada con la reproducción, con fines de establecer si a través de sus patrones de expresión tisular es posible inferir su participación en la regulación de la reproducción.

Realizar la caracterización de uno de los transcritos encontrados en las librerías, anotado como CHH-like, buscando entender cuál es su participación en el o los procesos fisiológicos del camarón blanco (*L. vannamei*).

5.2 PARTICULARES

1. Realizar la anotación de los transcritos de las librerías de cDNA y SSH de gónada y tallo ocular de hembras de camarón blanco
2. Conocer y cuantificar la distribución tisular de genes asociados al proceso reproductivo e identificados en las librerías de SSH y de cDNA obtenidas de gónada y tallo ocular, mediante la evaluación de la expresión a lo largo de la ontogenia (juveniles, subadultos y adultos) y en ambos sexos
3. Aislar y caracterizar el o los transcritos del gen tipo CHH (mRNA-cDNA) en tallo ocular y órgano pericárdico de hembra y macho, así como el gen codificante en organismos de *L. vannamei*.
4. Definir los tejidos de expresión del gen tipo CHH, así como la localización celular por *hibridación in situ*.
5. Cuantificar la expresión del gen tipo CHH en diferentes tejidos y estadios de muda en organismos de ambos sexos.
6. Evaluar la función *in vivo* del gen tipo CHH mediante el bloqueo del transcrito por RNA de interferencia.

6. MATERIALES Y METODOS

6.3 Aislamiento y caracterización de el o los transcritos del gen tipo CHH (mRNA-cDNA) en tallo ocular y gónada/órgano pericárdico de hembra y macho así como el gen codificante en organismos de *L. vannamei*.

Partiendo de la secuencia parcial tipo CHH anotada tanto en las librerías de tallo ocular como gónada/órgano pericárdico se diseñaron diferentes pares de oligonucleótidos específicos para, en primer lugar, corroborar mediante PCR punto final la secuencia obtenida del ensamble de lecturas, y posteriormente la obtención del o los transcritos completos mediante RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), así como para llevar a cabo la caracterización del gen codificante mediante la amplificación de las posibles regiones intrónicas (Tabla II).

Tabla II. Secuencias nucleotídicas de oligonucleótidos empleados en la caracterización del transcrito y gen codificante de la hormona hiperglucemiente encontrada en *L. vannamei*.

Primer	Secuencia (5' - 3')	T _m (°C)
<i>Lvchh-F1</i>	CTCAATAACGCATGCTTGGA	63
<i>Lvchh-F2</i>	TTAGAGCGGGAACCTCGTG	62.5
<i>Lvchh-F3</i>	CTCGAAATTCCTCGTCAGGA	61.6
<i>Lvchh-R1</i>	TTCTGTTTCTCTCGCGCA	63.6
<i>Lvchh-R2</i>	CTCGAAATTCCTCGTCAGGA	60
<i>Lvchh-R3</i>	CTCAATAACGCATGCTTGGA	61.2
<i>Lvchh-F5 (Nested)</i>	AACTGCTTCGGTACAGAGGT	70.6
<i>ef2-F</i>	CTGTGGTCTGGTTGGTGTG	62
<i>ef2-R</i>	TCGGATGAGTTCTTGGGTTC	60
<i>M13-F</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	55
<i>M13-R</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	55

F= forward, R= reverse, TM= *melting temperatura*= temperatura de fusión.

6.3.1 Material biológico

Se colectaron 35 organismos juveniles (≈10g) de ambos sexos provenientes del laboratorio experimental de maduración de crustáceos del CIBNOR- La Paz. Se realizó la disección de ambos tallos oculares desde su base preservando el tejido en RNAlater (Ambion) a -80°C hasta la extracción del RNA. Se realizó la disección del complejo neuroendocrino empleando material de microcirugía y un estereoscopio: se eliminó la cutícula del tallo ocular para liberar el tejido muscular y se removió cuidadosamente el tejido pigmentario de la retina evitando eliminar el tejido neuroendocrino de interés. Adicionalmente, se tomaron muestras de tejido pericárdico unido a gónada de 4 machos y 6 hembras adultas (30- 35g) obtenidos de la granja comercial FITMAR en Sinaloa; el tejido se preservó en RNAlater a 4°C durante 24 horas y posteriormente a -80°C hasta su posterior procesamiento.

6.3.2 Amplificación del fragmento de la hormona CHH obtenido de las librerías

La extracción de RNA y la síntesis de cDNA se realizaron conforme a lo descrito en la sección 6.2.2. Para la amplificación y corroboración del fragmento interno de 647pb, obtenido de las librerías sustractivas de tallo ocular y órgano pericárdico unido a gónada, se emplearon los oligonucleótidos *Lvchh-F2* y *Lvchh-R1* (Tabla II). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15µL conteniendo 2.5mM de MgCl₂, 1X de buffer de reacción, 0.45µM de cebador de cada oligonucleótido específico, 0.2mM de dNTP mix, 1U de Go Taq DNA polimerasa (Promega) y 250ng de cDNA como molde. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 (BioRad) con las siguientes condiciones: 94°C por 30s, 63°C por 30s, 72°C por 1 min (desnaturalización/alineación/extensión) por 35 ciclos.

Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X, empleando el fluorocromo *SYBR Green* (Invitrogen) en 4µL del producto de PCR. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador (Dark Reader, Clearchemical) y se cortaron empleando una navaja de bisturí estéril, colocando las bandas de manera individual en tubos eppendorf de 2.0 mL. La purificación se realizó con el kit Ultra Clean 15 DNA Purification kit (MoBio, Laboratories, Inc.) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Los productos purificados se ligaron al vector pGEM®-T Easy (Promega) para su transformación en células quimiocompetentes JM109 de *E.coli*. Las colonias positivas se seleccionaron y crecieron en medio LB-Agar con ampicilina durante 18 horas a 37°C (Sambroock y Russell, 2001) para la posterior extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina. Los oligonucleótidos M13 Forward y Reverse (Tabla II) fueron usados para verificar la presencia del inserto en las clonas obtenidas mediante PCR punto final en un volumen de reacción de 12.5 µL con las siguientes condiciones; 1U de Go Taq DNA polimerasa (Promega), 1X de Buffer PCR, 0.2 mM de dNTP mix, 1.5mM de MgCl₂, 0.2 µM de oligonucleótidos Forward y Reverse, y 1µL de DNA plasmídico con un factor de dilución 1:10. La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000, BioRad) con las siguientes condiciones: 95°C por 4 min, seguido de una fase de 30 ciclos

de 30s a 94°C, 30s a 50°C, 45s a 72°C (desnaturalización/alineación/extensión), con una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación tanto en sentido (5'-3') como en antisentido (3'-5') a MACROGEN (Corea del Sur).

6.3.3 Caracterización del transcrito de la hormona hiperglucemiente mediante RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Tallo ocular (XO-SG): A partir del RNA total obtenido de organismos juveniles (sección 6.3.1), se conformó una mezcla (*pool*) para la purificación de RNA mensajero empleando el kit Poly (A) Purist Kit (Ambion) partiendo de una concentración de 897 µg de RNA (870µL), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Órgano pericárdico / gónada de macho y hembra: Para la purificación del mRNA se emplearon seis reproductores adultos (35gr) de cada sexo. A partir de las muestras de hembras se realizó una mezcla (*pool*) del RNA total obtenido de individuos en diferentes estadios de desarrollo gonádico (previtelogénesis, vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria, maduras); en el caso de los machos, las muestras empleadas para la extracción de RNA total y posterior purificación de mRNA, se obtuvieron a partir de machos con madurez gonádica avanzada. La purificación del mRNA de los tejidos se realizó usando el kit Poly(A) Purist kit (Ambion), partiendo de una concentración de 1 mg de RNA total, y siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

Para la síntesis de cDNA-RACE se empleó 1 µg de mRNA de cada tejido como molde para la transcripción usando el kit SMARTer RACE cDNA y la enzima SmartScribe reverse transcriptasa (Clontech) siguiendo las especificaciones establecidas por el proveedor. Para la síntesis de cDNA-RACE 5', se empleó el oligonucleótido 5'-RACE CDS Primer A (5' - (T)₂₅ VN-3'; donde N= A,C,G o T; V= A,G o C) y el adaptador SMARTer IIA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX-3'; donde X representa una secuencia de bases desconocida patentada por Clontech), mismo que se liga a la región 5' del cDNA y que funcionará como secuencia complementaria a un oligonucleótido universal (UPM) empleado en la posterior amplificación por PCR. En el caso de la síntesis del cDNA-RACE 3', se empleó el oligonucleótido 3'-RACE CDS Primer A (5'-

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀-3'). El diseño de oligonucleótidos específicos para la secuencia tipo CHH se realizó a partir de la secuencia originalmente obtenida por PCR descrito en la sección 6.3.2 (Tabla II).

Se realizaron por separado reacciones de amplificación para la obtención de la secuencia hacia las regiones 5' y 3'. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μ L con las siguientes condiciones: 2 μ L de cDNA-RACE para cada reacción 5' o 3', 1X de buffer de reacción, 1X de mix de primer universal (UPM), 200 μ M de dNTP mix, 1X de mix polimerasa cDNA Advantage (Clontech), y 0.3 μ M de oligonucleótidos específicos para la secuencia. Para la reacción hacia 5', se empleó el primer *Lvchh-R1* y hacia 3' se utilizó el primer *Lvchh-F1*. La amplificación por PCR se llevó a cabo por 30 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C por 30s, alineamiento a 60°C por 30s, y extensión a 72°C por 3 min. Para el extremo 3', se realizó una segunda amplificación a partir de una dilución 1:10 del primer producto de PCR con la finalidad de descartar bandas inespecíficas. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 μ L conteniendo 2.5mM de MgCl₂, 1X de buffer de reacción, 0.20 μ M de *Nested Universal Primer* (NUP), 0.20 μ M del oligonucleótido específico *Lvchh-F5 Nested*, 0.2mM de dNTP mix y 0.5U de Go Taq DNA polimerasa (Promega). La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000, BioRad) con las siguientes condiciones: 94°C por 30s, 63°C por 30s, 72°C por 3 min (desnaturalización/alineación/extensión) por 20 ciclos. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X, empleando el fluorocromo *SYBR Green* (Invitrogen) en 4 μ L del producto de PCR. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador (Dark Reader, Clearchemical) y se cortaron empleando una navaja de bisturí estéril, colocando las bandas de manera individual en microtubos de 2.0 mL. Las bandas fueron eluidas en 20 μ L de agua libre de nucleasas (MiliQ). A partir de la elución, se realizó una dilución 1:20 de cada uno de los fragmentos aislados, y se reamplificaron con las siguientes condiciones: 2.5mM de MgCl₂, 1X de buffer de reacción, 0.20 μ M de primer NUP, 0.20 μ M del oligonucleótido específico *Lvchh-F5 Nested*, 0.2mM de dNTP mix, 0.5U de Go Taq DNA polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de punto final (C1000,

BioRad) con las siguientes condiciones: 94°C por 30s, 63°C por 30s, 72°C variable dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar (desnaturalización/alineación/extensión) por 15 ciclos. Los productos de PCR se purificaron y ligaron al vector pGEM®-T Easy (Promega) para la transformación en células quimiocompetentes JM109 de *E. coli*. Se seleccionaron las colonias positivas y se crecieron en medio LB con ampicilina para la extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina para su secuenciación (Macrogen-Corea del Sur) de acuerdo a lo descrito en la sección 6.3.2.

6.3.4 Caracterización parcial del gen de la hormona hiperglucemiantes en *L. vannamei*

Se colectaron 5 organismos subadultos (19-22 gr), provenientes de los estanques intermareales del CIBNOR. De cada individuo se tomó una porción del músculo de la región abdominal y se conservó en etanol al 90% a temperatura ambiente hasta la extracción del DNA genómico, que se hizo empleando el protocolo de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico de Wasko *et al.* (2003). Para la amplificación de las regiones intrónicas se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla II) a partir de la secuencia del transcrito obtenida, tomando como referencia las posiciones de las regiones intrónicas ya reportadas para secuencias tipo CHH (Chen *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2012).

Se realizaron dos reacciones de amplificación mediante PCR punto final con las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: en una primera reacción se emplearon los oligonucleótidos *Lvchh-F2* y *Lvchh-R2*, mientras que en una segunda reacción se utilizaron los oligonucleótidos *Lvchh-F3* y *Lvchh-R1*. Cada uno de los pares de oligonucleótidos se probaron bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 U de Taq polimerasa recombinante (Invitrogen), 1X de Buffer PCR, 0.2 mM de dNTP mix, 2.0 mM de MgCl₂, 0.45 μM de oligonucleótidos forward y reverse y 10 ng de DNA. La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000, BioRad) con las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, seguida de una primera fase de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 2 min a 72°C (desnaturalización/alineación/extensión) por 35 ciclos, en un volumen final de reacción de 15 μL. Los fragmentos obtenidos fueron purificados y ligados al vector pGEM®-T Easy

(Promega), y clonados de acuerdo a lo establecido en la sección 6.3.2, y enviados para su secuenciación a Macrogen (Corea del Sur).

6.3.5 Análisis bioinformático y filogenético de la proteína codificada por el transcrito de la hormona hiperglucemiente de *L. vannamei*

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se compararon en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa BLAST. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el software en línea MAFFT 7 (CBRC, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). El péptido señal y el sitio de corte del péptido maduro, fueron establecidos con la ayuda del software en línea SignalP 4.1 (CBS, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; Petersen *et al.*, 2011). El peso molecular y el punto isoeléctrico (pI) para la proteína fueron estimados teóricamente empleando el software ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) disponible en <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>, la búsqueda de dominios conservados en la secuencia proteica se realizaron empleando la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>; Finn *et al.*, 2014). Para el análisis filogenético, en primer lugar se seleccionaron de la base de datos de GenBank las secuencias proteicas tipo CHH previamente reportadas empleando una estrategia de homología Blastp, eligiendo a partir de esas aquellas proteínas con un valor de similitud de $E \leq -14$. En un segundo análisis se seleccionaron de la base de datos de GenBank las secuencias tipo CHH previamente reportadas para camarones peneidos. En ambos análisis se utilizó el método Jones-Taylor-Thornton en MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) como modelo evolutivo con un valor de *bootstrap* de 1000.

6.4 Patrones de expresión tisular y localización celular del transcrito de la hormona hiperglucemiente en *L. vannamei*

Para determinar los diferentes patrones de expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiente en hembras y machos de *L. vannamei* se realizó en primer lugar un análisis de ubicuidad en distintos tejidos mediante PCR en punto final. Posteriormente, mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) se cuantificaron diferencias en expresión entre tejidos en organismos de ambos sexos. Finalmente, la identificación de las células

específicas de expresión del transcrito en diferentes tejidos se determinó por medio de hibridación *in situ* (ISH). Para la realización de la cuantificación tisular y la localización celular se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir del transcrito obtenido por RACE (Tabla III).

Tabla III. Secuencias nucleotídicas de oligonucleótidos empleados en la determinación de los patrones de expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiante en *L. vannamei*.

Nombre de los oligonucleótidos	Secuencia (5' -3')	T _m (°C)	
Transcrito y gen parcial			
<i>Lvchh-F1</i>	CTCAATAACGCATGCTTGGA	63	
<i>Lvchh-F2</i>	TTAGAGCGGGAACCTCGTG	62.5	
<i>Lvchh-F3</i>	CTCGAAATTCCTCGTCAGGA	61.6	
<i>Lvchh-R1</i>	TTCTGTTTCTCTCGCGCA	63.6	
<i>Lvchh-R2</i>	CTCGAAATTCCTCGTCAGGA	60	
<i>Lvchh-R3</i>	CTCAATAACGCATGCTTGGA	61.2	
Ubicuidad			
<i>Lvchh-F4</i>	AACACAGCCATGGACAACAA	60	
<i>Lvchh-R4</i>	CTCTACCGGATTGCCAAGT	59.7	
qPCR			Eficiencia (%)
<i>18S-F</i>	AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA	63	87.6
<i>18S-R</i>	ATGCTTTCGCAGTAGGTCTGT	64.8	
<i>ef-F</i>	AGATCCAGGCTCGCTACTC	66.4	100
<i>ef-R</i>	GCTGGGAACCATCTTTACG	64.6	
<i>RPL8-F</i>	GCCTAAGGTGCGTGGTGT	58	87.1
<i>RPL8-R</i>	ATTCTGCCTTGGGTCCTTCT	60	
<i>Ubiquitin-F</i>	GGGAAGACCATCACCTTG	60	96.9
<i>Ubiquitin-R</i>	TCAGACAGAGTGCGACCATC	62	

6.4.1. Expresión en tejidos mediante PCR en punto final

Se colectaron seis hembras y seis machos adultos (35 g) provenientes de los estanques intermareales del CIBNOR-La Paz. De cada organismo se disecó tallo ocular, cerebro, branquia, corazón/órgano pericárdico, músculo, hepatopáncreas, intestino y gónada de la región cefalotorácica. Para el caso particular de los machos, se tomaron adicionalmente

muestras de vaso deferente y ámpula terminal. Los tejidos se preservaron en RNAlater a -80°C hasta la extracción del RNA total. Para la síntesis de cDNA se emplearon 250 ng de RNA total como molde para la retrotranscripción en un volumen final de 20µL siguiendo las mismas especificaciones descritas en la sección 6.2.2.

La amplificación del transcrito en los diferentes tejidos, se realizó usando una mezcla (pool) del cDNA de los seis individuos de cada sexo, utilizando 0.5 µL de dicho *pool* (dilución 1:5) como molde en un volumen de reacción de 15 µL con las siguientes condiciones: 1X de buffer de reacción, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP mix, 1U de Taq polimerasa (Promega), y 0.45 µM de oligonucleótidos específicos *Lvchh -F4* y *Lvchh- R4* (Tabla III). La amplificación por PCR se realizó en 40 ciclos, cada ciclo consistió de un periodo de desnaturalización por 30 s a 94°C, alineamiento por 30 s a 61°C, y extensión por 32 s a 72°C.

Como control de amplificación para ambos sexos en los diferentes tejidos analizados se empleó el gen de RNA ribosomal *18S* bajo las siguientes condiciones: buffer de reacción 1X, 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPmix, 1U de Taq polimerasa (Promega) y 0.2 µM de los oligonucleótidos *18S-F* y *18S-R* (Tabla III), en un volumen final de reacción de 15µL con 0.5 µL de cDNA (1:5) como molde. La amplificación por PCR se realizó en 40ciclos, cada uno con las siguientes condiciones: desnaturalización por 30 s a 94 °C, alineamiento por 30 s a 60 °C y extensión por 15 s a 72 °C. Los productos de amplificación de *Lvchh* y *18S*, se visualizaron en gel de agarosa al 1%.

6.4.2 Cuantificación de la expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiante de L. vannamei mediante qPCR

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir del consenso obtenido de las diferentes secuencias encontradas en la caracterización del transcrito por RACE (sección 6.3.3). En el caso de los genes de referencia (*ribosomal RNA 18S*, *ribosomal protein L8*, *ubiquitin*, *elongation factor 1*), se utilizaron oligonucleótidos diseñados a partir de genes constitutivos

encontrados en las librerías (Ibarra-Humphries *et al.*, 2012) (Tabla III) y empleados anteriormente con esta especie (Álvarez-Ruiz, 2012; Galindo-Torres, 2014). La cuantificación de la expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei* se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2.4. Para el análisis de expresión, se realizó un primer análisis considerando como factores el sexo y tejido, después de establecer que no había diferencia en la expresión entre sexos ($P=0.94$) y que la interacción entre ambos factores tampoco fue significativa ($P=0.86$), se realizó un análisis de variancia de una vía considerando la expresión entre tejidos como único factor. Los análisis se realizaron empleando el software STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) y las diferencias se consideraron como significativas cuando el valor de P fue menor a 0.05.

6.4.3 Localización de sitios de expresión mediante hibridación *in situ* (ISH)

Se colectaron 10 hembras y 10 machos (25 g) provenientes de los estanques intermareales del CIBNOR. El cefalotórax, incluyendo ambos tallos oculares, se fijó en paraformaldehído al 4% en PBS durante 48 h a 4°C. Transcurrido el tiempo de fijación, los tejidos se lavaron en PBS 1X por 30 min, se realizó la inclusión en parafina y se realizaron cortes de 6 μm de grosor, los cuales se montaron en laminillas tratadas con Poly L-lisina (Sigma- Aldrich).

Para la transcripción *in vitro* de ribosondas, se determinó en primer lugar el sentido de inserción del fragmento de interés a partir de clonas previamente secuenciadas durante la caracterización del transcrito (sección 6.3.2). Se seleccionaron clonas en sentido (5' - 3') y antisentido (3' - 5'), y a partir del DNA plasmídico de cada una de las clonas seleccionadas, se realizó una amplificación por PCR usando los oligonucleótidos M13 (Tabla III) con la finalidad de obtener el fragmento de interés flanqueado por los sitios de inicio de transcripción de las polimerasas SP6 y T7. La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μL con las siguientes condiciones: 1.5 mM de MgCl_2 , 0.5X de buffer de reacción, 0.2 mM de dNTP mix, 0.2 μM de oligonucleótidos M13 forward y reverse, 1 U de Go Taq DNA polimerasa (Promega), y 10 ng de DNA plasmídico como molde. La amplificación se realizó por 30 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización 30s a 94°C, alineamiento 30s a 50°C, y extensión 55s a 72°C. El producto de amplificación se purificó

mediante la precipitación por etanol absoluto (1 volumen del total de la muestra) por 30 min a -20°C , se centrifugó durante 20 min a 14,000 rpm y el pellet se lavó con etanol 75%. Las ribosondas (sentido y antisentido) se transcribieron empleando las enzimas T7 y SP6 en reacciones separadas usando 1 μg del molde linearizado. Las sondas generadas, se marcaron con digoxigenina-UTP utilizando el sistema DIG RNA Labeling (SP6/T7) (Roche Applied Science).

Para la hibridación, cada laminilla fue desparafinada y rehidratada mediante dos baños de xilol absoluto (10 min cada uno), alcohol absoluto (5 min), y concentraciones decrecientes de alcohol (95%, 80%, 50%, 5 min cada uno). Los cortes rehidratados se incubaron con proteinasa K y fueron post-fijados con paraformaldehído al 4%. La pre-hibridación, hibridación y post-hibridación se realizaron siguiendo el protocolo establecido por Sifuentes-Romero *et al.* (2010). Para la hibridación, se usó una concentración de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para cada ribsonda (sentido y antisentido) y los transcritos se visualizaron empleando el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina para su detección utilizando NBT/BCIP. Los tejidos fueron posteriormente teñidos con café de Bismark al 0.2% por 10 min y se examinaron las laminillas en microscopio (OLYMPUS BX50) realizando la fotodocumentación con ayuda del software ImagePro-Plus (Media Cybernetics, Inc.).

6.4.4 Localización de transcritos de diferente tamaño en diferentes tejidos mediante RACE-3'

Para establecer la presencia de los transcritos previamente caracterizados del gen *Lvchh* en diferentes tejidos, se sintetizó cDNA-RACE 3' siguiendo la metodología descrita en la sección 6.3.3. A partir de 500 ng de RNA previamente tratado con DNAsa, se realizó un *pool* de cinco machos y cinco hembras por separado, y se sintetizó cDNA de cerebro, corazón, branquia e intestino para ambos sexos, y en el caso de los machos adicionalmente se sintetizó cDNA de vaso deferente y espermátforo.

Las condiciones de amplificación fueron como lo descrito en la sección 6.3.3, empleando el oligonucleótido *Lvchh-F3* para la primera reacción de PCR-RACE 3'. Para descartar bandas

inespecíficas, se realizó una PCR anidada, utilizando el oligonucleótido Lvchh-F5Nested (Tabla IV). La amplificación por PCR se llevó a cabo por 25 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C por 30s, alineamiento a 60°C por 30s, y extensión a 72°C por 3 min. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñido con *Gel red*.

Tabla IV. Secuencias de oligonucleótidos usados para la amplificación mediante *RACE* 3' de los transcritos *Lvchh* en diferentes tejidos

Nombre	Secuencia (5' - 3')	T _m (°C)
<i>Lvchh-F3</i>	CTCGAAATTCCTCGTCAGGA	61.6
<i>Lvchh-F5 (Nested)</i>	AACTGCTTCGGTACAGAGGT	70.6

6.5 Cuantificación de la expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei* a lo largo del ciclo de muda

Se colectaron organismos subadultos de 20 g provenientes del laboratorio de reproducción de crustáceos del CIBNOR. Para determinar el estadio de muda, se consideró el grado de desarrollo de las setas en la región del urópodo, empleando como referencia las descripciones realizadas por de Oliveira-Cesar *et al.* (2006) y Corteel *et al.* (2012). Para este análisis, se consideraron 4 estadios: pos-muda A y B, en los cuales el tejido se observa unido a la base de las setas, o comienza a retraerse; intermuda C, el tejido se encuentra debajo de la base de las setas y los cromatóforos se observan extendidos; pre-muda temprana D0 y D1, en la cual se forma un espacio translúcido entre la cutícula y la epidermis; premuda tardía D2 y D3, las nuevas setas son visibles debajo de la antigua cutícula. La determinación de cada estadio de muda se realizó al momento de la toma de muestras con la ayuda de un estereoscopio. Los urópodos se conservaron a -20°C en agua marina filtrada para la posterior fotodocumentación. Para cada estadio de muda se colectaron 5 organismos de cada sexo, de los que se disecó tallo ocular, cerebro, corazón, branquia, intestino, y adicionalmente en el caso de los machos, los vasos deferentes y el ámpula terminal. Los tejidos se preservaron en *RNAlater* (Ambion) a -20°C hasta la extracción del RNA.

La cuantificación de la expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei* se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2.4. Los genes de referencia evaluados fueron los siguientes: *ribosomal RNA 18S*, *40S ribosomal protein*, *ubiquitin* y *ribosomal protein S12* (Tabla V). Para el análisis estadístico, después de establecer que no había diferencias en expresión entre sexos ($P > 0.05$), los datos se analizaron aplicando un análisis de varianza de dos factores (tejido y estadio de muda). El análisis post-hoc se realizó empleando la prueba de LSD (Least Significant Differences) de Fisher con un valor de significancia de $P < 0.05$.

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos usados en la determinación de los patrones de expresión del transcrito *Lvchh* durante el ciclo de muda

Nombre	Secuencia (5' -3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Eficiencia de amplificación (%)
<i>18S-F</i>	AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA	63	200	92.7
<i>18S-R</i>	ATGCTTTCGCAGTAGGTCGT	64.8		
<i>40S_S24 F</i>	CAGGCCGATCAACTGTCC	66.3	204	99.5
<i>40S_S24 R</i>	CAATGAGAGCTTGCCTTCC	64.8		
<i>S12-F</i>	GTGGAAGGAGACGTTGGTGT	66.5	150	100
<i>S12-R</i>	AGAGCCTTGACCGCTTCAT	64.6		
<i>Ubiquitin-F</i>	GGGAAGACCATCACCCCTTG	66.4	146	100
<i>Ubiquitin-R</i>	TCAGACAGAGTGCGACCATC	66.5		
<i>Lvchh-F3</i>	CTCGAAATTCCTCGTCAGGA	64.8	123	100
<i>Lvchh-R3</i>	CTCAATAACGCATGCTTGGA	63.0		

6.6. Análisis de la función *in vivo* del gen tipo CHH mediante el bloqueo del transcrito por RNA de interferencia.

6.6.1 Síntesis de RNA de doble cadena (*dsRNA*)

A partir del fragmento de 647pb obtenido de cDNA de pedúnculo, se realizó la síntesis de RNA de cadena simple (ssRNA) por transcripción *in vitro* en sentido (5' - 3') y anti-sentido (3' - 5'). Para la síntesis, se realizó en primer lugar la amplificación del fragmento del transcrito del gen de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei*. La reacción de

amplificación se realizó en un volumen final de 15 μ L conteniendo 2.5mM de MgCl₂, 1X de buffer de reacción, 0.30 μ M de primer de cada primer específico (Tabla VI), 0.2 mM de dNTP mix y 1 U de Go Taq DNA polimerasa (Promega). La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000, BioRad) utilizando con las siguientes condiciones: 94°C por 30s, 63°C por 30s, 72°C por 40s (desnaturalización/alineación/extensión) por 35 ciclos. Una vez verificado el tamaño del fragmento en gel de agarosa al 1%, se realizó la ligación al vector pGem®-T easy (Promega) el cual contiene la región promotora T7, y la clonación y obtención del DNA plasmídico se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.3. Con la finalidad de obtener un molde en sentido y otro en anti-sentido para la posterior transcripción de RNA de cadena simple, se verificó la orientación del fragmento *Lvchh* de acuerdo a la posición del promotor T7. Esto es, para una misma clona se realizaron dos reacciones de PCR por separado, en una reacción se emplearon los oligonucleótidos T7 + *Lvchh-F*, y en una segunda reacción los oligonucleótidos T7+*Lvchh-R*, teniendo que si el fragmento se ligó en dirección 5'-3' (sentido) en relación a la localización del promotor T7, la combinación T7+*Lvchh-R* resultaba en una amplificación positiva, mientras que si el fragmento se ligó en dirección 3'-5' (antisentido) respecto al promotor T7, la combinación T7+*Lvchh-F* daba lugar a la amplificación del fragmento esperado. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 15 μ L, conteniendo 0.5X de Buffer de reacción, 0.2 mM de dNTP' s, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 1 U de Go Taq DNA polimerasa (Promega) y 1 μ L de DNA plasmídico. La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000 BioRad) con las siguientes condiciones: 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 1 min (desnaturalización/alineación/extensión) por 35 ciclos. Los productos de amplificación en sentido y antisentido se purificaron mediante precipitación con una mezcla de 0.05 volúmenes de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M, 0.1 volúmenes de acetato de sodio (NaOAc) 3M y 2 volúmenes de etanol al 100% y se visualizaron en gel de agarosa al 1% empleando un marcador de masa (Low DNA Mass Ladder) para determinar la concentración de forma cualitativa. La obtención de los moldes en sentido y antisentido para el control negativo de silenciamiento eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) se realizó de acuerdo a lo descrito en Galindo-Torres (2014). En resumen, el molde para la

transcripción de RNA fue obtenido mediante amplificación por PCR usando 10 pg del vector pKGWFS7 el cual contiene el promotor del gen eGFP (Karimi *et al.*, 2002). La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000 BioRad) con las siguientes condiciones: 94°C por 30 s, 50°C por 36 s, 72°C por 30 s (desnaturalización/alineación/extensión) por 30 ciclos 94°C – 3 min. El producto de amplificación fue ligado en la región 5' a adaptadores T7 empleando el kit BLOCK-iT RNAi TOPO Transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) siguiendo las especificaciones del proveedor. El fragmento ligado al adaptador T7 fue utilizado como molde en las posteriores amplificaciones por PCR, empleando la combinación de cebadores eGFP-F +T7 y eGFP-R +T7 en reacciones separadas para la obtención de los moldes en sentido y antisentido.

Tabla VI. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la transcripción de la doble cadena de RNA de los genes de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei* y el promotor del gen eGFP en el constructo pKGWFS7.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm(°C)	Tamaño (pb)
Lvchh-F2	TTAGAGCGGGAAGCTCGTG	62.5	647
Lvchh-R1	TTCTGTTTCTCTCGCGCA	63.6	
eGFP-F	GACGTAAACGGCCACAAGTT	50	609
eGFP-R	GAAGTCCAGCAGGACCATGT	55	
T7-promoter	TAATACGACTCACTA	65.2	

La síntesis de RNA de cadena simple en sentido y antisentido para *Lvchh* y *eGFP* se realizó empleando el kit comercial MEGAscript® RNAi kit (Invitrogen), siguiendo las especificaciones establecidas por el proveedor. El RNA de doble cadena (dsRNA) se obtuvo a partir de la hibridación y alineamiento de ambas cadenas sencillas (ssRNAs) por incubación a 75°C durante 5 minutos, y la posterior disminución de temperatura por 20 minutos (Treerattrakool *et al.*, 2008; Soñanez-Organis *et al.*, 2010; Treerattrakool *et al.*, 2011). El dsRNA purificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y la

concentración final alcanzada fue determinada mediante el marcador de masa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

6.6.2 Silenciamiento del transcrito *Lvchh*

Se evaluaron organismos subadultos (16 ± 2 g) de ambos sexos sin ablacionar, manteniéndolos en condiciones ambientales de maduración (alimento peletizado semi-húmedo Breed-S®-FRESH INVE Aquaculture a una temperatura de 28°C y salinidad de 35ppm) durante la realización del bioensayo. Se establecieron tres tratamientos: (1) incluyó a aquellos organismos a los cuales se les indujo el silenciamiento inyectando la doble cadena del transcrito *Lvchh*; (2) un control negativo usando un gen exógeno al camarón, en el cual se realizó la inyección de RNA de doble cadena del gen eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) y; (3) un control negativo adicional con organismos inyectados únicamente con solución salina. Para cada tratamiento se emplearon 20 organismos de cada sexo y el dsRNA tanto del gen blanco (*Lvchh*) como del gen exógeno (eGFP) fueron diluidos en solución salina (20mM Tris, pH 7.4, 400 mM NaCl), inyectando 20 µg de doble cadena ajustando a un volumen final de 100 µL con solución salina (1 µg de dsRNA por gramo de peso), utilizando una jeringa de insulina entre el segundo y tercer segmento abdominal. Se tomaron muestras de tallo ocular, gónada y hepatopáncreas a las 24 horas y 48 horas y 5 días después de la inyección. Los tejidos como tallo ocular, gónada y hepatopáncreas se preservaron en RNAlater (Ambion) para la extracción de RNA total y fueron conservadas posteriormente a -80°C hasta su procesamiento.

6.6.3 Validación del silenciamiento del transcrito *Lvchh* mediante qPCR

La expresión del transcrito *Lvchh* para cada tratamiento se cuantificó mediante RT-qPCR en tallo ocular. El análisis de la expresión relativa se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.4, evaluando los genes *ribosomal RNA 18S*, *ribosomal protein L8*, *ribosomal protein S12*, *ribosomal protein S24* como genes potenciales de referencia para la normalización de la expresión.

7. RESULTADOS

7.2 Caracterización del transcrito de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei* y su gen codificante

Se aislaron dos transcritos. El primero corresponde a una secuencia de 1578 pb (Fig. 22A; GenBank No. KJ660842) encontrada en tallo ocular y órgano pericárdico de macho, conformada por una región UTR hacia el extremo 5' de 103 pb, una región codificante (ORF) de 387 pb y una región UTR hacia el extremo 3' de 1088 pb, la cual incluye una señal de poliadenilación (AATATA) localizada 18 pb hacia arriba de la región de *polyA*. El segundo transcrito, aislado únicamente de órgano pericárdico de hembra, presentó una longitud de 974 pb (GenBank No. KU174947), con una región UTR 3' de 484 pb. La señal de poliadenilación se identificó 9 pb hacia arriba de la región de *polyA*. Ambos transcritos codifican la misma proteína de 128 aminoácidos con un peso molecular teórico de 14.4 KDa, la cual está conformada por un péptido señal de 27 aminoácidos, un péptido precursor de 27 aminoácidos y el péptido maduro de 76 aminoácidos con los 6 residuos de cisteína característicos de las hormonas hiperglucemiantes (Fig. 22B). El análisis Pfam mostró que el péptido precursor de 27 aa no posee los motivos conservados de las neurohormonas H (CPRP - CHH precursor-related peptide) de la subfamilia tipo I de las hormonas hiperglucemiantes el cual es principalmente encontrado en las CHHs de diversas especies de cangrejo.

El gen sin la región del promotor es de 2504 pb, y está conformado por 4 exones y 3 intrones (GenBank No. KJ660843). El primer intrón presentó un tamaño de 480 pb y se localiza dentro de la región del péptido señal, el segundo intrón con un tamaño de 224 pb se localiza en la región del péptido maduro, y el tercer intrón de 251 pb se localiza dentro de la región UTR 3' (Fig. 22A).

El análisis de similitud realizado con las secuencias CHH reportadas en la base de datos de GenBank, reveló que la hormona hiperglucemiante descubierta en este trabajo (LvCHH) es un nuevo péptido que muestra una similitud no mayor a 54% con las proteínas tipo CHH-I previamente reportadas, principalmente en cangrejos e insectos. La mayor identidad, se observó con una CHH del isópodo *Eurydice pulchra* (54%) y con un péptido tipo ITP (Ion

Transport Peptide) del colémbolo *Folsomia candida* (54%), seguido por las secuencias MOIH de cangrejo *Libinia emarginata* (52%), una isoforma de una CHH de órgano pericárdico aislada del cangrejo *Potamon ibericum* (50%) y la CHH del camarón *Pandalopsis japonica* (50%). La proteína LvCHH también mostró un alto valor de similitud (E -14) con CHHs tipo I de otras especies de crustáceos, particularmente isoformas aisladas de tejidos extra-oculares, como órgano pericárdico, ganglio torácico, intestino medio y testículo de especies como *Pachygrapsus marmoratus*, *Gecarcinus lateralis*, *Gecarcoidea natalis*, *Homarus americanus* y *H. gammarus*. El análisis filogenético realizado con estas secuencias muestra la formación de dos clados, uno conformado por proteínas CHH tipo I, y un segundo clado integrado por péptidos tipo ITP de insectos. La secuencia proteica de LvCHH de este estudio se observó entre estos dos clados (CHH-I e ITP), en una rama separada junto con la proteína del isópodo *E. pulchra* (Fig. 23).

Por otro lado, el análisis filogenético con las secuencias tipo CHH registradas para peneidos indicó que la proteína LvCHH se ubica entre los tipos I y II de la familia CHH en una rama independiente, aunque más cercana a las proteínas tipo II (Fig. 24). En un análisis de alineamiento múltiple realizado posteriormente con las secuencias de las proteínas CHH reportadas para *L. vannamei* (Fig. 25), se observó que las proteínas tipo CHH-I presentan variación en longitud y secuencia de aminoácidos en la región CPRP, siendo la secuencia nombrada como ITP (ABN11282) la única que presenta los dominios conservados para esta región. Mientras que las secuencias de tipo CHH-II presentan la inserción de una glicina en la posición 12 aa, característica para esta subfamilia, y LvCHH se observa también la inserción de una glicina, esta se encuentra en la posición 32 del péptido maduro y no en la misma posición que la glicina de las CHH tipo II. La glicina insertada en LvCHH es una característica única entre las secuencias de hormonas hiperglucemiantes reportadas hasta ahora en crustáceos, ya que ninguna otra la presenta. Los valores de similitud entre las proteínas tipo I reportadas para *L. vannamei* con respecto a la proteína analizada en este trabajo, variaron entre 46% y 57%, mientras que en el caso de las proteínas tipo II la similitud fue menor, con valores entre 41% y 45%.

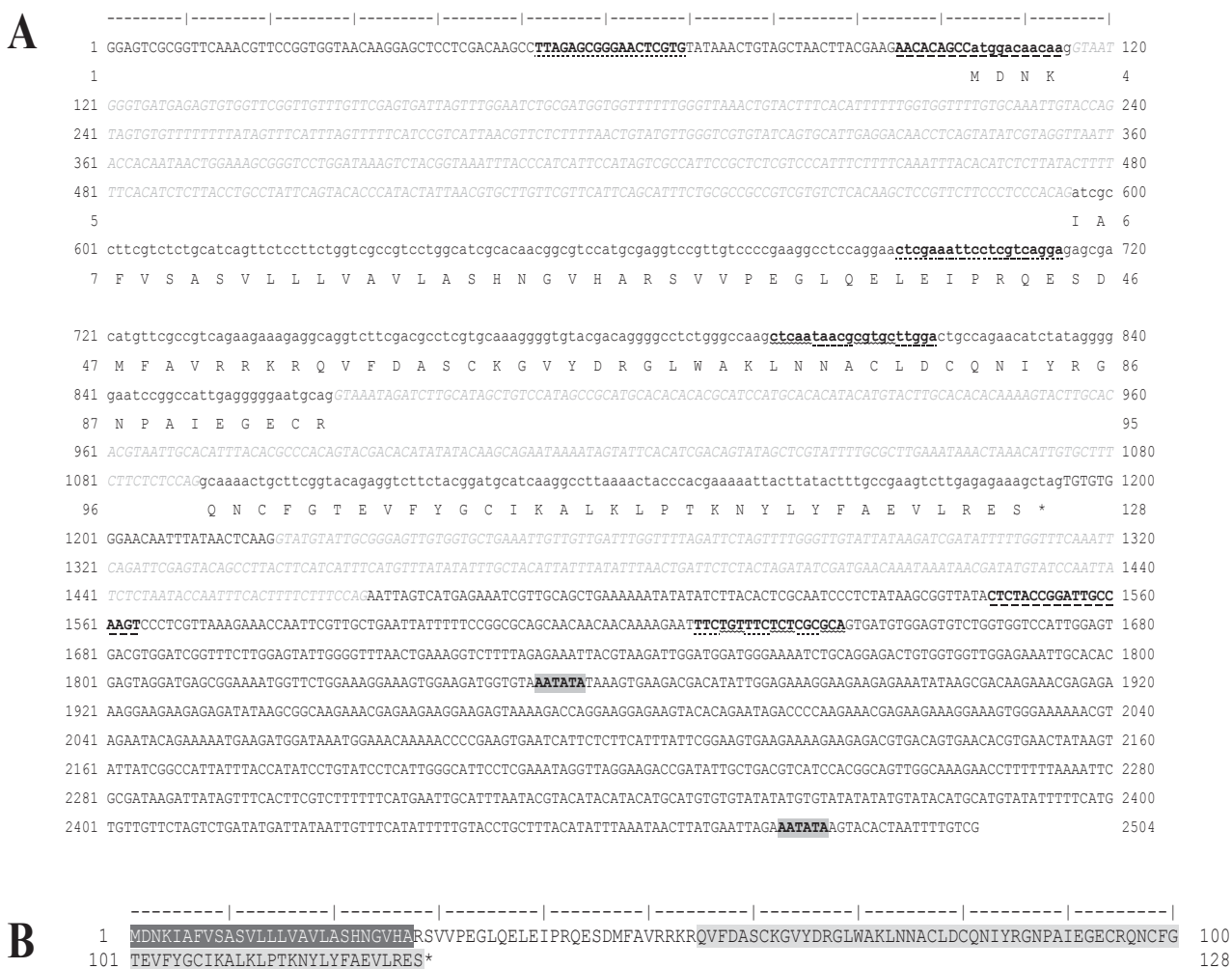


Figura 22. (A) Secuencia nucleotídica y traducción conceptual del transcrito *Lvchh* (GenBank No. KJ660842, KU174947) y gen (GenBank No. KJ660843). El marco abierto de lectura (ORF) se muestra en minúsculas y los aminoácidos correspondientes se localizan debajo. Las regiones exónicas se indican en negro y las regiones intrónicas en gris. Las señales de poliadenilación se muestran resaltadas y la localización de los oligonucleótidos se muestra subrayada. (B) Traducción conceptual de la proteína LvCHH.

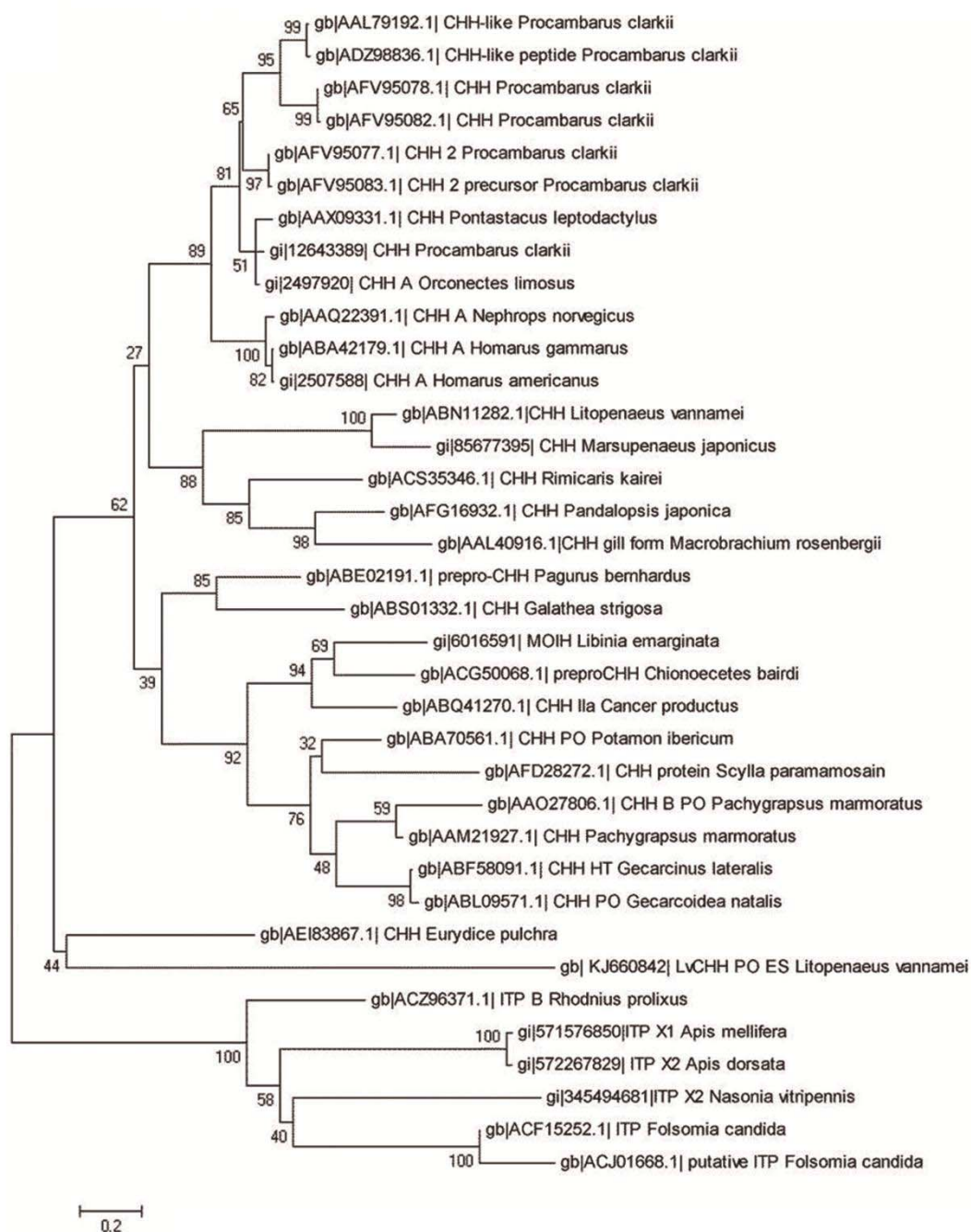


Figura 23. Árbol filogenético resultante del análisis de secuencias proteicas pertenecientes a la familia CHH reportadas en GenBank. El valor de iteración (*bootstrapping*) basado en 1000 réplicas se muestra en cada nodo. El número de acceso y nombre de la especie se incluye en cada rama.

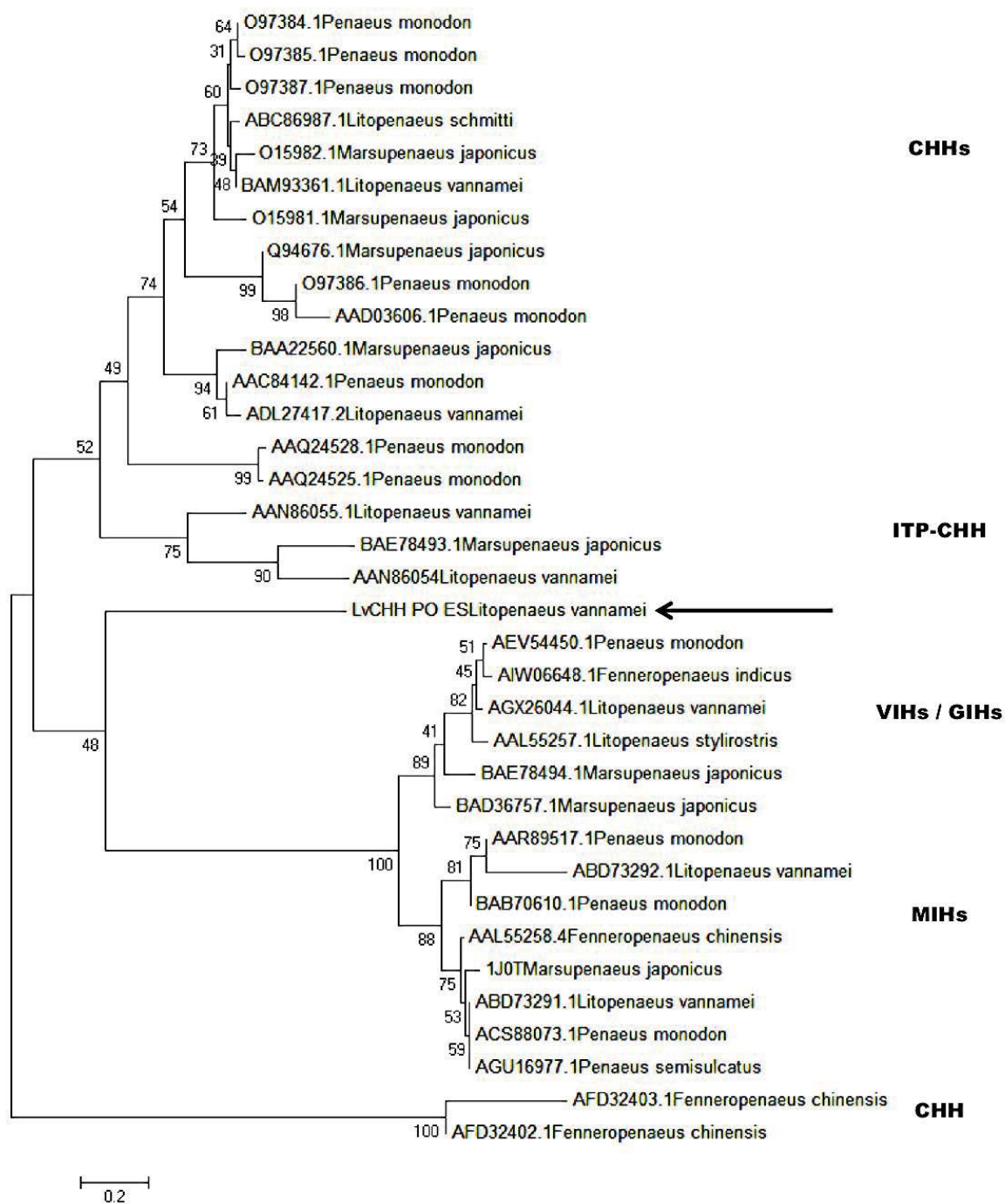


Figura 24. Árbol filogenético resultante del análisis de secuencias proteicas pertenecientes a la familia CHH reportadas para peneidos. El valor de iteración (*bootstrapping*) basado en 1000 réplicas se muestra en cada nodo. El número de acceso a la proteína en GenBank y nombre de la especie se incluye en cada rama. La flecha señala la posición de LvCHH en el árbol.

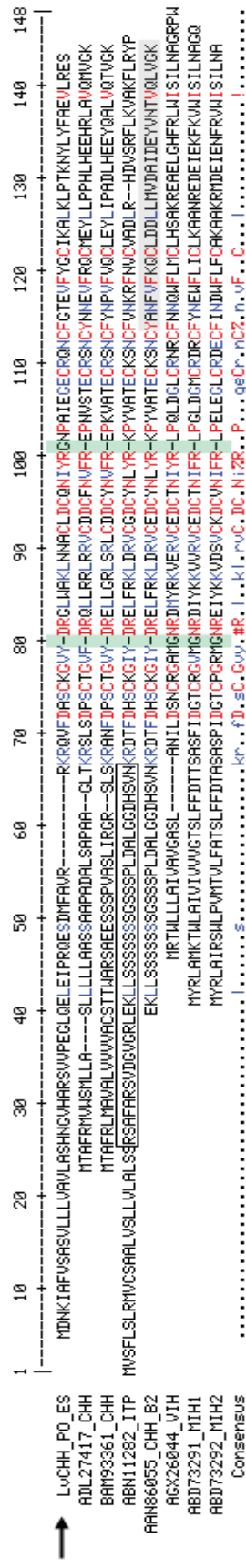


Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias peptídicas tipo CHH reportadas para *L. vannamei*. El número de acceso en GenBank y nombre de la proteína se indican en cada secuencia, la proteína LvCHH se señala con una flecha. Las regiones marcadas en verde indican el sitio de la inserción del aminoácido glicina en las CHHs tipo II y en la proteína LvCHH aislada en este trabajo. Los residuos altamente conservados se muestran en rojo. La región CPRP conservada para la secuencia ITP se muestra en un recuadro negro.

7.3 Patrones de expresión del transcrito de la hormona hiperglucemiante de *L. vannamei* (*Lvchh*)

7.3.1 Expresión por tejidos mediante PCR de punto final

El análisis de ubicuidad del transcrito *Lvchh* (521pb) mediante PCR de punto final indicó que este transcrito se expresa en tallo ocular, cerebro, corazón, branquia e intestino de ambos sexos (Fig. 26), y en el caso particular de machos, se detectó también su presencia en vaso deferente y espermatóforo/ámpula terminal (Fig. 26A). No se observó amplificación en tejidos como hepatopáncreas, músculo, testículo y gónada de hembra (Fig.26B).

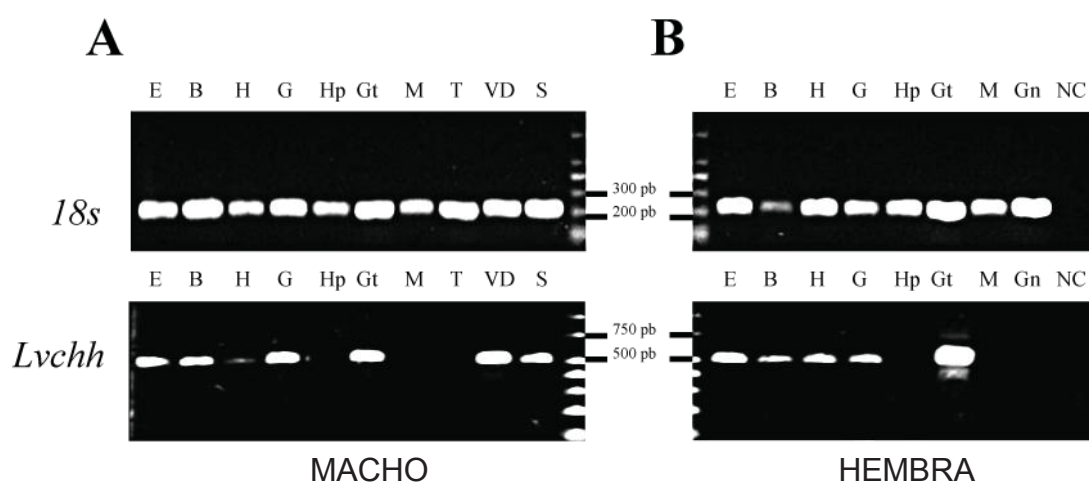


Figura 26. Expresión del transcrito *Lvchh* en diferentes tejidos de machos (A) y hembras (B) de organismos adultos de *L. vannamei*. Los productos de amplificación se obtuvieron a partir del RNA total de tallo ocular (E), cerebro (B), corazón (H), branquia (G), hepatopáncreas (Hp), intestino (Gt), músculo (M), testículo (T), vaso deferente (VD), ámpula terminal/espermatóforo (S) y gónada de hembra (Gn). El control negativo se denota como NC. Como control interno se utilizó el gen ribosomal 18S.

7.3.2 Cuantificación de la expresión en diferentes tejidos

Los genes *rpl8* y *ubiquitina* se eligieron como genes de referencia para estimar la expresión relativa en los diferentes tejidos ya que fueron los que presentaron una expresión más estable entre las condiciones evaluadas. En un primer análisis factorial de varianza se

encontró que no existían diferencias significativas en expresión de *Lvchh* entre machos y hembras ($P>0.05$), por lo que los datos de ambos sexos se juntaron para los siguientes análisis, estimando únicamente las diferencias entre los tejidos. Este análisis indicó que, respecto a lo observado en tallo ocular, la expresión del transcrito *Lvchh* es significativamente menor en vaso deferente y espermátforo de machos, así como también en corazón, branquia, cerebro (ambos sexos). Sin embargo, la expresión en tallo ocular fue significativamente menor a lo encontrado en intestino, el cual presentó el mayor valor de expresión (Fig. 27). Esto es, la expresión del gen *Lvchh* en intestino fue 1.6 veces mayor que en tallo ocular, 5.6 veces mayor que en cerebro y 14.6 veces mayor que en branquia. Por otro lado, la expresión en tallo ocular fue 3.4 veces mayor que lo observado en cerebro y 9 veces mayor que la expresión en branquia. Si bien no se observaron diferencias significativas entre la expresión observada en cerebro, branquia, corazón, vaso deferente y espermátforo, se puede observar que existe una tendencia tanto en branquia como en cerebro a presentar un nivel de expresión mayor al observado en el resto.

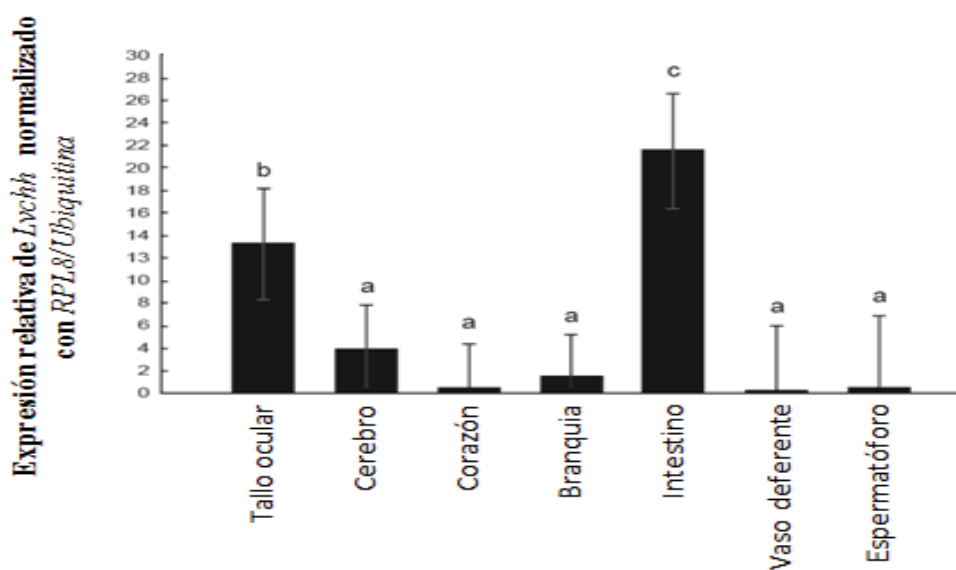


Figura 27. Expresión relativa del transcrito *Lvchh* en diferentes tejidos de organismos adultos de *L. vannamei*. Los valores se representan como medias con intervalos de confianza.

7.3.3 Localización de las células de expresión del transcrito *Lvchh*

La expresión del transcrito *Lvchh* en tallo ocular y tejidos extra-oculares se logró demostrar adicionalmente mediante hibridación *in situ*. En el caso de tallo ocular, la presencia del transcrito *Lvchh* se observó en el citoplasma de las células neuroendocrinas que componen el órgano de Hännstrom (Fig. 28-A1) en forma de puntos localizados a lo largo del contorno celular. En el resto de las células que componen el centro neurosecretor del tallo ocular no se detectó expresión. La figura 28-B1 muestra la señal de hibridación detectada en las terminaciones axónicas que se extienden de la médula terminal del órgano X conocido como nervio óptico. Anatómicamente, el nervio óptico se extiende hacia el ganglio supraesofágico (SoG) conectando con la región del protocerebro, tejido donde se observó también la presencia del transcrito a lo largo de los axones que lo conforman (Fig. 28-C1). En el resto del SoG no se encontró señal positiva de hibridación.

De manera adicional, se confirmó la expresión del transcrito *Lvchh* en la región ventral de la cavidad pericárdica tanto en machos como en hembras. En la figura 29 se muestra la señal positiva que exhiben las células que conforman el pericardio, específicamente en las fibras varicosas que se sitúan junto al tejido gonadal.

En el caso de las gónadas, no se encontró señal positiva en tejido de hembras. Mientras que en el caso de los machos, se detectó señal positiva de hibridación en el tejido que rodea la periferia del vaso deferente (Fig. 30A), la cual fue corroborada en diferentes secciones del mismo encontrando la presencia persistente del transcrito *Lvchh* en esta capa celular exterior. Finalmente, se detectó expresión del gen *Lvchh* en las fibras de tejido conectivo que conforman la cámara gástrica localizada en la región del intestino anterior (Fig. 30B).

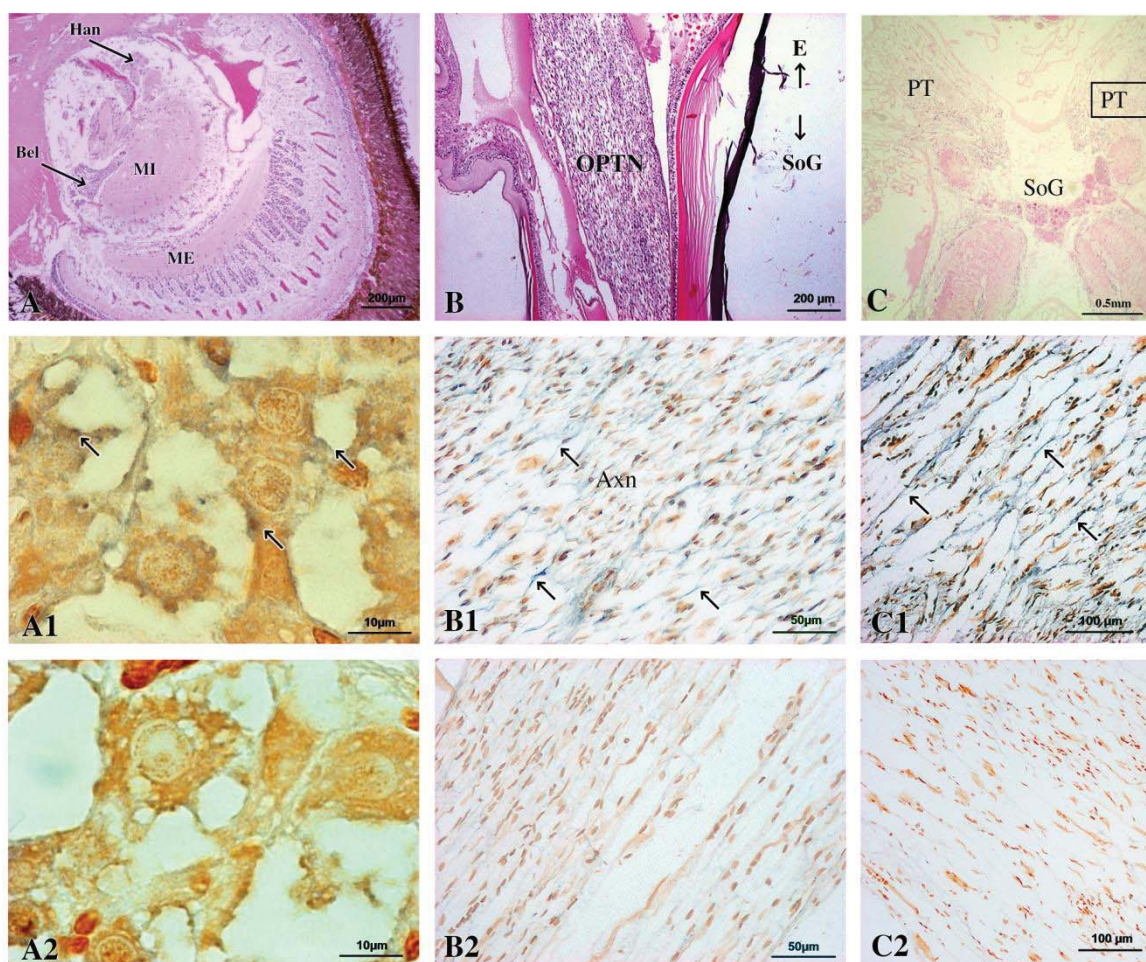


Figura 28. Órgano X, nervio óptico (OPTN) y ganglio supraesofágico (SoG) de *L. vannahmei*. (A) Vista longitudinal del tallo ocular teñido con hematoxilina y eosina (H&E) mostrando el órgano de Hanström (Han), Órgano de Bellonci (Bel), medula externa (ME) y medula interna (MI). (A1) Vista a mayor aumento del Órgano X donde se observa señal positiva del transcrito *Lvchh* en células neurosecretoras (flechas). (B) Vista longitudinal del nervio óptico (OPTN) teñido con H&E. (B1) Señal de hibridación positiva de la sonda antisentido de *Lvchh* en neuronas internas (flechas), (C) Vista dorsal del SoG teñido con H&E. (C1) Detalle celular del tracto del protocerebro (PT) señal de hibridación positiva en neuronas internas (flechas). (A2, B2, C2) Sonda sentido, usada como control negativo de hibridación.

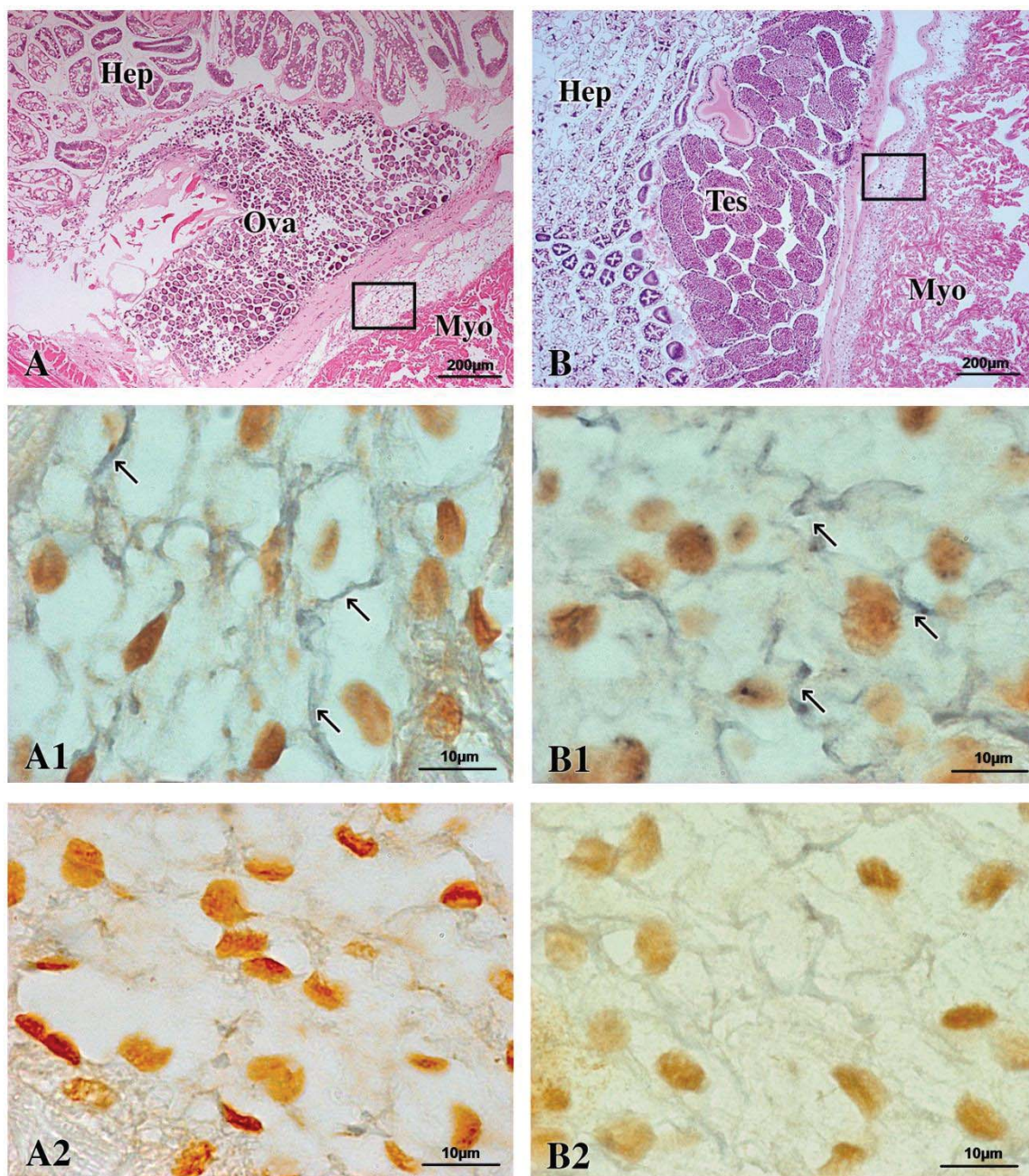


Figura 29. Cavity pericárdica de *L. vannamei*. Vista dorsal de hembra (A) y macho (B) de la región ventral de la cavity pericárdica, teñida con hematoxilina y eosina, mostrando células del miocardio (Myo), hepatopáncreas (Hep), ovarios (Ova) y lóbulo testicular (Tes). (A1, B1) Vista a mayor aumento del epicardio (recuadro en A y B) donde se observa señal positiva de hibridación de la sonda antisentido de *Lvchh* (flechas). (A2, B2) sonda sentido, utilizada como control negativo de hibridación.

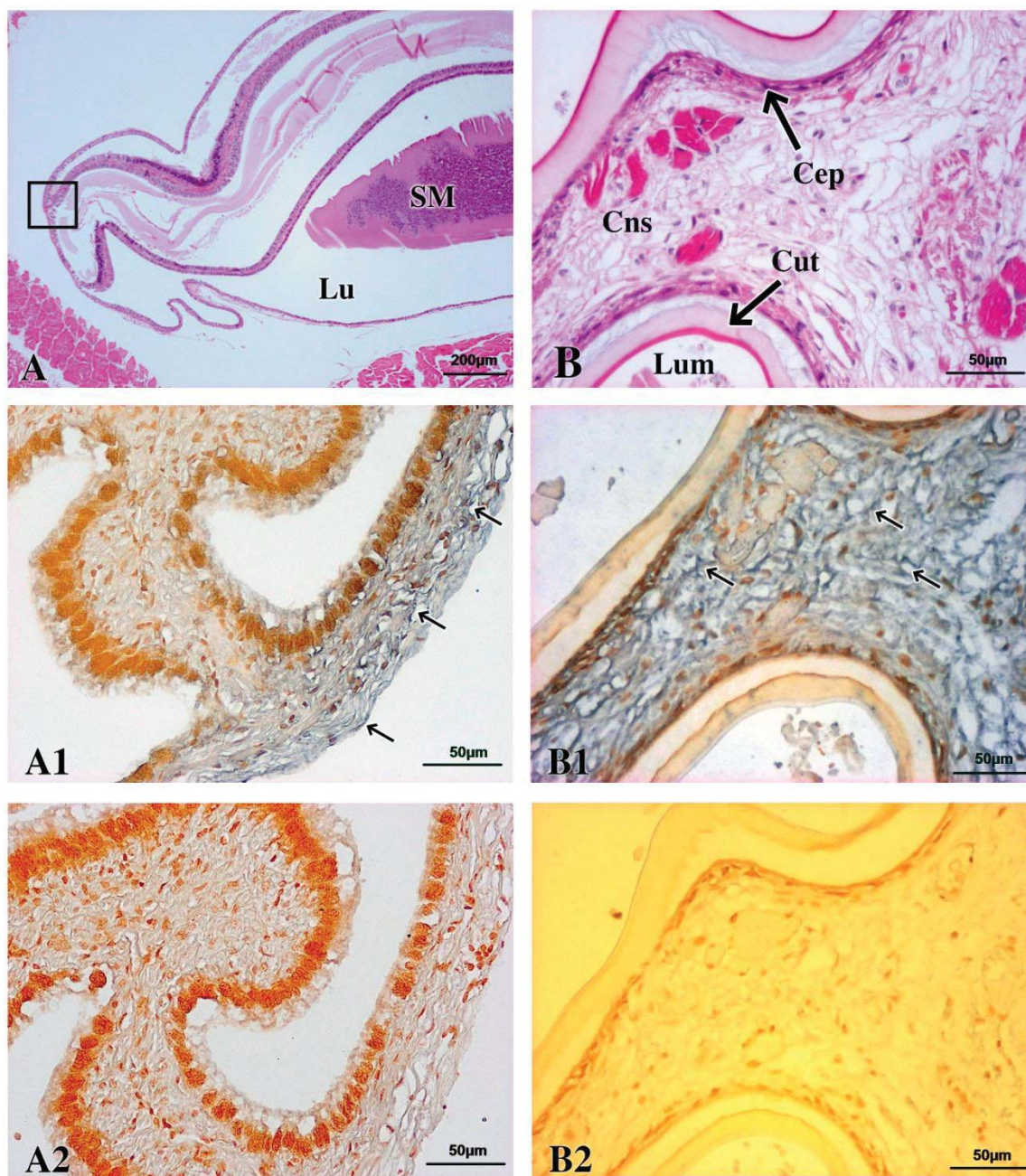


Figura 30. Vaso deferente (A) y cámara gástrica anterior (B) de *L. vannamei*, teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). En vaso deferente se muestra el lumen (Lu) y masa espermática (SM); en la cámara gástrica se observa la cutícula (Cut), epitelio cuticular (Cep), lumen del estómago (Lu) y tejido conectivo (Cns). A1&B1 señalan positiva de hibridación con sonda antisentido en tejido conectivo (flechas). A2&B2 control negativo de hibridación.

7.3.4. Localización de los transcritos *Lvchh* en diferentes tejidos mediante RACE 3'

Considerando la localización de los cebadores/oligonucleótidos *Lvchh*-F3 y *Lvchh*-F5Nesteds en las secuencias originales caracterizadas mediante RACE, los tamaños esperados al amplificar cDNA-RACE usando el cebador forward en sentido y hacia la región 3' para los transcritos eran de 583 pb para el transcrito corto, mientras que para el transcrito largo el tamaño esperado era de 1187 pb. Como se puede ver en la figura 31, líneas 5 a la 10, en machos se identificó la presencia de ambos transcritos en cerebro, corazón, branquia, intestino, vaso deferente y espermatóforo. Por otro lado, en el caso de las hembras solo se observa claramente el transcrito corto en branquia e intestino (Figura 31, líneas 3 y 4). Debido a la baja concentración de RNA empleada para la síntesis de cDNA en cerebro y corazón de hembra, no se logró observar amplificación de ningún transcrito.

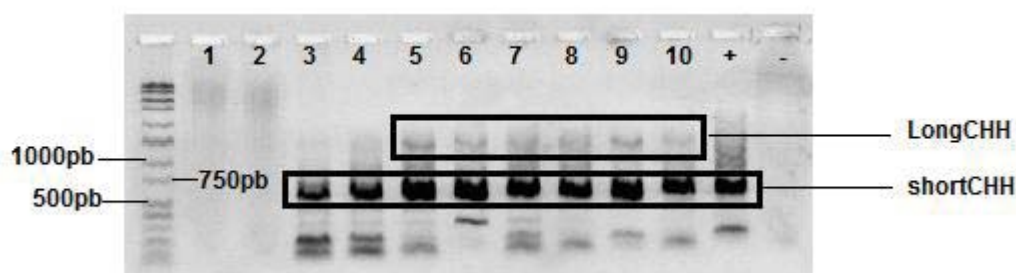


Figura 31. Expresión de transcritos *Lvchh* en diferentes tejidos de *L. vannamei*. 1. cerebro hembra; 2. Corazón hembra; 3. Branquia hembra; 4. Intestino hembra; 5. Cerebro macho; 6. Corazón macho; 7. Branquia macho; 8. Intestino macho; 9. Vaso deferente; 10. Espermatóforo. El control positivo corresponde al cDNA 3' de gónada/órgano pericárdico de hembra empleado en la caracterización original del transcrito.

7.3.5. Expresión del transcrito *Lvchh* a lo largo del ciclo de muda

Los genes ubiquitina y S12 se eligieron como genes de referencia para estimar la expresión relativa en los diferentes tejidos y estadio de muda. En un primer análisis factorial de varianza se encontró que no existían diferencias significativas en expresión de *Lvchh* entre machos y hembras ($P > 0.05$), por lo que los datos de machos y hembras se analizaron juntos en los siguientes análisis, estimando únicamente las diferencias entre estadio de

muda y tejido. Este análisis indicó un efecto significativo tanto del tejido ($P = 0.00$) como del estadio de muda ($P = 0.00$) en la expresión del transcrito *Lvchh*. La interacción entre ambos factores fue significativa ($P = 0.00$) debido a que la expresión entre estadios de muda no sigue el mismo patrón de expresión en todos los tejidos analizados. En general, se observa un incremento en la expresión de premuda 1 (D0-D1) a premuda 2 (D2-D3) en todos los tejidos. Sin embargo, en tejidos como cerebro, corazón y branquia, hay un incremento en la expresión de premuda 2 a posmuda, mientras que en espermátforo y vaso deferente esta disminuye. En el caso de tallo ocular e intestino, la expresión entre premuda 2 y posmuda no presenta diferencias significativas. Finalmente, en cerebro y branquia, la expresión disminuye del estadio de posmuda a intermuda, pero incrementa en vaso deferente y espermátforo, mientras que en tallo ocular, corazón e intestino permanece sin diferencia (Fig. 32).

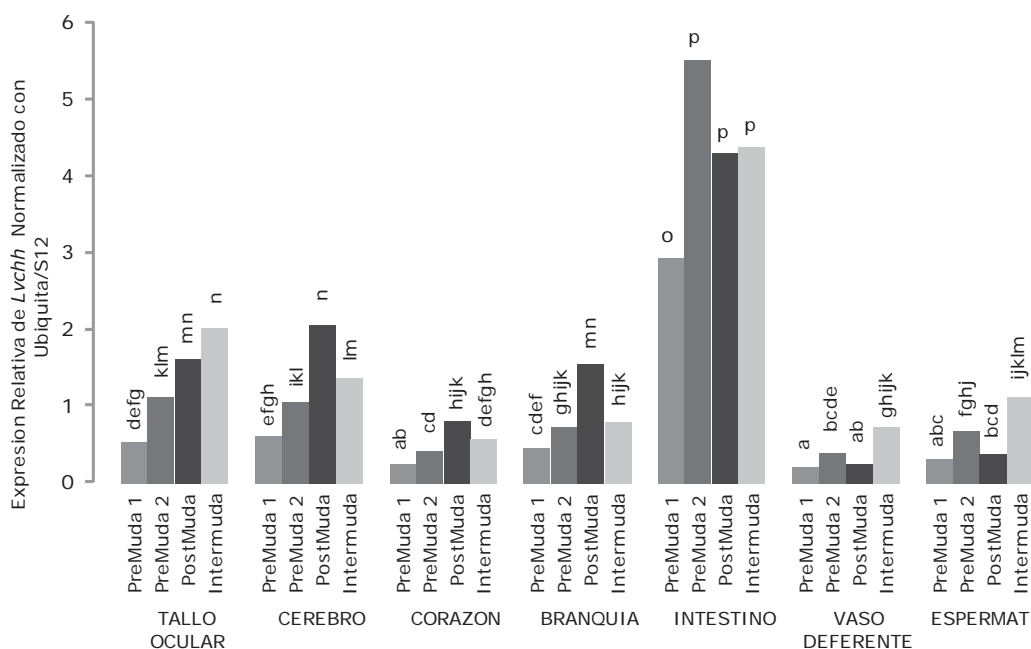


Figura 32. Expresión relativa del transcrito *Lvchh* en diferentes tejidos y estadios de muda en organismos subadultos de *L. vannamei*. Los valores de las medias se muestran en barras, y las diferencias entre medias se indican con letras ($P > 0.05$).

7.4. Inhibición del transcrito mediante RNA de interferencia

El análisis de expresión realizado con los datos obtenidos del bioensayo (Fig. 33), indicó que, a 24 y 48 horas después de la inyección de la doble cadena no se observan diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0.905$ y $P = 0.201$ respectivamente). Por otro lado, 5 días después de la inyección se observa que la expresión de *Lvchh* tiende a ser menor a lo observado en ambos controles, pero el análisis de varianza no alcanzó a mostrar diferencias significativas ($P = 0.246$).

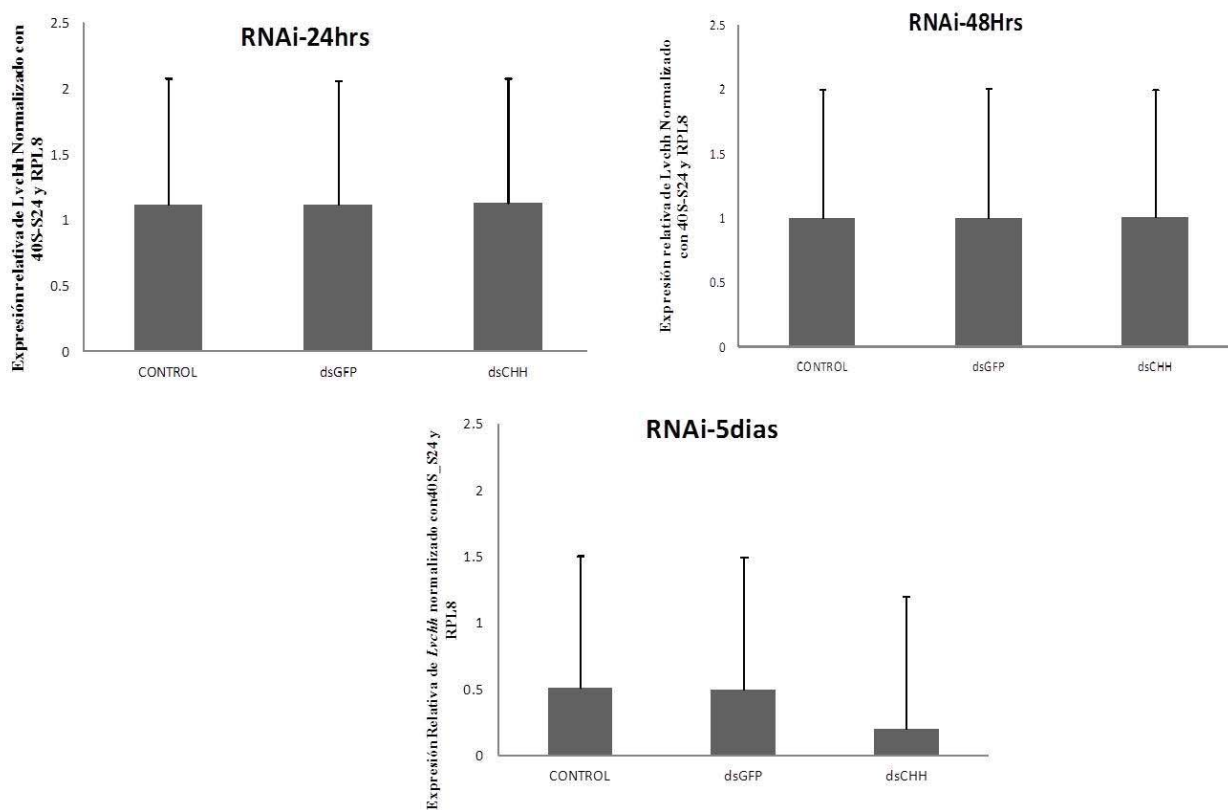


Figura 33. Expresión relativa del gen *Lvchh* en tallo ocular a 24 horas, 48 horas y 5 días posteriores a la inducción del silenciamiento mediante la inyección de RNA de doble cadena. Los valores se representan como medias con intervalos de confianza al 95%.

8. DISCUSION

8.3. Un nuevo gen CHH en *L. vannamei*

Se aislaron dos transcritos completos que codifican una nueva proteína para *L. vannamei*. El primer transcrito (1578pb) se aisló originalmente de tallo ocular, sin embargo, con la finalidad de encontrar posibles isoformas se realizó RACE de otros tejidos como gónada y tejidos circundantes tanto en hembras como en machos, encontrando un segundo transcrito de menor tamaño (947pb) exclusivamente en hembras. Los dos transcritos son resultado de la presencia de dos señales de poliadenilación en la región UTR 3'. Se sabe que la presencia de sitios alternativos de poliadenilación da lugar a transcritos con variación en la longitud de la región UTR 3', y cada uno de ellos tiene una distribución tejido-específica (Barret *et al.*, 2012). Por otro lado, la longitud de la UTR también determina la estabilidad de los transcritos, una región UTR 3' más corta es generalmente más estable que una de mayor longitud debido a que en esta última existe un mayor número de elementos reguladores que tienen efecto tanto en el tiempo de vida del transcrito como en la traducción del mismo (Matoulkova *et al.*, 2012). El transcrito de menor tamaño se encontró solo en tejido pericárdico unido a gónada de hembras, y se desconoce si otros tejidos extra-oculares en hembras también expresan la isoforma corta.

Los resultados obtenidos indican que el gen encontrado en este trabajo es uno nuevo para *L. vannamei*. El análisis filogenético agrupó las secuencias analizadas en dos grandes grupos, uno conformado con todas las secuencias CHH-I reportadas para penéidos, y el segundo conformado por el tipo CHH-II (VIH/GIH/MIH). Sin embargo, la secuencia LvCHH se ubicó entre ambas subfamilias y aparentemente es filogenéticamente más cercana a la subfamilia tipo II. Cabe señalar que las secuencias pertenecientes a la subfamilia II se caracterizan por presentar una inserción de glicina en la posición 12 del péptido maduro, la que de acuerdo a lo sugerido por Katayama y Nagasawa (2004) puede estar relacionada con la divergencia estructural y funcional entre las subfamilias I y II. Estos autores observaron que la inserción de glicina en un péptido CHH-I resulta en una disminución de la actividad de hiperglucemia en *M. japonicus*. Sin embargo, en el presente caso aún no sabe si la inserción de la glicina observada en la secuencia LvCHH tiene una función específica.

Por otro lado, la presencia de dos tipos de genes clasificados de acuerdo con la organización de los mismos con base al número de exones-intrones que poseen ha sido ampliamente reportada para los genes que codifican a las hormonas hiperglucemiantes (Chen *et al.*, 2005; Montagné *et al.*, 2008). Los genes tipo I se conforman por 4 exones y 3 intrones, los cuales pueden dar lugar a dos transcritos mediante mecanismos de *splicing* alternativo dando lugar a secuencias que difieren en la región carboxilo terminal del péptido maduro, cada una con una distribución espacial específica (Dircksen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Toullec *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2006; Jeon *et al.*, 2012), los transcritos compuestos por 4 exones están presentes en tallo ocular, mientras que los transcritos generados por *splicing*, compuestos únicamente por 3 exones, se localizan en tejidos como órgano pericárdico y/o ganglio torácico. Esta distribución tejido-específica ha sido reportada principalmente para cangrejos, sin embargo en el caso de *L. vannamei*, se tiene reporte únicamente de una secuencia CHH tipo I (Lago-Leston *et al.*, 2007), nombrada ITP por Tiu *et al.* (2007), cuyos transcritos que son productos de *splicing* presentan el mismo patrón espacial de distribución que lo reportado para cangrejos. Por otro lado, los genes tipo II se conforman por 3 exones y 2 intrones, y la presencia de múltiples transcritos se ha asociado principalmente a eventos de duplicación de genes (Lu *et al.*, 2000). En el caso del gen *Lvchh*, la estructura del gen conformada por 4 exones y 3 intrones nos permite clasificarla dentro de los genes tipo I, sin embargo la distribución espacial observada no estuvo asociada a mecanismos de *splicing* ya que en este caso los resultados obtenidos por RACE nos indicaron que un mismo transcrito conformado por 4 exones es expresado tanto en tallo ocular como en tejidos extra-oculares, lo que permite nombrarlo LvCHH_PO_ES tanto por su distribución tisular como por ser un único transcrito en cuanto a posibles transcritos derivados de *splicing* alternativo. Adicionalmente, la traducción conceptual de los dos transcritos encontrados y resultantes de utilizar diferente señal de poliadenilación da lugar a la misma proteína, la cual posee características conservadas de la subfamilia CHH tipo I, como la presencia de una leucina ubicada cuatro posiciones antes de la segunda cisteína del péptido maduro (Böcking *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las neurohormonas de la subfamilia tipo I, la proteína caracterizada en el presente estudio no posee una región CPRP conservada tal como lo

indicó el análisis realizado en Pfam y no posee el sitio de amidación localizado en la región carboxilo terminal como se ha reportado para otras CHH en *L. vannamei* (Lago-Leston *et al.*, 2007) y *M. japonicus* (Ohira *et al.*, 1997). Este sitio de amidación ha sido asociado con actividad de hiperglicemia en otras proteínas CHH (Yang *et al.*, 1996), por lo que la ausencia de este en la secuencia peptídica analizada en el presente trabajo, además de la posible pérdida o disminución de la actividad de hiperglicemia por la inserción de la glicina en el péptido maduro como fue encontrado para *M. japonicus* por Katayama y Nagasawa (2004), nos permite proponer que este péptido tiene una función diferente a la de regulación de glucosa en hemolinfa.

8.4. Distribución espacial del transcrito *Lvchh*

El transcrito *Lvchh* fue aislado originalmente de tallo ocular y gónada unida al tejido pericárdico circundante. Los resultados de hibridación *in situ* mostraron que en el caso del tallo ocular, la expresión del transcrito tiene lugar en la periferia del citoplasma de las células neuroendocrinas conocidas como “células tipo 5” (Smith y Naylor, 1972), las cuales han sido reportadas como el principal sitio de síntesis de esta familia de neuropéptidos (Jaros y Keller, 1979; Rotllant *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1993). Además de los tejidos ya identificados como sitios de expresión, los resultados obtenidos mediante PCR e ISH mostraron que el transcrito *Lvchh* también se expresa en nervio óptico, protocerebro, branquia e intestino de machos y hembras, así como en ámpula terminal / espermatóforo y vaso deferente de machos.

Adicionalmente al órgano X en tallo ocular, el tejido cerebral ha sido ampliamente reportado como sitio de expresión de las hormonas hiperglicemiantes en diferentes especies de crustáceos incluyendo peneidos (Sun, 1995; Gu y Chan, 1998; Chan *et al.*, 1998; Edomi *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006; Tiu *et al.*, 2007; Treeratrakool *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2012). De igual manera, diferentes transcritos se han identificado en corazón, específicamente en órgano pericárdico de diversas especies de cangrejos (Dircksen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2006; Toullec *et al.*, 2006; Chung y Zmora, 2008; Tsai *et al.*, 2008), aunque para peneidos solo se tiene reporte de dos

estudios en los cuales mediante PCR se detectó expresión en corazón (Udomkit *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos por ISH en el presente estudio, no solo confirman lo encontrado por estos autores, sino que además nos permiten identificar el órgano pericárdico (descrito por Fingerman 1997 y Christie 2011, como el tejido que rodea al corazón) como el sitio específico de expresión del transcrito *Lvchh*. Adicionalmente, dichos resultados explican por qué uno de los transcritos fue identificado en primer lugar en las genotecas de cDNA de gónada de hembras adultas: anatómicamente, la región ventral del corazón esta inmediatamente adherida a la región gonadal, por lo que el tejido pericárdico queda en contacto directo con la gónada y una porción del hepatopáncreas, por lo que al momento de realizar la toma de muestras de alguno de estos tejidos, es posible tomar una parte del tejido pericárdico.

Por otro lado, el nervio óptico se identificó como otro de los sitio de expresión del transcrito *Lvchh*. Mediante inmunolocalización, se ha reportado anteriormente la presencia de proteínas de la familia CHH en nervio óptico en diferentes especies de crustáceos (Gu *et al.*, 2001; Azzouna *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2013), así como la detección de transcritos mediante PCR (Lu *et al.*, 2001). Sin embargo, el presente estudio es uno de los pocos reportes en los cuales se observan transcritos en las terminaciones axónicas que conforman el nervio óptico (Minnen, 1994; Chun *et al.*, 1995). En el caso de algunos genes de mamíferos e invertebrados, se sabe que los transcritos pueden ser transportados desde las células de la glía hacia las terminaciones axónicas (Giuditta *et al.*, 2008). Para el caso particular del transcrito *Lvchh* no es posible establecer si el mRNA se sintetiza *de novo* en las terminaciones axónicas, o bien si es sintetizado en las células de la glía y de ahí es transportado hacia las terminaciones nerviosas.

Por otro lado, existen muy pocos reportes sobre la expresión de las CHHs en intestino y estructuras reproductoras de macho como vaso deferente y ámpula terminal como lo encontrado en este trabajo. La expresión en intestino únicamente ha sido reportada en peneidos por Tiu *et al.* (2007a), quienes observaron la expresión del transcrito Lv-ITP en branquia e intestino. Sin embargo, su investigación se enfocó únicamente en branquia, donde concluyeron que el péptido puede estar involucrado en procesos de osmoregulación,

función que ya ha sido atribuida previamente a diversas proteínas de la familia CHH. Se ha observado que la ablación del tallo ocular resulta en un incremento tanto en la presión osmótica como en la concentración de iones en la hemolinfa (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000). Estos mismos autores demostraron que una CHH aislada de glándula sinusal incrementa la entrada de Na⁺ en branquias del cangrejo *Pachygrapsus marmoratus*. La expresión del transcrito *Lvchh* observada en el presente trabajo en branquia e intestino nos permite proponer que puede estar involucrada en osmoregulación, al igual que el transcrito aislado por Tiu *et al.* (2007a). Considerando que la mayor expresión de *Lvchh* se observó en intestino, este nuevo péptido puede estar involucrado en el control o inducción de la absorción y liberación de agua en este tejido. Esto es, se sabe que durante el periodo de muda el intestino es responsable de la absorción de agua que ayudará en la remoción del exoesqueleto o ecdisis (Mykles, 1980). El efecto directo de las hormonas CHH sobre la absorción de agua en intestino fue demostrado en el cangrejo *Carcinus maenas*, donde se observó que durante el estadio de premuda y ecdisis se presenta una mayor liberación de una CHH en intestino, y que la inyección de la proteína aumenta la absorción de agua en estómago e intestino posterior. Adicionalmente, en el caso de *C. maenas*, el análisis de la secuencia demostró que la misma proteína está presente tanto en tallo ocular como en intestino, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que fue en ambos de esos tejidos donde observamos una mayor expresión. Adicionalmente, la expresión del péptido en *C. maenas* se localizó en células con actividad endocrina en la región del intestino medio e intestino posterior (Webster *et al.*, 2000), lo cual da soporte a los resultados obtenidos mediante hibridación *in situ*, mismos que nos permitieron identificar la región del intestino anterior como sitio de expresión para el transcrito *Lvchh*.

Otro de los sitios de expresión para *Lvchh* fue en algunas regiones del sistema reproductor de machos. Si bien el sistema reproductivo no es uno de los tejidos comúnmente identificados como uno en donde se observa la síntesis de las hormonas hiperglucemiantes, existen reportes previos con resultados similares. El trabajo realizado por Lee *et al.* (2007) fue uno de los primeros reportes observando la expresión de un transcrito de una CHH en el sistema reproductor (testículo) de machos del cangrejo *Gecarcinus*

lateralis. Posteriormente, el trabajo realizado por Li *et al.* (2010) fue el primero en demostrar la expresión de una CHH en el saco que contiene el espermátforo (ámpula terminal) en peneidos (*F. chinensis*). En el caso particular de este trabajo, se encontró expresión del transcrito *Lvchh* tanto en ámpula terminal como en las células epiteliales que recubren el vaso deferente. La localización específica de *Lvchh* en el sistema reproductor de machos nos permite proponer una participación en la inducción de la maduración de espermátidas hacia espermias, así como en la capacitación de los mismos. En camarones peneidos como *L. vannamei* y *L. stylirostris* el proceso de maduración de las espermátidas es similar al reportado para el cangrejo *Chionectes opilio*, en el cual la maduración tiene lugar en el vaso o ducto deferente (Sainte-Marie and Sainte-Marie, 1999; Alfaro-Montoya, 2013), uno de los sitios donde detectamos expresión del transcrito *Lvchh*. Adicionalmente, la presencia en espermátforo puede estar relacionada con alguna función asociada al proceso de maduración final del espermia, la cual se sabe que tiene lugar específicamente en este tejido, así como con la capacitación del espermia (Alfaro *et al.*, 2003, 2007; Aungsuchawan *et al.*, 2011). Esto es, se sabe que el proceso de capacitación de los espermatozoides involucra una serie de cambios fisiológicos incluyendo cambios en la concentración intracelular de iones, lo que los hace competentes para la fertilización (Alfaro *et al.*, 2007; Yanagimachi, 1994, citado en Visconti *et al.*, 1995). Por ejemplo, en el camarón *Sicyonia ingentis*, el espermia debe tener un alto pH intracelular para poder llevar a cabo la reacción acrosomal (Griffin *et al.*, 1987). Si bien el mecanismo exacto por el cual la CHH del presente estudio puede tener una participación en la maduración de espermátidas a través de su paso por el vaso deferente y la posterior maduración y capacitación del espermia en el espermátforo aún necesita ser determinado, es importante señalar que actualmente se cuenta con evidencia de la participación de canales iónicos en la diferenciación de espermátidas y en la activación/capacitación del espermia (ver Tosti y Boni, 2004).

9. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió la identificación de genes no reportados previamente para *L. vanamei*, los cuales se sabe que tienen una participación en procesos reproductivos de otras especies de vertebrados e invertebrados. Adicionalmente, se logró identificar un nuevo gen perteneciente a la familia de las hormonas hiperglucemiantes, cuya organización exón-intrón lo clasifica dentro de las hormonas CHH tipo I. Sin embargo, la estructura primaria del péptido posee características similares tanto a las CHH-I por la presencia de una región precursora, como con las CHH-II por la inserción de un residuo de glicina, aunque en una posición distinta a la ya reportada. El transcrito *Lvchh* se expresa en tallo ocular, cerebro, corazón, branquia e intestino de hembra y macho, así como en vaso deferente y espermatóforo. La mayor expresión del transcrito, se observó en intestino. Se observó también una variación en la expresión a lo largo del ciclo de muda, la cual presentó un patrón específico para cada tejido. Sin embargo, hay un incremento significativo de muda temprana a muda tardía en todos los tejidos evaluados, lo que sugiere que el transcrito *Lvchh* puede tener un papel en el intercambio iónico durante el proceso de ecdisis. Finalmente, la alta expresión en intestino, sugiere una participación importante en la absorción de agua durante el ciclo de muda, mientras que la expresión en vaso deferente y espermatóforo sugiere una participación en la maduración y capacitación del espermatozoide.

10. REFERENCIAS

- Alfaro, J., N., Muñoz, M., Vargas, J., Komen.2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeid shrimps. *Aquaculture* 216: 371-381.
- Alfaro, J., K., Ulate, M., Vargas. 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture* 270: 436- 442.
- Alfaro, J., G., Zuñiga, A., García, E., Rojas. 2008. Preliminary evaluation of the effect of juvenile hormone III and methyl farnesoate on spermatophore quality of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda: Penaeidae). *Rev Biol Mar Oceanog.* 43 (1): 167 - 171.
- Alfaro-Montoya, J. 2013. Descripción histológica de la oogénesis y espermatogénesis del camarón de cultivo, *Litopenaeus vannamei*. *Rev Biol Mar Oceanog.* 48(2), 335-344.
- Álvarez Ruiz, P.2012. Inducción de actividad antiviral por el silenciamiento del gen endógeno Rab7 en *Litopenaeus vannamei* mediante RNA de interferencia. Tesis doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz BCS, México. 142pp.
- Arcos, F.G., I.S., Racotta, A.M., Ibarra. 2004. Genetic parameter estimates for reproductive traits and egg composition in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 236 (1-4): 151 - 165.
- Arcos. F.G., A.M., Ibarra, I.S., Racotta. 2011. Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* shrimp. *Aquaculture* 316(1-4): 93 - 98.
- Ascoli, M., F., Fanelli, D.L., Segaloff. 2002. The lutropin/Choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine REviews.* 23: 141 – 174.
- Aungsuchawan, S., C.L., Browdy, B., Withyachumnarnkul. 2011. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res.* 42: 188-195.
- Avarre, J.C., R., Michelis, A., Tietz, E., Lubzens. 2003. Relationship between vitellogenin and vitelline in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNA's. *Biol Reprod.* 69: 355-364.
- Azzouna, A., M., Philippe, T., Jarry, P., Grève, G., Martin. 2003. Localization of crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in separate cell

- types in the protocerebrum of the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Gen Comp Endocr.* 131: 134 – 142.
- Bai, H., H., Qiao, F., Li, H., Fu, S., Sun, W., Zhang, S., Jin, Y., Gong, S., Jiang, Y., Xiong. 2015. Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation. *Gene* 562: 22 - 31.
- Barker, M.S., K.M., Dlugosch, L., Dinh, R.S., Challa, N.C., Kane, M.G., King, L.H., Rieseberg. 2010. EvoPipes.net: Bioinformatic tools for ecological and evolutionary genomics. *Evol Bioinform.* 6: 143-149
- Barrett, L.W., S., Fletcher, S.D., Wilton. 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci.* 69: 3613 – 3634.
- Bell, T.A., D.V., Lightner. 1988. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society. 114p
- Bellés, X., D., Martín, M.D., Piulachs. 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol.* 50: 181 -199.
- Bliss, D.E., J.R., Boyer. 1964. Environmental regulation of growth in the decapod crustacean *Gecarcinus lateralis*. *Gen Comp Endocr.* 4: 15 - 41.
- Böcking, D., H., Dirksen, R., Keller. 2001. The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities, in: Korana, W. (ed.), *The crustacean nervous system*. Springer, Berlin, pp. 84 – 97.
- Borst, D.W., J., Ogan, B., Tsukimura, T., Claerhooft, K.C., Holford. 2001. Regulation of the crustacean mandibular organ. *Am Zool.* 41: 430 – 441.
- Bustin, S.A., V., Benes, J.A., Garson, J., Hellems, J., Huggett, M., Kubista, R., Mueller, T., Nolan, M.W., Pfaffl, G.L., Shipley, J., Vandesompele, C.T., Wittwer. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 55: 611 – 622.
- Camacho-Jiménez, L., E., Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, M.E., Muñoz-Márquez. M.B., Aguilar, A.D, Re, F., Díaz. 2015. Hyperglycemic activity of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone B1 isoform (CHH-B1) of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides* 71: 32 – 39.
- Castellanos, M., F., Jiménez-Vega, F., Vargas-Albores. 2008. Single IB domain (SIBD) protein from *Litopenaeus vannamei*, a novel member for the IGFBP family. *Gen Comp Endocr. Part D.* 3: 270 - 274.

- Chan, S., P., Gu, K., Chu, S., Tobe. 2003. Crustacean neuropeptide gene of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies. *Gen Comp Endocr.* 134: 214-219.
- Chan, S.M., X.G., Chen, P.L., Gu. 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*). *Gene* 224: 23 – 33.
- Chang, E. S., G.D., Prestwich, M.J., Bruce. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Bioph Res Co.* 171: 818-826.
- Chang, E.S., R., Keller, S.A., Chang. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *Gen Comp Endocr.* 111: 359–366.
- Chang, E.S., D.L., Mykles. 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. *Gen Comp Endocr.* 172: 323 – 330.
- Charniaux- Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacea. *Am Zool.* 25: 197-206.
- Chen, H.Y., R.D., Watson, J.C., Chen, H.F., Liu, C.Y., Lee. 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *Gen Comp Endocr.* 151: 72 – 81
- Chen, S., C., Lin, C., Kuo. 2004. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Evidence of alternative splicing. *Mar Biotechnol.* 6: 83- 94
- Chen, S.H., C.Y., Lin, C.M., Kuo. 2005. In silico Analysis of Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. *Mar Biotechnol.* 7: 193-206.
- Chen, T., L.P., Zhang, N.K., Wong, M., Zhong, C.H., Ren, C.Q., Hu. 2014. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) is predominantly expressed in the brain and negatively regulates hepatopancreatic vitellogenin (vtg) gene expression. *Biol Reprod.* 90(3)47: 1 - 10.
- Choi, C.Y., J., Zheng, R.D., Watson. 2006. Molecular cloning of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from eyestalk ganglia of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Gen Comp Endocr.* 148, 383 – 387.

- Christie, A.E. 2011. Crustacean neuroendocrine system and their signaling agents. *Cell Tissue Res.* 345: 41 – 67.
- Christie, A.E. 2014. Expansion of the *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* peptidomes using transcriptome shotgun assembly sequence data. *Gen. Comp. Endocr.* 206: 235 – 254.
- Chuang, N.N., P.C., Wang. 1994. Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Phys A.* 108(3): 289 - 297.
- Chung, J.S., H., Dircksen, S.G., Webster. 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *P Natl Acad Sci USA* 96: 13103 – 13107.
- Chung, J.S., R., Manor, A., Sagi. 2011. Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: Implications for eyestalk regulation of IAG expression. *Gen Comp Endocr.* 173: 4 – 10.
- Chung, J.S., S.G., Webster. 2005. Dynamics of in Vivo release of molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology* 146: 5545 – 5551.
- Chung, J.S., N., Zmora. 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* – the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. *FEBS Lett.* 275: 693 – 704.
- Claeys, I., G., Simonet, J., Poels, T., Van Loy, L., Vervammen, A., De Loof, J., Vanden Broeck. 2002. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides* 23: 807 - 816.
- Clavero-Salas, A., R.R., Sotelo-Mundo, T., Gollas-Galván, J., Hernández-López, A.B., Peregrino-Uriarte, A., Muhlia-Almazán, G., Yepiz-Plascencia. 2007. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. *Fish Shellfish Immun.* 23: 459 - 472.
- Colombani, J., D.S., Andersen, L., Boulan, E., Boone, N., Romero, V., Virolle, M., Texada, P., Léopold. 2015. *Drosophila* Lgr3 couples organ growth with maturation and ensures developmental stability. *Curr Biol.* 25: 1 - 7.
- Corteel, M., J.J., Dantas-Lima, M., Wille, V., Alday-Sanz, M.B., Pensaert, P., Sorgeloos, H.J., Nauwynck. 2012. Moulting cycle of laboratory-raised *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*) and *Penaeus monodon*. *Aquacult Int.* 20: 13 – 18

- De Oliveira-Cesar, J.R., B., Zhao, S., Malecha, H., Ako, J., Yang. 2006. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture* 261: 688 – 694.
- de Kleijn, D.P.V., K.P.C., Janssen, S.L., Waddy, R., Hegeman, W.Y., Lai, G.J.M., Martens, F., Van Herp. 1998. Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *J Endocrinol.* 156: 291 – 298.
- Diaz Brinton, R., R.F., Thompson, M.R., Foy, M., Baudry, J.M., Wang, C.E., Finch, T.E., Morgan, F.Z., Stanczyk, C.J., Pike, J., Nilsen. 2008. Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 313 – 339.
- Dirksen, H., D., Böcking, U., Heyn, C., Mandel, J.S., Chung, G., Baggerman, P., Verhaert, S., Daufeldt, T., Plösch, P.P., Jaros, E., Waelkens, R., Keller, S., Webster. 2001. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem J.* 356: 159 – 170.
- Edomi, P., E., Azzoni, R., Mettullo, N., Pandolfelli, E.A., Ferrero, P.G., Giulianini. 2002. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. *Gene* 284: 93 – 102.
- Fanjul-Moles, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapods crustaceans: Review and update. *Comp Biochem Phys C.* 142: 390-400.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura. Primera Edición. Roma. 274p.
- Fingerman, M. 1997. Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiol Zool.* 70: 257 – 269.
- Fingerman, M., 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. *J Crustacean Biol.* 7(1): 1-24
- Finn, R.D., A., Bateman, J., Clements, P., Coggill, R.Y., Eberhardt, S.R., Eddy, A., Heger, K., Hetherington, L., Holm, J., Mistry, E.L.L., Sonnhammer, J., Tate, M., Punta. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acid Res.* 42: D222- D230.
- Galindo Torres, P.E. 2014. Caracterización del transcrito del gen *fem-1* en *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y análisis de su función en la reproducción mediante RNA

- de interferencia. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz BCS, México. 113p.
- Gallardo, N., O., Carillo, E., Moltó, M., Deás, R., González-Suárez, J.M., Carrascosa, M., Ros, A., Andrés. 2003. Isolation and biological characterization of a 6-kDa protein from hepatopancreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *Gen Comp Endocr.* 131: 284 - 290.
- Gasteiger, E., C., Hoogland A., Gattiker S., Duvaud M.R., Wilkins R.D., Appel A., Bairoch. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En: Walker, J.M. (eds.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 571-607.
- Ghaffari, N., A., Sánchez-Flores, R., Doan, D., García-Orozco, P.L., Chen, A., Ochoa-Leyva, A., López-Zavala, S., Carrasco, C., Hong, L.G., Briebe, E., Rudiño-Piñera, P.D., Blood, J.E., Sawyer, C.D., Johnson, S.V., Dindot, R.R., Sotelo-Mundo, M.F., Criscitiello. 2014. Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Sci Rep.* 4: 7081
- Götz, S., J.M., García-Gómez, J., Terol, T.D., Williams, S.H., Nagaraj, M.J., Nueda, M., Robles, M., Talón, J., Dopazo, A., Conesa. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36(10): 3420-3435
- Griffin, F.J., W.H., Clark, J.H., Crowe, L.M., Crowe. 1987. Intracellular pH decrease during the *In vitro* induction of the acrosome reaction in the sperm of *Sicyonia ingentis*. *Biol Bull.* 173: 311-323.
- Gu, P.L., S.M., Chan. 1998. Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*. *Mol Mar Biol Biotech.* 7:, 214 – 220.
- Gu, P.L., K.H., Chu, S.M., Chan. 2001. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Res.* 303: 129 – 136.
- Gu, P.L., S.S., Tobe, B.K.C., Chow, K.H., Chu, J.G., He, S.M., Chan. 2002. Characterization of an additional molt inhibiting hormone- like neuropeptide from the shrimp *Metapenaeus ensis*. *Peptides* 23: 1875 – 1883.
- Gu, P.L., K.L., Yu, S.M., Chan. 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Lett.* 472: 122 – 128.

- Guo, H., C.X., Ye, A.L., Wang, J.A., Xian, S.A., Liao, Y.T., Miao, S.P., Zhang. 2013. Transcriptome analysis of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to nitrite by RNA-seq. *Fish Shellfish Immun.* 35: 2008 - 2016.
- Guo, W., Z., Wu, J., Song, F., Jiang, Z., Wang, S., Deng, V.K., Walker, S., Zhou. 2014. Juvenile Hormone-Receptor Complex Acts on Mcm4 and Mcm7 to Promote Polyploidy and Vitellogenesis in the Migratory Locust. *PLoS Genet.* 10(10): e1004702.
- Hellemans, J., G., Mortier, A., De Paepe, F., Speleman, J., Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Homola, E., E.S., Chang. 1997a. Methyl farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of functions. *Comp Biochem Phys B.* 117(3): 347 - 356.
- Homola, E., E.S., Chang. 1997b. Distribution and regulation of esterases that hydrolyze methyl farnesoate in *Homarus americanus* and other crustaceans. *Gen Comp Endocr.* 106: 62 - 72.
- Hopkins, P.M. 2012. The eyes have it: A brief history of crustacean neuroendocrinology. *Gen Comp Endocr.* 175: 357 – 366.
- Hsu, Y.W.A., D.I., Messinger, J.S., Chung, S.G., Webster, H.O., de la Iglesia, A.E., Christie. 2006. Members of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) peptide family are differentially distributed both between and within the neuroendocrine organs of *Cancer* crabs: implications for differential release and pleiotropic function. *J Exp Biol.* 209: 3241 – 3256.
- Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191: 191 – 208.
- Hui, J.H.L., S.S., Tobe, S.M., Chan. 2008. Characterization of the putative farnesoic acid O-methyltransferase (LvFAMeT) cDNA from white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Evidence for its role in molting. *Peptides* 29: 252 - 260.
- Ibarra, A.M., F.G., Arcos, T.R., Famula, E., Palacios, I.S., Racotta. 2005. Heritability of the categorical trait "number of spawns" in Pacific white female shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 250: 95-101.
- Ibarra, A.M., I.S., Racotta, F.G., Arcos, E., Palacios. 2007. Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. *Aquaculture* 268: 23 – 43.

- Ibarra-Humphries, A.M., Arcos-Ortega, F., Garcia-Gasca S.A., Racotta Dimitrov, I.S., Llera-Herrera R.A., Galindo-Sanchez C.E. 2012. Aplicación de la genómica funcional como estrategia para la mejora continua de la industria del camarón-Modulo Reproducción. Tercer Informe SAGARPA.
- Jaros, P.P., R., Keller. 1979. Immunocytochemical identification of hyperglycemic hormone-producing Cells in the Eyestalk of *Carcinus maenas*. Cell Tissue Res. 204: 379 – 385.
- Jeon, J.M., B.K., Kim, J.H., Lee, H.J., Kim, C.K., Kang, D.L., Mykles, H.W., Kim. 2012. Two type I crustacean hyperglycemic hormone (CHH) genes in Morotoge shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning and expression of the eyestalk and pericardial organ isoforms produced by alternative splicing and novel type I CHH with predicted structure shared with type II CHH peptides. Comp Biochem Phys B. 162: 88 – 99.
- Jindra, M., S.R., Palli, L.M., Riddiford. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. Annu Rev Entomol. 58: 181 – 204.
- Jo, Q.T., H., Laufer, W.J., Biggers, H.S., Kang. 1999. Methyl farnesoate induced ovarian maturation in the spider crab, *Libinia emarginata*. Invertebr Reprod Dev. 36: 1 - 3.
- Karimi, M., D., Inzé, A., Depicker. 2002. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends Plant Sci. 7(5): 193-195.
- Katayama, H., H., Nagasawa. 2004. Effect of a Glycine Residue Insertion into Crustacean Hyperglycemic Hormone on Hormonal Activity. Zool Sci. 21: 1121 – 1124.
- Keller, R., 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. Experientia 48: 439 – 448.
- Khalaila, I., R., Manor, S., Weil, Y., Granot, R., Keller, A., Sagi. 2002. The eyestalk – androgenic gland – testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gen Comp Endocr. 127: 147 – 156.
- King, J.E. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biol Bull. 94: 244 – 262.
- Klein, J.M., S., Mangerich, P.V., de Kleijn, R., Keller, W.M., Weidemann. 1993. Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. FEBS. 334: 139 – 142.
- Kulkarni, G.K., R., Nagabhushanam, P.K., Joshi. 1984. Neuroendocrine control of reproduction in the male penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeid). Hydrobiologia 108: 281 – 289.

- Kumar, R.S., S., Ijiri, J.M., Trant. 2001. Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. *Biol Reproduc.* 64: 1010 – 1018.
- Lago-Lestón, A., E., Ponce, M.E., Muñoz. 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture* 270, 343 – 357
- Landau, M., W. J. Biggers, H., Laufer. 1997. Invertebrate Endocrinology. En: W. H. Dantzler (eds.). *Handbook of Physiology, Section 13, Comparative Physiology.* Oxford Univ. Press, New York. 1291–1389.
- Laufer, H. 1992. Method for increasing crustaceans larval production. United States Patent & Trademark Office, Patent Number 5,161,481.
- Laufer, H., J.S.B., Ahl, A., Sagi. 1993. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *Am Zool.* 33: 365 - 374.
- Laufer, H., M., Landau, E., Homola, D., Borst. 1987. Methyl farnesoate: Its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean. *Insect Biochem.* 17: 1129- 1131).
- Laufer, H., M., Landau, D., Borst, E., Homola. 1986. The synthesis and regulation of methyl farnesoate, a new juvenile hormone for crustacean reproduction. En: Porchet, M., Andries, C., Dhainaut, A. (eds.), *Advances in Invertebrate Reproduction 4.* Elsevier Science Publishing, Amsterdam. p 135- 143.
- Laufer, H., P., Takac, J.S.B., Ahl, M.R., Laufer. 1997. Methyl farnesoate and the effect of eyestalk ablation on the morphogenesis of the juvenile female spider crab *Libinia emarginata*. *Invertebr Reprod Dev.* 31(1 - 3): 63 - 68.
- Lee, K.J., R.M., Doran, D.L., Mykles. 2007. Crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Cloning, isoforms, and tissue expression. *Gen. Comp. Endocr.* 154: 174 – 183.
- Lee, K.J., R.D., Watson, R.D., Roer. 1998. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biochem Bioph Res Co.* 249: 624 - 627.
- Lee, S.O., J.M., Jeon, C.W., Oh, Y.M., Kim, C.K., Kang, D.S., Lee, D.L., Mykles, H.W., Kim. 2011. Two juvenile hormone esterase-like carboxylesterase cDNAs from a *Pandalus* shrimp (*Pandalopsis japonica*): Cloning, tissue expression, and effects of eyestalk ablation. *Comp Biochem Phys B.* 159: 148 - 156.

- Leelatanawit, R., S., Klinbunga, T., Aoki, I., Hirono, R., Valyasevi, P., Menasveta. 2008. Suppression subtractive hybridization (SSH) for isolation and characterization of genes related to testicular development in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *BMB Rep.* 41: 796 – 802.
- Li, C., S., Weng, Y., Chen, X., Yu, L., Lû, H., Zhang, J., He, X., Xu. 2012a. Analysis of *Litopenaeus vannamei* transcriptome using the next-generation DNA sequencing technique. *PLoS ONE* 7(10): e47442
- Li, S., F., Li, Z., Sun, J., Xiang. 2012b. Two spliced variants of insulin-like androgenic gland hormone gene in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Gen Comp Endocr.* 177: 246 - 255.
- Li, S., F., Li, B., Wang, Y., Xie, R., Wen, J., Xiang. 2010. Cloning and expression profiles of two isoforms of a CHH-like gene specifically expressed in male Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Gen. Comp. Endocr.* 167, 308 – 316.
- Liu, L., H., Laufer, P.J., Goarten, M., Wang. 1997. cDNA cloning of a mandibular organ inhibiting hormone from the spider crab *Libinia emarginata*. *Invertebr Neurosci.* 3: 199 – 204
- Liu, M., L., Pan, L., Li, D., Zheng. 2014. Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides* 53: 115 – 124.
- Llera-Herrera, R., A., García-Gasca, C., Abreu-Goodger, A., Huvet, A.M., Ibarra. 2013. Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing. *PLoS ONE* 8: e73176.
- Llera-Herrera, R., A., García-Gasca, A., Huvet, A.M, Ibarra. 2012. Identification of a *tubulin- α* gene specifically expressed in the testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Mar Genomics* 6: 33 – 44.
- Lu, W., G., Wainwright, L.A., Olohan, S.G., Webster, H.H., Rees, P.C., Turner. 2001. Characterization of cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer pagurus*; expression of *MIH* in non- X-organ tissues. *Gene* 278: 149 – 159.
- Lu, W., G., Wainwright, S.G., Webster, H.H., Rees, P.C., Turner, P.C. 2000. Clustering of mandibular organ-inhibiting hormone and moult-inhibiting hormone genes in the

- crab, *Cancer pagurus*, and implications for regulation of expression. *Gene* 253: 197 – 207.
- Luo, X., T., Chen, M., Zhong, X., Jiang, L., Zhang, C., Ren, C., Hu. 2015. Differential regulation of hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression by two putative molt-inhibiting hormones (MIH1/2) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Peptides* 68: 58-63.
- Ma, M., A.L., Gard, F., Xiang, J., Wang, N., Davoodian, P.H., Lenz, S.R., Malecha, A.E., Christie, L., Li. 2010. Combining *in silico* transcriptome mining and biological mass spectrometry for neuropeptide discovery in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides* 31: 27 – 43
- Magallón-Barajas, F. J., H., Villarreal-Colmenares, F., Arcos-Ortega, S., Avilés-Quevedo, R., Civera-Cerecedo, P., Cruz-Hernández, A., González-Becerril, V., Gracia-López, A., Hernández-Llamas, J., Hernández-López, A.M., Ibarra-Humphries, C., Lechuga-Deveze, C., J.M., Mazón-Suástegui, A.F., Muhlia-Melo, J., Naranjo-Páramo, R., Pérez-Enríquez, Porchas-Cornejo, G., Portillo-Clark, J.C., Pérez-Urbiola. 2007. Orientaciones Estratégicas para el Desarrollo Sustentable de la Acuicultura en México. Publicaciones especiales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Cámara de Diputados. LX Legislatura.
- Manor, R., S., Weil, S., Oren, L., Glazer, E.D., Aflalo, T., Ventura, V., Chalifa-Caspi, M., Lapidot, A., Sagi. 2007. Insulin and gender: An insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen. Comp. Endocr.* 150: 326 – 336.
- Matoulkova, E., E., Michalova, B., Vojtesek, R., Hrstka. 2012. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.* 9: 563 – 576.
- McFarland, K.C., R., Sprengel, H.S., Phillips, M., Köhler, N., Rosemlit, K., Nikolics, D.L., Segaloff, P.H., Seeburg. 1989. Lutropin-Chroriogonadotropin receptor: An unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 245: 494 – 499.
- Meissner, G.W., Luo, S.D., Dias, B.G., Texada, M.J., Baker, B.S. 2016. Sex-specific regulation of *Lgr3* in *Drosophila* neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* DOI: [10.1073/pnas.1600241113](https://doi.org/10.1073/pnas.1600241113) (pii: 201600241. Epub ahead of print)
- Mekuchi, M., T., Ohira, I., Kawazoe, S., Jasmani, K., Suitoh, Y.K., Kim, V., Jayasankar, H., Nagasawa, M.N., Wilder. 2008. Characterization and expression of the putative

- ovarian lipoprotein receptor in the kuruma Prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool Sci.* 25: 428-437.
- Meusy, J., G.G., Payen. 1988. Female reproduction in malacostracan crustacea. *Zool Sci.* 5: 217-265.
- Miura, T., M., Higuchi, Y., Ozaki, T., Ohta, C., Miura. 2006. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *PNAS.* 103: 7333 – 7338.
- Montagné, N., D., Soyez, D., Gallois, C., Ollivaux, J.Y., Toullec. 2008. New insights into evolution of crustacean hyperglycaemic hormone in decapods– first characterization in Anomura. *FEBS Lett.* 275: 1039 – 1052.
- Mykles, D.L. 1980. The mechanism of fluid absorption at ecdysis in the American lobster *Homarus americanus*. *J Exp Biol.* 84: 89 – 101.
- Nagai, C., S., Nagata, H., Nagasawa. 2011. Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kumura prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen Comp Endocr.* 172: 293-304.
- Nagaraju, G.P.C. 2007. Is the methyl farnesoate a crustacean hormone?. *Aquaculture* 272: 39 – 54.
- Nagaraju, G.P.C. 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *J Exp Biol.* 214: 3-16
- Nakatsuji, T., C., Lee, R.D., Watson. 2009. Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. *Comp Biochem Phys A.* 152: 139 – 148.
- Ngernsoungnern, A., P., Ngernsoungnern, W., Weerachayanukul, J., Chavadej, P., Sobhon, P., Sretarugsa. 2008. The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 279: 197 – 203.
- Ohira, T., T., Watanabe, H., Nagasawa, K., Aida. 1997. Molecular cloning of a molt inhibiting hormone cDNA from the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zool Sci.* 14 : 785 – 789.
- Okumura, T. 2007. Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kumura prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool Sci.* 24: 233–240.

- O'Leary, N.A., H.F., Trent, J., Robalino, M.E.T., Peck, D.J., McKillen, P.S., Gross. 2006. Analysis of multiple tissue-specific cDNA libraries from the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Integr Comp Biol.* 46(6): 931 – 939
- Ollivaux, C., D., Gallois, M., Amiche, M., Boscaméric, D., Soyez. 2009. Molecular and cellular specificity of post-translational aminoacyl isomerization in the crustacean hyperglycaemic hormone family. *FEBS Lett.* 276: 4790 – 4802.
- Palacios, E., D., Carreño, M.C., Rodríguez-Jaramillo, I.S., Racotta. 1999c. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance and biochemistry of white Pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, broodstock. *J Appl Aquacult.* 9(3): 1 - 23.
- Palacios, E., A.M., Ibarra, I.S., Racotta. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185: 353 - 371.
- Palacios, E., A.M., Ibarra, J.L., Ramírez, G., Portillo, I.S., Racotta. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquac Res.* 28: 183 - 189.
- Palacios, E., C.I., Pérez-Rostro, J.L., Ramírez, A.M., Ibarra. I.S., Racotta. 1999b. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture* 171: 309 - 321.
- Palacios, E., I.S., Racotta. 2003. Effect of number of spawns on the resulting spawn quality of 1-year-old pond-reared *Penaeus vannamei* (Boone) broodstock. *Aquac Res.* 34: 427 - 435.
- Palacios, E., C., Rodríguez-Jaramillo, I.S., Racotta. 1999a. Comparison of ovary histology between different-sized wild and pond-reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*). *Invertebr Reprod Dev.* 35(3): 251 - 259.
- Petersen, T.N., S., Brunak, S., G., von Heijne, H., Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. En: S.A. Bustin (ed.). *A-Z of quantitative PCR.* La Jolla CA, USA. 26p.
- Powell, D., W., Knibb, C., Remilton, A., Elizur. 2015. De novo transcriptome analysis of the banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) and identification of genes associated with reproduction and development. *Mar Genomics* 22: 71 - 78.
- Quackenbush, L.S. 2001. Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Am Zool.* 41: 458 – 464.

- Quackenbush, L.S. 1991. Regulation of vitellogenesis in Penaeid shrimp. En: *Frontiers in Shrimp Research*. Debach, P.F., Dongherty, Davidson, M.A. (eds.) Elsevier, Amsterdam, 125- 140.
- Racotta, I.S., E., Palacios, A.M., Ibarra. 2003a. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227: 107 - 130.
- Racotta, I.S., E., Palacios, R., Hernández-Herrera, A., Bonilla, C.I., Pérez-Rostro, J.L., Ramirez. 2003b. Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture* 233: 181 - 195.
- Raikhel, A., T.S., Dhadialla. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol.* 37: 217 – 251.
- Raviv, S., S., Parnes, C., Segall, C., Davis, A., Sagi. 2006. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *Gen Comp Endocr.* 145: 39–50.
- Richardson, N.A., A.J., Anderson, V.R., Sara. 1997. The effect of Insuline/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Gen Comp Endocr.* 105: 287 - 293.
- Robalino, J., J.S, Almeida, D., McKillen, J., Colglazier, H.F., Trent, Y.A., Chen, M.T.E., Peck, C.L., Browdy, R.W., Chapman, G.W., Warr, P.S., Gross. 2007. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiol Genomics* 29: 44 - 56.
- Rollant, G., D., De Kleijn, M., Charmantier-Daures, G., Charmantier, F., Van Herp. 1993. Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and gonad-inhibiting hormone (GIH) in the eyestalk of *Homarus gammarus* larvae by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Cell Tissue Res.* 271: 507 – 512.
- Roth, Z., I., Khalaila. 2012. Identification and characterization of the vitellogenin receptor in *Macrobrachium rosenbergii* and its expression during vitellogenesis. *Mol Reprod Dev.* 79: 478 - 487.
- Roth, Z., S., Parnes, S., Wiel, A., Sagi, N., Zmora, J.S., Chung, I., Khalaila. 2010. N-glycan moieties of the crustacean egg yolk protein and their glycosylation sites. *Glycoconjugate J.* 27: 159 - 169.
- Ruddell, C.J., G., Wainwright, A., Geffen, M.R.H., White, S.G., Webster, H.H., Rees. 2003. Cloning, characterization, and developmental expression of a putative

- farnesoic acid O-methyltransferase in the female edible crab *Cancer pagurus*. Biol Bull. 3: 308 - 318.
- SAGARPA. 2014. Registro y Estadística Pesquera y Acuícola. Primera Edición. México. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion.
- Sagi, A., E., Snir, I., Khalaila. 1997. Sexual differentiation in decapods crustaceans: role of the androgenic gland. Invertebr Reprod Dev. 31: 55 – 61.
- Sainte-Marie, G., B., Sainte-Marie. 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. Can J Zoolog. 77: 440 – 450.
- Sambrook, J., D.W., Russell. 2001. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Sedlmeier, D. 1985. Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. Am Zool. 25: 223 - 232.
- Serrano, L., G., Blanvillain, D., Soye, G., Charmantier, E., Grousset, F., Aujoulat, C., Spanings-Pierrot. 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. J Exp Biol. 206: 979 – 988.
- Shen, M., J., Hodgkin. 1988. mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. Cell 54: 1019 - 1031.
- Shinji, J., B.J., Kang, T., Okutsu, K., Banzai, T., Ohira, N., Tsutsui, M.N., Wilder. 2012. Changes in crustacean hyperglycemic hormones in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* subjected to air-exposure and low-salinity stresses. Fisheries Sci. 78: 833 - 840.
- Sifuentes-Romero, I., H., Merchant-Larios, A., García-Gasca. 2010. Hox gene expression in the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), a species with temperature-dependent sex determination. Gene Expr Patterns 10: 290 – 298.
- Silva Gunawardene, Y.I.N., S.S., Tobe, W.G., Bendena, B.K.C., Chow, K.J., Yagi, S.M., Chan. 2002. Function and cellular localization of farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. Eur J Biochem (now FEBS Journal) 269: 3587 - 3595.
- Sin, Y.W., N.J., Kenny, Z., Qu, K.W., Chan, K.W.S., Chan, S.P.S., Cheong, R.W.T., Leung, T.F., Chan, W.G., Bendena, K.H., Chu, S.S., Tobe, J.H.L., Hui. 2014.

- Identification of putative ecdysteroid and juvenile hormone pathway genes in the shrimp *Neocaridina denticulata*. *Gen Comp Endocr.* 214: 167 - 176.
- Smith, G., Naylor, E. 1972. The neurosecretory system of the eyestalk of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *J Zool (London)* 166: 313 – 321.
- Snigirevskaya, E., T.W., Sappington, A.S., Raikhel. 1997. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. *Cell Tissue Res.* 290: 175- 183.
- Soñanez-Organis, J., I., Racotta, G., Yepiz-Plascencia. 2010. Silencing of the hypoxia inducible factor 1 –HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Exp Mar Biol Ecol* 393: 51-58.
- Sookruksawong, S., F., Sun, Z., Liu, A., Tassanakajon. 2013. RNA-seq analysis reveals genes associated with resistance to Taura syndrome virus (TSV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol.* 41: 523 - 533.
- Spanings-Pierrot, C., D., Soyez, F., Van Herp, M., Gompel, G., Skaret, E., Grousset, G., Charmantier. 2000. Involvement of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Control of Gill Ion Transport in the Crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen Comp Endocr.* 119: 340 – 350.
- Starostina, N., J., M., Lim, M., Schvarzstein, L., Wells, A.M., Spence, E.T., Kipreos. 2007. A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C. elegans* sex determination. *Dev Cell.* 13(1): 127 - 139.
- Stewart, M.J., P., Stewart, P., M., Sroyraya, N., Soonklang, S.F., Cummins, P.J., Hanna, W., Duan, P., Sobhon. 2013. Cloning of the crustacean hyperglycemic hormone and evidence for molt-inhibiting hormone within the central nervous system of the blue crab *Portunus pelagicus*. *Comp Biochem Phys A.* 164: 276 – 290.
- Subramoniam, T. 2011. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Sci.* 77: 1 – 21.
- Summavielle, T., P.R., Rocha Monteiro, M.A., Reis-Henriques, J., Coimbra. 2003. In vitro metabolism of steroid hormones by ovary and hepatopancreas of the crustacean Penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Sci Mar.* 67: 299 – 306.
- Sun, P.S. 1995. Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol Mar Biol Biotech.* 4, 262 – 268.
- Swetha, C.H., S.B., Sainath, S.B., P., Ramachandra Reddy, P., Sreenivasula Reddy. 2011. Reproductive endocrinology of female crustaceans: Perspective and prospective. *J Marine Sci Res Development* S3:001.

- Tamura, K., G., Stecher, D., Peterson, A., Filipinski, S., Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725 – 2729.
- Tang, C., W., Lu, G., Wainwright, S.G., Webster, H.H., Rees, P.C., Turner. 1999. Molecular characterization and expression of mandibular organ-inhibiting hormone, a recently discovered neuropeptide involved in the regulation of growth and reproduction in the crab *Cancer pagurus*. *Biochem J.* 343: 355 – 360.
- Tatar, M., A., Bartke, A., Antebi. 2003. The endocrine regulation of aging by insuline-like signals. *Science* 299: 1346 - 1351.
- Tatar, M., A., Kopelman, D., Epstein, M.P., Tu, C.M., Yin, R.S., Garofalo. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107 - 110.
- Tensen, C.P., K.P.C., Janssen, R., Van Herp. 1989. Isolation, characterization and physiological specificity of the crustacean hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus* (Milne-Edwards). *Invertebr Reprod Dev.* 16: 155–164.
- Thomas, P. 2008. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component one (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol.* 29: 292 – 312.
- Thomas, P., Y., Pang, J., Dong, P., Groenen, J., Kelder, J., deVileg, Y., Zhu, C., Tubbs. 2007. Steroid and G Protein Binding Characteristics of the Seatrout and Human Progesterin Membrane Receptor : Subtypes and Their Evolutionary Origins. *Endocrinology.* 148: 705 – 718.
- Tinikul, Y., J., Poljaroen, N., Kornthong, C., Chotwiwatthanakun, P., Anuracpreeda, T., Poomtong, P., Hanna, P., Sobhon. 2011. Distribution and changes of serotonin and dopamine levels in the central nervous system and ovary of the pacific shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during ovarian maturation cycle. *Cell Tissue Res* 345: 103-124.
- Tiu, S.H., J., Benzie, S., Chan. 2008. From hepatopancreas to ovary: Molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin. *Biol Reprod.* 79: 66 – 74.
- Tiu, S.H.K., J.G., He, S.M., Chan. 2007a. The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed putative ion transport peptide (LvITP) for osmo-regulation. *Gene* 396: 226 – 235.

- Tiu, S.H.K., S.M., Chan. 2007b. The use of recombinant protein and RNA interference approaches to study the reproductive functions of a gonad-stimulating hormone from the shrimp *Metapenaeus ensis*. FEBS Lett. 274: 4385 – 4395.
- Tiu, S.H.K., J.H.L., Hui, J.G., He, S.S., Tobe, S.M., Chan. 2006. Characterization of vitellogenin in the shrimp *Metapenaeus ensis*: expression studies and hormonal regulation of MeVg1 transcription In vitro. Mol Reprod Dev. 73: 424- 436.
- Tobe, S.S., D.A., Young, H.W., Khoo, F.C., Baker. 1989. Farnesoic acid as a major product of release from crustacean mandibular organs in vitro. J Exp Zool. 249: 165 - 171.
- Tosti, E., R., Boni. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. Hum Reprod Update 10(1): 53-65.
- Toullec, J.Y., L., Serrano, P., Lopez, D., Soyez, C., Spanings-Pierrot. 2006. The crustacean hyperglycemic hormones from an euryhaline crab *Pachygrapsus marmoratus* and fresh water crab *Potamon ibericum*: eyestalk and pericardial isoforms. Peptides 27: 1269 – 1280
- Treerattrakool, S., S., Panyim, S.M., Chan, B., Withyachumnarnkul, A., Udomkit. 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. FEBS Lett. 275: 970 – 980.
- Treerattrakool, S., S., Payim, A., Udomkit. 2011. Induction of ovarian maturation and spawning in *Penaeus monodon* broodstock by double-stranded RNA. Mar Biotechnol. 13: 163 - 169.
- Tsai, K.W., S.J., Chang, H.J., Wu, H.Y., Shih, C.H., Chen, C.Y., Lee. 2008. Molecular cloning and differential expression pattern of two structural variants of the crustacean hyperglycemic hormone family from the mud crab *Scylla olivacea*. Gen. Comp. Endocr. 159: 16 – 25.
- Tsang, W.S., L.S., Quackembush, B.K.C., Chow, S.H.K., Tiu, J.G., He, S.M., Chan. 2003. Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas. Gene 303: 99 - 109.
- Tsukimura, B. 2001. Vitellogenesis: Its role in oocyte development. Am Zool. 41(3): 465 - 476.
- Tsukimura, B., F., Kamemoto. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretion in the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 92: 59-66.

- Tsutsui, N., I., Kawazoe, T., Ohira, S., Jasmani, W.J., Yang, M.N., Wilder, K., Aida. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kumura prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool Sci.* 17: 651-660.
- Tsutsui, N., T., Ohira, I., Kawazoe, A., Takahashi, M.N., Wilder. 2007. Purification of sinus gland peptides having vitellogenesis-inhibiting activity from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar Biotechnol.* 9: 360 – 369.
- Tsutsui, N., T., Ohira, T., Okutsu, J., Shinji, S.H., Bae, B.J., Kang, M.N., Wilder. 2013. Molecular cloning of a cDNA encoding vitellogenesis-inhibiting hormone in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and preparation of its recombinant peptide using an *E. coli* expression system. *Fisheries Sci.* 79(3): 357-365.
- Udomkit, A., S., Treerattrakool, S., Panyim. 2004. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. *J Exp Mar Biol Ecol.* 298: 79 – 91.
- Untergrasser, A., I., Cutcutache, T., Koressaar, J., Ye, B.C., Faircloth, M., Remm, S.G., Rozen. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40(15):e115
- Vaca, A., J., Alfaro. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture* 182: 373- 385.
- Vallejo, D.M., S., Juárez-Carreño, J., Bolivar, J., Morante, M., Domínguez. 2015. A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. *Science* 350: 6767.
- Vandesompele, J., K., De Preter, F., Pattyn, B., Poppe, N., Van Roy, A., De Paepe, F., Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: 0034.1 – 0034.11.
- VanHerp, F., D., Soye. 1997. 8. Arthropoda - Crustacea. En: *Progress in Reproductive Endocrinology*. Vol. VIII. Adams, T.S. (ed.). (Series: Reproductive Biology of Invertebrates). Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. 382pp.
- Vazquez-Islas, G., R., Garza-Torres, D.A., Guerrero-Toledo, R., Campos-Ramos. 2014. Histology of the androgenic gland and expression of the insuline-like androgenic gland hormone precursor gene in the genital organ of the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Crustacean Biol.* 34: 293 – 299.

- Veloso, A., G.W., Warr, C.L., Browdy, R.W., Chapman. 2011. The transcriptome response to viral infection of two strains of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Dev Comp Immunol.* 35: 241 - 246.
- Ventura, T., R., Manor, E., Aflalo, S., Weil, S., Raviv, L., Glazer, A., Sagi. 2009. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insuline-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinology* 150(3): 1278- 1286.
- Visconti, P.E., J.L., Bailey, G.D., Moore, D., Pan, P., Olds-Clarke, G.S., Kopf. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137.
- Wanlem, S., K., Supamattaya, C., Tantikitti, P., Prasertsan, P., Graidist. 2011. Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 877 – 885.
- Warrier, S., T., Subramoniam. 2002. Receptor mediated yolk protein uptake in the crab *Scylla serrata*: crustacean vitellogenin receptor recognizes related mammalian serum lipoproteins. *Mol Reprod Dev.* 61: 536-48.
- Wasko, A.P., C., Martins, C., Oliveira, F., Foresti. 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161–165.
- Webster, S.G. 1993. High-affinity binding of putative moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenas*. *P R Soc Lond B-Conta.* 251: 53 - 59.
- Webster, S.G., H., Dircksen, J.S., Chung. 2000. Endocrine cells in the gut of the shore crab *Carcinus maenas* immunoreactive to crustacean hyperglycemic hormone and its precursor-related peptide. *Cell Tissue Res.* 300: 193 – 205.
- Webster, S.G., R., Keller, H., Dircksen. 2012. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, molting, and reproduction. *Gen Comp Endocr.* 175: 217 – 233.
- Wiwegweaw, A., A., Udomkit, S., Panyim. 2004. Molecular structure and organization of crustacean hyperglycemic hormone genes of *Penaeus monodon*. *J Biochem Mol Biol.* 37: 177 – 184.
- Wongprasert, K., S., Asuvapongpatana, P., Poltana, M., Tiensuwan, B., Withyachumnarnkul. 2006. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 261: 1447- 1454.

- Xie, S., L., Sun, F., Liu, B., Dong. 2009. Molecular characterization and mRNA transcript profile of vitellogenin in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Mol Biol Rep. 36: 389 - 397.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. En: The Physiology of Reproduction (ed. E. Knobil and J. D. Neill). Raven Press, NY. pp. 189-317
- Yang, W.J., K., Aida, H., Nagasawa. 1996. Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormone from the kumura prawn, *Penaeus japonicus*. Peptides 18: 479 – 485.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey.
- Zheng D, X., Chen, D., Xie, Y., Zhao, C., Yang, Y., Li, N., Ma, M., Peng, Q., Yang, Z., Liao, H., Wang, X., Chen. 2013. Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas in response to Taura Syndrome Virus (TSV) experimental infection. PLoS ONE 8(2): e57515
- Zheng Y, L., Zhao, J., Gao, Z., Fei. 2011. iAssembler: a package for de novo assembly of Roche-454/Sanger transcriptome sequences. BMC Bioinformatics 12:453
- Zheng, J., H.Y., Chen, C.Y., Choi, R.D., Roer, R.D., Watson. 2010. Molecular cloning of a putative crustacean hyperglycemic hormone (CHH) isoform from extra-eyestalk tissue of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and determination of temporal and spatial patterns of CHH gene expression. Gen Comp Endocr. 169: 174 – 181.
- Zhu, Y., J., Bond, P., Thomas. 2002. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to fish membrane progesterin receptor. PNAS. 100(5): 2237 – 2242.

ANEXOS