

03062  
12.  
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFECIONALES Y DE POSGRADO DEL  
C.C.H. PROYECTO ACADEMICO DE LICENCIATURA MAESTRIA Y DOCTORADO EN  
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTRATEGIA PARA LA CLONACION DE UN GEN NEUROENDOCRINO DE  
CRUSTACEO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
PRESENTA

JESUS SANTA OLALLA TAPIA

FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MORELOS

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles.**

**COMITE TUTORIAL:**

**Dr. Hugp Aréchiga Urtuzuastegui**

**Dr. Carlos Arias Ortíz**

**Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles**

**JURADO DE EXAMEN.**

**Presidente: Dra. Patricia Jospén Bravo**

**Secretario: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles**

**Vocal: Dr. Baltazar Becerril**

**Suplente: Dr. David Romero Camarena**

**Suplente: Dr. Carlos Arámburo**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de  
Neuroendocrinología

Molecular bajo la dirección del Dr. Luis Covarrubias Robles  
en colaboración con la Dra. Patricia Joseph, el Dr. Jean Louis  
Charli y el Dr. Hugo Aréchiga

con apoyo de CONACyT y la Fundación Ricardo J. Zevada

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis  
Covarrubias por su interés en mi preparación, así como a la Dra.  
Patricia Joseph y el Dr. Jean Louis Charli por el apoyo brindado  
en la realización de este proyecto.

## RESUMEN.

Debido a la complejidad del sistema nervioso de los mamíferos, hemos buscado modelos más simples que den elementos para conocer de una mejor manera, los mecanismos involucrados en la regulación de la biosíntesis peptídica. Para ello, se seleccionó al *Acoel* como modelo de estudio en vista de presentar órganos neuronales, con actividades neuroendócrinas descritas y funcionalmente caracterizadas. Dentro de ellas se encuentran las hormonas efectoras pigmentarias, las cuales se encargan de controlar el grado de dispersión de los granulos de pigmento.

Este trabajo se enfoca en la estrategia empleada para la clonación del gen de la Hormona Dispersora de Pigmento (HDP), la cual se fundamenta en la construcción de un banco subgenómico para el aislamiento de un fragmento de 5 kilobases, el cual fue detectado en experimentos tipo Southern, utilizando en ellos oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia aminoácidica de la hormona. Se aislaron 5 clonas positivas, en las que se incluye al fragmento inicialmente buscado. Dichas clonas se caracterizaron hasta nivel de secuencia nucleotídica, demostrando tener poca homología para la HDP, así como no codificar para ningún péptido. Este trabajo permite con los resultados obtenidos plantear una nueva estrategia para el aislamiento del ADN complementario.

En la parte de introducción se proporciona información sobre comunicación celular, biosíntesis peptídica, así mismo se describen las principales actividades neuroendócrinas de los crustáceos enfatizando la fisiología de pigmentos.

Vt.Bo. DR. Luis Covarrubias Robles.

## PRESENTACION.

En la última década hemos presenciado un incremento impresionante en el conocimiento a nivel molecular de las funciones celulares, debido principalmente al desarrollo e invención de nuevas técnicas de estudio, mejorando así la forma de afrontar las incógnitas planteadas. Dentro de estas técnicas, las relacionadas con el ADN recombinante han sido las que han mostrado un mayor adelanto, y las que han permitido estudiar y/o manipular de una mejor manera fenómenos biológicos in vitro e in vivo. Esto ha permitido profundizar a nivel molecular en los diferentes eventos y funciones celulares (e.i. duplicación, tránsito intracelular, comunicación intra y extracelular, diferenciación, crecimiento, senescencia, muerte, etc.), así como mostrar la relevancia de la estructura de las proteínas en su función, al permitir cambios de secuencia y valorar su actividad tanto in vitro como en modelos biológicos, permitiéndonos acercarnos cada vez más al evento celular en estudio. Sin duda, la gran ayuda que nos brindan estas tecnologías, nos darán en el futuro toda una nueva gama de conocimientos obtenidos a partir de su aplicación en la investigación básica y aplicada.

Este trabajo se enfoca en la estrategia para la clonación del gen de la Hormona Dispersora de Pigmento (HDP), como parte de un proyecto que tiene como objetivo estudiar los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica de la neurona peptidérgica; principalmente, valorar en qué grado influye el estímulo nervioso sobre los posibles puntos de regulación en la biosíntesis peptídica.

Como introducción se proporcionan los conocimientos elementales a nivel de comunicación celular y biosíntesis peptídica, posteriormente se mencionan brevemente, ejemplos de regulación en los diferentes pasos de la biosíntesis

peptídica. Finalmente, se provee información del modelo biológico empleado, así como el conocimiento actualizado en la fisiología de la HDP.

La última parte de este trabajo presenta la estrategia empleada así como los resultados obtenidos y su discusión.



INDICE

|  |    |
|--|----|
| PRESENTACION.                                | 1  |
| INDICE.                                      | 3  |
| I .- GENERALIDADES.                          | 4  |
| II .- COMUNICACION CELULAR.                  | 7  |
| A) TIPOS DE COMUNICACION.                    | 7  |
| B) ELEMENTOS MOLECULARES DE LA COMUNICACION. | 10 |
| C) MECANISMOS DE INTEGRACION.                | 15 |
| III .- LOS PEPTIDOS Y SUS PRECURSORES.       | 19 |
| A) BIOSINTESIS PEPTIDICA.                    | 19 |
| B) PRECURSORES PEPTIDICOS.                   | 24 |
| C) REGULACION DE LA BIOSINTESIS PEPTIDICA.   | 28 |
| IV .- EL CRUSTACEO COMO MODELO.              | 32 |
| A) EL SISTEMA NEUROENDOCRINO DE CRUSTACEOS.  | 32 |
| B) SISTEMA PIGMENTARIO DE CRUSTACEOS.        | 39 |
| C) HORMONAS EFECTORAS PIGMENTARIAS.          | 43 |
| D) INTEGRACION.                              | 48 |
| V .- OBJETIVO Y ESTRATEGIA DEL PROYECTO.     | 49 |
| VI .- RESULTADOS.                            | 51 |
| VII .- DISCUSION.                            | 60 |
| VIII.- MATERIALES Y METODOS.                 | 66 |
| IX .- REFERENCIAS.                           | 92 |

## I GENERALIDADES.

La célula, como unidad de los seres vivos, ha tenido que desarrollar mecanismos que le permitan regular sus procesos con tal de adaptarse de una mejor manera a los cambios ambientales. Para ese fin, en los organismos unicelulares se presentan múltiples ejemplos de regulación a nivel de expresión génica, sobre todo en la forma de como se adaptan a la carencia de determinados metabolitos imprescindibles para su sobrevivencia; ejemplos de esto son los operones que regulan el metabolismo de azúcares o aminoácidos. Bajo esta estrategia, los organismos unicelulares presentan la capacidad de adaptarse a las modificaciones de su entorno, utilizando elementos que mantienen una comunicación con los cambios ambientales. Si bien, esta interacción con el medio ambiente solo involucra la respuesta de una célula, ha permitido estudiar de una manera aislada los elementos que intervienen en la adaptación, lo que ha hecho que sean utilizados como modelos biológicos para el estudio de los mecanismos que participan en la comunicación celular (40,122).

Conforme los organismos unicelulares han evolucionado en complejidad, se ha permitido la interacción entre células del mismo tipo formando estructuras multicelulares. Dos tipos unicelulares que permiten este tipo de relación son las mixobacterias y las algas verdes. Esta característica brinda un nivel más alto de estructuración, en el cual las células que mantienen este contacto pueden diferenciarse. Para el caso de las algas verdes, estas pueden incluso mostrar cooperatividad de funciones (56). Este tipo de interacciones son las que permitieron la aparición y desarrollo de los organismos multicelulares, en los cuales los distintos tipos celulares que los conforman optimizan el aprovechamiento de los recursos existentes en el medio ambiente. En la medida que los organismos multicelulares han avanzado en la escala evolutiva, han tenido que desarrollar a la par mecanismos que les permitan coordinar las funciones de los diferentes tipos

celulares que los conforman. En la actualidad encontramos en los mamíferos una gran variedad de formas de intercomunicación celular (6), las cuales brindan una mejor manera de mantener las funciones corporales dentro de límites que permitan la subsistencia de los individuos y, una mejor adaptación a los cambios ambientales. La complejidad de la respuesta a una determinada situación se incrementa en la medida que un mayor número de células y moléculas efectoras se encuentran involucradas. Como consecuencia el estudio de los elementos que participan se hace más difícil. Como ejemplo podemos citar los eventos involucrados en mantener la presión sanguínea, donde participan hormonas, neurotransmisores y prostaglandinas. Eventos como el anterior requieren de sistemas que permitan coordinar a las diferentes células que participan en la respuesta, manteniendo así un equilibrio interno (homeostasis). Como una necesidad de integrar las funciones de los principales sistemas involucrados en dicho evento ha surgido el sistema neuroendócrino, en el cual se unen por un lado los mediadores de las funciones endócrinas (hormonas) y, por el otro, la neurotransmisión. En ambas funciones los neuropéptidos juegan un papel importante como moléculas mediadoras en la transmisión de un mensaje de una célula a otra.

El sistema neuroendócrino está constituido por neuronas que presentan la característica de secretar moléculas sobre el torrente circulatorio, a través del cual pueden llegar a cada una de las células que conforman al organismo; dicha liberación se produce en respuesta a un estímulo nervioso. Estas neurohormonas en muchos de los casos regulan la secreción glandular (70), los productos de secreción de éstas a su vez pueden controlar entre otras cosas la liberación o síntesis del mismo efector neuroendócrino, lo que se conoce como efecto retroalimentador negativo (39).

Este proyecto contempla como objetivo final valorar la repercusión que puede tener el estímulo nervioso sobre la biosíntesis peptídica, eligiendo para ello

cuantificar el ARNm de la Hormona Dispersora de Pigmento (HDP) del Acocil Procambarus clarkii, en el cual se conoce su fisiología en lo que respecta a las variaciones sufridas en su concentración durante el transcurso del ciclo circadiano (9), así como los efectores involucrados en su liberación (14). Todo ello proporciona variables fácilmente controlables que permitirán valorar de una mejor manera los elementos que influyen sobre la regulación neuronal a través del impulso nervioso.

El trabajo que se presenta aquí, describe la estrategia empleada para la clonación del gen de la HDP, el cual servirá para la cuantificación del ARNm específico de la hormona.

## II COMUNICACION CELULAR.

### A) TIPOS DE COMUNICACION

Todas las células que participan en el control de las funciones del organismo presentan mecanismos que les permiten identificar oportunamente cualquier cambio en su entorno, lo que a su vez permite originar una respuesta específica. En el presente capítulo se describen los diferentes elementos con los que se cuenta para dicho control.

Los diferentes tipos de comunicación celular comprenden fundamentalmente 3 clases (6); 1) comunicación mediada por mensajeros químicos; 2) comunicación mediada por contacto celular directo y 3) comunicación mediada por uniones comunicantes. Dichas estrategias permiten mantener una comunicación entre los diferentes tipos celulares y coordinar de una mejor manera las diversas funciones corporales.

La comunicación mediada por mensajeros químicos se caracteriza por la liberación de una molécula a partir de una célula efectora que interactuará con una célula blanco. Este tipo de comunicación puede clasificarse en 3 tipos atendiendo a la distancia que tiene que recorrer la molécula para efectuar su acción (Fig. 1): A) de tipo endócrino, cuando el mensajero empleado es liberado al torrente circulatorio y actúa sobre una célula blanco a una distancia considerable del punto donde fue liberado; B) De tipo parácrino, cuando el mensajero es liberado en el intersticio solo actuando en las células vecinas (dentro de este tipo de comunicación podemos encontrar a la transmisión sináptica, la cual se realiza en una unión especializada entre dos neuronas, Fig. 1C) y C) de tipo autócrino, cuando la molécula liberada actúa sobre la misma célula que la libera.

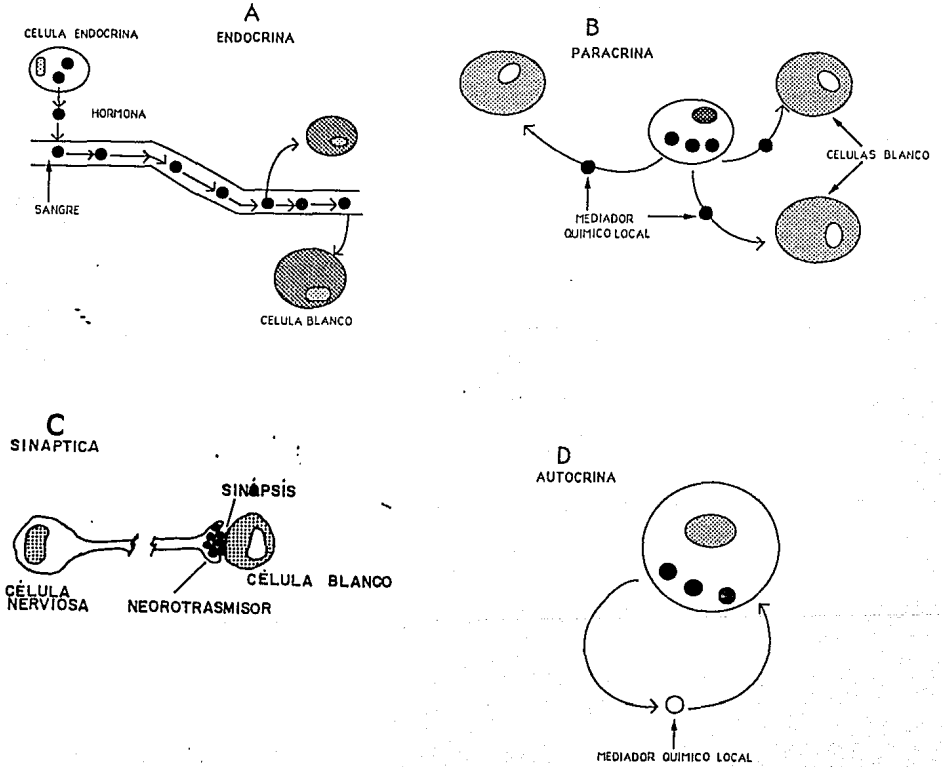


FIG. 1) DIFERENTES MECANISMOS DE COMUNICACION MEDIADOS POR MENSAJEROS QUIMICOS.

La transmisión del mensaje se realiza cuando la molécula efectora interactúa con una molécula proteínica colocada en la célula blanco (6); esta molécula llamada receptor es la que da la especificidad en la respuesta a un mensaje, puesto que solo se encuentra en aquellas células que deben de responder a un determinado estímulo.

La comunicación por contacto celular directo involucra a moléculas especializadas colocadas en la membrana celular que interactúan con proteínas receptoras en otra célula; este tipo de comunicación tiene una gran importancia en el desarrollo (51,93,191) y en las interacciones presentes en el sistema inmune (178). Recientemente se ha sugerido su papel en algunos mecanismos de regeneración axonal (159), así como en eventos que regulan la liberación de algún efector (163), los cuales incluso podrían utilizar segundos mensajeros (160).

La comunicación mediada por uniones comunicantes, se realiza a través de la formación de un poro en la membrana citoplásmica de las células que mantienen esta comunicación, de tal forma que pueden compartir moléculas intracelulares de escasa masa molecular. Estos poros se encuentran formados por proteínas integradas en la membrana (transmembranales) presentes en las células participantes, que al interaccionar ponen en comunicación los citoplasmas de ambas células, permitiendo que mensajeros químicos intracelulares y metabolitos difundan libremente en los tejidos que presentan este tipo de organización (167). Esta comunicación es de suma importancia, por ejemplo, para coordinar la contracción del músculo cardíaco e intestinal, así mismo, puede acoplar la transmisión del impulso eléctrico entre dos células nerviosas (sinapsis eléctrica), permitiendo una transmisión más rápida del estímulo con respecto a la sinapsis mediada por mensajeros químicos (sinapsis química) (7); en la embriogénesis se ha demostrado también su participación para coordinar la diferenciación (13). Las uniones comunicantes se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo, sin embargo no se comprende claramente su

función, aunque en principio, al compartir pequeñas moléculas e iones proporcionan un mecanismo para sincronizar las actividades de las células en dichos tejidos. Ya que el AMPc puede pasar a través de las uniones comunicantes, la respuesta de células acopladas a señales extracelulares podría ser propagada y coordinada por este mecanismo (95).

Este capítulo se enfoca fundamentalmente en la comunicación mediada por mensajeros químicos, ya que es el tipo de comunicación presente en el sistema de estudio. Sin embargo, no debe ignorarse la posible participación de los otros mecanismos en su regulación.

#### B) ELEMENTOS MOLECULARES DE LA COMUNICACION.

Los elementos que participan en la comunicación celular son el efector o mensaje, el receptor y los transductores.

##### EFFECTORES.

Los efectores son moléculas de diferentes características químicas, sintetizadas por la célula efectora (70), la maquinaria que se requiere puede en algunos casos estar regulada por estímulos externos o internos a la célula (96,172), de tal forma que la regulación de la respuesta se incrementa en complejidad permitiendo una mayor fineza. Para cada uno de los distintos efectores se requiere una vía particular de síntesis, sin embargo, los que tienen un origen común pueden sintetizarse de ramificaciones a partir de una vía metabólica inicial (por ejemplo las diferentes prostaglandinas o las hormonas esteroideas) (61).

De particular importancia para este proyecto son los efectores de origen peptídico, los cuales se caracterizan por ser moléculas constituidas por cadenas de aminoácidos, que van desde un par hasta cientos de ellos (70). Fueron caracterizados en forma inicial por su actividad hormonal, pero en los últimos años se han encontrado también en el Sistema Nervioso (SN), en donde pueden cumplir



funciones de neurotransmisores o neuromoduladores (70). La síntesis de los efectores peptídicos, como toda proteína, se realiza mediante la vía ribosomal, a través de la transmisión de la información contenida en el ADN (ver detalles más adelante) (8).

#### RECEPTORES.

Los receptores son moléculas de origen proteínico especializadas en el reconocimiento de los efectores (6), cuya principal función es identificar el mensaje en la célula blanco y, a través de los mecanismos de transducción, ocasionar una respuesta adecuada al estímulo recibido. Los diferentes receptores muestran una gran similitud entre ellos de acuerdo al mecanismo de transducción empleado. Así, podemos encontrar receptores que proporcionan determinada actividad enzimática (p. ej. tirosin-quinasa) (180); aquellos que presentan afinidad por secuencias de ADN que modulan la transcripción (43,119); con dominio que interactúan con transductores intracelulares (a.i. proteínas G) (154,155), o bien, están constituidos por múltiples regiones transmembranales que permiten el paso de iones (86,181). En algunos casos, receptores para el mismo efector pueden presentar variedad en su afinidad (138) o utilizar diferentes mecanismos de transducción (47). Así mismo, estas moléculas presentan modulaciones en su sensibilidad para el efector, a través de la acción de segundos mensajeros (67). Todo lo anterior permite originar una respuesta específica para cada uno de los diferentes efectores, la cual puede diferir dependiendo del tipo celular involucrado y de la condición fisiológica de su receptor.

#### TRANSDUCTORES.

Conforme se ha incrementado la diversidad de tipos celulares se han tenido que implementar mecanismos específicos que interpreten de una manera acertada la gran diversidad de estímulos que se reciben, todo ello con la finalidad de poder coordinar las respuestas a los efectores que son capaces de responder.

Intracelularmente, este tipo de organización se realiza por varios mecanismos de transducción existentes, los cuales pueden producir diferentes respuestas que a su vez originan cambios funcionales en una gran diversidad de proteínas importantes para la célula, las que en última instancia, llevan a cabo las funciones adecuadas al estímulo recibido. Dentro de los diversos mecanismos de transducción podemos mencionar los que involucran un segundo mensajero, por ejemplo: los nucleótidos cíclicos (12), los fosfolinosítidos (13,14) o, calcio (13) (Fig. 2); aquellos asociados directamente a los mismos receptores como los que presentan una actividad catalítica (180); los que producen cambios de permeabilidad membranar con la consiguiente despolarización o hiperpolarización (181).

La cascada de transducción involucra en muchos casos a protein-quinasas (127), las cuales, además de proporcionar un punto de amplificación de la señal, pueden ser utilizadas como un elemento más de regulación. Estas proteínas presentan una gran variedad dependiendo del segundo mensajero que las activa: I) Dependientes de AMPc (Proteincinasa A) (177); II) de calmodulina (127); III) de diacilglicerol (Proteincinasa C) (82), estas dos últimas requieren de la presencia de  $Ca^{++}$ ; IV) de GMPc (127). De las tres primeras se han descrito subclases, las cuales presentan, variedad en su afinidad por el factor que las activa o por sus sustratos (82,127,177). Existen a su vez algunas otras proteincinasas que no dependen de segundos mensajeros como las tirosincinasas y la rodopsincinasa (127). Las proteincinasas presentan una especificidad por el residuo a fosforilar en su proteína blanco, los cuales comúnmente pueden ser de serina, treonina o de tirosina, lo que ocasionará una regulación de su actividad en forma negativa o positiva. La desactivación de dichos elementos se realiza por intermedio de una fosfatasa (18,19), sumando así otro punto de control intracelular.

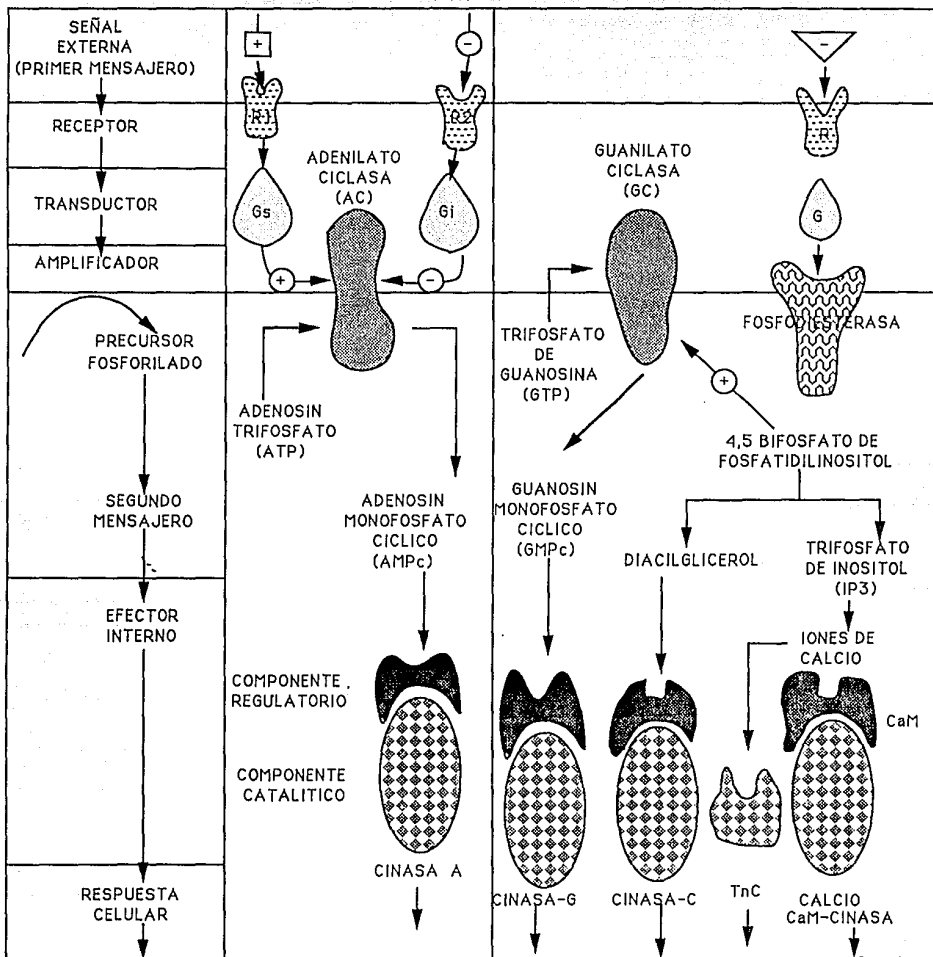


FIG. 2) MOLECULAS MEDIADORAS DE LA COMUNICACION CELULAR. Diagrama simplificado que muestra los principales elementos en la transducción de señales en las que se afecta las vías de AMPc, GMPc y Fosfolinosítidos. CaM: Calmodulina, TnC: Troponina C.

Un evento más en la organización intracelular de la transducción, puede involucrar aquellas moléculas que presentan un efecto regulador de la transcripción sobre diferentes genes relacionados con la respuesta celular. Estas moléculas muestran una variedad en su mecanismo de activación (vía hormonal (43), por segundos mensajeros (185), por proteincinasas (121) o por la formación de dímeros (17)) donde, en algunos casos, la modulación por fosforilación pudiera ser crítica (121,164,165). El común denominador de todas estas proteínas se encuentra en poder reconocer una secuencia nucleotídica específica en el ADN (elementos responsivos) (43,164), mecanismo que debe estar asociado directamente a sus interacciones con compuestos moduladores, así como con información presente en la secuencia nucleotídica o en regiones aledañas, lo que incrementará o disminuirá la velocidad de transcripción del gen involucrado. Dentro de este tipo de moléculas se pueden destacar a: los receptores de hormonas tiroideas, esteroides, de eccidisona y algunas otras moléculas relacionadas (43); la Proteína de Unión al Elemento Responsivo de AMPc (CREBP), cuya activación depende de la actividad de la proteincinasa A (164); la familia fos y la familia jun (164); así como algunos otros factores cuyos elementos responsivos no han sido identificados (c-myc y nur/77). Existe también una proteína que recibe el nombre de elemento responsivo a suero (121), la cual es un factor transcripcional relacionado con la activación por los receptores del tipo tirosincinasa, o a través de la vía del diacilglicerol. Algunas de estas moléculas han recibido el nombre de terceros mensajeros por estar asociada su actividad a los segundos (fos.jun). Para aquellos en que su activación involucra incremento de su transcripción, se les ha denominado genes de respuesta inicial temprana (20).

### C) MECANISMOS DE INTEGRACION.

Los organismos multicelulares presentan un gran número de funciones que son vitales para la adecuada relación con su entorno. Algunas involucran mecanismos de interacción con los cuales los organismos sondan su medio ambiente; otras más comprenden las respuestas que deben de ser tomadas per se. Todas estas funciones deben de mantener una estrecha comunicación para mantener la homeóstasis. Dentro de este tipo de organización los efectores y sus receptores son las moléculas que brindan la comunicación necesaria para corregir o responder en forma adecuada a las modificaciones ambientales o internas del organismo. Los efectores son liberados a la circulación o intersticio por las células que los producen de acuerdo con las necesidades del organismo, para lo cual, muchas de las células efectoras presentan dispositivos que permiten conocer las necesidades del efector que liberan, o bien, se encuentran en íntima relación con los órganos que mantienen una vigilancia constante sobre determinada función; todo ello permite una rápida respuesta a condiciones inadecuadas. Estas moléculas presentan una gran versatilidad, ya que dependiendo del tipo de comunicación general y del sitio de acción originan diferentes respuestas. Así, es posible encontrar efectores con actividad hormonal cuando son liberados a la sangre y, sin embargo, funcionar como neurotransmisores cuando son liberados en el espacio sináptico (70). Esta organización incrementa en complejidad cuando se requiere de diferentes efectores para una determinada condición fisiológica. Por tal motivo, se han desarrollado simultáneamente mecanismos que mantienen una influencia recíproca entre las diferentes células efectoras, lo que permite integrar el funcionamiento de los diferentes efectores involucrados en determinado evento. En la mayoría de los casos esta coordinación de respuestas es realizada por el sistema neuroendócrino, en el cual se unen las características del SN (contacto directo con el exterior o interior a través de

órganos sensores) y del sistema endócrino (la liberación de hormonas a la circulación). Este sistema a través de la secreción de neurohormonas permite controlar la liberación de hormonas a partir de las glándulas de secreción interna. A su vez, los niveles hormonales controlan varias de las funciones en las células blanco, que inclusive pueden ser las mismas células neuroendócrinas (39,113). Uno de los mejores ejemplos al respecto es el que se encuentra en la coordinación de eventos que se suceden en los ejes neuroendocrinos, donde toda la cascada de eventos que se suceden en ellos pueden brindar posibilidades alternativas de control. Además, es posible que las células participantes presenten dispositivos que les mantengan informadas de los niveles del efector final, permitiendo así contar con dispositivos de retroalimentación tanto positivos como negativos. De ellos el más estudiado es tal vez el que controla la liberación de hormonas esteroideas a partir de la corteza suprarrenal. Estas hormonas presentan múltiples actividades a nivel del metabolismo de las proteínas, carbohidratos y lípidos (61,130), así como también, dependiendo del tipo influyen en el transporte de electrolitos y la distribución del agua en los tejidos, además de presentar múltiples regulaciones a nivel del SN en donde pueden modular la síntesis peptídica (71) o la actividad eléctrica neuronal (161). La regulación de la liberación de las hormonas esteroideas se encuentra controlada por hormonas tróficas liberadas por la hipófisis (adrenocorticotropina) (39), esta hormona a su vez recibe influencia para su liberación de un factor hipotalámico, así como un efecto retroalimentado: negativo sobre su síntesis por las hormonas esteroideas (72). Esta coordinación de eventos puede estar influida también por el ciclo circadiano (190), agregándose un elemento más de control.

El ciclo circadiano se encarga de coordinar un gran número de funciones (40,122), encontrándose presente inclusive en organismos unicelulares (40,58), mantiene a su cargo actividades que están relacionadas con los hábitos de conducta

(donde en los mamíferos juegan un papel muy importante las hormonas esteroideas o tiroideas) (130,132). En dicho efecto, las diferentes células efectoras que ven influida su liberación hormonal se encuentran moduladas por un reloj biológico, el cual presenta una actividad cíclica durante las 24 Hrs. (58); y que a su vez, se encuentra sincronizado por estímulos externos directos (ciclo luz-obscuridad) (10). En los mamíferos se ha establecido la presencia de un grupo neuronal que presenta actividad eléctrica o liberación de vasopresina rítmica en el núcleo supraquiasmático (140); su actividad cíclica se mantiene en condiciones de estímulos externos continuos (luz u oscuridad) solo presentando ligero desfasamiento del ritmo normal, el cual es corregido al reinstalarse las condiciones alternas de luz-oscuridad (40,58). Esto permite apreciar la íntima relación que presentan los mecanismos de control hormonal con el exterior. En el núcleo supraquiasmático se han encontrado terminaciones nerviosas provenientes de la retina (en forma precisa de las células ganglionares), las cuales se piensa que intervienen en la coordinación del ciclo (114). Múltiples efectores peptídicos presentan cambios circádicos en su concentración en los líquidos corporales e inclusive en los tejidos mismos (Adrenocorticotropina (118), Vasopresina (170), Calcitonina (95), Tirotropina (155), Hormona Liberadora de Tirotropina (29,30) etc.) los cuales pueden estar influenciados por el ciclo luz-obscuridad (101,170).

Bajo las estrategias anteriores, se puede integrar una gran parte de las funciones hormonales de acuerdo a la interpretación del SN sobre las modificaciones ocurridas en el organismo, o bien controlar las actividades hormonales a través de algún reloj biológico.

Las características antes descritas hacen del sistema neuroendócrino un elemento importante para controlar los niveles hormonales. Este sistema por su importancia se encuentra ampliamente distribuido en los organismos multicelulares, siendo posible encontrarlo filogenéticamente muy temprano (Moluscos (25,153),

Celenterados (57,137), crustáceos (27)) mostrando actividades y modulaciones generales muy similares a las presentes en los mamíferos. Sin embargo, el total de factores involucrados es menor debido al número de células que los constituyen. Esta característica ha permitido utilizarlos como modelos de estudio para los diferentes eventos que controlan el funcionamiento de las neuronas peptidérgicas.

A nivel intracelular también existe una organización que permite responder en forma coordinada a los diferentes efectores que afectan una célula blanco, de tal forma que es posible realizar la respuesta adecuada para cada uno de ellos (8). Para esto, cada efector presenta una vía de transducción específica la cual realizará las modificaciones requeridas en un tipo celular dado (12). Estos mecanismos de transducción en otro tipo celular podrían estar influenciados por diferente efector o inclusive proporcionar una respuesta diferente (12,47). Además, en cada célula es posible encontrar mecanismos que regulan cada uno de los pasos en el evento de transducción permitiendo así una regulación más fina. Dicho control puede originarse como un efecto colateral del mismo fenómeno de transducción (69), o bien, a consecuencia de la influencia de una vía de transducción diferente activada por otro efector (22). Así mismo, cada paso puede ser utilizado como un punto de amplificación (6,12). Toda la organización intracelular se fundamenta en la especificidad y variedad que presentan los diferentes mecanismos de transducción, así como la posible interacción en sus diferentes etapas.



### III LOS PEPTIDOS Y SUS PRECURSORES.

#### A) BIOSINTESIS PEPTIDICA.

Como se menciona anteriormente, un gran número de efectores neuroendocrinos son peptidos. Estas moléculas son sintetizadas por vía ribosomal como precursores (B), los cuales sufrirán modificaciones para originar un péptido maduro. La información para sintetizarlos se encuentra contenida en la secuencia nucleotídica presente en los genes respectivos. Esta información es transferida al citoplasma en una molécula de ARN, cuya síntesis se encuentra dirigida por la ARN polimerasa II. La molécula así sintetizada se le denomina transcrito primario y es un reflejo fiel de la información contenida en un fragmento del ADN (unidad transcripcional) que incluye regiones tanto en el extremo 5' como en el 3' que no son traducidas. Esta enzima para poder iniciar su actividad reconoce en la región promotora una secuencia consenso que recibe el nombre de caja TATA; su posición suele estar entre los nucleótidos -25 a -30 con respecto al punto de iniciación de la transcripción. Para la adecuada actividad transcripcional la ARN polimerasa debe interactuar con otras proteínas, las cuales reciben el nombre de factores transcripcionales, los que facilitan la formación de un complejo estable para iniciar la transcripción, elongar la cadena de ARN o terminar la síntesis. Sobre la región promotora se encuentran otras secuencias que facilitan la actividad de esta enzima, entre ellas se puede comentar: Caja CCAAT o GGGCG, secuencia que se localiza entre la posición -60 o -120 y secuencias regulatorias, que influyen de una manera positiva o negativa sobre la velocidad de la transcripción (ver más adelante).

Una vez que la información se transfiere al transcrito primario, se realizan modificaciones sobre la molécula, para finalmente proporcionar un ARN mensajero maduro. Las modificaciones se realizan a nivel nuclear y comprenden principalmente:

A) Colocación de un encasquillado en su extremo 5', proceso que involucra la

colocación de una guanina metilada por medio de un enlace 5'-5', elemento importante para unirse al ribosoma. B) Extensión del extremo 3', que comprende la colocación de una cola de poli-A, en un sitio definido por la secuencia consenso (AAUAAA) (39). C) Metilación de residuos de adenina, modificación necesaria para proporcionar una mayor estabilidad al ARNm. D) Empalme (Splicing); este procedimiento es de los más complejos en lo que respecta al procesamiento del ARN, involucrando el corte de la molécula, escisión de los fragmentos que no codifican para el péptido predeterminado en el tejido (intrones) y ligación de los fragmentos que finalmente lo constituirán (exones) (Fig. 3). Este procesamiento se realiza por ribonucleoproteínas (171) las cuales se auxilian en su actividad por secuencias específicas dentro del intrón que por sí mismas delimitan la región a ser excindida (en el 100 % de los casos se encuentra el dinucleótido GU en el extremo 5'; mientras que en el extremo 3' se encuentra el dinucleótido AG). Todas las modificaciones anteriores se encuentran presentes en la mayoría de los ARNm descritos hasta el momento.

Una vez que el transcrito primario ha sido completamente procesado, se constituye así, en la molécula de ARN mensajero maduro. Esta molécula es transferida al citoplasma en donde se unirá a los ribosomas, los que junto con los ARN de transferencia permitirán codificar al precursor peptídico bajo el procedimiento de traducción (8).

El proceso de traducción involucra 3 pasos (iniciación, elongación y terminación) (61). Conforme la síntesis progresa se expone el extremo amino del precursor peptídico en el citoplasma, en cuyo extremo las proteínas que deben ser enviadas al retículo endoplásmico presentan una secuencia de características hidrofóbicas (péptido señal) (52), la cual es identificada por una partícula de reconocimiento (26), con lo que se produce una detención del proceso de traducción. Durante este lapso los ribosomas interaccionan con la membrana del retículo

endoplásmico, mediante un receptor específico para la partícula de reconocimiento, por donde se transloca la cadena peptídica nascente (26). Una vez dentro del lumen endoplásmico la secuencia señal se corta, y el ribosoma continúa la síntesis impulsando al péptido hacia el interior. Dentro del retículo endoplásmico las proteínas que requieren ser glicosiladas se les añade un núcleo de carbohidratos el cual sufrirá modificaciones posteriores en el aparato de Golgi (6). Dentro de estos dos organelos también se producen otras modificaciones, entre las que se encuentran sulfataciones, acilaciones o se agregan grupos como fosfoinosítidos; para todas estas reacciones se requiere de una o varias enzimas. Para cada una de estas actividades se requiere del reconocimiento de secuencias específicas dentro de la molécula peptídica, las cuales se ven afectadas por la estructura secundaria que presenta el precursor (131). Todos estos eventos son de suma importancia para la obtención de un péptido completamente funcional o bien proporcionan información para la compartimentalización de proteínas (131).

Cuando los péptidos se encuentran en el aparato de Golgi son envesiculados mediante un proceso de gemación. Dicho proceso es posible que siga dos caminos (133): uno que recibe el nombre de vía regulada la cual generará vesículas que serán liberadas por la célula bajo alguna condición o estímulo determinado; o bien, por la vía no regulada, la cual guiará al péptido envesiculado directamente a la membrana plasmática en donde se liberará sin tener control alguno sobre dicho proceso. En la selección de la vía que ha de seguir la proteína, no se ha detectado una secuencia específica determinante, por lo que su estructura debe jugar un papel importante.

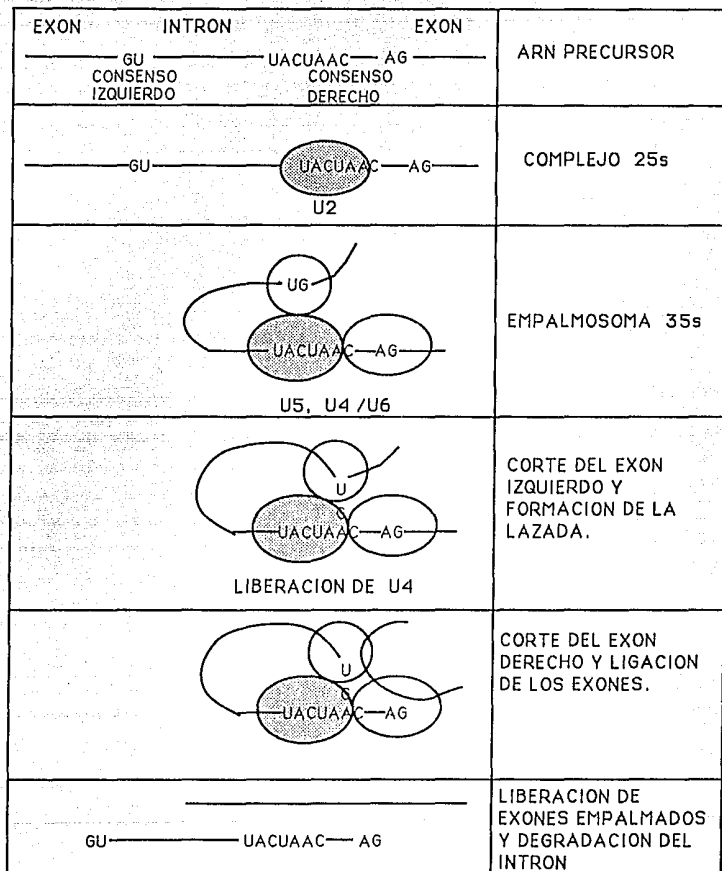


FIG. 3) PROCESO DE EMPALME. Estadíos identificados durante el proceso de empalme, por medio del cual se escinde un intron, destacándose las ribonucleoproteínas involucradas en cada uno de estos pasos.

Dentro de las vesículas los precursores sufren cortes proteolíticos, los cuales se encuentran determinados por aminoácidos básicos que flanquean la región que constituye al péptido maduro (54,158). Para este efecto, se han identificado que secuencias Arg-Arg-Lys-Arg, Lys-Lys-Arg-Arg, Arg-Lys-Arg, Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Arg, Arg-Lys e inclusive en algunos casos solo Arg o Lys están involucradas en la proteólisis limitada (33). Este corte es realizado por endopeptidasas, las cuales ven influido su reconocimiento a las secuencias anteriores por la estructura del precursor. Al respecto, algunos experimentos confieren cierta importancia a la conformación de  $\beta$ -plegamiento cercana a los aminoácidos básicos (150). Una vez realizado el corte, los aminoácidos básicos que quedan en los extremos de los péptidos son retirados por carboxipeptidasas o aminopeptidasas dependiendo del extremo (166). La maduración completa del péptido involucra en ocasiones modificaciones en ambos de sus extremos; en los péptidos que lo requieren es común encontrar amidaciones en su extremo carboxilo, para lo cual, se necesita de una glicina presente en el precursor entre el último aminoácido de dicho extremo y los aminoácidos básicos de procesamiento (42). Este aminoácido posteriormente es utilizado para ceder su grupo amino por medio de una reacción enzimática realizada por una peptidilamidasa (Peptidil-glicin monooxigenasa  $\alpha$ -amidasa PAM) (42), la cual requiere que el radical carboxilo esté libre, por lo que debe realizarse en forma previa el corte proteolítico dirigido por los aminoácidos básicos, así como la escisión de ellos (166). En lo que se refiere al extremo amino es posible encontrar en algunos péptidos la ciclización del aminoácido glutamina.

Una vez que los efectores peptídicos han sufrido todas las modificaciones pertinentes para adquirir el total de su actividad, las vesículas que los contienen son almacenadas hasta su liberación.

## B) PRECURSORES PEPTIDICOS.

Los precursores peptídicos contienen la secuencia que dará origen al péptido funcional, esta región puede ser única o repetida, o bien presentar en el mismo precursor diferentes péptidos con actividad biológica, lo que se conoce con el nombre de precursor poliproteínico (166). Cada una de dichas secuencias es procesada para originar un péptido maduro, teniendo en consideración las señales de procesamiento antes descritas. Los precursores peptídicos muestran una gran conservación de estos elementos, así es posible encontrar dichas señales en eucariotes unicelulares como levadura. Por ejemplo, el factor de apareamiento alfa de levadura presenta 4 copias de la secuencia del péptido en el precursor (90), las cuales se encuentran delimitadas por pares de aminoácidos básicos. En organismos más organizados, como *Aplysia*, se encuentran estructuras más complejas, como el precursor de FMRFamida (176), el cual presenta 28 copias del péptido, también delimitadas por aminoácidos básicos, además de contener la glicina necesaria para la amidación en el extremo carboxilo, y una secuencia de otro péptido (FLRFamida). El precursor de este mismo péptido en *Drosophila* contiene al menos 15 secuencias con 10 diferentes estructuras, las cuales contienen las secuencias de procesamiento (aminoácidos básicos y glicina) (125).

En *Aplysia* se presentan precursores poliproteínicos que muestran particularidades en su procesamiento. El precursor de la Hormona para la Postura de los Huevos (HPH), la cual es importante en el proceso de postura de los huevos, proviene de una poliproteína en donde, por procesamiento proteolítico, es posible generar hasta 9 péptidos, de los cuales 4 han sido caracterizados fisiológicamente (alfa, beta, gamma y HPH) (109). En esta misma especie se encuentra un péptido muy similar al anterior llamado péptido A, cuyo precursor presenta una delección que

escinde los péptidos beta y gamma; este precursor muestra una gran homología con el de la HPH pero se encuentran cambios en los patrones de formación de puentes disulfuro (no presentes en la HPH), así como en los de amidación y proteólisis, destacándose la importancia de dichas reacciones en la producción de diferentes efectores (166). En insectos la hormona adipocinética (HAC), encargada del metabolismo de lípidos, presenta un procesamiento particular. En este caso la cadena precursora (cadena A), se convierte en un homodímero el cual producirá dos moléculas de HAC-I y un dímero de un péptido relacionado al precursor de la HAC (FRPHA) (63,64). En este ejemplo resalta así mismo, la relevancia de la estructura para el adecuado procesamiento del FRPHA (63), ya que en su secuencia se encuentra un par de aminoácidos básicos los cuales no sufren corte proteolítico *in vivo* pero sí *in vitro*, destacando la relevancia de factores intracelulares para el adecuado procesamiento del precursor peptídico. La variedad en estructura de estas moléculas proporciona una singular importancia para los eventos de regulación, siendo en algunos casos un punto determinante en la expresión del efector. Tal vez el ejemplo más típico en la actualidad de esta característica es el procesamiento que presenta el precursor de la proopiomelanocortina (POMC).

El POMC es un precursor poliproteínico, que puede originar en forma tejida específica diferentes péptidos a través de un procesamiento diferencial (102). En el lóbulo anterior (LA) de la pituitaria se expresa la Adrenocorticotropina y  $\beta$ -Lipotropina, mientras que en el lóbulo intermedio (LI) se produce  $\beta$ -MSH (Hormona Estimulante de los Melanocitos),  $\alpha$ -Lipotropina,  $\beta$ -endorfina y CLIP (Péptido del Lóbulo Intermedio Semejante a Corticotropina). Además del procesamiento diferencial que se presenta sobre esta molécula, es posible apreciar eventos regulatorios distintos sobre su transcripción, así, en el LA es posible encontrar un efecto positivo por el Factor Liberador de Corticotropina (3), mientras que, en el LI no hay efecto por este factor, donde es posible apreciar un efecto negativo por

dopamina (28).

Los neuropéptidos se encuentran ampliamente distribuidos filogenéticamente, siendo posible encontrar efectores de mamíferos en esponjas (Colicistocinina) (153); estos últimos son los organismos multicelulares más primitivos y los primeros en contar con un SN. Las actividades que presentan son muy distintas a pesar de las similitudes que guardan a nivel de secuencia, en muchos de los casos se ignora su función. Un ejemplo de la diversidad de función es la familia HAC-HCP, la cual comprende un gran número de neuropéptidos encontrados en diversos géneros de insectos o crustáceos (Tabla 1). En estos se pueden distinguir tres tipos de funciones: la de concentración de pigmentos en crustáceos, la de regulación del metabolismo de lípidos en algunos insectos, mientras que en otros regula la concentración de glucosa (67). Los péptidos de esta familia muestran características estructurales comunes (Tabla 1): presentan de 8 a 10 aminoácidos con el ácido piruglutámico en el extremo amino y el extremo carboxilo bloqueado por una, fenilalanina y triptofano en los residuos 4 y 8 respectivamente, el segundo residuo puede ser leucina o valina y el tercero serina o treonina. La HAC, cuando se administra a crustáceos, presenta una actividad regulatoria sobre la concentración de pigmentos, mientras que la Hormona Concentradora de Pigmentos de crustáceos puede afectar el metabolismo de los lípidos en insectos (120). Esta propiedad hace resaltar las características que presentan los péptidos a través de la evolución, en la cual estas moléculas son empleadas como efectores adaptándose a las necesidades de los organismos aprovechando los elementos moleculares con los que se cuenta.

Actualmente se conoce la secuencia de un gran número de efectores peptídicos de diferentes especies, lo que ha permitido realizar estudios comparativos. Teniendo como base sólo su secuencia ha sido factible agruparlos en familias, en las cuales es posible encontrar una variedad de funciones. Como ejemplos se puede



TABLA 1

| GENERO       | HORMONA | SECUENCIA  |
|--------------|---------|--|
| Pandalus     | HCP     | pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Locusta      | HAK I   | pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH <sub>2</sub> |
| Schistocerca | HAK II  | pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Thr-Gly-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Locusta      | HAK II  | pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Ala-Gly-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Romalea      | Rc I    | pGlu-Val-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH <sub>2</sub> |
| Periplaneta  | M II    | pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Leptinotarsa | C.C. II | pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Blaberus     | HTH     | pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Thr-NH <sub>2</sub> |
| Gryllus      | HAK-G   | pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Thr-Gly-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Carausius    | HTF II  | pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH <sub>2</sub> |
| Manduca      | HAK     | pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-NH <sub>2</sub>     |
| Heliothis    | HrTH    | pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-NH <sub>2</sub> |
| Tabanus      | HAK     | pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Gly-Trp-NH <sub>2</sub>         |
| Tabanus      | HoTH    | pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Gly-Trp-Gly-Tyr-NH <sub>2</sub> |
| Drosophila   | HAK-D   | pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH <sub>2</sub>         |

mencionar a las familias peptídicas de la HPH (109), Somatostatina (174), la de HAC/HCP (58), ocitocina/vasopresina (1) y la de los opioides (4). Los precursores de algunos miembros de dichas familias han sido secuenciados, lo que a su vez ha permitido la realización de estudios evolutivos con ellos (126,174). Estos estudios han destacado la conservación en forma preferencial de la secuencia que codifica al péptido funcional en relación a las secuencias aledañas de las diferentes especies estudiadas, revelando así la presencia de una presión selectiva sobre el mantenimiento de péptidos con una actividad ya establecida (129). Sin embargo, es importante resaltar que en algunos casos, es posible encontrar en los tejidos los péptidos intermedios obtenidos del procesamiento (24), los cuales podrían tener alguna actividad aún no descrita; por otro lado, podrían ser regiones que se encuentran en proceso evolutivo. Desde este punto de vista, es comprensible encontrar una mayor variedad en la estructura general de los precursores que en la secuencia del péptido "funcional". En *Aplysia*, se han realizado estudios para identificar la variedad intraespecie que presenta un gen (126), estos resultados apoyan la existencia entre 4 y 5 genes de la familia de la HPH presentes en la mayoría de las subespecies estudiadas. No obstante, en dos especies sólo se detectaron 2 genes y en una de ellas no se detectó ninguno de los genes A o B, estos últimos se consideran que fueron originados por duplicación del gen de la HPH. Estos codifican para proteínas encontradas regularmente en *Aplysia*, presentando funciones relacionadas a la activación de las neuronas de la bolsa, las cuales producen la HPH. Múltiples datos como los anteriores sugieren la generación de efectores a través de duplicaciones génicas (1,128), en las cuales modificaciones posteriores les confieren nuevas actividades (109,128). Un precursor peptídico que podría apoyar este mecanismo de diversificación, es el que se encuentra en el precursor de vasotocina e isotocina de la remora blanca (52); los cuales son la contraparte de vasopresina y ocitocina respectivamente en los

mamíferos. Estos últimos pertenecen a la familia del mismo nombre compuesta por más de una docena de variantes, cuyos precursores guardan una gran homología (1). En ellos se encuentra codificada la hormona y una proteína llamada neurofina (146), la cual se piensa que es importante en el transporte intracelular de la hormona. En el caso de vasopresina se encuentra además una glicoproteína, que por lo menos en rata ha mostrado efectos sobre la liberación de prolactina (123). En la rana blanca los precursores de vasotocina e isotocina presentan solo la hormona y un péptido estructuralmente muy similar a la neurofina, pero con una prolongación en su extremo carboxilo que presenta características muy similares al glicopéptido de vasopresina y ocitocina (62). Es probable que durante la evolución de esta familia se hallan presentado eventos de deleciones del extremo carboxilo durante el evento de duplicación que dieron origen al precursor de ocitocina, mientras que en otro de los casos, se separó el glicopéptido de la neurofina originando el precursor de vasopresina.

#### C) REGULACION DE LA BIOSINTESIS PEPTIDICA.

La concentración peptídica muestra un sin número de eventos regulatorios, que permiten mantener los niveles apropiados del efector tanto en forma intracelular como extracelular. Extracelularmente el evento que participa en la regulación se encuentra modulando la liberación, lo cual permite responder a las necesidades del organismo como consecuencia de un estímulo específico, de tal forma que se realicen las adaptaciones o respuestas adecuadas a una nueva condición fisiológica por intermedio del efector requerido. Otro de los mecanismos que podría estar involucrado en dicho control, son los mecanismos de degradación, los cuales impiden que el efector mantenga su actividad por más tiempo del necesario. Muchas de las enzimas involucradas en este proceso pueden actuar en forma inespecífica, sin embargo, se han reportado enzimas que muestran cierta especificidad

(101,124,179,162). Para algunas de ellas se han descrito condiciones fisiológicas en las cuales podrían ser relevantes en el control de la concentración peptídica extracelular (101,124,136).

La liberación podría decirse que es el evento de mayor relevancia en la respuesta del organismo a los cambios ambientales, ya que de acuerdo a las necesidades del organismo se modula la presencia en sangre o intersticio del efector requerido para llevar a cabo la modificación adecuada. En la mayoría de los casos la liberación se realiza por interacción de uno o más efectores con sus receptores específicos en la célula productora (15,70,91,135,141), lo que produce en general modificaciones en la concentración intracelular de calcio, como respuesta a cambios de potencial de membrana o a un incremento en segundos mensajeros, dicha modificación producirá la fusión de la vesícula que contiene al péptido y la membrana presináptica (80).

Una vez que los efectores peptídicos son liberados es posible que se produzca una modificación en la concentración intracelular del péptido maduro; el grado en que ello sucede está relacionado con las necesidades del organismo. En varias condiciones fisiológicas (e. i. pubertad, embarazo, lactancia), así como también en interacciones que presentan los organismos con su medio (e. i. estrés, variaciones de temperatura, estaciones del año, ciclo circádico) se esperarían cambios importantes en la concentración peptídica intracelular. A este respecto, se han descrito cambios circádicos de la concentración de la Hormona Liberadora de Tirotrópina en el hipotálamo de la rata, que correlacionan con el periodo de mayor actividad (30); así mismo, se han encontrado modificaciones del recambio de prolactina en la adenohipófisis durante la lactancia (53). Para algunos efectores que presentan este tipo de modulación, es posible encontrar dicho efecto restringido a determinadas regiones; así, las modificaciones circádicas de TRH no se muestran en lóbulo olfatorio (29) o, en el caso de substancia P, la cual

presenta modulación circádica en la sustancia nigra y no en el área preóptica, amígdala y globus pallidus (81). Algunas otras moléculas que muestran variaciones circádicas en su concentración involucran a la vasopresina (101), angiotensina (124) y Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) (15). Estas modificaciones puedan deberse a cambios en la biosíntesis, degradación y/o liberación. Una estrategia para determinar la participación de la biosíntesis en dichos fenómenos, es la medición de los niveles de ARNm, bajo la cual ha sido posible correlacionar cambios en los niveles del ARNm específico en las células productoras de algunos efectores, con los incrementos de péptidos circulantes. Dicho evento es posible observarlo en efectores como la Prolactina en la adenohipófisis durante la lactancia (53), la  $\beta$ -endorfina en el lóbulo intermedio durante el ciclo circadiano, la vasopresina y oxitocina en la neurohipófisis secundarios a estímulos osmóticos (16), sugiriendo que el control de la biosíntesis se encuentra de alguna forma acoplado a los mecanismos de liberación. Un posible mecanismo de acoplamiento entre la liberación y la biosíntesis es a través de los efectores y receptores correspondientes. De acuerdo a esta hipótesis se ha demostrado que los mismos efectores que inducen la liberación son también capaces de incrementar los niveles de ARNm. En el caso específico del precursor de la adrenocorticotropina (proopiomelanocortina) es posible encontrar *in vitro* un efecto regulador positivo sobre los niveles de ARNm y la liberación por el Factor Liberador de Corticotropina (3). Este tipo de acoplamiento también es posible apreciarlo en las células adenohipofisarias que secretan Hormona Luteinizante bajo la acción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (23). Por otro lado, los mediadores intracelulares parecen ser los mismos; por ejemplo en los incrementos de la concentración de los niveles del ARNm de Proopiomelanocortina y la liberación de Adrenocorticotropina se han obtenido resultados que apoyan al AMPc como mediador de esta respuesta (3). En estudios realizados en la línea celular GH4, se apoya también a este mediador en los eventos

que controlan la liberación y regulación de la concentración del ARNm para Prolactina (5,53,78). En el caso de la regulación de la Hormona Luteinizante se han acumulado múltiples resultados que apoyan a la vía de los fosfolipídicos como mediadora de la respuesta de liberación y el control de su ARNm (23).

Múltiples datos demuestran que la modulación en la transcripción es la causa del incremento en los niveles de ARNm, encontrándose diferentes efectores intracelulares que la influyen (AMPc (2,3),  $Ca^{++}$  (23), diacilglicerol (65,83) o por activación de receptores de tirosincinasa (73)). En estos casos parece ser que factores transcripcionales son los responsables directos de mediar el efecto (32,66,121,164).

En resumen existen evidencias que establecen mecanismos de acoplamiento entre la biosíntesis y la liberación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, la modulación en la biosíntesis puede realizarse sobre diferentes puntos (transcripción, traducción, procesamiento); en el momento actual es posible decir que cada uno de los eventos es susceptible de control. Para el caso de precursores peptídicos se han demostrado regulaciones del procesamiento como en el caso de Gastrina, en el cual es posible apreciar acumulación del precursor durante la ontogenia (147) y, en el caso particular de la proopiomelanocortina, se encuentra un procesamiento diferencial que origina diferentes péptidos en dos tipos celulares (lóbulo anterior y lóbulo intermedio) con una diferencia notable en los mecanismos que regulan su expresión (3,28,102). Así mismo, se han descrito eventos regulatorios sobre Carboxipeptidasa B (152) y, para el caso de la Peptidil-glicin monooxigenasa  $\alpha$ -amidasa (PAM), es factible encontrar niveles de actividad que correlacionan con los niveles de diferentes péptidos (Endorfina, TRH), con lo que se podría especular la posible modulación de dicha actividad (42). No obstante a lo anterior, los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados son pobremente comprendidos y se desconoce el mecanismo exacto de como se realiza su modulación.

#### IV. EL CRUSTACEO COMO MODELO DE ESTUDIO.

##### A) EL SISTEMA NEUROENDOCRINO DE CRUSTACEOS.

El mayor número de efectores caracterizados en los crustáceos son secretados por células de origen neural (27); sin embargo, bajo el control de estas secreciones neuroendócrinas es posible encontrar órganos típicos de tipo endócrino (45). Las glándulas endócrinas de tipo epitelial comúnmente encontradas en los crustáceos son: el órgano "Y", el cual produce la hormona de la muda; la glándula androgénica, que controla la diferenciación del sistema reproductor masculino, así como el desarrollo de las características sexuales secundarias; el ovario, productor de las hormonas que controlan la diferenciación de los caracteres secundarios femeninos y finalmente el órgano mandibular, involucrado en la producción de la hormona juvenil.

El sistema neuroendócrino de crustáceos comprende 3 órganos (27): el órgano postcomisural, el órgano pericárdico y el complejo órgano X-glándula sinusal.

El órgano postcomisural, es una agrupación de terminales nerviosas (nervios postcomisurales) las cuales están en contacto con la hemolinfa, constituyendo así un órgano neurohemal, dichos nervios cursan por la comisura postesofágica, estructura que pone en contacto las terminaciones circumesofágicas. Este órgano es de los menos caracterizados, no obstante, se han identificado en él hormonas que presentan actividad en el control de la dispersión de pigmentos (27).

El órgano pericárdico, es una estructura localizada en la cavidad verosa del pericardio, a partir de la cual se ha demostrado la liberación de compuestos cardioestimuladores, tanto aminas biógenas como péptidos (27,36). Las terminales que conforman esta estructura provienen de los nervios segmentarios, los cuales se originan en los ganglios torácicos; estos nervios, además de proporcionar las terminales neurosecretoras, proporcionan también ramas sensoriales y motoras al tórax y corazón. La distribución anatómica de este órgano es muy variada, tanto

entre órdenes de crustáceos como dentro de ellos mismos. En *Procambarus*, el órgano pericárdico aparece como troncos interconectores cortos, los cuales están localizados en la vena braquiocardiaca ventrolateralmente al miocardio. Aparentemente los nervios segmentarios torácicos 3-7 contribuyen a la mayoría de las terminales en dichos troncos, aunque se han descrito nervios simpáticos provenientes de los nervios segmentarios subesofágicos, su relevancia estructural en la constitución de este órgano no se ha establecido. Dentro de los cuerpos neuronales plenamente demostrados que le envían axones, se encuentran las células B y C (localizadas en la región dorsal y ventral del ganglio torácico respectivamente); células de la raíz (localizadas en la primera bifurcación de los nervios segmentarios torácicos); células A (localizadas en el ganglio comisural) así como células intrínsecas del mismo órgano. Estudios de microscopía electrónica han demostrado la presencia de diversos tipos de terminales atendiendo a las características de las vesículas de secreción que contienen (27). Bajo este punto de vista ha sido posible identificar hasta 7 diferentes tipos de terminales, en las cuales se han identificado algunos efectores, como Octopamina (100), Serotonina (100), Proctolina (168), Péptido Cardioactivo de Crustáceos (PCAD) (36,169), así como un péptido que muestra inmunoreacción a la FMRF-amida (116). Este último en algunas especies de crustáceos se ha sugerido como formas extendidas del péptido RF-amida, comúnmente encontradas en insectos (97). La mayoría de estos efectores presenta una actividad cardioestimuladora, sin embargo, en lo que respecta a los 2 últimos efectores se han detectado en múltiples neuronas del SN de crustáceos (36,116), en el cual podrían estar funcionando como neurotransmisores o neuromoduladores. El órgano neuroendócrino de mayor importancia en los crustáceos es sin duda alguna el complejo órgano X-glándula sinusal (27,45) (Fig. 4). Su actividad se relaciona con la liberación de hormonas peptídicas a la hemolinfa, las cuales modulan determinada condición fisiológica a través de órganos endócrinos o



directamente sobre las células blanco involucradas (45). Este sistema guarda cierta similitud con las neuronas hipotalámicas en mamíferos, en las cuales los efectores neuroendócrinos controlan la secreción hipofisiaria. Las hormonas liberadas por la glándula sinusal, están involucradas en un gran número de eventos, dentro de ellos se pueden comentar: el proceso de la muda, crecimiento, maduración sexual, modulación del grado de dispersión de pigmentos, la regulación del metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos (45). Así mismo, es importante destacar que algunos de estos procesos reciben influencia en su liberación a través de cambios ambientales (9,107,149). Las funciones que se ven reguladas por este tipo de mecanismo incluyen: la regulación de la concentración de glucosa (45), la concentración iónica y osmótica (45); la adaptación a la luz y al color de fondo (9,45,149); y tal vez al mantenimiento del ritmo circadiano y locomotor (45). Muchas de las actividades antes mencionadas fueron descritas inicialmente en experimentos de extirpación y administración de extractos del tallo ocular (región del SN de crustáceos en donde se encuentra el complejo órgano X-glándula sinusal) Posteriormente se realizó el aislamiento, caracterización e identificación bioquímica del efector involucrado (27,45). No obstante, algunos efectores del tallo ocular no han sido caracterizados totalmente (45).

Es posible visualizar a la glándula sinusal como una estructura blanquecina iridicente en la superficie del ganglio óptico en el lado dorsal o dorsolateral, a nivel de la médula interna o externa. Se encuentra inmediatamente debajo de una placa de tejido conectivo esponjoso y en algunos casos, bajo los músculos asociados con el movimiento del tallo ocular. Se encuentra constituida por terminaciones nerviosas que muestran un contacto importante con la hemolinfa. Estas terminales provienen en un 90 % del órgano X (agrupación neuronal localizada en el extremo próximo ventral de la médula terminal), en donde dependiendo de la especie, es posible encontrar de 100 a 250 cuerpos neuronales.

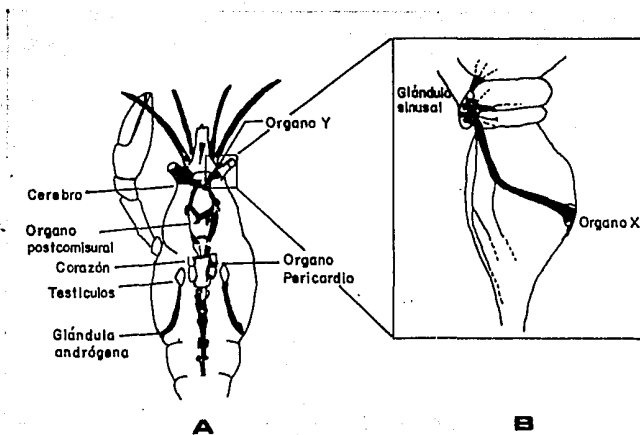


FIG. 4) A) Localización de los diferentes órganos endócrinos y neuroendócrinos del *Procambarus*. B) Localización del complejo órgano X-glándula sinusal.

En Procambarus se aprecian 120 neuronas en promedio (27). Estudios ultraestructurales de la glándula sinusal han evidenciado la presencia de una variedad de gránulos de neurosecreción, las cuales dependiendo de la especie pueden ser de 2 a 7 clases distintas (27). Algunos estudios de microscopía apoyan cambios relacionados con alguna condición fisiológica y el incremento o descarga de gránulos de la terminal (38,137). Esta clasificación apoya la posibilidad de encontrar más de un péptido en los diferentes tipos de terminales, puesto que el número de actividades descritas lo sobrepasa. Los efectores peptídicos liberados a partir de la glándula sinusal completamente identificados en la actualidad, comprenden: Hormona Hiperglicémica; Hormona Inhibidora de la Muda y las hormonas que presentan efecto sobre el sistema pigmentario de crustáceos (Hormona Concentradora de Pigmento y la Hormona Dispersora de Pigmento).

La Hormona Hiperglicémica de Crustáceo (HHC) es un efector de origen peptídico (79), que como su nombre lo indica produce un incremento en la concentración de glucosa en hemolinfa (45). Esta hormona parece pertenecer a una familia de péptidos relacionados (68), en la cual se podría incluir, tal vez, a la Hormona Inhibidora de la Muda (184).. así como a diferentes péptidos con actividad hiperglicémica presentes en la misma especie (65). La actividad hiperglicémica es especie específica (137), lo cual parece deberse a diferencias estructurales en la hormona apreciables por variaciones del volumen de elución en columnas de DEAE-celulosa, así como por diferente patrón de corrimiento en geles de acrilamida de la fracción eluida (85). Un dato a favor de múltiples formas de esta hormona en la misma especie es el reportado por Stuenkel (173); este autor empleando experimentos de pulso y caza, logró identificar múltiples formas del precursor de la HHC, así como demostrar la presencia de un péptido de funciones desconocidas presente en el precursor (Péptido H). Esto último fue comprobado con la reciente clonación de ADNc de la HHC en Carcinus maenas (188), a partir del cual se dedujo la secuencia del

precursor de la HHC demostrando la presencia adicional de un péptido llamado péptido C (Péptido H de Stuenkel), los cuales coinciden con los pesos esperados. La HHC presenta un comportamiento circádico en su liberación con la consiguiente fluctuación de la concentración de glucosa (77), presentando un incremento nocturno en su concentración, cuya duración varía dependiendo de la especie analizada. La concentración de glucosa presenta fluctuaciones bajo otro tipo de condiciones como son la muda y las estaciones del año (76,77), lo que puede involucrar otros factores en el control de la liberación de la HHC. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de esta hormona solo en el órgano X, y al menos no hay una colocalización con la Hormona Inhibidora de la Muda (137).

La Hormona Inhibidora de la Muda (HIM) es una hormona peptídica (19), termosensible, con un tamaño aproximado de 6 a 14 Kilo-daltons, y que al parecer no es especie específica (27,45,137). Originalmente, solo se le atribuía como actividad la de disminuir la secreción de la hormona de la muda (ecdisona) por el órgano-Y (27). No obstante, Freeman et al han proporcionado evidencias de un efecto antagónico directo de la HIM sobre la ecdisona a nivel de las células epidérmicas (46). Recientemente se han acumulado datos sobre el efecto que presenta la HIM sobre la producción de ecdiesteroides en el órgano Y (106); en los cuales, realizando estudios de incorporación de uridina, timidina y leucina tritiadas, se ha podido apoyar, como posible mecanismo de acción de la HIM, una disminución en la traducción, evento que se encuentra mediado por un incremento de AMPc (46,106), presentándose además un efecto regulador antagónico por calcio y calmodulina (110), para el cual se ha demostrado la intervención de una fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (110). Así mismo, se ha identificado una proteincinasa que presenta efecto regulatorio positivo sobre la síntesis de ecdiesteroides, lo cual incrementa la síntesis de proteína sin afectar la síntesis de ARN y, al parecer se encuentra relacionada con la vía que regula la fosfodiesterasa antes mencionada (111). En lo

que respecta a la liberación de la HIM, estudios farmacológicos han apoyado la dependencia a 5-hidroxitriptamina (45), la que a su vez es posible que se encuentre como mediadora en la regulación de la liberación de la HIM por estrés (157). Otros factores ambientales que pueden influir sobre esta hormona son el fotoperíodo y la temperatura (106).

Basándose en resultados iniciales en los que se demostró inmunoreactividad a vasopresina en invertebrados (99), se valoró la actividad de vasopresina, vasotocina y ocitocina las cuales mimetizan el efecto de la HIM (106). lo que podría sugerir cierta similitud con esta familia. Sin embargo, recientemente se ha podido secuenciar un péptido con actividad inhibitoria sobre la muda en la langosta Homarus americanus (20), cuyo tamaño es de 71 aminoácidos el cual presenta, además, una actividad hiperglicémica, lo que se encuentra respaldado en la gran homología que presenta con la HHC de Carcinus Maenas (79). La secuencia de la HIM en Carcinus maenas también ha sido secuenciada (186), pero a diferencia de la anterior no presenta actividad hiperglicémica, y la homología con la anterior es escasa a nivel de secuencia primaria, sin embargo, la HHC de esta misma especie si presenta una actividad sobre la síntesis de ecdiesteroides *in vitro* a pesar de su baja homología (25%) con la HIM (20). Estos resultados dejan entrever una gran complejidad en el control de la muda en los crustáceos. Otros reportes proporcionan datos sobre péptidos que presenta esta actividad bivalente (21), lo que apoyaría la existencia de una gran familia a la que pertenecerían ambas hormonas (66).

Estudios inmunocitoquímicos para la HIM han demostrado la presencia de cuerpos neuronales en el órgano X, no encontrando inmunoreactividad en ninguna otra parte del Sistema Nervioso Central (37,187). Los cuerpos neuronales se encuentran colocados periféricamente en el órgano-X, encontrándose entremezclados con los de la HHC. Estos últimos en mayor número con una relación de 2:1. Los axones de dichas neuronas terminan en finas bifurcaciones a nivel de la glándula sinusal, lugar en

el cual es evidente la abundancia de las terminales de la H.C.

#### B) SISTEMA PIGMENTARIO DE CRUSTACEOS

Las hormonas efectoras pigmentarias presentan actividad sobre diferentes clases de células que contienen pigmentos (27,45,129). En los crustáceos se presentan dos tipos celulares que los contienen que involucran a los localizados en la hipodermis (cromatóforos), mientras que las otras células se encuentran localizadas en el ojo (59). Los cromatóforos propiamente dichos, presentan gránulos en los cuales se encuentran pigmentos de variada tonalidad, comúnmente se les asigna con el nombre del color presente en sus gránulos, existiendo así: eritróforos, melanóforos, leucóforos, xantóforos etc. El número y distribución de los diferentes cromatóforos varía en cada especie, pudiendo encontrarse desde dos hasta 4 o más arreglados en patrones complejos (59,74).

Los cromatóforos muestran rápidos cambios en la distribución de sus gránulos de pigmentos, con la consiguiente modificación de su intensidad aparente (129) (en la medida que los gránulos se concentran en el centro de la célula, los cromatóforos se hacen menos evidentes contribuyendo poco a la coloración del animal, situación contraria cuando se dispersan). Varios factores ambientales afectan el grado de dispersión de los pigmentos, entre ellos encontramos a los cambios de temperatura, luz y el estrés (59,129). Así mismo, es posible identificar ciclos circádicos de la dispersión en muchas especies (9,45). Los movimientos pigmentarios no se encuentran controlados sinápticamente, las modificaciones en el grado de dispersión de los gránulos se encuentran controlados por niveles hormonales y en parte por una respuesta directa de los cromatóforos a factores ambientales tales como la luz o la temperatura (137). La relativa contribución de los factores hormonales o ambientales al grado de dispersión encontrado en los animales es pobremente comprendido para los cromatóforos, sin embargo, se cuenta

con un mejor conocimiento de los factores fisiológicos que controlan los pigmentos del ojo (9,59).

En el ojo compuesto de los crustáceos se puede distinguir en forma simplificada 3 tipos de pigmentos (59). El pigmento proximal el cual es la primer pantalla de pigmento para contener el exceso de luz, se encuentra en las células retinianas; el control de su dispersión se encuentra casi exclusivamente bajo la respuesta a la iluminación del ojo, no dependiendo de niveles hormonales. El pigmento distal se encuentra localizado en células que rodean al cono cristalino y el grado de dispersión de sus granulos esta mediado exclusivamente por hormonas. El tercer pigmento es el pigmento reflejante, el cual responde tanto a iluminación y hormonas, localizandose este último en diferentes tipos celulares e inclusive coexistiendo con los anteriormente mencionados. Este último es de color blanco, similar al encontrado en los leucóforos, los cuales son relativamente insensibles a las hormonas efectoras pigmentarias y directamente sensibles a la luz. La organización de los pigmentos antes descritos puede variar en complejidad dependiendo de la especie de crustáceo estudiada. Así es posible encontrarlos ausentes en algunos organismos o bien identificar un mayor número de células pigmentadas (74). En cangrejos, dependiendo de la especie, es posible detectar hasta 6 diferentes tipos celulares (59). Los pigmentos antes descritos, pueden agruparse en forma general dependiendo de sus propiedades físicas, en dos clases (reflejantes y absorbentes). Esta clasificación involucra además una variedad de colores originada en su diferente composición química. Los pigmentos absorbentes se encuentran representados por omocromos y carotenoides; los primeros son derivados del aminoácido triptófano, el cual sufre transformaciones en los crustáceos para formar la omatina y omina; los carotenoides no pueden ser sintetizados por los animales, siendo obtenidos de las plantas a través de la cadena alimenticia. En los crustáceos la combinación con proteínas causa un cambio de su tonalidad que va

desde el negro hasta ser casi incoloro. Los pigmentos reflejantes de crustáceos consisten de una mezcla de diferentes pteridinas y de algunas purinas. Entre los últimos se ha descrito la presencia de pigmentos basados en guanina como uno de los mayores pigmentos reflejantes. La organización ultraestructural de los gránulos varía dependiendo del tipo de pigmento que contiene. Así los gránulos ommatocromos presentan membrana siendo electrodensos, mientras que los gránulos que contienen carotenoides se encuentran desprovistos de membrana variando en su densidad a los electrones, finalmente los pigmentos reflejantes pueden presentar membrana arreglándose en forma esférica o bien en forma cristalina. En las células pigmentadas es posible que coexistan tanto pigmentos reflejantes como de absorción, con lo cual se permite una mejor modulación de la sensibilidad a las diferentes condiciones de iluminación que presentan los crustáceos durante su ciclo de vida.

Los pigmentos muestran una movilidad que permite adaptarse a las condiciones de iluminación presentes en su medio, los movimientos que se realizan en el ojo bajo diferentes condiciones de adaptación a la luz se esquematizan en la Fig. 5. Esta adaptación a la luz muestra en *Procambarus* un control dependiente de algún reloj interno (9); que controla la liberación de los efectores peptídicos pigmentarios y, que a su vez, se le ha podido demostrar modulación al recibir estímulos luminosos (9).



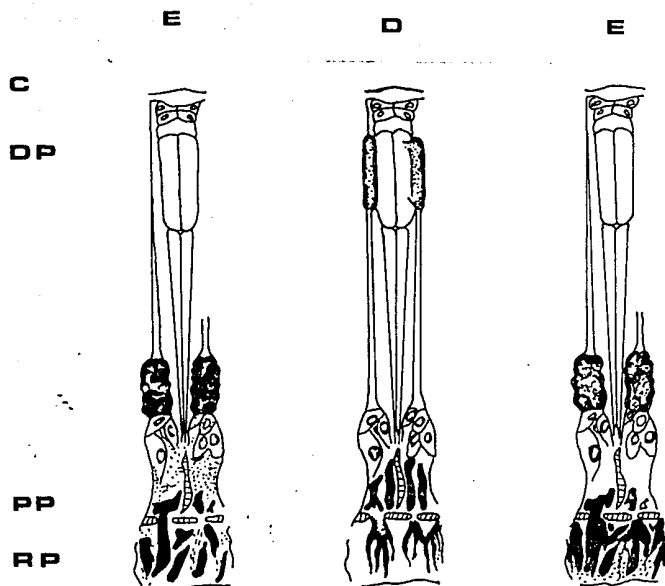


FIG. 5) Omatidia del ojo de crustáceo, mostrando su estructura general y la posición de los 3 mayores pigmentos bajo diferentes condiciones. L, ojo adaptado a la luz; D, ojo adaptado a la oscuridad; E, ojo de un animal adaptado a la oscuridad 45 minutos después de la inyección de extractos del tallo ocular. BM, membrana basal; C, córnea; DP, pigmento distal; PP, pigmento proximal; RH, rhabdom; RP, pigmento reflejante.

### C) HORMONAS EFECTORAS PIGMENTARIAS.

En el pasado se ha discutido mucho acerca del número de las distintas hormonas que afectan a las células pigmentarias (129). Confusión que fue creada por muchos factores (75,84,85,141), sin embargo actualmente, al menos en camarón y acocil, solo hay dos hormonas: una que causa la dispersión de los cromatóforos y la adaptación del ojo a la luz (144), y otra que produce la concentración de los cromatóforos y posiblemente la adaptación a la obscuridad en el ojo (45). Puede ser que existan variaciones de especie en lo que respecta a estas hormonas y su receptor, pero las evidencias aun no son claras (55).

#### HORMONA CONCENTRADORA DE PIGMENTO.

La primer neurohormona de crustáceo aislada y secuenciada fue la Hormona Concentradora de Pigmento (HCP) de *Pandalus borealis* (137). Es una hormona con un peso molecular de 1 000 Daltones, la cual muestra bloqueados ambos extremos (el amino por ácido piroglutámico y el carboxilo por amidación). La HCP presenta una gran homología a la Hormona Adipocinética (HAC) de langosta (Tabla 1). Se ha postulado que alguna mutación puntual en el codón de Thr (ACA) del gen de HCP haya originado uno de Arg (AGA), con el consiguiente procesamiento y producción de un octapéptido amidado en lugar de un decapeptido (137). Estudios fisiológicos con HCP y HAC sintéticas han mostrado que la primera presenta efectos adipocinéticos en insectos, mientras que HAC tiene actividad concentradora de pigmentos en camarón (120). Ambas hormonas también tienen actividad hiperglicémica, pero sus potencias varían con la especie estudiada: por ejemplo, en cangrejos la HAC tiene actividad hiperglicémica pero no la HCP (67), mientras en cucarachas ambos péptidos tiene actividad hiperglicémica (67), sin embargo, HCP es la más potente. En la actualidad se ha podido secuenciar un gran número de efectores peptídicos tanto en insectos como en crustáceos que presentan este tipo de actividades, lo que ha permitido

agruparlas en una gran familia, (Tabla 1), cuyas características se han descrito con anterioridad (Capítulo III), de ellas la más importante es la carencia de residuos ionizables lo cual dificultó la producción de anticuerpos (27,45). Sin embargo, es necesario comentar la existencia de 3 miembros de esta familia recientemente descritos que presentan aminoácidos cargados, uno de ellos con una tirosina en la posición (49), mientras que en los otros dos se encuentra ácido aspártico en la posición 7 (50,156). Estudios de bioactividad de estos péptidos demuestran la importancia de su estructura apolar en las actividades de desplazamiento de lípidos y de carbohidratos, quedando pendiente la descripción de alguna actividad propia a estas modificaciones (156).

En contraste con la gran similitud en estructura de esta familia, es posible encontrar una gran variedad de actividades. En insectos, estos péptidos producen movilización de lípidos, hiperglicemia, efectos metabólicos relacionados con otros carbohidratos y cardioexcitación (67). Mientras que en crustáceos, la HCP pertenece probablemente a un grupo de péptidos relacionados los cuales presentan una máxima efectividad sobre un juego de células pigmentarias (53). Estudios inmunocitoquímicos de la HCP han puesto en evidencia localizaciones externas al sistema órgano-X de la HCP, destacando su posible utilización como neurotransmisor (104). Un ejemplo de ello es la modulación que presenta sobre el ritmo de las "aletas" (swimmeret) (165), evento que se encuentra controlado por un circuito localizado a nivel del ganglio abdominal. Así mismo, se han descrito otras actividades en las cuales algunos miembros de la familia HAC-HCP podrían estar involucrados como neuromoduladores que involucran actividades sobre el corazón (49), intestino (35), músculo esquelético y otras neuronas (35).

Estudios farmacológicos han apoyado claramente la relevancia de la dopamina en la liberación de la hormona concentradora de pigmento (141), sin embargo, también es liberada por Met-enkefalina y FMRFamida (89), dato que ha sido relevante a:

demostrarse inmunorreactividad para estos mismos efectores en los tallos oculares de los crustáceos estudiados (45,116).

La HCP presenta actividad sobre sus células efectoras dentro del intervalo de picomolas, lo que refleja en parte el grado de afinidad por su receptor (45,137). La afinidad que presenta esta hormona para con su receptor está relacionada con la presencia del triptófano en la posición 8; la pérdida de este residuo o de las modificaciones en sus extremos tanto amino como carboxilo modifican grandemente su actividad hasta casi desaparecer (45). Poco se ha estudiado acerca del mecanismo de transducción de la señal, pero los datos que hay al respecto apoyan al AMPc y  $Ca^{++}$  como segundos mensajeros, y en este último caso al parecer calcio extracelular (92); el incremento intracelular de estos mensajeros a su vez puede realizar los cambios pertinentes para el desplazamiento de los gránulos, para lo cual podría utilizarse las interacciones que presentan los gránulos con el citoesqueleto (48). Sin embargo, es posible postular otros mecanismos para el desplazamiento de los gránulos en las células pigmentadas de ojo, los cuales involucrarían movimientos amiboides.

#### HORMONA DISPERSORA DE PIGMENTO.

La primer hormona de este tipo aislada en crustáceos, fue la HDP u Hormona Adaptadora a la Luz de Pandalus borealis, aislada por Ferlung (44). Este péptido es mas grande que la HCP además de encontrarse presente en una mayor cantidad (27,45,137); sin embargo, es muy inestable, debido a que contiene dos residuos de metionina, lo cual podría explicar los diferentes picos de actividad por posibles formas oxidadas (87), modificaciones que pueden ser toleradas sin pérdida completa de su actividad. Esta inestabilidad hace difícil determinar si hay distintas formas fisiológicas de este péptido, siendo esto improbable, al menos en Pandalus, debido a que todos los picos separados tienen el mismo espectro de actividades (44). Este

primer péptido aislado se le designa en la literatura actual como  $\alpha$ -HDP. Un octadecapéptido diferente al anterior en 6 posiciones y designado como  $\beta$ -HDP, ha sido identificado como la forma más abundante en los tallos oculares de los cangrejos Uca puqilator (145) y Cancer magister (86). Recientemente se han aislado otros péptidos con estructuras similares en el camarón Penaeus astecus (134) y en el acocil Procambarus clarkii (112) los cuales presentan mayor homología con la forma beta, cuyas secuencias se muestra en la tabla 2. A causa de la sustitución de ácido glutámico por la glicina, la HDP de Penaeus y Procambarus, así como la  $\beta$ -HDP son más ácidas y eluyen en menor volumen que la  $\alpha$ -HDP en cromatografía de intercambio catiónico (86,134). Cuando se comparan los perfiles de elución,  $\alpha$ -HDP no puede ser detectada en extractos de tallos oculares provenientes de Uca, Penaeus y Procambarus y aún en Pandalus, siendo identificada la  $\beta$ -HDP como la forma más abundante (144). En vista de que extractos de la cabeza de insectos presentan actividad sobre la dispersión de pigmentos de Uca, se aislaron y determinaron las secuencias primarias de dos péptidos activos de insectos (Factores Dispersores de Pigmento FDP), uno en el saltamontes Ranales microptera (142) y otro en el grillo Acheta domestica (143). La similitud entre las secuencias de los FDPs de insectos y de las HDPs de crustáceos permite agruparlos en una familia péptica, en la que se conserva la longitud (18 residuos), sus extremos (amino terminal Asn y carboxiterminal Ala-amida) y al menos un 50 % de homología en su secuencia (144). Los factores de insectos muestran en forma similar a la HDP de Penaeus y Procambarus una mayor homología con la forma  $\beta$ -HDP. La caracterización de estos péptidos se ha realizado en un bioensayo para la dispersión de pigmentos en Uca, inclusive para los FDPs de insectos (144), en donde se desconoce su función. Utilizando estos ensayos se ha caracterizado su potencia relativa, demostrando la mayor potencia en los péptidos de Pandalus y de Penaeus (144), el último de los cuales presenta sustituciones en las posiciones 8 y 11. Es importante destacar que

TABLA 2.

| ESPECIE                        | SECUENCIA                                 | P/R * |
|--------------------------------|---|-------|
| <i>Uca pugilator</i> (β-HDP)   | N-S-E-L-I-N-S-I-L-G-L-P-K-V-M-N-D-A amida | 1.0   |
| <i>Cancer magister</i> (β-HDP) | N-S-E-L-I-N-S-I-L-G-L-P-K-V-M-N-D-A amida | 1.0   |
| <i>Procambarus c.</i> HDP      | N-S-E-L-I-N-S-I-L-G-L-P-K-V-M-N-E-A amida | 0.14  |
| <i>Penaeus aztecus</i> HDP     | N-S-E-L-I-N-S-L-L-G-L-P-K-V-M-N-D-A amida | 1.0   |
| <i>Acheta domesticus</i> FDP   | N-S-E-I-I-N-S-L-L-G-L-P-K-V-L-N-D-A amida | 0.5   |
| <i>Romalea microptera</i> FDP  | N-S-E-I-I-N-S-L-L-G-L-P-K-L-L-N-D-A amida | 0.5   |
| <i>Pandalus borealis</i> αHDP  | N-S-G-M-I-N-S-I-L-G-I-P-R-V-M-T-E-A amida | 0.05  |

P/R = Potencia Relativa, basada en un bioensayo sobre la dispersión de gránulos en melanoforos de *Uca pugilator*.

en el caso de Procambarus un solo cambio en la posición 17 de ácido aspártico por ácido glutámico produce una importante disminución de su actividad (144).

Para estudiar de una mejor manera la relación estructura función entre las dos formas de HDP se han sintetizado péptidos con diferentes modificaciones (144,151,163). en estos estudios se ha identificado la zona del péptido que confiere la actividad, la cual se puede localizar entre la posición 5 a 10 (144). Los miembros de esta familia presentan conservados su extremos, los cuales bajo este tipo de experimentos se demostró su importancia para conferir la totalidad de la función. Trabajos recientes han mostrado que los péptidos 5-9-NH<sub>2</sub>, 5-10-NH<sub>2</sub>, 6-9-NH<sub>2</sub> y 6-10-NH<sub>2</sub> fueron capaces de causar dispersión de pigmentos en Uca, pero fueron inefectivos en leucóforos (144). Así, aunque los residuos 6-9 pueden constituir la secuencia mensaje requerida para la activación de los melanoforos, una o mas componentes del octadecapeptido pueden ser necesarios para las múltiples acciones de la HDP (144). Así mismo, se han podido sintetizar análogos con una mayor potencia, los cuales al parecer le confieren una mayor estabilidad al péptido (163).

Estudios inmunocitoquímicos para la HDP han identificado cuerpos neuronales en los ganglios del tallo ocular y en varios ganglios centrales del acocíl Orconectes immunis y en Carcinus maenas (103,105). Estos resultados indican que la HDP no solo está asociada con células neurosecretoras que proyectan hacia la glándula sinusal, sino que además, es posible localizarla en neuronas no secretoras y en fibras no asociadas con sitios de liberación neurohemal. Por lo que es posible postular su posible función como neuromodulador o neurotransmisor. No obstante, hasta el momento solo se ha descrito su influencia en la liberación de la Hormona Juvenil (94). En el tallo ocular de Orconectes limosus, Carcinus maenas y Penaeus aztecus. algunos de los cuerpos neuronales inmunorreactivos a HDP también lo son a FMRF-amida, sin embargo, los cuerpos que contienen HDP en los ganglios centrales, así

como los que proyectan a la glándula sinusal de *O. conactes* no la presentan (105). La relevancia funcional de esta colocalización requerira mayores estudios.

La principal actividad que presenta la HDP en *scocil* es el control del grado de dispersión de los gránulos de pigmentos (27,45), así como el fenómeno de adaptación a la luz, al regular el desplazamiento del pigmento distal (137). Para esta actividad se ha demostrado ritmicidad circádica en su concentración en el tallo ocular (9), así mismo, presenta variaciones en respuesta a estímulos luminosos (9,38). Esta hormona es liberada a partir de la glándula sinusal, sin embargo se postuló desde hace tiempo la posible liberación a partir de terminales libres de otras neuronas no relacionadas con el complejo órgano X-glándula sinusal (31), datos que se vuelven más relevantes al identificar inmunocitoquímicamente un mayor número de células en el tallo ocular que no guardan relación con dicho complejo (105). No obstante, la relevancia de los factores involucrados en la liberación de este efector a partir de la glándula sinusal se encuentran vigentes; encontrando una respuesta a 5-hidroxitriptamina (141), así como variaciones en la concentración de los gránulos de pigmentos a nivel de la glándula sinusal bajo condiciones de oscuridad continua (38).

#### D) INTEGRACION.

Con todo lo anterior es posible destacar las actividades antagónicas de la HCP y de la HDP sobre la regulación del grado de dispersión de los gránulos de pigmento (27,45), evento de gran relevancia en el control de la luz que debe de llegar a la retina en crustáceos (59). Es importante resaltar que es posible evaluar directamente las actividades de estas hormonas en el organismo vivo, ya que las modificaciones que presenta el Pigmento Distal son fácilmente apreciadas (45), así mismo, es de destacar que resultados recientes apoyan la posibilidad de un efecto de la HCP sobre el pigmento distal, sumándose al efecto ejercido sobre los cromatóforos.



Resultados preliminares han puesto en evidencia actividades circadianas inversas entre las dos hormonas, por lo que es posible que el mecanismo que coordina este evento deba presentar una integración de la respuesta a nivel del animal, que permita mantener las concentraciones adecuadas requeridas para la respuesta necesaria a nivel de las células blanco. Por supuesto se requiere la realización de una mayor cantidad de estudios para conocer cómo el organismo coordina hormonas con influencia antagónica, mecanismos que permitan conocer mejor la manera como una célula responde a múltiples estímulos.

#### V OBJETIVO Y ESTRATEGIA DEL PROYECTO.

El objetivo de este proyecto tiene como finalidad determinar la participación de la transmisión nerviosa en la expresión genica de dos hormonas antagónicas en crustáceos (HDP+HCP), en las cuales se ha documentado la influencia de estímulos externos (e.g. ciclo luz-oscuridad), además de conocerse algunos de los neurotransmisores involucrados en su liberación. Como primera etapa del trabajo se contempla la clonación y caracterización del gen o ADNc de la Hormona Dispersora de Pigmento y de la Hormona Concentradora de Pigmento (HCP), para posteriormente ser utilizados como sondas, lo que permitirá cuantificar el ARNm específico bajo diferentes condiciones fisiológicas o bajo el efecto de fármacos con la finalidad de valorar el impacto de la neurotransmisión en su biosíntesis, así mismo conocer las estructuras de sus precursores. El presente trabajo incluye la estrategia empleada en la clonación y caracterización del gen de la HDP.

El Acócil, *Procambarus clarkii*, se eligió como especie a analizar debido a que el grupo con el que colaboramos (Dr. Arechiga Depto. Fisiología en CINVESTAV) lo ha utilizado como especie de estudio y, en el cual se ha caracterizado fisiológicamente el papel de la HDP y de la HCP en diferentes condiciones. Desafortunadamente, al inicio de este trabajo, la HDP no había sido purificada y

por lo tanto su secuencia era desconocida; cabe notar que la Metionina necesaria para su actividad no hace trivial su purificación.

Así entonces, se decidió clonar en forma inicial el gen o ADNc de Uca puillator puesto que la secuencia aminoacídica en este crustáceo se conoce y podrían diseñarse oligonucleótidos sintéticos basados en ella. Posteriormente al contar ya con ésta clona, se utilizaría para obtener el gen de Acocil. Esta alternativa se fundamentó principalmente en la gran similitud entre las diferentes hormonas secuenciadas al momento de iniciar el proyecto, lo que hacía pensar en su conservación estructural. Además, utilizando hibridaciones bajo condiciones de baja estringencia se ha podido clonar una gran diversidad de proteínas con diferentes grados de homología. (148) La perspectiva actual parece ser distinta en lo que respecta a precursores peptídicos (ver discusión).

La estrategia preveía construir en forma simultánea un banco genómico y uno de ADNc. Sin embargo, los problemas relacionados a la extracción de ARNm del tallo ocular, así como la representatividad de las neuronas productoras de HDP (el número total de neuronas en el órgano X es de 120, de las cuales sólo unas cuantas sintetizan el péptido en estudio), hacían figurar al banco genómico como más prometedor.

## VI RESULTADOS.

## SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS.

De acuerdo a la estrategia planteada previamente, se diseñaron oligonucleotidos basados en la secuencia aminoacídica de la HDP de *Uca pugilator*. Para ello se buscaron las regiones de mayor longitud que presentarían el menor número de aminoácidos degenerados en su código genético, de tal forma que permitieran por lo menos sintetizar un oligonucleótido con la longitud requerida para detectar una señal única a partir de un rastreo en un banco genómico (60,163). En vista del tamaño del péptido (18 aminoácidos) y el elevado número de aminoácidos con 4 codones degenerados, las opciones fueron limitadas. Se sintetizaron las mezclas de oligonucleotidos HDP-1 y HDP-2 (Fig. 6), las cuales son las más largas y con el menor número de constituyentes. La primera mezcla cuenta con un total de 40 14meros, mientras que la segunda cuenta con un total de 32 17meros. Estas mezclas se sintetizaron en dos grupos por separado cada una con la mitad de sus elementos, lo que debería permitir contar con una mayor actividad específica al poder realizar la hibridación con cada uno de los subgrupos por separado. La secuencia utilizada en la síntesis fue la complementaria al código genético, lo que podría ser útil para detectar el ARNm en caso de ser abundante.

Los oligonucleótidos se marcaron con P<sup>32</sup>-ATP con el procedimiento descrito en materiales y métodos. La eficiencia de incorporación alcanzada fue del 80 % para la mezcla HDP-2, mientras que para la mezcla HDP-1 solo se alcanzó el 35 % (Fig. 7)

## DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE HIBRIDACION.

Para determinar las mejores condiciones de hibridación a utilizarse en el rastreo del banco genómico (o de ADNc), se realizó un experimento tipo Southern. El ADN de *Uca pugilator* y *Procambarus clarkii* fue digerido con 2 enzimas de restricción, separados los fragmentos por electroforesis en gel y transferidos a

HDP-1

|    |  |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|    | H <sub>2</sub> N-Asn - Ser - Glu - Leu - Ile - Asn - Ser - Ile - Leu - |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| 5' | AAU  | UCU | GAA | UUA | AUU | AAU | UCU | AUU | UUA | 3' |
|    | AAC  | UCC | GAG | UUG | AUC | AAC | UCC | AUC | UUG |    |
|    |  | UCA |     | CUU | AUA |     | UCA | AUA | CUU |    |
|    |  | UCG |     | CUC |     |     | UCG |     | CUC |    |
|    |  | AGU |     | CUA |     |     | AGU |     | CUA |    |
|    |  | AGC |     | CUG |     |     | AGC |     | CUG |    |
| 3' |  |     | CTT | AAC | TAA | TTA | AG  |     |     | 5' |
|    |  |     | C   | G   | G   | G   | TC  |     |     |    |
|    |  |     |     |     | T   |     |     |     |     |    |

HDP-2

|    |   |     |     |     |     |     |     |     |     |       |    |
|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|----|
|    | Gly - Leu - Pro - Lys - Val - Met - Asn - Asp - Ala - NH <sub>2</sub> |     |     |     |     |     |     |     |     | (Gly) |    |
| 5' | GGU   | UUA | CCU | AAA | GUU | AUG | AAU | GAU | GCU | GGU   | 3' |
|    | GGC   | UUG | CCC | AAG | GUC |     | AAC | GAC | GCC | GGC   |    |
|    | GGA   | CUU | CCA |     | GUA |     |     |     | GCA | GGA   |    |
|    | GGG   | CUC | CCG |     | GUG |     |     |     | GCG | GGG   |    |
|    |   | CUA |     |     |     |     |     |     |     |       |    |
|    |   | CUG |     |     |     |     |     |     |     |       |    |
| 3' |   |     | TTT | CAA | TAC | TTA | CTA | CG  |     |       | 5' |
|    |   |     | C   | G   |     | G   | G   |     |     |       |    |
|    |   |     |     | T   |     | T   |     |     |     |       |    |
|    |   |     |     | C   |     |     |     |     |     |       |    |

FIG. 6) OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS PARA LA HORMONA DISPERSORA DE PIGMENTO (HDP). A partir de la secuencia de la HDP de *Uca puqillator* se seleccionaron 2 regiones de la hormona estas fueron; del aminoácido 3 al 7 para la mezcla HDP-1 y del aminoácido 13 al 18 mezcla HDP-2. En ambas regiones el aminoácido mas degenerado se localizó en uno de sus extremos, por lo que la última base de dicho triplete no se incluyó en la síntesis disminuyendo así el número de elementos en las mezclas. Para la mezcla HDP-1 se seleccionó solo una base en la tercera posición del triplete que codifica para la Leucina, ya que considerar todas las posibilidades incrementaría demasiado la mezcla (hasta 288). La síntesis y purificación de la mezcla HDP-2, fue realizada por una casa comercial, la síntesis de la mezcla HDP-1 fue realizada en la unidad de síntesis del CIIGyB y purificada por el método descrito en materiales y métodos.



FIG. 7) INCORPORACION DE ( $P^{32}$ ) ATP A LA MEZCLA DE OLIGONUCLEOTIDOS HDP 2. Los oligonucleótidos fueron marcados con T4 polinucleótido cinasa, y posteriormente corridos en un gel desnaturalizante (8 M urea, 20 % acrilamida). La autoradiografía muestra una alta incorporación (80 %) determinada por la ausencia de ATP libre (ATP no incorporado), y por cuantificación de la marca incorporada en ADN precipitado en TCA 10%. Las bandas en la parte superior son impurezas.

papel de nitrocelulosa. La mezcla HDP-2 fue seleccionada para este experimento ya que presenta mayores ventajas que la HDP-1: Una mayor longitud (17 contra 14), representa todas las posibilidades de codificación y en reacciones de marcaje su porcentaje de incorporación siempre fue mayor.

Este experimento utilizó como variable la temperatura. Las diferentes condiciones se determinaron tomando en consideración una Temperatura Media (TM) promedio obtenida por la fórmula  $Td = [2 \text{ } ^\circ\text{C} \times \text{el número de A+T}] + [4 \text{ } ^\circ\text{C} \times \text{el número de G+C}]$  (184). Utilizando la mezcla completa (no hay que olvidar que la mezcla HDP-2 presenta un total de 32 secuencias distintas agrupadas en dos conjuntos de 16), cuya TM fluctúa desde 42 a 52  $^\circ\text{C}$ , se escogió un intervalo de temperatura de hibridación y lavado que comprendía desde 35 a 50  $^\circ\text{C}$  (115,175) (Fig. 8); este intervalo de temperaturas permitiría valorar de una mejor manera el pegado inespecífico del oligonucleótido. La concentración de sales fue constante en la prehibridación e hibridación (115).

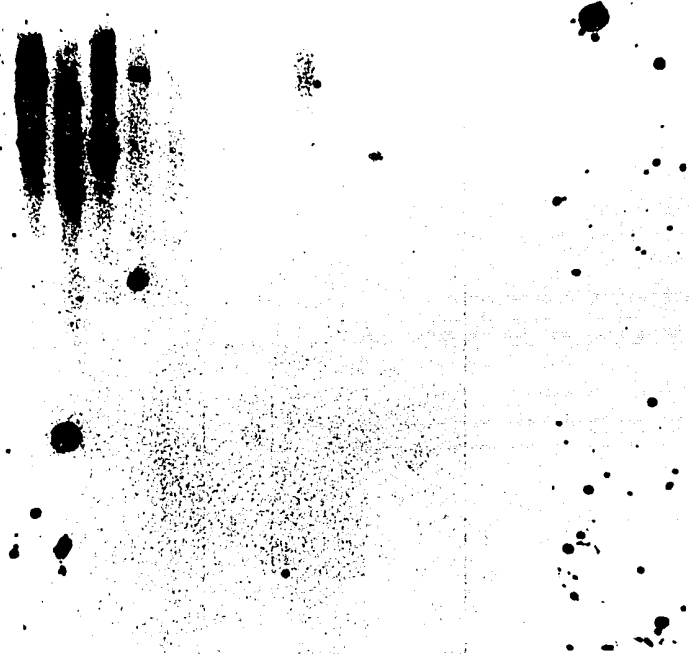
Como puede apreciarse en la figura 8 B a la temperatura de hibridación de 35  $^\circ\text{C}$  se encuentra el mayor ruido de fondo, y a la de 45  $^\circ\text{C}$  no hay señal distinguible en el ADN de ninguna de las especies. Además se observa una banda de hibridación en las dos digestiones del ADN de *Acocil*; esta señal es de un tamaño aproximado de 5 Kb (fragmento Eco-5 Kb) en la digestión con Eco RI y mayor de 10 Kb en la digestión con Hind III, presentándose tanto a 35 como 40  $^\circ\text{C}$ , y en esta última con muy poco ruido de fondo. En el ADN de *Procambarus* hay abundantes secuencias repetidas (Fig. 8 A) lo que podría ocasionar la señal detectada, sin embargo, la banda de hibridación no corresponde a ninguna de las secuencias más repetidas en el *Procambarus*, representadas por las bandas distinguibles por tinción con bromuro de etidio. Así mismo tampoco lo apoyaba el dato de encontrar fragmentos únicos bajo la digestión de tres enzimas de restricción (Pal 1 proporciona un fragmento de 600 pares de bases ver más adelante). Llama la atención la carencia de señal en el ADN

**PREHIBRIDACION 65 °C**

**UP PC M**  
**E H E E**

**UP PC M**  
**E H E E**

**UP PC M**  
**E H E**



8B

**HIBRIDACION 35 °C**

**40 °C**

**45 °C**

**LAVADO 42 °C**

**42 °C**

**50 °C**

UP PCM UP PCM UPPCM

E H E H E E H E H E E H E



SA

FIG. 8) HIBRIDACION DE LA MEZCLA DE OLIGONUCLEOTIDOS HDP-2 SOBRE A ADN DE CRUSTACEO. A) ADN teñido con bromuro de etidio previo a su transferencia a la membrana de nitrocelulosa. B) La mezcla de oligonucleótidos fue marcada por cinación a una actividad específica de  $3 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g e hibridada sobre los filtros obtenidos en A; lo que se realizó en 3 diferentes condiciones (indicadas en la figura), las cuales fueron seleccionadas considerando la temperatura media de desnaturalización (TM) para la mezcla de oligonucleótidos. Observese la banda de hibridación en las digestiones de *Procambarus* (Eco R1 - Hind III) a una temperatura óptima de 40 °C. Comparando (A) y (B) se determinó el peso molecular aproximado en 5 Kb del fragmento específico de hibridación en la digestión de Eco R1, además de no presentar empalme en bandas repetidas.



de Uca pugilator, lo que puede deberse a una posible variación de especies. La especie a partir de la que se purificó y secuenció proviene de Florida, mientras que la utilizada para obtener el ADN para el experimento fue de Yucatan, en donde además, se conoce que vive en asociación con otras subespecies (si bien estas no fueron utilizadas). Otra posibilidad puede deberse a que las condiciones no fueron lo suficientemente sensibles para detectar el gen. Sin embargo, datos reportados sugerían que este no era el caso ya que es posible detectar genes únicos con mezclas de oligonucleótidos con una actividad específica comparable, sobre ADN tan complejo como el humano (34).

Para valorar de una mejor manera la señal detectada, se realizó un experimento adicional en donde se hibridó por separado los dos grupos de la mezcla HDP-2 con el ADN de acocil. La Fig. 9 muestra la selectividad de la señal a uno de los grupos (46S). Este resultado habla de la especificidad en la hibridación puesto que la única diferencia entre las dos mezclas se encuentra en un nucleótido.

Durante el curso de este experimento, a través de una comunicación personal, se obtuvo información sobre la secuencia de la HDP de Procambarus siendo esta idéntica a la de Uca. Este dato y el resultado encontrado en los experimentos previos, abría una mejor alternativa para clonar en forma directa el gen de la HDP de Procambarus que involucraría rastrear un banco subgenómico en el cual estaría representado el fragmento EcoRI-5 Kb que supuestamente contendría el gen de la HDP o parte de él.

#### CONSTRUCCION Y RASTREO DEL BANCO SUBGENOMICO.

El ADN de Procambarus fue digerido con la enzima EcoRI y separado por electroforesis en gel de agarosa. Cinco fracciones fueron seleccionadas y purificadas como se describe en materiales y métodos (Fig. 10). Lambda-gtWest fue utilizado como vector puesto que el tamaño de insertos que permite integrar (2 a 15

4 6 7

4 6 8

E H

E H

FIG. 9) ESPECIFICIDAD DEL GRUPO 468. El ADN de *Procambarus* fue digerido con dos enzimas de restricción e hibridado por separado con los grupos 467 y 468. La señal esperada es obtenida selectivamente a partir del grupo 468.

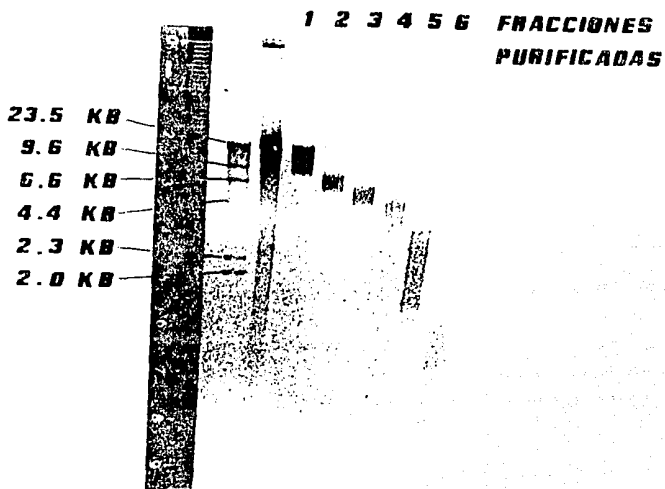


FIG. 10) PURIFICACION DE FRACCIONES DE ADN DE *PROCAMBARUS* PARA EL BANCO SURGENONICO. Teniendo presente la posicion en donde hibridó la mezcla de oligonucleoticos para la HDP, se purificaron fracciones de una digestion total de Eco RI de ADN de *Procambarus*. De acuerdo al marcador (Hind III) la tercera fraccion contiene fragmentos de alrededor de 5 Kb y por lo tanto el fragmento que hibrida al grupo HDP-2.

(b), es adecuado para poder construir moléculas recombinantes con fragmentos del tamaño requerido; así mismo, su eficiencia de infección es alta.

El ADN de la tercera fracción de *Procambarus* fue ligado con T4 ligasa en una proporción 3:1 con respecto al vector (Fig. 11), la cual se determinó que es la más eficiente para la producción de fagos recombinantes (tabla 3). El producto de ligación fue empaquetado utilizando extractos preparados y optimizados en el laboratorio hasta una eficiencia de  $1 \times 10^7$  utilizando fago silvestre (ver materiales y métodos). Bajo este procedimiento se obtuvo un banco con un total de 250 000 fagos recombinantes.

El rastreo de estos fagos se realizó con la mezcla del oligonucleótido HDP-2, bajo las condiciones determinadas previamente (Fig. 8). De este rastreo se aislaron 7 clonas que mostraban hibridación positiva al oligonucleótido. Cada una de ellas se aisló de la caja original y, en vista de la gran densidad de placas, se efectuaron plaqueras e hibridaciones subsiguientes hasta contar en el último rastreo con un 100 % de placas positivas. Bajo esta estrategia finalmente se clonaron 4 fagos que muestran una señal fuerte de hibridación en placa (se distinguen en una autoradiografía a las 6 h. de exposición con doble pantalla) (Fig. 12).

Para un mejor análisis y garantizar la homogeneidad de la clona se purificó el ADN de cada una de ellas a gran escala a partir de una placa de este último rastreo.

El ADN de cada una de las clonas y de *Procambarus* fue digerido con la enzima Eco RI y Pal I e hibridado con la mezcla de oligonucleótidos HDP-2. Los patrones de digestión en el ADN de *Procambarus*, ver Fig. 8, debían mostrar el mismo patrón en las clonas aisladas lo que verificaría la positividad de alguna de ellas para el fragmento EcoRI-5 Kb). Como puede apreciarse en la figura 13, el ADN de *Procambarus* muestra la banda de hibridación esperada en la digestión con Eco RI no encontrando correlación con alguno de los insertos de las clonas; de acuerdo con este dato son los resultados obtenidos en la digestión con Pal I cuyo fragmento el cual debería

**1 2 3 4 5 6 7 8 9 10**

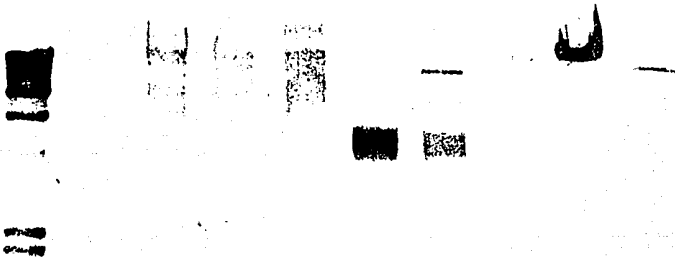


FIG. 11) LIGACION DEL ADN DE PROCAMBARUS CON BRAZOS DEL VECTOR gtWEST. Para conocer la cantidad necesaria de inserto y de brazos de vector que proporcionen el mayor número de moléculas recombinantes, se efectuó un ensayo preliminar en el que se demostró una adecuada ligación de los brazos del vector con el inserto. En este experimento se fijó la cantidad de ADN del vector en .15 ug y se ligó con diferentes cantidades de ADN de *Procambarus* de la tercera fracción .05, .1 y .150 (carriles 2-3-4 respectivamente); carril 5 ADN *Procambarus* ligado; carril 6 ADN de *Procambarus* sin ligar; carril 7 ADN del vector y ADN de *Procambarus* sin ligar; carril 8 brazos del vector ligados; carril 9 ADN del vector íntegro; carril 10 brazos del vector sin ligar. Las moléculas híbridas se empaquetaron y se cuantificó los fagos recombinantes.

TABLA 3.  
PORCENTAJE DE RECOMBINANTES CON INSERTO UNICO

| MICROGRAMOS DE ADN DE INSERTO | NUMERO DE RECOMBINANTES | %  |
|-------------------------------|-------------------------|----|
| .05                           | 10,000                  | 90 |
| .10                           | 17,000                  | 50 |
| .15                           | 15,000                  | 40 |

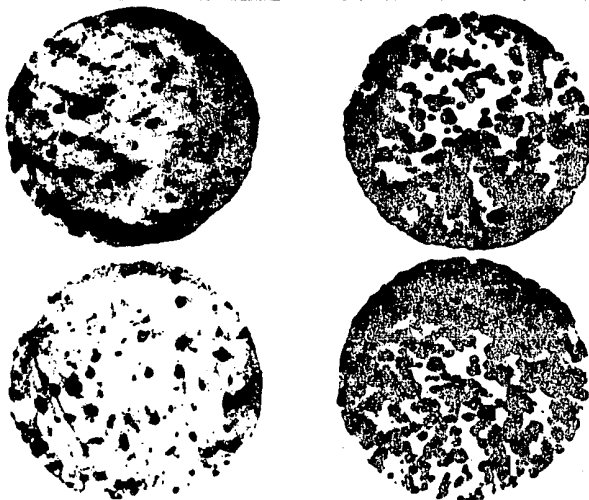


FIG. 12) SEÑAL AUTORADIOGRAFICA ORIGINADA POR LAS CLONAS A11 Y B-41. Exposición con doble pantalla a  $-70^{\circ}\text{C}$ , tiempo de exposición 6 Hrs.



FIG. 13) CLONAS AISLADAS EN EL PRIMER RASTREO CON EL OLIGONUCLEOTIDO HDP-2. A) El ADN de *Procambarus* y el de diferentes clonas se digirió con 2 enzimas de restricción Eco RI (carriles 2 a 7) y Pal I (carriles 8 - 13), se corrieron en un gel de agarosa, en el siguiente orden: *Procambarus*, A-11, A-21, B-3, B-41 y B-42 para ambas enzimas, transferido a una membrana de nitrocelulosa e hibridado con el oligonucleótido HDP-2. Como puede apreciarse las bandas de hibridación de las clonas no corresponden al tamaño esperado en el ADN de *Procambarus*. B) Para el caso de la clona A11, se había realizado con anterioridad el mismo tipo de experimento, no encontrando señal que comigrara con Pal I, (en el gel de la figura A por error se omitió la muestra).



ser de 600 pb tampoco muestra correlación. Con este experimento se descartaron como posibles portadoras de la secuencia buscada.

Las causas que pudieron condicionar el resultado anterior podían ser: A) La región seleccionada para la clonación pudiera no incluir el fragmento que hibrida. B) La cantidad de clonas rastreadas, subrepresenta la cantidad requerida para contener la totalidad de los fragmentos del tamaño seleccionado.

Teniendo en consideración los aspectos anteriormente mencionados, se construyó un nuevo banco en el cual se purificó una fracción de ADN de *Procambarus* con un mayor rango tratando de tener la seguridad de contar con el fragmento buscado, el total de clonas en este segundo banco fue de 500 000; la mitad del cual se utilizó en un segundo rastreo, mientras que las demás se utilizaron para amplificar el banco.

#### CLONACION DEL FRAGMENTO DE 5 KB POSITIVO A LA MEZCLA HDP-2.

Como una manera de evitar aislar nuevamente las clonas "falsas positivas" anteriores, se realizó el rastreo del segundo banco con el grupo 428, el cual muestra una selectividad por el fragmento buscado (Fig. 9). En esta ocasión se aisló un total de 60 clonas. Para facilitar el aislamiento e identificación del fragmento EcoRI-S<sub>1</sub>b se hicieron grupos de 5 clonas, estos se amplificaron creciendo los fagos a pequeña escala, se purificó el ADN de cada uno de ellos y se realizó un experimento tipo Southern en donde el filtro contaba con el ADN de *Procambarus* y el de cada uno de los grupos digerido con Pst I y Eco RI; después de identificar en que grupo se encontraba la clona con el fragmento deseado se realizó el mismo procedimiento con las clonas en forma individual. La Fig. 14 muestra la positividad de la clona C-58 para el oligonucleótido y su correlación con los fragmentos esperados en el ADN de *Procambarus*. Considerando el tiempo empleado para obtener la señal en esta autoradiografía (48 Hrs), la clona C-58 presenta una señal muy debili

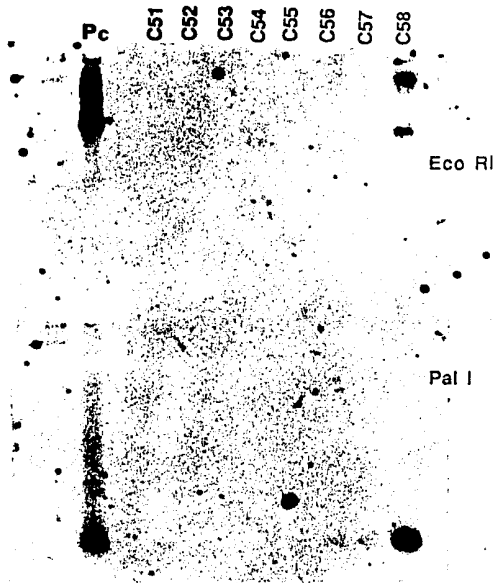


FIG. 14) CLONACION DEL FRAGMENTO DE 5 KB POSITIVO A LA MEZCLA HDP-2 EN ADN DE PROCAMBARUS. En un experimento tipo Southern se valoraron diferentes clonas aisladas de un segundo rastreo. La autoradiografía muestra que la clona C-58 presenta el mismo patron de restricción que en ADN de Procambarus para la señal específica detectada con la mezcla de oligonucleótidos HDP-2 (se aprecia una banda de hibridación del mismo tamaño tanto en acocil como en la clona C-58). E = Eco RI, P = Pal I, Pk= Procambarus kjarckii.

en relación a las aisladas en el primer rastreo, esta comparación sugiere una discrepancia importante entre el oligonucleotido y la secuencia blanco donde híbrido, por lo que analizar el grado de apareamiento que guardan todas ellas con el oligonucleotido fue imprescindible.

#### ESTABILIDAD DEL APAREAMIENTO ENTRE LA MEZCLA HDP-2 Y LAS CLONAS.

En vista de que la intensidad de la señal que se origina en un experimento de hibridación está relacionada con el grado de apareamiento que guarda con la sonda (11) o con el número de secuencias blanco, se decidió realizar una hibridación tipo Southern para valorar el grado de homología que presenta la mezcla de oligonucleótidos HDP-2 con las diferentes clonas. En este experimento se colocó ADN de *Procambarus* digerido con varias enzimas de restricción así como también el ADN de las 5 clonas aisladas digerido con Eco RI. La variable utilizada fue la temperatura, modificando las condiciones de hibridación y lavado de los filtros (Fig. 15). Claramente puede apreciarse que hay una señal más intensa en las clonas A-11, A-21, B-41 y B-42 en relación con la clona C-58 a 42 °C. Además estas clonas persisten a la temperatura de 45 °C mientras que C-58 desaparece. Estos datos sugieren que las clonas A-11, A-21, B-41 y B-42 son las que presentan la mayor homología a la mezcla HDP-2. Sin embargo, la posibilidad de que la secuencia blanco se encuentre repetida dentro de alguno de los insertos no se puede descartar. También es de notar que la señal detectada en *Procambarus* desaparece bajo las condiciones en las que es posible aún detectar señal en las clonas más homólogas, lo que sugiere fuertemente que la señal detectada en ADN de *Procambarus* muestra una menor homología a las clonas y haberla detectado implica que muy probablemente es una secuencia repetida. En vista de este resultado se decidió valorar la presencia de secuencias repetidas de *Procambarus* en las clonas, como una manera de caracterizarlas.

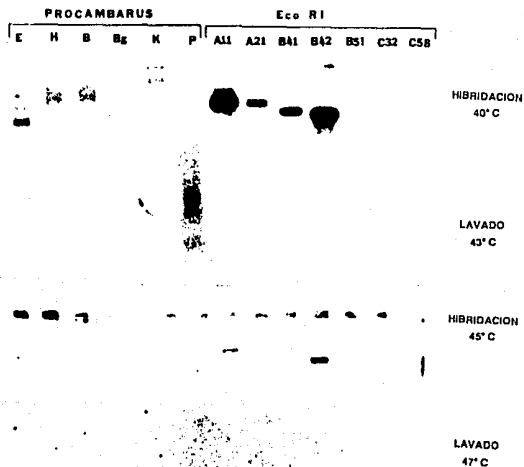


FIG. 15) VALORACION DEL APAREAMIENTO ENTRE LAS DIFERENTES CLONAS AISLADAS CON HDP-2. El ADN de varias clonas fue digerido con la enzima de restriccion Eco RI (nombre de las clonas en la parte superior de la figura), así como ADN de *Procambarus* con varias enzimas de restriccion. Se prepararon 2 membranas de nitrocelulosa con las mismas muestras, cada membrana se hibridó y lavó a la temperatura indicada en la figura. Se aprecia como desaparece la señal detectada en ADN de *Procambarus* al elevar la temperatura de hibridacion 5 °C así como la señal de la clona C-58, persistiendo de mayor a menor intensidad las clonas B42, A11, B41 y A21. Así mismo se destaca en forma importante la escasa señal proporcionada por C-58 en las condiciones de baja estringencia. E= Eco RI; H= Hind III; B= Bam HI; Bg= Bgl I; K= Kpn I; P= Pal I.

#### DETECCION DE SECUENCIAS REPETIDAS DE PROCAMBARBUS EN LAS CLONAS.

Uno de los procedimientos para valorar la presencia de secuencias repetidas en el ADN de una especie determinada, es hibridar las clonas con exceso de ADN marcado de la especie en estudio (Fig. 16). Con este experimento se demostró claramente la presencia de secuencias repetidas en las clonas A-11, A-21 y C-58, mientras que B-41 y B-42 no presentan secuencias altamente repetidas. Este resultado y el de haber presentado una mayor homología con la mezcla de oligonucleótidos las hacía figurar como probables para contener secuencias que codificaran a la HDP, por lo que se decidió secuenciarlas para caracterizar la región donde hibridó el oligonucleótido. En vista del tamaño de los insertos (en promedio 4.3 kb) la secuencia directa sobre ellos era difícil. Así entonces, para valorar y analizar en menor tiempo la región adyacente a la secuencia blanco del oligonucleótido, se intentó secuenciar en forma directa sobre doble cadena utilizando como iniciador el mismo oligonucleótido empleado en la hibridación. Los resultados obtenidos bajo esta estrategia no fueron concluyentes por alta inespecificidad de la reacción, razón por la cual se optó por realizar la subclonación y secuenciación directa sobre cadena sencilla.

#### SUBCLONACION DE LOS FRAGMENTOS QUE CONTIENEN LA SECUENCIA BLANCO A LA MEZCLA HDP-2.

Con la finalidad de detectar fragmentos de un tamaño fácilmente secuenciable, se digirió el ADN de las clonas con varias enzimas y se hibridó con la mezcla de oligonucleótidos HDP-2 en un experimento tipo Southern (Fig. 17). Con este procedimiento se detectaron fragmentos en cada una de las clonas con un tamaño adecuado para poder secuenciarlas en una sola reacción. Así mismo es de notar la presencia de un patrón similar en las clonas A-11 y A-21 lo que estaba de acuerdo con que la secuencia blanco es una secuencia repetida; sin embargo, no se pudo

A11 A21 B41 B42 C58

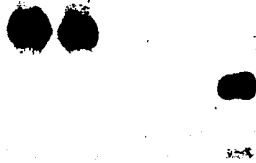


FIG. 16) HIBRIDACION DE ADN DE PROCAMBARUS SOBRE LAS DIFERENTES CLONAS. El ADN de *Procambarus* se marcó radioactivamente bajo el procedimiento de Nick translation con una actividad específica de  $1.5 \times 10^8$  cpm/ug, e hibridado con el ADN de las diferentes clonas digeridas con Eco R1, bajo un protocolo de alta estringencia, se aprecia que las clonas A-11, A-21 y C-58 presentan en su inserto secuencias muy repetidas, (tiempo de exposición 2 Hrs.).

descartar la posibilidad de que el gen del péptido se encuentre repetido. Teniendo en consideración estos resultados, cada uno de los insertos fue purificado y digerido completamente con la enzima que proporciona el fragmento más pequeño que contiene la secuencia de reconocimiento al oligonucleótido. En vista de la dificultad para purificarlos se optó por subclonarlos a partir de la digestión total del inserto: el vector empleado en el procedimiento de subclonación fue el M13 mp19. El aislamiento de la subclona fue realizado por rastreo en 200 fagos recombinantes para cada una de las clonas, utilizando como sonda la mezcla de oligonucleótidos HDP-2. Los fagos recombinantes fueron aislados por sucesivos rastreos hasta obtener un 100% de clonas positivas, la clona así aislada fue analizada por doble digestión (Eco RI y Hind III) la cual libera el inserto, corroborando así la presencia de un solo inserto por fago y ser del tamaño esperado para cada una de las clonas. Una vez verificado su patrón se procedió a la secuencia.

#### ANÁLISIS Y SECUENCIA DE LAS CLONAS A-11, B-41 Y B-42.

Con la finalidad de poder leer desde el inicio del inserto la secuencia se realizó con el iniciador de la posición -40 del Kit de secuenciación (United States Biochemical Corporation). La secuencia fue completa en los insertos de la subclona B-41 y B-42 (Fig. 18A). La subclona A-11 se secuenció parcialmente en dos subclonas distintas, sin embargo la secuencia en ambas y los resultados que apoyaban una secuencia repetida en parte del inserto (Fig. 17), se vieron comprobados al encontrar una secuencia que se repetía cada 27 nucleótidos con una homología de 14 nucleótidos para la mezcla HDP-2, por lo que se consideró innecesario concluirlo. En B-41 se encuentra una homología con la mezcla HDP-2 de 16 nucleótidos, mientras que en B-42 la zona donde presenta más homología se ve interrumpida por un nucleótido (Fig. 18B); para verificar la secuencia de B-42 se secuenció en las dos

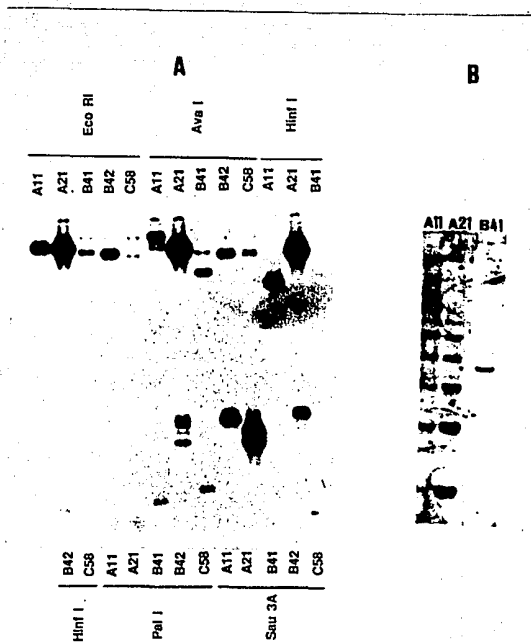


FIG. 17) IDENTIFICACION DE FRAGMENTOS QUE CONTIENEN LA SECUENCIA BLANCO DE LA MEZCLA HDP-2. El ADN de las diferentes clonas se digirió con varias enzimas de restricción y en una hibridación tipo Southern se detectaron los fragmentos que presentan hibridación con el oligonucleótido. A) Transferencia de gel de agarosa, B) en gel de acrilamida, A11 y A21 digestión con Pst I, para B41 Sau 3A, para el resto de las clonas no se apreció alguna señal.



## SECUENCIA NUCLEOTIDICA CLONA B41

```

10      20      30      40      50      60
GATCTGGGGG TCGATATCAC ACCGAACTG TCCDCAGAGG CCCADATCGA AAGGATATTA
CTAGACCCDC AGCTATAGTG TGGCTTGGAC AGGGGTCTCC GGSTGTAGCT TTCTATAAT

70      80      90      100     110     120
TCAGCGSCAA TTATAAAAC TGCCTTTAGA ATCTTGTGTA AGGAATCGTT CATGACCTTG
AGTGCDCSTT AATATTTTTG ACGGAAATCT TAGAACACAT TCCTTAGCAA GTACTGGAA

130     140     150     160     170     180
TATATATDCT GGAATCTGCA GCTTCAGCCT GGAGTCCATA CCTAGTTAAC ATAATTTAAA
ATATATAGSA CCTTAGACGT CGAAGTCGGA CCTCAGGTAI EGATCAATG TATTAATTT

189
ATTTGAGAA
TAAACTCTT

```

## SECUENCIA NUCLEOTIDICA CLONA B42

```

10      20      30      40      50      60
AATCGAACC GGGCATTAG GACTADGACC CCGGAGCACT ATCDACTCAG CCGCATTGCC
TTAGCTTGGG CCGCGTAATC CTGATGCTGG GGGCTCGTGA TAGGTGAGTC GGGTAACGG

70      80      90      100     110     120
CCTAACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACGACAGC ATCGTTACAT
GGATTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGCTGTGG TAGCAATGTA

130     140     150     160     170     180
GACDATTACT CCTTTTTTAT GTTTGGTTTC TTCAAAATCT TCCTCGGACG TCAGAGGACA
CTGSTAATGA GGA AAAAATA CAAACCAAAG AAGTTTTAGA AGGAGCCTGC AGTCTCCTGT

190     200     210     220     230     240
CATAAATTAC TTATGTGTCC TCTAACTTAT GTGTACGTGC ACTCAAACTT AATGCAAGAA
GTATTTAATG AATACACAGG AGATTGAATA CACATGCADG TGAGTTTGAA TTACGTTCTT

250     260     270     280     290     300
CGTTCTTGTA ATCTTTTTTC TAATAAACTT CGTATGAACC AGAATCCTGC AGGCATGCAA
GCAAGAACAT TAGAAAAAGG ATTATTTGAA GCATACTTGG TCTTAGSAGG TCGTACGTT

```

GC  
CG

FIG. 18) A) SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS DEL FRAGMENTO DE LAS CLONAS B41 Y B42 QUE PRESENTAN HIBRIDACION CON LA MEZCLA HDP-2. B) REGION QUE MUESTRA HOMOLOGIA CON EL OLIGONUCLEOTIDO.

OLIGONUCLEOTIDO

5' G C A T C A T T C A T A A C T T T 3'  
G G G C

CLONA B41

107 123  
G A A T C G T T C A T G A C C T T

CLONA B42

113 130  
G C A T C G T T A C A T G A C C A T149 166  
G G T T T C T T C A A A T C T T

cadenas realizando para ello un proceso de subclonación en el vector M13mp18, así mismo también se realizó la secuencia en otras tres clonas aisladas en forma individual, en donde se corroboró los datos de secuencia obtenidos. Las secuencias obtenidas se analizaron buscando zonas aledañas que pudieran codificar para los aminoácidos de la HDP, así como alguna fase de lectura abierta o señales de procesamiento para péptidos. Con este procedimiento no se encontró ninguna similitud con la HDP o señales de procesamiento que indiquen que las clonas aisladas codifican para algún péptido homólogo.

Las secuencias de B-41 y B-42, se compararon con la base de datos Gen-bank. Para B-41 se encontró la mayor homología con un pequeño fragmento de la apolipoproteína B de Humano, así mismo se encuentra una homología variable con genes ribosomales. En lo que respecta a la clona B-42 se identificó una región que muestra una gran homología (93.3%) con una secuencia que pertenece a la familia rica en CA, la cual se encuentra en una de las variedades de secuencias repetidas llamada SINE (Short Interspersed Element), ampliamente distribuidas en el genoma eucariótico; algunas de estas secuencias se encuentran en sitios en donde se podrían utilizar como elementos colaboradores en el proceso de recombinación (117).

## VII. DISCUSION.

Utilizando una mezcla de oligonucleótidos sintetizada en base a la secuencia de la Hormona Dispersora de Pigmento (HDP) de *Uca puqilator*, se aislaron 5 clonas a partir de un banco subgenómico de *Procambarus*, las cuales presentan una homología parcial a la mezcla HDP-2. La estrategia inicial de este trabajo contemplaba clonar el gen de *Uca puqilator*, cuyo fundamento se encontraba en resultados previos en donde por medio de hibridación a baja estringencia es posible clonar genes relacionados. Sin embargo, esta estrategia fue reestructurada en base a los resultados encontrados inicialmente. Dichos datos se obtuvieron en un experimento diseñado para determinar las mejores condiciones de hibridación que permitieran realizar un rastreo con poco ruido de fondo originado del ADN de *Uca* en un banco genómico o de ADNc. Este experimento, permitió detectar una banda de hibridación específica en las dos digestiones empleadas en ADN de *Procambarus* (Fig. 8), la cual se presenta en forma selectiva para una de las mezclas de oligonucleótidos (Fig. 9) (las que difieren solo en un nucleótido), no perteneciendo a las secuencias de ADN más repetidas en *Procambarus* (Fig. 8A). Así mismo, presenta un tamaño demasiado grande para ser una secuencia repetida que origina solo una banda con por lo menos 3 enzimas de restricción. Uno de los mayores puntos de apoyo para el cambio de estrategia fue la información con la que se contaba acerca de que la secuencia de la HDP era la misma en *Uca* y *Procambarus*. Todo ello hacia figurar a esta señal como probable para contener el gen buscado.

La explicación a la falta de señal de hibridación en el ADN de *Uca*, se consideró como posible causa de una variedad de especies. A este respecto es necesario comentar que se presentaron dificultades para identificar plenamente la especie empleada en la purificación del ADN. Así mismo, se apoyó esta posibilidad en vista de no haber detectado ninguna señal bajo un amplio rango de temperaturas

de hibridación, teniendo como antecedente que es posible detectar una señal única con actividades específicas similares (34). Por tal motivo, la construcción de un banco subgenómico era la alternativa más prometedora para el aislamiento del gen de la HDP en Procambarus.

No obstante lo anterior, en el momento en que se aisló la clona que suponíamos portaba la secuencia buscada (Fig. 14), fue evidente que ésta pertenecía a una secuencia repetida (Fig. 15 y 16). Así mismo, las clonas que inicialmente se habían descartado pasaban ahora a ser consideradas como probables para contener secuencias de mayor homología, en particular las clonas B-41 y B-42, las cuales presentaban la mayor señal bajo experimentos de hibridación (Fig. 15), este dato pudiera también estar originado por la presencia de varias copias de la secuencia blanco dentro de la clona. Tal como se encontró en las clonas A-11 y A-21 (Fig. 17B), las cuales por la similitud de sus patrones de restricción con Pal I, se consideró como probable que formaran parte de una familia de secuencias repetidas. De tal forma que la alternativa más certera de saber si las clonas aisladas contenían la secuencia que codificaría para la HDP era secuenciarlas. Algunas alternativas para reducir el número de clonas a secuenciar, fue realizar hibridación con otro oligonucleótido, el cual presentara hibridación con una región distinta a la utilizada para la mezcla HDP-2, bajo estos experimentos no se detectó señal alguna sobre las clonas en experimentos tipo Southern (datos no mostrados), sin embargo, la secuencia empleada fue la de Lca, y aunque la secuencia de Procambarus se nos había referido como la misma, no se encontró ningún reporte en la literatura que lo apoyara, y por lo tanto cualquier resultado negativo no era concluyente. Por tal razón la única alternativa para confirmar la positividad de la señal fue secuenciarlas. Finalmente, la secuencia de pequeños fragmentos que presentan la zona de reconocimiento del oligonucleótido de las 4 clonas, demostraron no codificar para la HDP, ni para algún péptido relacionado.

Recientemente se pudo contar con la secuencia de la HDP de *Procambarus clarkii* (112), la cual difiere en un aminoácido con respecto a la de *Uca puillata*. Este cambio se presenta precisamente en la región empleada para sintetizar el oligonucleótido utilizado en los rastreos. Explicando en parte las causas por las cuales no se detectó ninguna otra banda en ADN de *Procambarus*. Otra razón que pudo influir en no detectar la señal del gen podría ser el contar con una actividad específica menor a la requerida para la detección de secuencias únicas en ADN de crustáceos, lo cual se encuentra relacionado con el tamaño del genoma. El experimento en el cual se identificaron secuencias únicas (34) se realizó sobre ADN de humano, mientras que algunos crustáceos presentan un mayor tamaño de su genoma, (el tamaño del genoma en *Procambarus* se desconoce).

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos Gen-Bank, no encontrando similitudes importantes con alguna secuencia reportada. La mayoría de las secuencias con las que guarda homología la clona B-42 se relacionan con aquellas secuencias que presentan regiones ricas en CA. Para el caso de la clona B-41 se presenta homología variable con diversos genes ribosomales. Es de particular importancia destacar que la relevancia de estos datos está condicionada a la obtención de una mayor longitud de secuencia, puesto que los fragmentos analizados son sólo una pequeña parte de la clona. En un intento de analizar mejor estos fragmentos se realizó una hibridación tipo Southern y Northern, en ambos casos bajo condiciones de alta estrictancia, se encontró una señal a toda la longitud del carril (datos no mostrados). En el caso del experimento tipo Southern, el resultado estaría de acuerdo en que estos fragmentos representan secuencias repetidas. Para el caso del Northern, no fue factible apreciar ninguna banda, sin embargo, la calidad del ARNm no fue la adecuada. No obstante lo anterior, los dos fragmentos secuenciados no presentan un marco de lectura abierto, por lo que es improbable que codifiquen para algún péptido.

Es evidente con los resultados previos, que el continuar con el análisis de las clonas aisladas sería infructuoso, por lo que es necesario contemplar nuevas alternativas de abordaje para el proyecto. Al respecto, teniendo como antecedente los resultados obtenidos en este trabajo, la construcción de un banco genómico no sería la alternativa más viable, puesto que la presencia de secuencias repetidas en el genoma de Procambarus que muestran homología con oligonucleótidos para la HDP es muy alta, y la posibilidad de clonar nuevamente alguna de las secuencias aisladas se incrementaría. En este punto es importante comentar que en un intento previo para clonar la HCP de Procambarus también se aislaron secuencias repetidas. Una posibilidad de evitar el aislamiento de secuencias repetidas, sería la construcción de un banco de ADNC, alternativa planteada al inicio del proyecto, sin embargo, la escasa población celular de neuronas que sintetizan la HDP (105), podrían dificultar el aislamiento del ADNC específico. En el caso de la HHC, la cual es una de las hormonas más abundantes en la glándula sinusal (27,45) y la cual fue clonada a partir de un banco de ADNC, se aislaron 3 clonas de un rastreo sobre 60 000 fagos recombinantes (186). A este respecto es importante resaltar que la concentración peptídica de la HDP es menor que la de la HHC por lo que es probable que se requiera de un mayor número de clonas para el rastreo, lo cual se agrega a las limitaciones de obtención de tejido (en el caso de la clonación de la HHC, se requirió más de 500 tallos oculares). Las condiciones de hibridación deben estar por arriba de las empleadas en este trabajo como una medida de evitar aislar nuevamente secuencias con homología parcial, por supuesto, considerando además, la síntesis de un nuevo oligonucleótido que se fundamente en la secuencia de la HDP de Procambarus (HDP-3 C/G-I-G-A-A/G-T/C-T-I-A-T-T/C/A-A-A-T/C-T/A- C/G-I-A-T). Una alternativa que puede solucionar en parte la escasez del ARN específico de la HDP y sobrepasar las limitaciones de tejido, es utilizar un protocolo que contemple una Reacción de Amplificación en Cadena de la Polimerización de ADN, el cual serviría

para incrementar la población de mensajeros específicos, utilizando para ello ARN obtenido a partir de una región del SN de *Procambarus* en donde se presenta la mayor cantidad de cuerpos neuronales que sintetizan la HDP. La estrategia de amplificación de secuencias de ADN en los últimos años ha permitido el aislamiento rápido de varios genes (41,139), en los que se incluye parte del ADNc de la Hormona Hiperiglicémica de Crustáceo de un Acocil. La amplificación del fragmento del ARN específico, podría realizarse utilizando una mezcla de oligonucleótidos dirigida a uno de los extremos del ARNm y un oligonucleótido de poli-C o poli-T que además presente una región con múltiples sitios de reconocimiento de varias enzimas de restricción que facilite la amplificación y subclonación (la región con poli-T o poli-C hibridarían con la cola de poli-A o con una cola de poli-G, esta última agregada *in vitro*). Para el caso del oligonucleótido HDP-3 se utilizaría el oligo poli-T como iniciador en la generación del ADNc (Fig. 19). Así mismo, es importante destacar que con el reciente desarrollo de anticuerpos para la HDP (144), se han iniciado estudios inmunocitoquímicos (16,144), los cuales podrían proporcionar datos iniciales acerca de la respuesta celular a la liberación de este efector. Sin duda, el desarrollo de una mayor variedad de técnicas siempre permite contar con mejores alternativas para poder afrontar los problemas que se presentan.

Si bien el desarrollo de este trabajo bajo la estrategia empleada no produjo el resultado esperado, la relevancia del proyecto sigue vigente. Los datos aportados en este trabajo proporcionan información importante para la mejor selección de las diversas estrategias existentes.

La coordinación de dos hormonas antagónicas, que ejercen su efecto fisiológico sobre la misma célula, es un mecanismo común en los organismos multicelulares. En particular este modelo permite la manipulación fácil de diferentes estímulos que controlan su actividad (neurotransmisores, estímulo luminoso, ciclo luz-oscuridad). Para uno de ellos se han acumulado datos que apoyan su intervención como efector



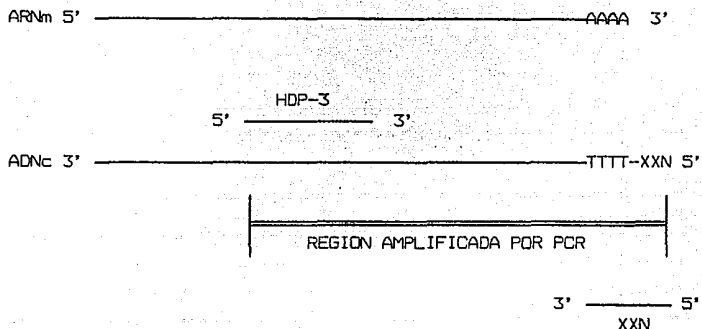


FIG. 19) ESTRATEGIA PARA LA AMPLIFICACION DEL ADnc PARA LA HDP. Después de realizar la cadena complementaria al ARNm, utilizando para ello un oligo-dT que en su extremo contenga varios sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, se utilizara el oligonucleótido HDP y el mismo polilinker para amplificar un fragmento del ARN.

común para ambas hormonas, por lo que es posible postular que los mecanismos de integración presentes en este sistema deben mostrar modulación concertada. La comprensión de esta estrategia de control, permitirá conocer un poco más la forma como las células de los organismos pluricelulares integran los diferentes estímulos que reciben.

## VIII MATERIALES Y METODOS.

## REACTIVOS.

| Reactivo  | Marca           | N° Catalogo |
|---|-----------------|-------------|
| Acetato de sodio  | Sigma           | S-2889      |
| Acido acetico   | J.T. Baker      | 9507-62     |
| Acido bórico  | J.T. Baker      | 0084-20-1   |
| Acido clorhídrico   | J.T. Baker      | 9535-59     |
| Acido desoxiribonucleico<br>tipo III a partir de<br>testículo de salmón | Sigma           | D-1626      |
| Acido etilen Diamino ter-<br>tracetico dihidratado<br>disodico (EDTA)   | Sigma           | E-5134      |
| Acido tricloroacetico   | Merck           | 807         |
| Acrilamida  | Bio-Rad         | 161-0103    |
| Adenosin 5' trifosfato<br>grado II                                      | Sigma           | A-3377      |
| Agar  | Difco           | 0140-01-0   |
| Agarosa HGT (gelifica-<br>cion a alta temperatu-<br>ra)                 | Marine Colloids | 49-054      |
| Agarosa Sea Plaqué (ge-<br>lificacion a baja tem-<br>peratura)          | FMC             | 60319       |
| Agarosa ultrapura grado<br>ADN  | Bio-Rad         | 162-0126    |
| Albumina de suero bovina<br>(fraccion V)                                | Sigma           | A-8022      |
| Alcohol isoamilico  | Merck           | 979         |
| Alcohol isopropilico  | Merck           | 9634        |
| Ampicilina  | Sigma           | A-9518      |
| Azul de bromofenol  | Bio-Rad         | 161-0404    |
| Bacto triptona  | Difco           | 0123-01-1   |
| Bis-acrilamida  | Bio-Rad         | 161-0201    |
| Bolsas de diálisis  | Sigma           | D-9277      |
| 5-bromo-4-cloro-3-indo-<br>lil-8-D-galactopirano<br>sido (X-Gal)        | Sigma           | B-9146      |
| Bromuro de etidio   | Sigma           | E-8751      |
| Citrato de sodio  | J.T. Baker      | 3646-20-0   |
| Cloroforno  | J.T. Baker      | 9180-60     |
| Cloruro de amonio   | Sigma           | A-4514      |
| Cloruro de calcio<br>(anhidro)  | Sigma           | C-4901      |
| Cloruro de cesio  | Sigma           | C-3032      |
| Cloruro de Magnesio   | Sigma           | M-0250      |
| Cloruro de potasio  | Sigma           | P-4504      |
| Cloruro de sodio  | J.T. Baker      | 3624        |
| Desoxiribonucleasa I<br>(tipo I)  | Sigma           | D-4763      |
| Dextran sulfato   | Pharmacia       | S/C         |

|   |            |          |
|---|------------|----------|
| N,N-Dimetilformamida                          | Sigma      | D-4254   |
| Dimetil sulfoxido (DMSO)                      | Sigma      | D-5879   |
| DL-Ditiotreitol                               | Sigma      | D-0632   |
| Dodacil sulfato de sodio (SDS)                | Bio-Rad    | 161-0302 |
| Espermidina (base libre)                      | Sigma      | S-2626   |
| Etanol absoluto                               | Merck      | 15853    |
| Extracto de levadura                          | Difco      | 0127-01  |
| Fenol   | Merck      | 206      |
| Ficol   | Sigma      | F-9378   |
| Formaldehido en solucion                      | J.T. Baker | 2106     |
| Formamida                                     | BRL        | 5515UB   |
| Fosfato de sodio dibasico anhidro             | Sigma      | S-0676   |
| Fosfato de sodio monobasico anhidro           | Sigma      | S-0751   |
| Glicerol                                      | J.T. Baker | 2136-59  |
| Glicina                                       | Bio-Rad    | 161-0718 |
| B-D(+)-glucosa                                | Sigma      | G-5250   |
| Hidroxido de sodio (lentejas)                 | Merck      | 6498     |
| Isopropil-B-D-tiogalacto piranosido (IPTG)    | Sigma      | I-5502   |
| Lisozima grado I                              | Sigma      | L-6876   |
| Maltosa                                       | Bioxon     | S/C      |
| Metanol absoluto                              | Merck      | 6009     |
| Persulfato de amonio                          | Bio-Rad    | 161-0700 |
| Polietilenglicol (B000)                       | Sigma      | P-5413   |
| Polivinilpirrolidona                          | Sigma      | PVP-360  |
| POPOP   | Merck      | 7249     |
| Putresina dihidrocloruro                      | Sigma      | P-5780   |
| Ribonucleasa A                                | Sigma      | R-5125   |
| Sacarosa grado I                              | Bio-Rad    | 161-0720 |
| Tetrametiletildiamino (TEMED)                 | Bio-Rad    | 161-0601 |
| Tiamina hidroccloruro                         | Sigma      | T-4625   |
| Tolueno                                       | J.T. Baker | 9460     |
| Trizma base (tris[hidroxiometil] aminometano) | Sigma      | T-8524   |
| Urea  | Merck      | 8487     |
| Xilen cianol                                  | Bio-Rad    | 161-0423 |
| Yoduro de propidio                            | Sigma      | P-5264   |

## METODOS.

1.- PROTOCOLO PARA LA PRODUCCION Y ALMACENAMIENTO DE EXTRACTO DE EMPAQUETAMIENTO.

Contar con un día de anticipación de:

- 460 ml de medio LBK en un matraz Erlen Meyer de 1 Lt. de capacidad para 460 ML.

|                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
| 1 % Bactotriptona         | 4.6 Gr.                   |
| 1 % NaCl                  | 4.6 Gr.                   |
| .5 % Extracto de levadura | 2.3 Gr.                   |
| 4 mM NaOH                 | 1.84 ML de Sol. 1 N NaOH. |

Esterilizar 20 min a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión.

Colocar 3 ml del medio en un tubo de cristal para cultivo antes de la esterilización, el cual se utilizará como blanco para la lectura de absorbancia (A<sub>600</sub>).

- 12 ml de solución TSP.

|                   |                              |
|-------------------|------------------------------|
| 40 mM Tris        | 480 ul. de tris 1 M pH 7.5.  |
| 10 mM Espermidina | 1200 ul. de espermidina .1 M |
| 10 mM Putrecina   | 19.332 mg. de putrecina.     |

Ajustar a pH 7.8 con HCl (aproximadamente 8 gotas con pipeta pasteur 1 N de HCl), filtrar por membrana de .22 µm.

- Eppendorf .5 ml, tubos para rotos de centrifuga JA-20 y JA-10 (15 ml y 500 ml respectivamente), pipetas pasteur tallo largo y agitador de cristal, (esterilizar bajo las mismas condiciones que medio LBK).

- Prever el lugar para las incubaciones a 44 °C, 37 °C y 30 °C.

- Tener asegurado nitrógeno líquido y un recipiente de boca ancha para congelar los tubos.

- Cepa SMR-10 ya verificada su labilidad a 42 °C.

## PROTOCOLO.

- 1.- Inocular un tubo de cristal para cultivo con capacidad de 5 ML, con 3 ML de medio LBK con la cepa SMR-10, incubar a 37 °C con 200 rpm durante 10 a 12 Hrs.
- 2.- Inocular el matraz Erlen-Meyer con 500 ul del cultivo previo, incubar a 30 °C con 200 rpm hasta alcanzar una densidad celular de  $2 \times 10^8$  A<sub>550</sub> lo mas próxima a .800 U. de Densidad Optica (D.O.). Realizar lecturas a las 5:00 y 5:30 Hrs., con adecuado crecimiento se obtiene una absorbancia de .230 y .350 U. de D.O. respectivamente, sacando el matraz con un poco mas de 6:30 Hrs. de incubacion (absorbancia aprox. a las 6:30 Hrs de .700 U. de D.O.), durante este tiempo se verifica la labilidad de la cepa a 42 °C, estriando dos cajas de petri e incubando a 37 °C y 42 °C, utilizar como control positivo de desarrollo a 42 °C la cepa D-359.
- 3.- Mientras se alcanza la densidad adecuada se prepara una incubadora a 44 °C y la solución de preservacion, la que debe mantenerse en frio.

- Solución de preservación para preparar 1 Ml.  
 50 % Dimetil sulfoxido 500 ul.  
 7.5 mM ATP (pH 7.0) 75 ul ATP .1 M pH 7.0.
- 4.- Alcantada la absorbancia de (.80) se induce la producción de la capsida a 44 °C con 200 rpm por 15 Min.
  - 5.- Incubar a 27 °C con 200 rpm durante 90 Min. . Colocar tubos de centrifuga, camisas para tubos de 15 ml, rotores y puntas para pipetas volumetricas de 200 ul en el cuarto frío. Poner los tubos Eppendorf de .5 ml con 5 ul de solución de preservación y la solución TSP en hielo de agua. Preparar la centrifuga a la temperatura adecuada (4 °C).
  - 6.- Al termino de los 90 Min. colocar el cultivo en 2 tubos de centrifuga para rotor JA-10 , centrifugar a 6000 rpm durante 6 Min. a una temperatura de 4 °C. retirar el sobrenadante por decantación, dejar escurriendo sobre la tapa el resto del medio, mantener siempre las células en hielo de agua.
  - 7.- Con una toalla absorbente retirar el medio remanente que se encuentra en la boca del tubo, resuspender las células en 9 ml de TSP frío (lavar primero un frasco con 6 ml, pasarlo al otro y resuspender las células, posteriormente pasar el TSP con las células resuspendidas a un tubo frío de 15 ml para rotor JA-20 colocar en hielo, repetir la misma operación con los 3 ml restantes pasando el TSP al mismo tubo).
  - 8.- Centrifugar a 5000 rpm a 4 °C durante 3.5 Min. en el rotor JA-20, retirar sobrenadante por decantación, colocar el tubo con las células en hielo.
  - 9.- Resuspender las células gentilmente con 350 ul de TSP con agitador de cristal.
  - 10.- Alicuotar en los tubos Eppendorf de .5 ml 20 ul del extracto, vortexear e inmediatamente congelar en nitrogeno liquido, almacenarlos en un contenedor con nitrogeno liquido. Aproximadamente se obtienen de 55 a 60 tubos.

## 2.- PROTOCOLO PARA ENPAQUETAMIENTO IN VITRO DE ADN DE LAMBDA.

Preparar las siguientes soluciones.

- Solución TEK para preparar 50 Ml.  
 10 mM Tris 500 ul. de tris 1 M pH 8.0.  
 1 mM EDTA 200 ul. de EDTA .25 M pH 8.0.  
 50 mM KCl 186 mg. de KCl .  
 Ajustar a pH 8 esterilizar a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 Min.

- Solución SMC para preparar 50 Ml.  
 .7 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .35 Gr.  
 .3 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .15 Gr.  
 .05 % NaCl 25 mg.  
 .1 % NH<sub>4</sub>Cl 50 mg.  
 1 mM MgCl<sub>2</sub> 50 ul de una Sol. 1 M MgCl<sub>2</sub>.  
 .1 mM CaCl<sub>2</sub> 50 ul de una Sol. .1 M CaCl<sub>2</sub>.

Esterilizar por filtración con equipo de filtración Millipor por membrana de poro de .22 μm.

### PROTOCOLO.

- 1.- Sacar el tubo Eppendorf de nitrogeno liquido y colocar en hielo, descongelar bruscamente el extracto colocando el tubo durante 30 Seg. a 23 °C regresar inmediatamente a hielo.
- 2.- Agregar 10 ul de solución TEK con el ADN a enpaquetar, no más de 4 ug.

- 3.- Agitar gentilmente con tubos delgados de vidrio. (hacerlos con pipetas pasteur, a las que se les sello y redondeo su punta con calor).
- 4.- Incubar a Temp. Amb. (28 °C) durante 90 Min.
- 5.- Al termino de los 90 Min., añadir 3 ul de cloroformo, y 500 ul de solución SMC que contenga 50 ug/ml de DNasa I.
- 6.- Agitar en un mezclador de tubos a Max. Vel. hasta disolver el material solido.
- 7.- Centrifugar 2 Min. a 12000 rpm en microfuga.
- 8.- Retirar sobrenadante con pipeta pasteur esteril.
- 9.- Almacenar en tubos esteriles.
- 10.- Titular empaquetamiento.

3.- PROTOCOLO PARA MARCAJE POR MEDIO DE T4 POLINUCLEOTIDOCINASA.

Soluciones y reactivos.

- 100 pMol. de oligonucleótido.
- Polinucleotidocinasa 14 U.
- Papel para cromatografía DE 81.
- Columna para cromatografía con Bio-gel A de 1.5.
- 100 uCi. de P<sup>32</sup> ATP.
- Solución acarreadora.
- Líquido de Centelleo (V. apéndice).
- H<sub>2</sub>O bidestilada esteril.
- Preparar solución amortiguadora para cinación.  
Amortiguador para cinación 10X:  

|                        |  |
|------------------------|--|
| .7 M Tris              | 3.5 Ml. de Sol. de tris 2 M pH 7.5.            |
| .1 M MgCl <sub>2</sub> | 1 Ml. de Sol. de MgCl <sub>2</sub>             |
| .05 M DTT              | .5 Ml. de Sol. de DTT 1 M con acetato de sodio |
- Esterilizar por filtración en membrana de .22 um, alicuitar.

PROTOCOLO.

- 1.- Preincubar durante 5 Min. a 60 °C 100 picomolas de oligonucleotido en amortiguador para cinación 1X, 1 ul de espermidina .1 M neutralizada mas agua para un volumen final de reacción de 20 ul (no haber agregado enzima ni marca).
- 2.- Colocar en hielo de agua y añadir 14 U. de polinucleotidocinasa.
- 3.- Pasar la mezcla a un tubo que contenga 100 uCi de P<sup>32</sup> ATP.
- 4.- Incubar durante 2 Hrs. a 37 °C.
- 5.- Valorar el porcentaje de incorporación a los 90 Min. con el siguiente procesamiento.
  - Tomar .5 ul del volumen de reacción llevar a 20 ul con solución acarreadora.
  - En 2 cuadros de papel de cromatografía DE81 (aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) colocar 2 ul.
  - Exponer un papel a 15 ml de TCA 10 % frio durante 15 Min. con agitación ocasional (cada 4-5 Min.), cambiar el TCA a los 7 Min.
  - Lavar con 15 ml de etanol al 70 % frio, durante 15 Min., repetir otro lavado durante 2 a 3 Min. Todos los lavados con TCA y etanol se deben realizar con el tubo en hielo agua.
  - Cuantificar la radiación en cada uno de los papeles (lavado y no lavado), colocándolos en 5 ml de líquido de centelleo, contar por 1 Min. en contador de radiaciones B y determinar el porcentaje de marca incorporada (marca en el papel lavado) en relación a la marca total (papel no lavado).

- 6.- En caso de presentar adecuada incorporación (> del 60 %), proceder a purificar el oligonucleótido marcado, por medio de una columna de Bio gel A 1.5, colocar el Vol. total de la reacción en el lecho del gel iniciar en forma inmediata la colección de alícuotas, ( las alícuotas deben de ser de 3 gotas lo que proporciona un volumen aproximado de 150 ul en columnas de 1 cm de diámetro, el oligonucleótido inicia la salida del gel aproximadamente entre la fracción 20 y 22).
- 7.- Tomar : ul del volumen total que contenga el oligonucleótido, contar con 5 ml de líquidos de centelleo en contador B para determinar la cantidad total de marca recuperada.
- 8.- Hibridar con 10 millones de cpm por Ml. de solución de hibridación.

#### 4.- PROTOCOLO DE PURIFICACION DE ADN DE LAMBDA A PEQUEÑA ESCALA.

##### Reactivos y soluciones.

- Pallillos estériles.
- Medio de cultivo LB.
- Solución SMC (V. protocolo N° 4).
- Solución de maltosa al 20 %.
- Solución de  $MgCl_2$ .
- Cloroformo.
- Solución de tris 2 M pH 7.5.
- DNasa 1 mg/ml (V. apéndice).
- RNasa 10 mg/ml (V. apéndice).
- Solución 5 M de NaCl.
- Polietilenglicol de peso aproximado 9000.
- Solución TM (V. apéndice).
- Solución de SDS al 10 %.
- Fenol saturado.
- Etanol frío.
- Solución TE pH 7.5.

- 1.- Picar una placa con palillo estéril, resuspender los fagos en 200 ul de SMC, (también se puede colocar la placa entera en un Ml. de SMC).
- 2.- Colocar 100 ul del SMC con el fago mas 100 ul de células Le-392 o Y-1090 preparadas con el protocolo N° en un tubo de cristal para cultivo.
- 3.- Freincubar 30 Min. a 37 °C, sin agitación, agregar 5 Ml. de LB pH 7.5, agregar maltosa para una concentración final de 2 % y  $MgCl_2$  para una concentración final de 10 mM.
- 4.- Incubar toda la noche a 37 °C con 200 rpm.
- 5.- Al día siguiente añadir 50 ul de cloroformo, agitar 1 Min., a máxima velocidad.
- 6.- Centrifugar a 2700 rpm por 10 Min. a temp. amb.
- 7.- Tomar el sobrenadante con pipeta pasteur, evitar traerse el detrito celular.
- 8.- Añadir:
  - 50 ul de Tris 2 M pH 7.5.
  - 50 ul de DNasa 1 mg/ml.
  - 30 ul de RNasa 10 mg/ml.
- 9.- Agitar 15 Seg., dejar a Temp. Amb. 15 Min.
- 10.- Agitar 5 Seg., dejar en hielo 30 Min.



- 11.- Añadir 500  $\mu$ l de una solución 5 M NaCl para llevar a .5 M y 500 mg de polietilenglicol de P.M. aproximado 8000 para llevar a 10 %.
- 12.- Dejar en hielo de agua por 3 Hrs.
- 13.- Centrifugar a 2700 rpm en centrifuga de mesa durante 15 Min. a 4  $^{\circ}$ C.
- 14.- Resuspender el precipitado en 400  $\mu$ l de solución 20 mM tris pH 7.4 10 mM de  $MgCl_2$ , y pasar la suspensión a un tubo Eppendorf.
- 15.- Añadir 800  $\mu$ l de cloroformo, agitar a máxima velocidad en un mezclador de tubos durante 2 Min.
- 16.- Centrifugar a 2700 rpm durante 10 Min. a 4  $^{\circ}$ C, tomar el sobrenadante.
- 17.- Añadir 20  $\mu$ l de una solución 5 M de NaCl para llevar a .25 M, 32  $\mu$ l de una solución .25 M de EDTA pH 8.0 para llevar a .02 M y, 12  $\mu$ l de una solución de SDS al 10 % para llevar a una concentración final de .5 %.
- 18.- Agitar 2 min. a máxima velocidad en un mezclador de tubos.
- 19.- Agregar un Vol. de fenol, agitar por 2 Min., agregar 1 Vol. de cloroformo, agitar por 2 Min.
- 20.- Centrifugar a Max. Vel. en microfuga por 1 Min. a Tem. Amb.
- 21.- Tomar la fase acuosa, y añadir 1 Vol. de cloroformo, agitar por 2 Min.
- 22.- Centrifugar a Max. Vel. en microfuga a Temp. Amb.
- 23.- Tomar la fase acuosa y precipitar el ADN con 2 Vol. de etanol frío, guardar a -20  $^{\circ}$ C toda la noche o congelar en hielo seco etanol y mantener durante 2 Hrs.
- 24.- Centrifugar a Max. Vel. en microfuga durante 10 Min. a 4  $^{\circ}$ C, descartar por decantación el etanol.
- 25.- Secar el ADN y resuspender en 50  $\mu$ l. de Sol. TE.

#### 5.- PROTOCOLO PARA PURIFICAR ADN DE LAMBDA A GRAN ESCALA.

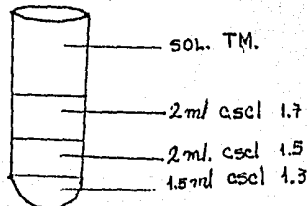
##### Reactivos y soluciones.

- Cultivo de células LE-392 o Y-1090.
- Medio de cultivo LB-Mg.
- Cloroformo.
- Polietilenglicol.
- NaCl.
- Tubos de ultracentrifuga para rotor SW-40.
- Solución TM (V. apendice).
- DNasa 1 mg/ml.
- Cloruro de cesio.
- Jeringa de 3 ml.
- Fenol saturado.
- Solución cloroformica 24:1.
- Solución TE pH 7.5.

##### PROTOCOLO:

- 1.- Infectar 1 ml. de cultivo de células LE-392 o Y-1090, con .3 ml. de lisado primario del fago a purificar.
- 2.- Incubar a 37  $^{\circ}$ C sin agitación durante 10 Min.
- 3.- Inocular con lo anterior 1 Lt. de medio LB-Mg e incubar a 37  $^{\circ}$ C con rotación de 200 rpm durante toda la noche.
- 4.- Adicionar aproximadamente 1 ml de  $CHCl_3$  y colocar a 37  $^{\circ}$ C con rotación de 200 rpm durante 10 Min. mas.
- 5.- Centrifugar a 7000 rpm en rotor JA-10 a 4  $^{\circ}$ C durante 20 Min., tomar el sobrenadante.

- 6.- Añadir 100 Gr. de polietilenglicol de peso aproximado 8000 y 42.8 Gr. de NaCl, disolver con gentil agitación
- 7.- Mantener en hielo de agua por lo menos 3 Hr.
- 8.- Centrifugar a 7000 rpm a 4 °C durante 20 Min.
- 9.- Descartar el sobrenadante completamente, colocar el tubo de centrifuga boca abajo con la pared que contenga los fagos en contacto con hielo.
- 10.- Resuspender los fagos en 5 ml de Sol. TM que incluya de 50 a 100 ug de DNasa I, ayudarse con pipeta pasteur.
- 11.- Añadir un volumen de CHCl<sub>3</sub>, mezclar durante 5 Min.
- 12.- Centrifugar a 7000 rpm a 4 °C durante 10 Min.
- 13.- Hacer un gradiente discontinuo de CsCl.



- 14.- Centrifugar durante 90 Min a 15 °C en un rotor SW-40 a una Vel. de 36000 rpm.
- 15.- Tomar por punción con una jeringa la banda de los fagos, por lo regular aparece entre la interfase de las densidades de 1.5 y 1.3.
- 16.- Dializar contra 2 Lt. de Sol. TM durante 2 a 3 Hrs. a Temp. Amb. o a 4 °C durante toda la noche.
- 17.- Añadir un decimo del Vol. de 5 M de NaCl, un centesimo de Vol. de 20 % SDS, y llevar a 10 mM de EDTA.
- 18.- Extraer con 1 Vol. de Fenol, mezclar por 2 Min., añadir un Vol. de Sol. cloroformica (cloroformo/alcohol isomilico 24:1), centrifugar a 7000 rpm a 4 °C durante 5 Min. en rotor JA-20.
- 19.- Tomar la fase acuosa, agregar un Vol. de Cloroformo/A1A. mezclar por 2 Min., centrifugar en las condiciones anteriores.
- 20.- Precipitar el ADN con dos Vol. de etanol. Si se tiene una buena cantidad de ADN se formara una malla (la cual debe de manejarse con cuidado), se desecha el etanol sin centrifugar, se lava la malla con etanol al 70 %, se desecha el etanol de la misma forma, secar el ADN en un secador de muestras, resuspender ADN en 1 ml. de solución TE con puntas de pipetas volumetricas, a las cuales se les halla cortado su punta.
- 21.- Valorar calidad y cantidad de ADN.

#### 6.- PROTOCOLO PARA PREPARAR CELULAS COMPETENTES.

Soluciones y reactivos utilizados:

- Solución 50 % polietilenglicol (PEG) sin filtrar (alta viscosidad).
- Solución 1 M MgCl<sub>2</sub>, filtrar por membrana de .22 µm y esterilizar.
- Medio de cultivo LB 2X
  - 2 % Bactotripton.
  - 2 % NaCl.
  - 1 % Extracto de levadura.

- Ajustar a pH 6.5 esterilizar.
- Medio de cultivo LB-Mg IX
    - 1 % Bactotripton.
    - 1 % NaCl.
    - .5 % Extracto de levadura.
    - 10 mM MgCl<sub>2</sub>.
  - Ajustar a pH 7.5 esterilizar.
  - Dimetilsulfoxido.
 

|                               |                                 |
|-------------------------------|---------------------------------|
| - Solución TSS                | para preparar 5 Ml.             |
| 1 X Medio LB pH 6.5           | 2.5 Ml. de LB 2X.               |
| 10 % PEG peso/Vol             | 1.0 Ml. PEG 50 %.               |
| 5 % Dimetilsulfoxido Vol./Vol | .250 Ml. DMSO                   |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>       | .250 Ml. MgCl <sub>2</sub> 1 M. |
|                               | 1 Ml. H <sub>2</sub> O.         |
- Ajusta por si sola a pH 6.5 por el LB 2X, esterilizar por filtración con membrana de .45 µm.

#### PROTCCOLO.

- 1.- Inocular 30 ml de medio LB-Mg con 30 ul de células JM-101 (células obtenidas con el protocolo N° 13) en un matraz Erlen-Meyer con capacidad de 250 Ml.
- 2.- Incubar a 37 °C con 200 rpm hasta alcanzar una densidad aproximada de .5 de D.O. a 600 rM (aproximadamente 3 Hrs.).
- 3.- Colocar el matraz en hielo de agua por 10 Min.
- 4.- Centrifugar a 4000 rpm durante 10 Min. a 4 °C en rotor JA-20 en tubos frios.
- 5.- Desecnar sobrenadante por decantación.
- 6.- Resuspender las células en un decimo del Vol. original (3 Ml.) en solución TSS.
- 7.- Hacer alícuotas de 200 ul. en tubos Eppendorf previamente enfriados.
- 8.- Congelar en forma inmediata los tubos en hielo seco etanol.
- 9.- Guardar a -70 °C, hasta su uso.

#### 7.- PROTOCOLO PARA TRANSFORMACION CON PLASMIDO.

##### Soluciones y reactivos:

- Células competentes (preparadas con el protocolo N° 6).
- ADN de plásmido a una concentración de 1 ng por ul.
- Medio de cultivo LB-Mg (V. apéndice).
- Cajas de petri con agar al 2 % en medio LB-Mg y ampicilina a una concentración de 50 ug por Ml.

##### PROTCCOLO.

- 1.- Descongelar gradualmente las células competentes en hielo de agua (aproximadamente 30 Min. ).
- 2.- Agregar 1 ul de ADN de plásmido, mezclar con ligeros golpes con el dedo.
- 3.- Incubar en hielo de agua durante 30 Min. (agitar de la manera anterior a los 15 Min.).
- 4.- Agregar 800 ul de medio LB-Mg e incubar durante 1 Hr. a 37 °C con 200 rpm.

- 5.- Colocar en Hielo.
- 6.- Titular la eficiencia de transformación plaqueando 100 ul del Vol. final de transformación en una caja de petri con ampicilina. La eficiencia de este protocolo en nuestras manos llevo a ser del orden de  $1 a 5 \times 10^8$  por ug.

### 8.- PROTOCOLO DE TRANSFORMACION CON ADN RECOMBINANTE EN M13.

#### Soluciones y reactivos:

- Reacción de ligación (M13 recombinante).
- Medio de cultivo LB-Mg 1 X (V. apéndice).
- IPTG en solución .1 M.
- X-Gal en solución al 2 %.
- Células JM-101 (V. protocolo 13).
- Agarosa al .5 % en medio LB-Mg (V. apéndice).
- Cajas de petri con agar al 2 % en medio LB-Mg.

#### PROTOCOLO.

- 1.- Descongelar gradualmente las células competentes en hielo de agua (aproximadamente 30 Min.).
- 2.- Añadir 2 ul del volumen de reacción de ligación, mezclar gentilmente con ligeros golpes con el dedo.
- 3.- Incubar en hielo agua por 1 Hr. (agitar de la forma anterior cada 15 Min.).
- 4.- Agregar 800 ul de medio LB-Mg.
- 5.- Incubar a 37 °C con 200 rpm de agitación durante 30 Min.
- 6.- Colocar en hielo hasta plaquear.
- 7.- Colocar en tubos para cultivo de cristal estériles con capacidad de 5 Ml., 15 ul de la solución de IPTG, 30 ul de la solución de X-GAL y 200 ul de células JM-101.
- 8.- Agregar 100 ul de las células transformadas y 3 Ml. de agarosa al .5 % en Medio LB-Mg a los tubos que contienen la mezcla previa (la agarosa debio ser fundida y mantenida a 50 °C por lo menos 1 Hr. antes).
- 9.- Plaquear la mezcla en una caja petri, la cual debe de estar a la temperatura de 37 °C.
- 10.- Incubar la caja a 37 °C durante toda la noche.

### 9.- PROTOCOLO PARA PREPARAR CAJAS PETRI CON MEDIO NN (MINIMO).

#### Soluciones y reactivos:

- Solución de sulfato ferroso al .005 %.
- Solución 10 N de KOH
- Preparar solución de sales 2 X (para 300 Ml.).

|                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 8.16 Gr.               |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$  | 1.56 Gr.               |
|                          | 600 ul de Sol. .005 %. |

Llevar a pH 7.3 con una solución 10 N de KOH esterilizar.

- Solución de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 4 % esterilizar.
- Solución de Dextrosa al 20 % esterilizar.
- Solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 8 % esterilizar.
- Solución de  $\text{CaCl}_2$  Anhidro al .2 % esterilizar.

- Solución de Tiamina al .1 % filtrar.
- Agar.

#### PROTODCOLO.

- 1.- Esterilizar 1.5 Gr. de agar en 46 Ml. de H<sub>2</sub>O.
- 2.- Añadir:
  - 1 Ml. de Solución de MgSO<sub>4</sub> al 4 %.
  - 1 Ml. de Solución de dextrosa al 20 %.
  - 1 Ml. de NH<sub>4</sub>Cl al 8 %.
  - 1 Ml. de CaCl<sub>2</sub> al .2 %.
  - 10 ul. de Tiamina al .1 %.
  - 50 Ml. de Solución de sales 2 X.
- 3.- Vaciar el medio en cajas.
- 4.- Guardar a 4 °C hasta usarse.

#### 10.- PROTODCOLO PARA PREPARAR GEL DE SECUENCIA.

##### Reactivos y soluciones:

- Solución de acrilamida al 40 % (38/2).

152 Gr. de Acrilamida.

8 Gr. de Bis-acrilamida.

Aforar a 400 Ml., filtrar por membrana de .45 µm o papel Watman N° 1, guardar a 4 °C en frasco color ámbar.

- Solución TBE 10 X (para 1 Lt.).

.89 M de tris 108 Gr.

.89 M de Acido bórico 55 Gr.

.02 M de EDTA ( Na<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O ) 9.3 Gr.

Aforar a un litro, se ajusta por si solo a aproximadamente a pH 8.0 (utilizar agua desionizada).

- Solución de acrilamida al 7 % 8 M urea.

87.5 Ml. de Acrilamida al 40 %.

240 Gr. de Urea.

50 Ml. de Solución TBE 10 X.

Aforar a 500 ML., filtrar por membrana de .45 µm, guardar en frasco color ámbar a Temp. Amb.

- Cristales para montar gel de secuencia para cámara Hoefer Scientific Mod. SE-1500.

- Solución de persulfato de amonio al 10 % (para 1 Ml.)

.1 Gr.

Utilizar el mismo día.

- TENED.

- Solución de SDS al 10 %.

- Peine para gel de secuencia, separadores de gradiente.

#### PROTODCOLO.

- 1.- Preparar los cristales con el siguiente procedimiento.
  - Lavar los cristales con etran.
  - Enjuagar con agua filtrada tipo Milli-RO.
  - Dejar secar.
  - Limpiar con etanol.

- Limpiar con Cloroformo.
  - Aplicar una capa de solución de SDS al 10 %.
  - Dejar secar.
  - Pulir los cristales en cámara de extracción (este paso solo se realiza en la cara del cristal que se pondrá en contacto con el gel).
  - Armar los cristales con separadores de gradiente colocando cinta de empaque alrededor. (la parte delgada del separador debe de estar hacia arriba).
- 2.- Mezclar en un vaso de precipitado 55 Ml. de acrilamida al 7 % 8 M urea , con 300 ul de persulfato de amonio al 10 % y 30 ul de TEMED.
  - 3.- Colocar la acrilamida con una jeringa de 50 Ml. entre los cristales, sosteniendo estos en un ángulo aproximado de  $120^\circ$  con respecto a la mesa, cuando se termina de colocar la acrilamida recostar los cristales lentamente.
  - 4.- Colocar el peine. En caso de utilizar peine con dientes de tiburón, colocar el peine formador de pozo en este paso.
  - 5.- Prensar los cristales con pinzas doble clip dos en cada uno de los extremos, incluyendo el lado donde se coloca el peine. Iniciar de abajo hacia arriba.
  - 6.- Dejar gelificar aproximadamente 20 Min. (es posible dejar el gel toda la noche, cubrir con una película de Plien-Pack para evitar evaporación).
  - 7.- Enjuagar el borde superior del gel con agua filtrada para remover el exceso de acrilamida , retirar el peine y posteriormente enjuagar con agua.
  - 8.- Montar el gel en cámara de secuencia, en caso de utilizar el peine con dientes de cocodrilo, este debe ser colocado antes de montar el gel en la cámara.

#### 11.- PROTOCOLO DE CORRIDA DE GEL DE SECUENCIA.

##### Soluciones y materiales requeridos:

- Solución TBE 1X.
- Cámara de electroforesis para secuencia Marca Hoefer-Scientific Mod. SE-1500.
- Fuente de poder marca Hoefer-Scientific Mod. F8-2500.
- Gel de secuencia.
- Reacción de secuencia.
- Puntas para pipetas volumétricas con extremo plano.

##### PROTOCOLO.

- 1.- Montar el gel en la cámara de secuencia con solución TBE 1X.
- 2.- Precorrer el gel durante 40 Min. a 110 Watts mantener fijo el poder.
- 3.- Precalentar las muestras durante 2 Min. a  $70^\circ\text{C}$ .
- 4.- Poner las muestras en hielo de agua, aplicar 2 o 3 ul de la muestra lo mas pronto posible en el gel (previamente haber lavado cada uno de los pozos con la misma solución de corrida para retirar la urea, hacerlo con mucho cuidado para no romper el pozo, o separar los dientes de tiburón del gel).
- 5.- Permitir que penetren las muestras durante 5 Min. a 10 Watts.
- 6.- Correr el gel a 130 Watts (mantener fijo el poder).

## 12.- PROTOCOLO PARA LA TITULACION DE LISADOS DEL FAGO LAMBDA.

### Soluciones , reactivos y materiales.

- Lisado de fago a ser titulado.
  - Tubos de cristal para cultivo con capacidad de 5 Ml. estériles.
  - Células LE-392 o Y-1090 ( V. protocolo 13).
  - Agar blanco al 0.5 % en medio LB-Mg.
- A 100 Ml. de Medio LB-Mg agregar .5 Gr de agar, esterilizar.  
 -- Cajas petri con agar al 2 % de 100 mm. de diámetro.

### PROTOCOLO.

- 1.- Hacer diluciones adecuadas del lisado\*, que permitan tomar un volumen igual o menor de 100 ul. (para la titulación de extractos por empacquetamiento se hace una dilución 1/1000; para lisados primarios 1/10<sup>4</sup>, 1/10<sup>5</sup>, 1/10<sup>6</sup> y cuando se resuspende una placa se hacen diluciones de 1/10<sup>3</sup> y 1/10<sup>4</sup>).
- 2.- Agregar 200 ul de células LE-392 o Y-1090 \*\* en un tubo de cultivo y el Vol. requerido para la dilución que se desee.  
El mejor conteo se realiza plaqueando las siguientes diluciones:
  - 1/10, 1/100, 1/1000 para extractos de empacquetamiento.
  - 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup>, 1/10<sup>5</sup> para lisados primarios.
  - 1 ul., 1/100, 1/10<sup>4</sup> cuando se resuspende una placa.
- 3.- Incubar sin agitación a 37 °C durante 20 Min.
- 4.- Añadir 3 Ml. de Agar .5 % en medio LB-Mg la cual tenga una temperatura de 50 °C.
- 5.- Plaquear en cajas petri precalentadas a 37 °C.
- 6.- Dejar que gelifique, aproximadamente 15 Min.
- 7.- Retirar el vapor de agua que se haya formado en la tapa de la caja , exponiendo la tapa a un mechero.
- 8.- Incubar a 37 °C por 12 Hrs.

\*Cuando se requiere transferir un numero determinado de placas, se plaques nuevamente teniendo en consideración el titulo determinado, por ello se deben guardar a 4 °C las diluciones.

\*\*La cepa Y1090 presenta un mejor desarrollo, formando placas mas nitidas.

## 13.- PROTOCOLO PARA LA OBTENCION DE CULTIVO DE CELULAS PARA PLAQUEAR.

### Soluciones , reactivos y materiales:

- Medio de cultivo LB-Mg.
- Células LE-392, Y-1090 y JM-101.
- Tubo de cristal para cultivo estéril con capacidad de 5 Ml.
- Cajas petri con agar al 2 % en medio LB-mg.
- Matraz Erlen-Meyer con capacidad de 250 Ml.
- Maltosa al 20 %.
- Cajas petri con agar al 1.5 % en medio NM (V. protocolo N° 9).
- Cajas petri con agar al 2 % en medio LB-Mg (V. apéndice).

### PROTOCOLO.

- 1.- A partir de un tubo donde se tenga guardada la cepa se toma una asada y se inoculan 3 ml de medio LB-Mg en un tubo de cultivo de cristal con capacidad de 5 Ml.
- 2.- Incubar toda la noche a 37 °C con 200 rpm.
- 3.- Estriar una caja con el cultivo previo, para la cepa JM-101 utilizar la caja con medio NN; para las cepas Y-1090 y LE-392 utilizar las cajas con medio LB-Mg.
- 4.- Incubar por 12 Hrs. para las cepas LE-392 y Y-1090 y durante 24 Hrs. para la cepa JM-101 a 37 °C.
- 5.- Tomar una colonia de la cepa que se desee, e inocular en el matraz Erlen-Meyer que contenga 50 Ml. de medio LB-Mg, incubar durante toda la noche a 37 °C con 200 rpm.
- 6.- A partir de este cultivo se toman 30 ul y se reinoculan 30 Ml de medio LB-Mg en un matraz Erlen Meyer con capacidad de 250 Ml..
- 7.- Incubar a 37 °C durante 5 Hrs. con 200 rpm.
- 8.- Conservar a 4 °C. Almacenadas a esta temperatura pueden utilizarse en el transcurso de 2 semanas.

#### 14.- PROTOCOLO PARA LA PURIFICACION DE ADN.

##### Soluciones y reactivos:

- Tejido a partir del cual se purifica el ADN (musculo del telson de Accol).

- Solución ETS.

.1 M de EDTA.

.05 M de Tris.

.5 % de SDS.

Ajustar el pH a 7.8.

- Solución TN para 25 Ml.

1 M Tris

3.0275 Gr.

.5 M NaCl

.7305 Gr.

Disolver en agua bidestilada, llevar a pH 8.0, aforar a 25 Ml. , filtrar por membrana de .22 um.

- Preparar UNC-fenol.

Disolver en baño maria aproximadamente 100 Ml. de fenol, agregar 25 Ml. de Sol. TN (1 M tris y .5 M de NaCl a pH 8.0), mantener en agitacion por 12 Hrs. a 4 °C.

- Solución cloroformica 24:1 para 100 Ml.

Cloroformo 24 Ml.

96 Ml.

Alcohol isocamilico 1 Ml.

4 Ml.

- Solución TE pH 7.8.

Tris 10 mM.

EDTA 1 mM.

- Bolsa para dialisis.

- Solución TBE 1X (V. apendice).

- Solución 5 M NaCl (V. apendice).

- Solución 3 M acetato de sodio (V. apendice).

- Proteinasa K (V. apendice).

- RNasa 10 mg/ml (V. apendice).



El siguiente protocolo se encuentra estandarizado para 100 mg de tejido, por lo que se deben hacer las correcciones pertinentes para el peso del tejido a procesar.

En este caso particular la toma del tejido se realizó en animales que permanecieron en ayuno por un lapso aproximado de 6 Hrs., el tejido utilizado fue el músculo del tison de Acocil, el cual fue congelado en forma inmediata hasta su uso.

#### PROTODCOLO.

- 1.- 100 mg de tejido se maceran en nitrogeno líquido.
- 2.- El tejido pulverizado se coloca en 2 Ml. de Sol. ETS, al que se le agrega Proteinasa K a una concentración final de 500 ug/ml. y de 30 ug/ml para RNasa.
- 3.- Incubar a 55 °C toda la noche aproximadamente 16 Hrs con 50 rpm.
- 4.- Agregar un Vol. de UNC-Fenol, mezclar suavemente por inversión durante 20 Min a Temp. Amb.
- 5.- Agregar un Vol. de Sol. cloroformica.
- 6.- Mezclar por inversión suavemente durante 20 Min.
- 7.- Centrifugar a 2,700 rpm por 15 Min. tomar la fase acuosa. (realizar nuevamente extracción con UNC-Fenol y sol. cloroformica, para el caso del tejido de acocil fue requerida otra extracción para quitar lo mas posible el colorante, si solo se realiza extracción con fenol se retira de una mejor manera el pigmento).
- 8.- Realizar una extracción a la fase acuosa sólo con cloroformo bajo las mismas condiciones de mezclado y centrifugación.
- 9.- Dializar la fase acuosa contra 2 Lt. de Sol. TE durante 16 Hrs. a 4 °C .
- 10.- Precipitar el ADN al añadir 1/25 de NaCl 5 M o 1/10 de acetato de sodio 3 M, y un Vol. de etanol frío, mezclar gantilmente.
- 11.- Al formarse la malla se retira el etanol por decantación, y se lava la malla con etanol al 70 %.
- 12.- Secar el ADN en un desecador de muestras (aproximadamente 15 Min.)
- 13.- Resuspender el ADN en 500 ul de TE pH 7.5, si la eficiencia es buena la concentración aproximada debe de ser de .3 a .5 ug/ul.
- 14.- Valorar la calidad y cantidad del ADN por espectrofotometria, realizando lecturas a 260 nm y 280 nm, si el cociente entre ambas lecturas resulta mayor a 1.8, la pureza del ADN es aceptable, si resulta de alrededor de 1.5, el ADN puede contener hasta un 50 % de proteina, por lo que se debe de realizar una nueva extracción con UNC-Fenol/ Sol. cloroformica. Para cuantificar el ADN se tiene en consideración que una lectura de A<sup>260</sup> a una longitud de onda de 260 nm una U. de D.O. equivale a 50 ug/ml. de ADN.
- 15.- Checar la cantidad de ADN por densitometria de una fotografía de un gel de agarosa al 1 % en TBE, colocando una curva de concentración con ADN control. En este mismo paso se valora la presencia de ARN, de existir este se expone el ADN a RNasa.

#### 15.- PROTOCOLO DE TRANSFERENCIA DE PLACAS.

Soluciones y reactivos:

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

15.- PROTOCOLO DE TRANSFERENCIA DE PLACAS.

## Soluciones y reactivos:

- Solución 20 X SSC (V. apéndice).
- Solución Tris 2 M pH 7.5 (V. apéndice).
- Solución 10 N NaOH (V. apéndice).
- Solución desnaturalizante para 100 ML.
  - .1 M de NaOH 1 ML. NaOH 10 N.
  - 1.5 M de NaCl 8.76 Gr. NaCl.

Aforar a 100 ML. no es necesario filtrar la solución.

- Solución amortiguadora para 100 ML.
  - .2 M Tris pH 7.5 10 ML. tris 2 M pH 7.5.
  - 2 X SSC 10 ML. 20X SSC.

Aforar a 100 ML. no es necesario filtrar la solución.

- Solución salina para 100 ML.
  - 2 X SSC 10 ML. 20X SSC.

Aforar a 100 ML. no es necesario filtrar la solución.

- Cajas de Petri con placas a transferir ( pueden ser de 100 mm o 150 mm de diámetro).
- Filtros de nitrocelulosa con poro de .45  $\mu$ M, de diámetro adecuado para las cajas (82.5 mm. para las cajas de 100 mm y de 142 mm para las cajas de 150 mm. ).
- Papel de cromatografía 3 MM chr.
- Aguja hipodérmica con calibre número 21.
- Guantes desechables.

## PROTOCOLO:

- 1.- Colocar las cajas a ser transferidas por lo menos 1 Hr. a 4  $^{\circ}$ C.
- 2.- Marcar con bolígrafo los filtros de nitrocelulosa con fecha y número de identificación para la caja, así como también marcar su duplicado ( utilizar guantes para tomar el filtro).
- 3.- Utilizando para la transferencia el lado que no fue marcado, colocar suavemente el filtro sobre las placas a transferir, dejar que la nitrocelulosa se adhiera por sí sola a la agarosa, mantener el filtro por 10 Min.
- 4.- Retirar el filtro con pinzas y permitir que se seque sobre papel de cromatografía 3 MM Chr durante 10 Min. con la cara que tiene las placas transferidas hacia arriba. (repetir este paso para el duplicado).
- 5.- Humedecer en distintos refractarios 3 pedazos de papel para cromatografía, con cada una de las soluciones de transferencia (solución desnaturalizante, solución amortiguadora y solución salina).
- 6.- Humedecer los filtros en el papel de cromatografía con la cara que presenta la transferencia hacia arriba, durante 2 Min., hacerlo con cada una de las soluciones de transferencia en el siguiente orden:
  - 1 - Solución desnaturalizante.
  - 2 - Solución amortiguadora.
  - 3 - Solución salina.
- 7.- Secar durante 10 Min. igual que en el paso 4.
- 8.- Hornear los filtros durante 120 Min. a 80  $^{\circ}$ C. cada filtro de nitrocelulosa debe de estar separado por papel de cromatografía.
- 9.- Hibridar los filtros.

16.- PROTOCOLO DE HIBRIDACION EN PLACA CON LOS OLIGONUCLEOTIDOS HGP-2.

Soluciones y reactivos:

- Bolsas de hibridación.
- Sellador de bolsas.
- Baños de incubación.
- Contador Geiger.
- Oligonucleotido marcado.

|                    |            |                               |
|--------------------|------------|-------------------------------|
| - Solución NET 20X | para       | 1 Lt.                         |
| 3 M NaCl           | 175.05 Gr. | NaCl.                         |
| 20 mM EDTA         | 7.44 Gr.   | EDTA.2 Na.2 H <sub>2</sub> O. |
| .3 M Tris          | 36.34 Gr.  | tris.                         |

Disolver en 600 Ml., llevar a pH 7.5 con HCl 1 N., aforar a 1 Lt. y filtrar por membrana de 0.22 µm.

- Acido desoxirribonucleico de salmón sonicado 10 mg/ml (ADNs).
- Solución de SDS al 10 %.
- Solución Denhardt 50 X.
  - 1 % de Ficoll.
  - 1 % de Albumina serica bovina (Fracción V).
  - 1 % de Polivinilpirrolidona.
- Solución 20 X SSC.

PROTOCOLO:

- 1.- Preparar solución de prehibridación. Para 10 filtros de nitrocelulosa de 142 mm. de diametro se utilizaron rutinariamente 50 Ml.
 

|               |        |                        |
|---------------|--------|------------------------|
| 6 X NET       | 15 Ml. | de sol. 20 X NET.      |
| 10 X Denhardt | 10 Ml. | de sol. 50 X Denhardt. |

 Llevar a un volumen muy cercano a 50 Ml con agua bidestilada, mezclar. Añadir .5 Ml. de una sol. de SDS al 10 % y 375 ul. de ADNs previamente hervido durante 10 Min., aforar a 50 Ml.
- 2.- Colocar los filtros en una bolsa de hibridación lo suficientemente grande que permita tener por separado los filtros en dos paquetes de 5 Filtros, agregar la solución de prehibridación, sellar la bolsa.
- 3.- Prehibridar a 45 °C con ligera agitación 40 rpm durante 3 Hrs.
- 4.- Preparar sol. de hibridación, esta solución debe realizarse en el menor Vol. posible que permita contar con una concentración de 5 a 10 millones de cpm por Ml. de sol. de hibridación. Para los 10 filtros de nitrocelulosa de 142 mm de diametro se utilizaron 10 Ml.
 

|                        |        |                       |
|------------------------|--------|-----------------------|
| 6 X NET                | 3 Ml.  | de Sol. 20 X NET.     |
| 10 X Denhardt          | 2 Ml.  | de Sol. 50 X Denhardt |
| .1 % DE SDS x          | .1 Ml. | de Sol. 10 % SDS.     |
| Oligonucleotico cinado |        | volumen variable.     |
| H <sub>2</sub> O       |        | aforar a 10 Ml.       |

 # Tener la misma precaución que se tuvo en el paso 1 para el SDS.
- 5.- Terminado el tiempo de prehibridación se mezcla la sol. de un extremo a otro de la bolsa, sujetando un grupo de los filtros en uno de los extremos, esto se hace varias veces hasta contar con todos los filtros en un solo paquete.
- 6.- Sacar toda la solución de prehibridación posible, haciendo presión sobre la bolsa con una pipeta.
- 7.- Agregar la solución de hibridación y sellar la bolsa. Al sellar la bolsa se debe de tener cuidado de reducirla lo más posible, sin dejar burbujas de aire en la sol. de hibridación.
- 8.- Incubar a la temperatura de hibridación seleccionada durante 12 a 14 Hrs.

- con 40 rpm, (el rastreo rutinario empleado con el oligonucleótido HDP-2 se realiza a 40 °C).
- 9.- Lavar los filtros con Sol. 6 X SSC que contenga .5 Gr de fosfato de sodio monobásico por Lt. de Sol., bajo los siguientes tiempos:
    - 15 Min. a Temp. Amb. con 50 rpm.
    - Cambiar la solución.
    - 15 Min. a Temp. Amb. con 50 rpm.
  - 10.- Realizar 2 tiempos más de lavado de 15 Min. a una Temp. 5 °C más alta de la sol. de hibridación, con sol. 6X SSC fosfato precalentada.
  - 11.- Valorar con un Geiger la señal emitida por el filtro, debe encontrarse entre .1 y .2 mR por Hr. en escala de 1 X, en caso de que no sea así lavar a una temp. mas alta ( en el caso de que se este haciendo un segundo rastreo de una clona positiva , por el alto numero de clones positivas, el valor puede llegar hasta .4 mR por Hr.).
  - 12.- Permitir secar el filtro.
  - 13.- Exponer aproximadamente 24 Hrs. si se realiza un Southern o entre 2 a 6 Hrs. cuando se realiza en placa.

#### 17.- PROTOCOLO PARA LA PURIFICACION DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

##### Soluciones y reactivos:

- Solución de bromuro de etidio.
- Solución de lavado TEN.
  - .01 mM de Tris.
  - .1 mM de EDTA.
  - .1 M de NaCl.
- Solución de elución.
  - 1 M de NaCl.
- Fenol saturado.
- Solución cloroformica 24/1.
- Jeringas de 1 Ml.
- Etanol frío.
- Solución TE.
- Tubos de centrifuga de 15 Ml.
- Agarosa ultrapura grado ADN.
- Solución TBE 1 X.
- Papel de cromatografía DE-81.

##### PROTOCOLO:

- 1.- Preparar un gel de agarosa en TBE 1 X a la concentración que permita una mejor resolución de la banda a purificar, (para el porta gel de la cámara de ERL N° 1085 Mod. H3, se agrega 65 Ml. de agarosa en TBE 1X, utilizando el peine de 1 mm. de ancho con 14 dientes, colocar una cinta adhesiva sobre 3 dientes para formar el carril preparativo.
- 2.- Colocar en dos pozos alejados al preparativo, parte de la muestra y un marcador de peso molecular, en un Vol. no mayor de 10 ul. incluyendo colorante, el Vol. de carga para el gel preparativo no debe de contar con mas de 100 ul. incluyendo 20 ul de colorante.
- 3.- Correr el gel a 7 mAmp. , manteniendo constante la corriente durante aproximadamente 12 - 14 Hrs.
- 4.- Cortar con una navaja el fragmento de gel que incluya los dos carriles alejados al preparativo mencionados en el paso 2, teñir este fragmento con bromuro de etidio, ubicar la banda de ADN a purificar por medio de

- luz ultravioleta, hacer una pequeña muesca de 1 a 2 mM. al frente de la banda, regresar el fragmento de gel a su lugar.
- 5.- Hacer un corte al gel con navaja sobre la trayectoria del pozo preparativo, tomando como referencia la muesca realizada.
  - 6.- Colocar en la hendidura con unas pinzas una tira de papel DE-91 de aproximadamente .5 cm. de alto.
  - 7.- Reiniciar la corrida a 100 Volts aproximadamente 35 mAmp., para permitir que el ADN se fije en el papel (aproximadamente 30 Min).
  - 8.- Tomar con pinzas el papel y colocarlo en una camisa de jeringa de 1 Ml., llevar al fondo de la jeringa el papel con el embolo de la misma, retirar el embolo, colocar la camisa en un tubo de centrifuga de 15 Ml.
  - 9.- Agregar 200 ul. de Sol. de lavado.
  - 10.- Centrifugar a 2700 rpm durante 1 Min., repetir 2 veces el lavado.
  - 11.- Colocar un tubo Eppendorf al que previamente se le corto la tapa en el fondo del tubo de 15 Ml., agregar 200 ul. de sol. de elución, centrifugar a 2700 rpm 1 Min., repetir la elución 2 veces.
  - 12.- Sacar el tubo Eppendorf y agregar 500 ul. de fenol, agitar 2 Min., añadir 400 ul de Sol. clorofórmica, agitar 2 Min., centrifugar a máxima velocidad por 1 Min a Temp. Amb. en microfuga.
  - 13.- Tomar la fase acuosa, teniendo cuidado de no llevarse fenol (dejar un poco de Vol. aproximadamente 10 ul), repetir extracción con 500 ul de Sol. clorofórmica, agitar 2 Min., centrifugar 30 Seg. a Max. Vel. en microfuga a Temp. Amb., tomar 500 ul de la fase acuosa.
  - 14.- Precipitar el ADN agregando 1 Ml. de etanol frío, colocar en hielo seco etanol, dejar 1 Hr. por lo menos.
  - 15.- Centrifugar durante 10 Min. a 4 °C a Max. Vel. en microfuga, desechar el etanol por decantación.
  - 16.- Lavar el ADN con 400 ul de etanol al 70 % Frío, centrifugar por 5 Min. a Max. Vel. a 4 °C, descartar el etanol.
  - 17.- Sacar el ADN.
  - 18.- Resuspender el ADN en un Vol. pequeño, aproximadamente 20 ul. de TE.
  - 19.- Cuantificar el ADN por electroforesis en Gel y densitometria.
  - 20.- Ajustar la concentración requerida.

#### 18.- PROTOCOLO DE TRANSFERENCIA DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

##### Soluciones y reactivos:

- Gel con ADN a transferir.
- Sol. bromuro de etidio.
- Papel para cromatografía 3 MM Chr.
- Nitrocelulosa con poro de .45 ul.
- Sol. desnaturante para 500 Ml.
  - .5 M NaOH 25 Ml. de NaOH 10 N.
  - 1.5 M NaCl 3.8 Gr. de NaCl.
- Aforar a 500 Ml., no es necesario filtrar la solución.
- Sol. Amortiguadora para 500 Ml.
  - .5 M Tris 125 Ml. de Tris 2 M pH 7.5.
  - 3 M NaCl 87.7 Gr. de NaCl.
- Aforar a 500 Ml., no es necesario filtrar la solución.
- Solución 20 X SSC.

##### PROTOCOLO:

- 1.- Teñir el gel con bromuro de etidio.
- 2.- Tomar una fotografía del gel, exponer el menor tiempo posible a la luz

- ultravioleta , utilizar de preferencia longitud de onda larga.
- 3.- Enjuagar el gel con agua desionizada.
  - 4.- Dejar el gel con Sol. desnaturalizante 1 Hr. a Temp. Amb. con 50 rpm. , cambiar la Sol., dejar otra Hr.
  - 5.- Enjuagar el gel con agua destilada, agregar Sol. amortiguadora, dejar una Hr. a Temp. Amb. a 50 rpm. cambiar la Sol. , dejar una hora mas.
  - 6.- Cortar dos pedazos de papel para cromatografía 3 MM Chr del tamaño del gel a transferir, utilizar uno como molde para cortar un fragmento de nitrocelulosa.
  - 7.- Humedecer la nitrocelulosa en agua desionizada y posteriormente mojarla con Sol. 20 X SSC . humedecer un pedazo de papel 3 MM chr, colocar sobre un cristal a manera de puente en un refractario.
  - 8.- Colocar el gel sobre el puente de papel ( ver figura), sacar todas las burbujas que se encuentran debajo del gel con ligera presión sobre este con pipeta, colocar sobre el gel en el siguiente orden la nitrocelulosa, papel de cromatografía, toallas absorbentes , cristal y un peso que proporcione una fuerza aproximada de 500 Gr. Es necesario que se coloque alrededor del gel una película plástica que evite que la solución 20 X SSC no pase por fuera del gel a las toallas absorbentes. ( es importante destacar que debe de manejarse la nitrocelulosa con pinzas).
  - 9.- Dejar aproximadamente 14 Hrs. a Temp. Amb.
  - 10.- Hornear el filtro de nitrocelulosa durante 2 Hrs. a 80 °C.
  - 11.- Hibridar.

Si el filtro no es utilizado de inmediato , se puede guardar entre papel de cromatografía en una bolsa de hibridación sellada hasta utilizarlo.

#### 19.- PROTOCOLO DE PURIFICACION DE FLASMIDO A GRAN ESCALA.

Este protocolo fue empleado para purificar el ADN doble cadena del fago M-13, para el procedimiento de subclonación.

##### Soluciones y reactivos:

- Medio de cultivo LB-Mg.
- Solución .5 M de EDTA pH 8.0, pH 7.8 (V. apéndice).
- Solución 10 % de Triton X 100.
- Solución EDTA pH 8.0 .
- Solución Tris 1 M. pH 8.0, pH 7.8 (V. apéndice).
- Solución NaCl 5 M.
- Solución TES para 100 Ml.  
 Tris 50 mM pH 8.0 5 Ml. de Tris 1 M pH 8.0.  
 EDTA 1 mM pH 8.0 .2 Ml. de EDTA .5 M pH 8.0.  
 Sacarosa 25 % 25 Gr. de Sacarosa.

Aforar a 100 Ml. y filtrar por membrana de .22 µm.

- Solución lítica 3 X triton.  
 3 Ml. de Sol. de triton al 10 %.  
 75 Ml. de .25 M EDTA pH 8.0.  
 15 Ml. de 1 M Tris pH 8.0.  
 7 Ml. de agua.
- Lisozima.

- RNAsa 10 mg/Ml.
- Ioduro de propidio 2 mg/Ml.
- Solución TNE para 100 Ml.  
 20 mM de Tris pH 7.8      2 Ml. de Tris 1 M pH 7.8.  
 1 M de NaCl                    20 Ml. de NaCl 5 M.  
 1 mM de EDTA pH 7.8      .2 Ml. de EDTA .5 M pH 7.8.
- Solución TE pH 7.5.
- Fenol saturado.
- Cloroformo.
- Solución 30 % de PEG.
- Cloruro de cesio.
- Tubos para ultracentrifuga para rotor SW-50.1.

PROTODCOLO:

- 1.- Inocular 500 ml de medio LB-Mg, con una placa de lisis mas 500 ul. de células para plaquear en un matraz Fembak, incubar a 37 °C con 200 rpm. durante 10 a 12 Hrs.
- 2.- Centrifugar a 6000 rpm en un rotor JA-10, durante 6 Min. , descartar el sobrenadante por decantación, retirar el exceso de medio con una toalla absorbente.
- 3.- Resuspender gentilmente las células en 45 Ml. de Sol. TES.
- 4.- Añadir 6.75 Ml. de una Sol. .5 M de EDTA pH 8.0 ,40 mg. de lisozima, 4 Ml. de RNAsa , Mezclar e incubar durante 15 Min. a Temp. Amb.
- 5.- Añadir 13.5 Ml. de mezcla lítica 3 X triton incubar 15 Min. a Temp. Amb.
- 6.- Centrifugar a 18000 rpm durante 40 Min. a 4 °C en un rotor JA-20.
- 7.- Tomar el sobrenadante con puntas azules a las cuales se halla cortado su punta (puntas cortadas), añadir un Vol. de H<sub>2</sub>O, dividir el Vol. total en fracciones de 15 Ml. en tubos Falcon de 50 Ml.
- 8.- Añadir un Vol. de fenol saturado, mezclar gentilmente durante 5 Min.
- 9.- Añadir un Vol. de cloroformo, Mezclar gentilmente durante 5 Min. mas.
- 10.- Centrifugar a 1800 rpm durante 15 Min. a Temp. Amb. en centrífuga de mesa.
- 11.- Tomar sobrenadante con puntas azules cortadas, realizar dos extracciones mas con fenol/cloroformo (pasos 8,9,10).
- 12.- Realizar una extracción con solo cloroformo.
- 13.- Añadir .2 Vol. de 5 M NaCl y .33 Vol. de PEG 30 %, mezclar y dejar 0 °C toda la noche, 2 Hrs. si se deja a -10 °C , o bien congelar a -70 °C y descongelar.
- 14.- Centrifugar a 9000 rpm durante 20 Min. a 4 °C, en un rotor JA-20. descartar el sobrenadante por decantación.
- 15.- Resuspender en 5 Ml. de Sol. TNE por tubo y precipitar el ADN con 2 Vol. de etanol frío.
- 16.- Centrifugar a 7000 rpm a 4 °C durante 5 Min.
- 17.- Descartar el etanol, lavar el ADN con etanol al 70 %.
- 18.- Resuspender el ADN en Sol. TE 1 Ml. por tubo.
- 19.- Cuantificar ADN por electroforesis en gel.
- 20.- Colocar gradiente de cloruro de cesio, a 2.1 Ml. de Sol. de ADN( con no mas de 500 ug) agregar 2.15 Grs. de CsCl por tubo de ultracentrifuga rotor (SW 50.1), mezclar por inversión cubriendo la tapa con un papel parafilm, cuando se halla disuelto todo el cesio añadir 150 ul de una sol. de ioduro de propidio con una concentración de 2 mg/Ml., mezclar por inversión en oscuridad parcial, cubrir con 2 a 3 ml de aceite mineral, centrifugar a 38000 rpm durante 20 Hrs.

- 21.- Al término de la corrida visualizar la banda de ADN bajo iluminación con luz UV. de longitud de onda larga, recuperar el ADN con los siguientes pasos ;
- Perforar con una aguja la base del tubo, teniendo cubierta la boca del tubo con un dedo (Utilizar Guantes).
  - Permitir que salga la Sol. del gradiente lentamente a través del orificio, procurar no hacer movimientos bruscos para evitar romperlo.
  - Recolectar el ADN en un tubo Eppendorf cuando la banda salga por el orificio.
  - Hacer extracción con 1 Vol. de alcohol isobutilico, para retirar el yoduro de propidio, repetir las extracciones hasta que se pierda el color rosado del yoduro o pasar por una columna de Dowex 50 W0-X8.
- 22.- Dializar contra dos Lt. de Sol. TE a 4 °C durante 12 Hrs.
- 23.- Al término de la diálisis, tomar una alícuota para cuantificar la calidad y cantidad de ADN.
- 24.- Precipitar el ADN con 1 / 10 de acetato de sodio 3 M Ph 5.2 y 2 Vol. de etanol, resuspender en Sol. TE a una concentración final de .5 µg/µl, teniendo en cuenta el valor del paso 23.

20.- PROTOCOLO DE PURIFICACION DE DOBLE CADENA PARA EL FAGO M13 (A PEQUEÑA ESCALA).

Soluciones y reactivos:

- |                       |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| - Solución STET       | para 100 Ml                 |
| 8 % Sacarosa          | 8 Gr. de Sacarosa.          |
| .5 % Triton X-100     | .5 Ml. de triton X 100      |
| 50 mM EDTA            | 10 Ml. de EDTA .5 M pH 8.0. |
| 10 mM Tris.HCl pH 8.0 | 1 Ml. de Tris 1 M pH 8.0.   |
- RNAsa 10 mg/Ml.
  - Lisozima 10 mg/Ml.
  - Medio LB-Mg 1 X.
  - Células JM-101.
  - Solución TE.
  - Fenol saturado.
  - Cloroformo.
  - Etanol frío.
  - Etanol frío al 70 %.
  - Acetato de sodio 3 M pH 5.2.

PROTOCOLO:

- 1.- Inocular 5 Ml. de medio LB-Mg con 125 ul. de células JM-101 mas una placa de lisis del fago seleccionado, o 1/10 del Vol. donde se halla resuspendido, (utilizar un tubo falcon de 50 Ml).
- 2.- Incubar a 37 °C con 200 rpm durante 4 o 5 Hrs. ( en caso de utilizar una placa) o 5 a 6 Hrs. ( para un décimo de suspensión de una placa).
- 3.- Centrifugar 15 Min. a 2800 rpm a Temp. Amb.
- 4.- Tomar el sobrenadante con pipeta pasteur (guardarlo para la purificación de cadena sencilla), tener cuidado de no dejar medio, retirar las gotas de la pared con isopo de algodón.
- 5.- Resuspender en 350 ul de STET.
- 6.- Añadir 5 ul de RNAsa y 25 ul de lisozima ( solución fresca que contenga 10 mg/Ml. en TE), agitar 3 Seg.
- 7.- Colocar el tubo en agua hirviendo , durante 40 Seg., centrifugar



- inmediatamente, durante 10 Min. a Max. Vel. a Temp. Amb. en microfuga, remover el detrito celular con un palillo.
- 8.- Agregar un Vol. de fenol, mezclar por 2 Min. agregar 1 Vol. de cloroformo, Mezclar durante 2 Min., centrifugar 1 Min. a Max. Vel. a Temp. Amb.
  - 9.- Tomar la fase acuosa, agregar 300 ul de cloroformo, mezclar durante 2 Min., centrifugar 30 Seg. a Max. Vel. a Temp. Amb.
  - 10.- Tomar 300 ul de la fase acuosa, precipitar el ADN con 30 ul de acetato de sodio 3 M y 350 ul de alcohol isopropílico, mezclar, congelar en un baño de hielo seco etanol durante 15 Min.
  - 11.- Centrifugar durante 10 Min. a Max. Vel. en microfuga a Temp. Amb., lavar el ADN con etanol al 70 %, secar y resuspender en 40 ul de TE, el rendimiento de ADN fluctúa entre 5 a 10 ug.

## 21.- PROTOCOLO PARA PURIFICAR ADN CADENA SENCILLA DEL FAGO M13.

### Soluciones y reactivos:

- Solución PN.  
20 % de polietilenglicol.  
2.5 M de NaCl.
- Solución TE pH 8.0.
- Fenol saturado.
- Cloroformo.
- Acetato de sodio 3 M pH 5.2.
- Etanol absoluto frío.
- Etanol al 70 % frío.

### PROTOCOLO.

- 1.- Tomar el sobrenadante obtenido del protocolo N<sup>o</sup> 20 en el paso 4.
- 2.- Agregar .25 Vol. de la solución PN, mezclar por inversión, vortexear gentilmente, dejar el tubo a Temp. Amb. durante 15 Min.
- 3.- Centrifugar a 10000 rpm en rotor JA-20 a 4 °C durante 5 Min.
- 4.- Descartar el sobrenadante por decantación, retirar el exceso de medio con isopo de algodón.
- 5.- Resuspender la pastilla en 200 ul de Sol. TE (pH 8.0), vortexear a Max. Vel., pasar el Vol. a un tubo Eppendorf.
- 6.- Añadir 100 ul de fenol, agitar durante 30 Seg., dejar la muestra a Temp. Amb. durante 1 Min., agitar nuevamente por otros 30 Seg.
- 7.- Centrifugar la muestra a Max. Vel. en microfuga a Temp. Amb. por 1 Min., tomar la fase acuosa, colocarla en otro tubo Eppendorf y añadir 1 Vol. de cloroformo, mezclar durante 2 Min., centrifugar a Max. Vel. a Temp. Amb. durante 30 Seg., tomar la fase acuosa. Durante las extracciones no intentar llevarse toda la fase acuosa, el mejor templado para secuencia se obtiene cuando se deja un poco de Sol. acuosa en la interfase aproximadamente 10 ul.
- 8.- Agregar 600 ul de una mezcla de 25:1 de etanol absoluto:3 M acetato de sodio (pH 5.2), Mezclar y guardar toda la noche a - 20 °C.
- 9.- Centrifugar a Max. Vel. a 4 °C durante 10 Min., retirar sobrenadante por decantación, recentrifugar el tubo por otros 15 Seg. y retirar cualquier remanente de Sol. con pipeta volumétrica.
- 10.- Añadir etanol al 70 %, vortexear brevemente y centrifugar nuevamente en las condiciones anteriores, remover el etanol de la misma manera.
- 11.- Secar el ADN y resuspender en 20 ul de Sol. TE.

APENDICE.

- Medio para cultivo LB-Mg 1 X. para preparar 1 Lt.
 

|                      |       |  |
|----------------------|-------|--|
| Bactotripton         | 1 %   | 10 Gr.                                 |
| NaCl                 | 1 %   | 10 Gr.                                 |
| Extracto de levadura | .5 %  | 5 Gr.                                  |
| MgCl <sub>2</sub>    | 10 mM | 10 Ml. de Sol. 1 M MgCl <sub>2</sub> . |

Disolver en 800 ml., ajustar a pH 7.5 con Sol. 1 N de NaOH, aforar a 1 000 ml y esterilizar.
- Agar al .7 % o agarosa blanda al .5 % para preparar 100 Ml.
 

Agregar .5 Gr. de agarosa de bajo punto de gelificación en 100 ml. de medio LB-Mg, esterilizar, al terminar esterilización mezclar gentilmente hasta disolver totalmente la agarosa. Utilizar agar al 7 % en los protocolos de titulación, pero en los de transferencia de placas siempre utilizar agarosa.
- Cajas petri al 2 % de agar para preparara 40 cajas.
 

Agregar 20 Gr. de agar a 1 Lt. de medio LB-Mg, esterilizar, al termino de la esterilización, agitar gentilmente hasta disolver el agar (evitar la formación de burbujas), esperar a que se enfríe lo suficiente para poder vertir el medio en las cajas.
- Solución acetato de sodio 3 M.
 

Para preparar 100 Ml. pesar 24.509 Gr., disolver en 60 Ml., llevar a pH 5.2 con ácido acético grado Buffer, aforar a 100 Ml, filtrar por membrana de .22 µm y alicuotar.
- Solución TBE 10X. para preparar 1 Lt.
 

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| .89 M de Tris-base                    | 108 Gr. |
| .89 M de cido bórico                  | 55 Gr.  |
| .02 M de EDTA.2 H <sub>2</sub> O.2 Na | 9.3 Gr. |

Ajusta solo aproximadamente pH 8.0.
- Solución TBE 1X. para prepara 1 Lt.
 

A 100 Ml. de solución TEE 10X agregar 900 Ml. de agua desionizada.
- Solución 5 M NaCl para preparara 100 Ml.
 

Disolver 29.22 Gr. de NaCl en agua desionizada destilada, aforar a 100 ml. filtrar y esterilizar.
- Solución de NaOH 10 N para preparar 100 Ml.
 

Disolver 40 Gr. de NaOH en 50 Ml, aforar a 100 Ml, esterilizar.
- Solución de NaOH 1 N para preparar 100 Ml.
 

Disolver 4 Gr. de NaOH en 70 Ml, aforar a 100 Ml., esterilizar.
- Solución SSC 20X para preparar 1 Lt.
 

|      |     |                 |
|------|-----|-----------------|
| NaCl | 3 M | 175.3 Gr. NaCl. |
|------|-----|-----------------|

Citrato de sodio .3 M 88.2 Gr. citrato de sodio.

Disolver en agua desionizada, filtrar por membrana de .22 µm, guardar hasta su uso a Temp. Amb.

- Solución 10 % SDS para prepara 100 Ml.  
Disolver 10 Gr. de SDS en 80 Ml., aforar a 100 Ml, filtrar por membrana de .22  $\mu$ M, esterilizar.
- Solución 1 N HCl para preparar 100 Ml.  
A 91.38 ml. de agua añadir 8.62 ml. de HCl concentrado, guardar en frasco color ambar.
- Solución de bromuro de etidio 10 mg/ml. para preparar 20 Ml.  
Disolver .2 Gr. de bromuro de etidio en 20 Ml.
- Solución de acrilamida al 40 % (3B/2) para preparar 400 Ml.  
Disolver 152 Gr. de acrilamida y 8 Gr de Bis-acrilamida, aforar a 400 Ml. filtrar por membrana de .45  $\mu$ M, guardar en frascos color ambar hasta usarse a 4 °C.
- Solución de acrilamida al 20 % S M urea para preparar 100 ml.  
Añadir 48 Gr. de Urea y 10 ml. de Sol. TBE 10X a 50 ml de Sol. acrilamida al 40 %, afora por si solo a 100 ml., Filtrar por membrana de .45  $\mu$ M, guardar a temperatura ambiente en frasco color ambar.
- Solución 1 M  $MgCl_2$ .  
En vista de la gran hidrosopicidad del  $MgCl_2$ , siempre se preparó a partir de una botella de 500 Gr. una Sol. 4 M al llevar su contenido a aproximadamente 610 Ml.
- Solución de EDTA .5 M a pH 8.0 y 7.8.  
Disolver 18.61 Gr. de EDTA y 2.3 Gr. de NaOH en agua bidestilada esteril en aproximadamente 60 ml., llevar a pH adecuado con Sol. 10 N de NaOH, aforar a 100 ml , filtrar por membrana de .22  $\mu$ M y esterilizar.
- Solución de EDTA al .25 M a pH 8.0 y 7.8 para preparar 100 ml.  
Disolver 9.3 Gr. de EDTA y 1 Gr. de NaOH en 60 Ml. de agua bidestilada esteril, ajustar el pH al requerido con Sol. 10 N NaOH, aforar a 100 ml., filtrar por membrana de .22  $\mu$ M, esterilizar.
- Solución de Tris 1 M pH 7.4, 7.5, 7.8, 8.0 para preparar 100 Ml.  
Disolver 12.1 Gr. en 60 Ml. , ajustar al pH requerido con HCl concentrado, aforar a 100 ml., filtrar por membrana de .22  $\mu$ M y esterilizar.
- Solución de Tris 2 M pH 7.5 para preparar 500 Ml.  
Disolver 121.1 Gr. de Tris en 300 Ml de agua bidestilada esteril, ajustar a pH 7.5, con ácido clorhídrico concentrado, filtrar por membrana de .22  $\mu$ M y esterilizar.
- Solución TE pH 7.5 para preparar 100 ml.  
Tris 10 mM 1 ml. de Sol. Tris 1 M pH 7.5.  
EDTA 1 mM .2 ml. de Sol. EDTA .5 M pH 8.0.
- Solución TE pH 7.8 para preparar 100 ml.  
Tris 10 mM 1 ml. de Sol. Tris 1 M pH 7.8.  
EDTA 1 mM .2 ml de Sol. EDTA .5 M pH 8.0.

- Solución TM para preparar 1 Lt.  
Tris 20 mM 20 ml. de Sol. Tris 1 M pH 7.4.  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM 10 ml. de Sol. MgCl<sub>2</sub> 1 M.
- Solución ATP .1 M para preparar 1 ml.  
Pesar 60 mg, disolver en 800 ul de agua bidestilada estéril, llevar a pH 7.5 con 1 M NaOH, ajustar el volumen a 1 ml., colocar la Sol. en pequeñas alícuotas (100 ul), congelar y almacenar a -70 °C.

## IX REFERENCIAS

1. Acher, R. and J. Chauvet. 1988. . *Biochimie* 70:1197-1207.
2. Adler, G.K., C. M. Smas, M. Fiandaca, D. M. Frim, and J. A. Majzoub. 1990. Regulated expression of the human corticotropin releasing hormone gene by cyclic AMP. *Mol. Cell. Endocrinol.* 70:165-174.
3. Affolter, H-U. and T. Reisine. 1985. Corticotropin Releasing Factor Increases Proopiomelanocortin Messenger RNA in Mouse Anterior Pituitary Tumor Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 260:15477-15481.
4. Akil, H., S. J. Watson, E. Young, M. E. Lewis, Khachaturian, H., and J. M. Walker. 1984. . *Annu. Rev. Neurosci.* 7:223-255.
5. Albert, P.R., K. A. Neve, J. R. Bunzow, and O. Civelli. 1990. Coupling of a Cloned Rat Dopamine-D2 Receptor to Inhibition of Adenylyl Cyclase and Prolactin Secretion. *The Journal Of Biological Chemistry* 265:2098-2104.
6. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York & London..
7. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1989. The Nervous System. In *Molecular Biology of The Cell*. M. Robertson, editor. Garland Publishing, New York y London. 1059-1136.
8. Aiberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1989. Basic Genetic Mechanisms. In *Molecular Biology the Cell*. M. Robertson, editor. Garland Publishing, New York y London. 201-274.
9. Ar chiga, H. and F. Mena. 1974. Circadian Variations of Hormonal content in the Nervous System of the Crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A:581-584.
10. Aronin, N., S. M. Sagar, F. R. Sharp, and W. J. Schwartz. 1990. Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:5959-5962.
11. Berent, S.L., M. Mahmoudi, R. M. Torczynski, P. W. Bragg, and A. P. Bollon. 1985. Comparison of oligonucleotide and long ADN fragments as probe in ADN and RNA Dot, Sourthen, Northen, Colony an Plaque Hybridization. *Biotechniques* 208-220.
12. Berridge, M.J. 1991. The molecular Basis of the Communication within the Cell. The number of substances serving as signals in cells is remarkably small. Each such "second messenger" is a crucial guide for the cell, helping to determine how the cell responds to the organism's needs. *Science*
13. Berridge, M.J. and R. F. Irvine. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *NATURE* 312:315-320.
14. Berridge, M.J. and C. W. Taylor. 1991. Inositol Trisphosphate and Calcium Signaling. *Science*
15. Brabant, G., K. Ocran, U. Renft, A. Von Zur Mühlen, and R. D. Hesck. 1989.

Physiological regulation of thyrotropin. *Biochimie* 71:293-301.

16. Britto, A.L., A. M. Castrucci, M. A. Visconti, and L. Josefsson. 1990. Quantitative in vitro assay for crustacean chromatophorotropins and other pigment cell agonists. *Pigment. Cell. res.* 3:28-32.

17. Busch, S.J. and P. Sassone-Corsi. 1990. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *TIG FEBRUARY* 6:36-40.

18. Carter, D.A. and D. Murphy. 1991. Rapid Changes in Poly (A) Tail Length of Vasopressin and Oxytocin mRNAs Form a Common Early Component of Neurohypophyseal Peptide Gene Activation following Physiological Stimulation. *Neuroendocrinology* 53:1-6.

19. Chang, E.S., M. J. Bruce, and R. W. Newcomb. 1987. Purification and Amino Acid Composition of a Peptide with Molt-Inhibiting Activity from Lobster, *Homarus americanus*. *General and Comparative Endocrinology* 65:56-64.

20. Chang, E.S., G. D. Prestwich, and M. J. Bruce. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *homarus americanus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 171:818-826.

21. Chang, E.S., G. D. Prestwich, and M. J. Bruce. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171:818-826.

22. Chang, F-H. and H. R. Bourne. 1987. Dexamethasone Increases Adenylyl Cyclase Activity and Expression of the alpha-Subunit of Gs in GH3 Cells. *Endo.* 121:1711-1715.

23. Clayton, R.N. 1989. Gonadotrophin-releasing hormone: its actions and receptors. *J. Endocr.* 120:11-19.

24. Cackle, S.M. and D. G. Smyth. 1986. Processing of the thyrotropin releasing hormone (TRH) precursor in *Xenopus* skin and bovine hypothalamus: evidence for the existence of extended forms of TRH. *Regulatory Peptides.* 14:217-227.

25. Conlon, J.M., M. Reinecke, M. C. Thorndyke, and S. Falkmer. 1988. Insulin and Other Islet Hormones (Somatostatin, Glucagon and PP) in the Neuroendocrine System of Some Lower Vertebrates and that of Invertebrates-A Mini-review. *Horm. metabol. Res.* 20:406-410.

26. Connolly, T. and R. Gilmore. 1989. The Signal Recognition Particle Receptor Mediates the GTP-Dependent Displacement of SRP from the Signal Sequence of the Nascent Polypeptide. *Cell.* 57:599-610.

27. Cooke, I.M. and R.E. Sullivan. 1982. Hormones and Neurosecretion. In *The Biology of Crustacea*. D.E. Bliss, editor. New York. 206-289.

28. Cote, T.E., R. Felcer, J. W. Kebabian, R. D. Sekura, T. Reisine, and H-U. Affolter. 1986. D-2 Dopamine Receptor-mediated Inhibition of Pro-opiomelanocortin Synthesis in Rat Intermediate Lobe. *The Journal Of Biological Chemistry* 261:4555-4561.

29. Covarrubias, L., J. L. Charli, M. A. Vargas, J. L. Redondo, and P. Joseph-Bravo. 1991. TRH Release Responsiveness to High Potassium in Vitro Correlates with TRH mRNA Levels in Vivo. *en preparacion*
30. Covarrubias, L., R. M. Uribe, M. M. ndez, J. L. Charli, and P. Joseph-Bravo. 1988. Neuronal TRH Synthesis: Developmental and Circadian TRH mRNA Levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151:615-622.
31. Cuadras, J. 1989. Non-synaptic release from dense-cored vesicles occurs at all terminal types in crayfish neuropile. *Brain Research* 477:332-335.
32. Deutsch, P.J., J. P. Hoeffler, J. L. Jameson, J. C. Lin, and J. F. Habener. 1988. *Journal Biol. Chem.* 263:18466-18472.
33. Devi, L. 1991. Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS.* 280:189-194.
34. Devlin, P.E., K. L. Ramachandran, and R. L. Cate. 1991. Southern analysis of genomic ADN with unique and degenerate oligonucleotides probes: a method for reducing probe degeneracy. *ADN* 7:499-507.
35. Dickinson, P.S. and E. Marder. 1989. Peptidergic modulation of a multioscillator system in the lobster. I. Activation of the cardiac sac motor pattern by the neuropeptides proctolin and red pigment-concentrating hormone. *J. Neurophysiol.* 61:833-844.
36. Dirksen, H. and R. Keller. 1988. Immunocytochemical localization of CCAP, a novel crustacean cardioactive peptide, in the nervous system of the shore crab, *Carcinus maenas* L. *Cell Tissue Res* 254:347-360.
37. Dirksen, H., S. G. Webster, and R. Keller. 1988. Immunocytochemical demonstration of the neurosecretory systems containing putative moult-inhibiting hormone and hyperglycemic hormone in the eyestalk of brachyuran crustaceans. *Cell. Tissue. Res.* 251:3-12.
38. Dirksen, H., C. A. Zahnow, G. Gaus, R. Keller, K. R. Rao, and J. P. Riehm. 1987. The ultrastructure of nerve endings containing pigment-dispersing hormone (PDH) in crustacean sinus glands: Identification by an antiserum against a synthetic PDH. *Cell Tissue Res* 250:377-387.
39. Díez, S., C. Páramo, A. Vicente, J. J. Alcañiz, and B. Barceló. 1991. Adenhipofisis. Hormonas hipotalámicas e hipofisiarias. *Science*
40. Dunlap, J.C. 1990. Closely watched clocks: molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora* and *Drosophila*. *TIG* 6:159-165.
41. Ehlen, T. and L. Dubeau. 1989. Detection of ras mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 160:441-447.
42. Eipper, B.A. and R. E. Mains. 1988. Peptide alpha-Amidation. *Ann. Rev. Physiol.* 50:333-344.

43. Evans, R.M. 1988. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Super-family. *Science* 240:669-675.
44. Ferrnald, P. 1976. Structure of a Light-Adapting Hormone from the Shrimp, *Pandalus borealis*. *Biochimic and Biophysical Acta*. 439:17-25.
45. Fingerman, M. 1987. The Endocrine Mechanisms of Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 7:1-24.
46. Freeman, J.A. and J. D. Costlow. 1979. Hormonal control of apolysis in barnacle mantle tissue epidermis, in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 210:333-345.
47. Freissmith, m., P. J. Casey, and A. G. Gilman. 1989. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *The FASEB Journal* 3:2125-2131.
48. Frixione, E. 1983. Firm Structural Associations between Migratory Pigment Granules and Microtubules in Crayfish Retinula Cells. *The Journal of Cell Biology* 96:1258-1265.
49. Gäde, G. 1991. A unique charged tyrosine-containing member of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family isolated and sequenced from two beetle species. *Biochem. J.* 275:671-677.
50. Gäde, G., H. Wilps, and R. Kellner. 1990. Isolation and structure of a novel charged member of the red-pigment-concentrating hormone-adipokinetic hormone family of peptides isolated from the corpora cardiaca of the blowfly *Phormia terraenovae* (Diptera). *Biochem. J.* 269:309-313.
51. Gerhart, J. 1989. the primacy of cell interactions in development. *TIG* 5:233-236.
52. Gierasch, L.M. 1989. Signal Sequences. *Biochemistry*. 28:923-930.
53. Gilula, N.B. 1991. Gap Junctions and Cell Contacts. In *Cell Interactions in Differentiation*. M. Karkinen-Jaaskelainen and L. Saken, editors. Academic Press, London-New York-San Francisco. 327-337.
54. Gomez, S., G. Boileau, L. Zollinger, C. Nault, M. Rholam, and P. Cohen. 1989. Site-specific mutagenesis identifies amino acid residues critical in prohormone processing. *The EMBO Journal* 8:2911-2916.
55. Gorbman, A. and A. Hyder. 1991. Behavior of Chromatophores of the Fiddler Crab *Uca pugilator* and the Dwarf Crayfish *Cambarellus shufelditi* in Response to Synthetic *Pandalus* Red Pigment-Concentrating Hormone. ,
56. Grilione, P.L., J. Pangborn, and J. Bacterio. 1975. . *Science* 124:1558-1565.
57. Grimmelikhuisen, C., F. Sundler, and J. F. Rehfeld. 1980. . *Regul. Peptides Suppl.* 1:
58. Hall, J.C. 1990. Genetics of Circadian Rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 24:659-697.
59. Hallberg, E. and R. Eiofsson. 1989. Construction of the Pigment Shield of the



Crustacean Compound Eye: a Review. *Journal of Crustacean Biology* 9:359-372.

60. Hames, B.D. and S. J. Higgins. 1985. *Nucleic Acid Hybridization a practical approach*. IRL.PRESS.

61. Harper, H.A., V. W. Rodwell, and P. A. Mayes. 1980. *Manual de Química Fisiológica. El manual Moderno, Mexico D.F.* 1 pp.

62. Heierhorst, J., S. D. Morley, J. Figueroa, C. Krentler, K. Lederis, and D. Ritcher. 1989. Vasotocin and isotocin precursors from the white sucker, *Catostomus commersoni*: Cloning and sequence analysis of the cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:5242-5246.

63. Hakimi, S., W. Burkhart, M. Moyer, E. Fowler, and M. O'Shea. 1989. Dimer Structure of a Neuropeptide Precursor Established: Consequences for Processing. *Neuron*. 2:1363-1368.

64. Hakimi, S. and M. O'Shea. 1989. Biosynthesis of Adipokinetic Hormones (AKH): Further Characterization of Precursors and Identification of Novel Products of Processing. *The Journal of Neuroscience* 9(3):996-1003.

65. Higuchi, H., H. Y. Yang, and S. L. Sabol. 1988. Rat neuropeptide  $\gamma$  precursor gene expression mRNA structure, tissue distribution, and regulation by glucocorticoids, cyclic AMP, and phorbol ester. *Journal. Biol. Chem.* 263:6288-6295.

66. Hoeffler, J.P., P. J. Deutsch, J. Lin, and J. F. Habener. 1989. Distinct adenosine 3'5'-monophosphate and phorbol ester-responsive signal transduction pathways converge at the level of transcriptional activation by the interactions of DNA-binding proteins. *Mol. Endocrinol.* 3:868-880.

67. Holman, M., M. S. Wright, and R. J. Nachman. 1988. Insect Neuropeptides: Coming of Age. *Animal and Plant Science*. 1:129-136.

68. Huberman, A., A. Hernández-Arana, M. B. Aguilar, and A. Rojo-Domínguez. 1989. Secondary Structure of a Crustacean Neuropeptide Hormone Family by Means of CD. *Peptides*. 10:1113-1115.

69. Huganir, R.L. and P. Greengard. 1990. Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* 5:555-567.

70. Iversen, L.L. 1991. Signals are sent from one neuron to another by diverse chemical transmitters. These chemical systems, overlaid on the neuronal circuits of the brain, add another dimension to brain function. *Science*

71. Jingami, H., S. Matsukura, S. Numa, and H. Imura. 1985. Effects of Adrenalectomy and Dexamethasone Administration on the Level of Prepro-Corticotropin-Releasing Factor Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) in the Hypothalamus and adrenocorticotropin/Beta-Lipotropin Precursor mRNA in the Pituitary in Rats. *Endo* 117:1314-1320.

72. Jingami, H., S. Matsukura, S. Numa, and H. Imura. 1985. Effects of Adrenalectomy and Dexamethasone Administration on the Level of Prepro-Corticotropin-Releasing Factor Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) in the Hypothalamus and Adrenocorticotropin/beta-Lipotropin Precursor mRNA in the

Pituitary in Rats. *Endocrinology* 117:1314-1320.

73. Jones, S.D., D. J. Hall, B. J. Rollins, and C. D. Stiles. 1988. Platelet-derived growth factor generates at least two distinct intracellular signals that modulate gene expression. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 53:531-536.

74. Jordan, S.D., D. W. Dunham, and N. W. Jordan. 1986. A Color Morph of the Crayfish *Orconectes Propinquus* (GIRARD) (DECAPODA, CAMBARIDAE). *Crustaceana* 51:104-107.

75. Josefsson, L. 1983. Chemical Properties and Physiological Actions of Crustacean Chromatophorotropins. *Amer. Zool.* 23:507-515.

76. Kallen, J.L. 1985. The hyperglycemic hormone producing system in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Thesis*

77. Kallen, J.L., S. L. Abrahamse, and F. V. Herrp. 1990. Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. *Biol. Bull.* 179:351-357.

78. Keech, C.A. and A. Gutierrez-Hartman. 1989. Analysis of rat prolactin promoter sequence that mediate pituitary-specific and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated gene expression in vivo. *Mol. Endocrinol.* 3:632-639.

79. Kegel, G., B. Reichwein, s. Weess, G. Gaus, J. Peter-Katalinic, and R. Keller. 1969. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS* 35:10-14.

80. Kelly, R.B. 1988. The Cell Biology of the Nerve Terminal. *Neuron* 1:431-438.

81. Kerdahue, B., M. Palkovits, M. Karteszi, and A. Reinberg. 1981. Circadian variations in substance P, luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) contents in hypothalamic and extra-hypothalamic brain nuclei of adult male rats. *Brain Research* 206:405-413.

82. Kikkawa, U., A. Kishimoto, and Y. Nishizuka. 1989. THE PROTEIN KINASE C FAMILY; HETEROGENEITY AND ITS IMPLICATIONS. *Annu. Rev. Biochem.* 58:31-44.

83. Kinnunen, P., T. Taskinen, M. Jarvinen, and H. Ruskoaho. 1991. Effect of phorbol ester on the release of atrial natriuretic peptide from the hypertrophied rat myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 102:453-461.

84. Kleinholz, L.h. 1970. A Progress Report on the Separation and Purification of Crustacean Neurosecretory Pigmentary-Effector Hormones. *General and Comparative Endocrinology* 14:578-586.

85. Kleinholz, L.h. and R. Keller. 1973. Comparative Studies in Crustacean Neurosecretory Hyperglycemic Hormones. *General and Comparative Endocrinology* 21:554-564.

86. Kleinholz, L.h., K. R. Rao, G. E. Riehm, G. E. Tarr, L. Johnson, and S. Norton. 1985. Isolation and sequence analysis of pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab *Cancer magister*. *Biol. Bull.* 170:135-143.

87. Kleinholz, L.h., K. R. Rao, J. P. Riehm, G. E. Tarr, L. Johnson, and S. Norton. 1986. Isolation and Sequence Analysis of a Pigment-Dispersing Hormone from Eystalks of the Crab, Cancer Magister. *Biol. Bull.* 170:135-143.
88. Krueger, B.K. 1989. Toward an understanding of structure and function of ion channels. *The FASEB Journal* 3:1906-1914.
89. Kulkarni, G.K. and M. Fingerman. 1987. Distal Retinal Pigment of the Fiddler Crab, *Uca Pugilator*: Release of the Dark-Adapting Hormone by Methionine Enkephalin and FMRFamide. *Pigment Cell Research* 1:51-56.
90. Kurjan, J. and I. Herskowitz. 1982. *Cell* 30:933-943.
91. Lam, K.S.L. and S. Reichlin. 1989. Pituitary Vasoactive Intestinal Peptide Regulates Prolactin Secretion in the Hypothyroid Rat. *Neuroendocrinology* 50:524-528.
92. Lambert, D.T. and M. Fingerman. 1979. Evidence Implicating Calcium as the Second Messenger for Red Pigment-Concentrating Hormone in the Prawn *Palaeomonetes Pugio*. *Physiol. Zool.* 54:497-508.
93. Lander, A.D. 1989. Understanding the molecules of neural cells contacts:emerging patterns of structure an fuction. *TINS* 12:189-195.
94. Laufer, H. 1991. JH-like compounds and their implications for crustacea reproduction. *Regulation of Development* 67. (Abstr.)
95. Lausson, S., N. Sagond, G. Milhaud, and J. F. Staub. 1989. Circadian rhythms of calcitonin gene expression in the rat. *Journal of Endocrinology* 122:527-534.
96. Lee, L.R., D. J. Haisenleder, J. C. Marshall, and M. S. Smith. 1989. The role of the suckling stimulus in regulating pituitary prolactin mRNA in the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 64:243-249.
97. Lehman, H.K. and D. A. Price. 1987. Localization of FMRFamide-like peptides in the snail *Helix aspersa*. *J. exp. Biol.* 131:37-53.
98. Lewis, E.J., C. A. Harrington, and D. M. Chikaraishi. 1987. Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3550-3554.
99. Lichtensteiger, W. and D. Felix. 1980. Vasopressin and ACTH 4-10: studies on individual giant dopamine neurons of the snail *Planorbis corneus*. In *Neuropeptides and Neural Transmission*. A.C. Marsan and W.Z. Trackzyk, editors. Raven Press, New York. 333-338.
100. Livingstone, M.S., S. F. Schaeffer, and E. A. Kravitz. 1981. Biochemistry and ultrastructure of serotonergic nerve endings in the lobster:Serotonin and octopamine are contained in different nerve endings. *J. Neurobiol.* 12:27-54.
101. Lui, B. and J. P. H. Burbach. 1988. circadian Variations of Vasopressin Level and Vasopressin-Converting Aminopeptidase Activity in the rat Pineal Gland. *Peptides* 9:973-978.

102. Lynch, D.R. and S. H. Snyder. 1986. Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolise pathways and receptors. *Ann. Rev. biochem.* 55:773-801.
103. Mangerich, S. and R. Keller. 1986. Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) immunoreactivity in the central nervous system of *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* (Crustacea), with reference to FMRFamide immunoreactivity in *O. limosus*. *Cell Tissue Res* 253:199-208.
104. Mangerich, S., R. Keller, and H. Dircksen. 1986. Immunocytochemical identification of estrostructures containing putative red pigment-concentrating hormone in two species of decapod crustaceans. *Cell. Tissue. Res.* 245:377-386.
105. Mangerich, S., R. Keller, H. Dircksen, R. K. Rao, and J. P. Riehm. 1987. Immunocytochemical localization of pigment-dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide-immunoreactive material in the eyestalks of the decapod crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*. *Cell Tissue Res* 250:365-375.
106. Mattson, M. 1986. New Insights into Neuroendocrine Regulation of the Crustacean Molt Cycle. *Zoological Science* 3:733-744.
107. Mattson, M.P. and E. Spaziani. 1985. Stress Reduces Hemolymph Ecdysteroid Levels in the Crab: Mediation by the Eyestalks. *The Journal of Experimental Zoology* 234:319-323.
108. Mattson, M.P. and E. Spaziani. 1985. Functional relations of crab molt-inhibiting hormone and neurohypophysial peptides. *Peptides* 6:635-640.
109. Mattson, M.P. and E. Spaziani. 1986. Regulation of the Stress-Responsive X-Organ-Y-Organ axis by 5-Hydroxytryptamine in the Crab, *Cancer Antennarius*. *General and Comparative Endocrinology* 62:419-427.
110. Mattson, M.P. and E. Spaziani. 1986. Regulation of crab Y-organ steroidogenesis in vitro: evidence that ecdysteroid production increases through activation of cAMP-phosphodiesterase by calcium-calmodulin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 49:135-151.
111. Mattson, M.P. and E. Spaziani. 1986. Regulation of Y-organ ecdysteroidogenesis by molt-inhibiting hormone in crabs: involvement of cyclic AMP-mediated protein synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63:414-423.
112. McCallum, M.L., K. R. Rao, J. P. Riehm, C. J. Mohrherr, and W. T. Morgan. 1988. Isolation of a Beta-PDH analog from the cray-fish, *Procambarus clarkii*. *Am. Zool.* 28:117.
113. McEwen, B.S. and D. W. Pfaff. 1985. Hormone effects on hypothalamic neurons: analysing gene expression and neuromodulator action. *TINS* 105-110.
114. Meijer, J.H. and W. J. Rietveld. 1989. *Physiol. Rev.* 69:671-707.
115. Meinkoth, J. and G. Wahl. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry* 138:267-284.
116. Mercier, A.J., I. Orchard, and V. Tebrugge. 1991. FMRFamide-Like

Immunoreactivity in the Crayfish Nervous System. *J. exp. Biol.* 156:519-538.

117. Miesfield, R., M. Krystal, and N. Arnheim. 1981. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eukaryotic evolution is found between the human alpha and beta-globin genes. *Nucl. Acids. Res.* 9:5931-5947.

118. Millington, W.R., M. Blum, R. Knight, G. P. Mueller, J. L. Roberts, and T. L. O'Donohue. 1986. A Diurnal Rhythm in Proopiomelanocortin Messenger Ribonucleic Acid that Varies Cocomitantly with the Content and Secretion of Beta-Endorphin in the Intermediate Lobe of the Rat Pituitary. *Endo* 118:829-834.

119. Moore, D.D. 1989. Promiscuous behaviour in the steroid hormone receptor superfamily. *TINS* 12:165-168.

120. Mordue, W. and J. V. Stone. 1977. Relative Potencies of Locust Adipokinetic Hormone and Prawn Red Pigment-Concentrating Hormone in Insect and Crustacean Systems. *General and Comparative Endocrinology* 33:103-109.

121. Morgan, J.I. and T. Curran. 1983. Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium* 9:303-311.

122. Morse, D.S., L. Fritz, and W. Hastings. 1990. What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *TIBS* 262-265.

123. Nagy, G., J. J. Mulchahey, D. G. Smyth, and J. D. Neill. 1988. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151:524-529.

124. Nahmod, V.E., M. S. Balda, C. J. Pirola, S. Finkelman, P. V. Gejman, and D. P. Gardinali. 1982. Circadian rhythm and neural regulation of rat pineal angiotensin converting enzyme. *Brain. Res.* 236:216-220.

125. Nambu, J.R., C. Murphy-Erdosh, P. C. Andrews, G. J. Feistner, and R. h. Scheller. 1988. Isolation Characterization of a Drosophila neuropeptide gene. *Neuron* 1:55-61.

126. Nambu, J.R. and R. h. Scheller. 1986. Egg-Laying Hormone Genes of *Aplysia*: Evolution of the ELH Gene Family. *The Journal of Neuroscience.* 6(7):2026-2036.

127. Nestler, E.J. and P. Greengard. 1989. Protein Phosphorylation and the Regulation of Neuronal Function. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Raven Press, editor. Raven Press, New York. 373-398.

128. Niall, H.D. 1982. The Evolution of Peptide Hormones. *Ann. Rev. Physiol.* 44:615-624.

129. Nicholson, W.J., C. J. Maggiore, and I. J. Selikoff. 1972. Crustacean Color-Change Hormone: Amino Acid Sequence and Chemical Synthesis. *Science* 177:173-175.

130. Oppenheimer, J.H. 1979. Thyroid Hormone Action at the Cellular Level. *Science* 203:971-979.

131. Paulson, J.C. 1989. Glycoproteins: What are the sugar chains for? *TIBS*

14:272-275.

132. Pfaff, D.W. 1987. Patterns of Steroid Hormone Effects on Electrical and Molecular Events in Hypothalamic Neurons. *Molecular Neurobiology* 3:135-154.
133. Pfeffer, S.R. and J. E. Rothman. 1987. Biosynthetic Protein Transport and Sorting by the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Ann. Rev. biochem.* 56:829-852.
134. Phillips, J.M., K. R. Rao, J. P. Riehm, and W. T. Morgan. 1988. Isolation and characterization of a pigment-dispersing hormone from the shrimp *Penaeus aztecus*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14:534.
135. Plotsky, P.M. and J. D. Neill. 1982. Interactions of Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Prolactin Release in Lactating Rats. *Endo.* 111:168-173.
136. Ponce, G. 1988. Tissue-specific regulation of Pyroglutamate Aminopeptidase II activity by Thyroid Hormones. *Neuroendocrinology* 48:211-213.
137. Price, D.A. 1991. Crustacean Neuropeptides. In *Brain Peptides*. DOROTHY T. KRIGER., editor. 1983, St. Augustine, Florida.. 218-227.
138. Pritchett, D.B., H. Lüddens, and P. H. Seeburg. 1989. Type I and Type II GABA A-Benzodiazepine Receptors Produced in Transfected Cells. *Science* 245:1389-1392.
139. Prost, E. and D. Larzul. 1989. The polymerase Chain Reaction and its Applications. *Methods in Molecular and Cell Biology* 1:45-52.
140. Ralph, M.R., R. G. Foster, F. C. Davis, and M. Menaker. 1990. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science* 247:975-978.
141. Rao, K.R. and M. Fingerman. 1983. Regulation of Release and Mode of Action of Crustacean Chromatophorotropins. *Amer. Zool.* 23:517-527.
142. Rao, K.R., C. J. Mohrherr, J. P. Riehm, C. A. Zahnow, S. Norton, L. Johnson, and G. E. Tarr. 1987. Primary Structure of an Analog Crustacean Pigment-dispersing Hormone from the Lubber Grasshopper *Romalea macroptera*. *The Journal Of Biological Chemistry* 262:2672-2675.
143. Rao, K.R. and J. P. Riehm. 1988. Pigment-Dispersing hormones: a novel family of neuropeptides from arthropods. *Peptides* 9:153-159.
144. Rao, K.R. and J. F. Riehm. 1989. The Pigment-Dispersing Hormone Family: Chemistry, Structure-Activity Relations, and Distribution. *Biol. Bull* 177:225-229.
145. Rao, K.R., J. P. Riehm, C. A. Zahnow, L. h. Kleinholz, G. E. Tarr, L. Johnson, S. Norton, M. Landau, O. L. Semmes, R. M. Sattelberg, W. H. Jorenby, and M. F. Hintz. 1985. Characterization of pigment-dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugnator*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5319-5322.
146. Rehbién, M., M. Hilliers, E. Mohr, R. Ivell, S. Morley, H. Schmale, and D. Richter. 1986. *Biol. Chem.* 367:695-704.
147. Rehfeld, J.F. 1990. Posttranslational attenuation of peptide gene expression.

FEBS 268:1-4.

148. Reichardt, J.K.V. and P. Berg. 1988. Conservation of short patches of amino acid sequence amongst proteins with a common function but evolutionarily distinct origins: implications for cloning genes and for structure-function analysis. *Nucleic Acids Research*. 16:9017-9026.
149. Reid, D.G. and J. C. Aldrich. 1989. Variations in response to environmental Hypoxia of Different Colour Forms of The Shore Crab, *Carcinus Maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A:535-539.
150. Rholam, M., P. Nicolas, and P. Cohen. 1986. Precursors for peptide hormones share common secondary structures forming features at the proteolytic processing sites. *FEBS*. 207:1-5.
151. Riehm, J.P. and K. R. Rao. 1982. Structure-Activity Relationships of a Pigment-Dispersing Crustacean Neurohormone. *Peptides* 3:643-647.
152. Rodriguez, C., K. A. Brayton, M. Brownstein, and J. E. Dixon. 1989. Rat Preprocarboxidase H. Cloning, Characterization, and sequence of the cDNA regulation of the mRNA by Corticotropin-Releasing Factor. *The Journal Of Biological Chemistry* 264:5988-5995.
153. Roth, D.L., J. Shiloach, and J. Roth. 1982. Is there an Earlier Phylogenetic Precursor That is Common to Both the Nervous and Endocrine Systems? *Peptides* 3:211-215.
154. Ross, E.M. 1989. Signal Sorting and Amplification through G Protein-Coupled Receptors. *Neuron* 3:141-152.
155. Rose, S.R. and B. C. Nisula. 1989. Circadian Variation of Thyrotropin in Childhood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 68:1086-1090.
156. Schaffner, M.H., B. E. Noyes, C. A. Slaughter, and G. C. Thorne. 1990. The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *Biochem. J.* 269:315-320.
157. Scheller, R.h., J. F. Jackson, L. B. McAllister, B. S. Rothman, E. Mayeri, and R. Axel. 1983. A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell* 35:7-22.
158. Schmale, H. and D. Richter. 1983. Processing Signals of the Vasopressin and Oxytocin Precursors. In . A. Zellbiochemie, editor. hamburg,FRG.. 185-192.
159. Schnell, L. and M. E. Schwab. 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associate neurite growth inhibitors. *NATURE* 343:269-272.
160. Schuch, U., M. J. Lohse, and M. Schachner. 1989. Neural Cell Adhesion Molecules Influence Second Messenger Systems. *Neuron* 3:13-20.
161. Schumacher, M. 1990. Rapid membrane effects of steroid hormones:an emerging concept in neuroendocrinology. *TINS* 13:359-362.

162. Schwartz, J., B. Canny, W. W. Vale, and J. W. Funder. 1989. Intrapituitary Cell-Cell Communication Regulates ACTH Secretion. *Neuroendocrinology* 50:716-722.
163. Semmes, D.J., J. P. Riehm, and K. R. Rao. 1985. Substitution of Norleucine for Methionine Residues in a Crustacean Pigment-Dispersing Hormone. *Peptides* 6:491-494.
164. Sheng, M. and M. E. Greenberg. 1990. The Regulation and Function of c-fos and Other Immediate Early Genes in the Nervous System. *Neuron* 4:477-485.
165. Sherff, C.M. and B. Mulloney. 1991. Red Pigment Concentrating Hormone is a Modulator of the Crayfish Swimmeret system. *J. exp. Biol.* 155:21-35.
166. Sossin, W.S., J. M. Fisher, and R. h. Scheller. 1989. Cellular and Molecular Biology of Neuropeptide Processing and Packaging. *Neuron*. 2:1407-1417.
167. Staehelin, L.A. and B. E. Hull. 1991. Junctions between Living Cells. Where the cells of certain key animal tissues meet they do not simply touch. They are linked by specialized structures, the architecture of which is revealed by electron microscopy. *Science*
168. Stangier, J., H. Dirksen, and R. Keller. 1986. Identification and Immunocytochemical localization of proctolin in the pericardial organs of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Peptides* 7:67-72.
169. Stangier, J., C. Hilbich, H. Dirksen, and R. Keller. 1988. Distribution of a Novel Cardioactive Neuropeptide (CCAP) in the Nervous System of the Shore Crab *Carcinus maenas*. *Peptides*. 9:795-800.
170. Stark, R.I. and S. S. Daniel. 1989. Circadian Rhythm of Vasopressin Levels in Cerebrospinal Fluid of the Fetus: Effect of Continuous Light. *Endo* 124:3095-3101.
171. Steitz, J.A. 1988. "Snurps". The name stands for small nuclear ribonucleoproteins, particles that help to remove meaningless "introns" from the messages issued by a cell's genes. Without them cellular activity would grind to a halt. *SCIENTIFIC AMERICAN*. 36-41.
172. Stoffers, D.A., C. B. --R. Green, and B. A. Eipper. 1989. Alternative mRNA splicing generates multiple forms of peptidyl-glycine alfa-amidating monooxygenase in rat atrium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:735-739.
173. Stusnkei, E.L. 1986. A Common Precursor to Two Major Crab Neurosecretory Peptides. *Peptides*. 7:397-406.
174. Su, C.J., J. W. White, W. H. Li, C. C. Luo, M. L. Frazier, G. F. Saunders, and L. Chan. 1989. *MOL ENDO.* 2:209-216.
175. Suggs, G.V., R. B. Wallace, T. Hirose, E. H. Kiwashima, and K. Itakura. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:6613-6617.
176. Taussig, R. and R. h. Scheller. 1986. The *Aplysia* FMRFamide gene encodes sequences related to mammalian brain peptides. *DNA*. 5:453-461.
177. Taylor, S.S., J. A. Buechler, and W. Yonemoto. 1990. cAMP-DEPENDENT PROTEIN



- KINASE; FRAMEWORK FOR A DIVERSE FAMILY OF REGULATORY ENZYMES. *Annu. Rev. Biochem.* 59:971-1005.
178. Tonegawa, S. 1991. The Molecules of the Immune System. *Science*
179. Turner, A.J. 1988. Metabolism of Neuropeptides. *Atlas of Science Pharmacology* 362-366.
180. Ullrich, A. and J. Schlessinger. 1990. Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. *Cell* 61:203-212.
181. Unwin, N. 1989. The Structure of Ion Channels in Membranes of Excitable Cells. *Neuron* 3:665-676.
182. Vargas, M.A. 1988. Relevancia fisiologica de un PGA membranial que degrada al TRH en el SNC de la rata. *TESIS*
183. Wallace, R.B., M. J. Johnson, T. Hirose, and T. Miyake. 1981. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probe. II Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit B-globin ADN. *Nucleic Acids Research* 9:879-894.
184. Wallace, R.B., J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, and K. Itakura. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to X 174 ADN: The effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research* 6:
185. Waterman, M. and G. H. Murdoch. 1985. Cyclic AMP Regulation of Eukaryotic Gene Transcription by Two Discrete Molecular Mechanisms. *Science* 225:267-269.
186. Webster, S.G. 1991. Amino acid sequence of putative molt-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond.* 244:247-252.
187. Webster, S.G. and H. Dircksen. 1991. Putative Molt-Inhibiting Hormone in Larvae of the Shore Crab *Carcinus maenas* L.: An Immunocytochemical Approach. *Biol. Bull.* 180:65-71.
188. Weidemann, W., J. Gromoll, and R. Keller. 1989. Cloning and Sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS* 257:31-34.
189. Weiss, E.R., D. J. Kelleher, C. W. Woon, S. Soparkar, S. Osawa, L. E. Heasley, and G. L. Johnson. 1988. Receptor activation of G proteins. *FASEB J.* 2:2841-2843.
190. Xu, R.B., Z. M. Liu, and Y. Zhao. 1991. A Study on the Circadian Rhythm of Glucocorticoid Receptor. *Neuroendocrinology* 53:31-36.
191. Zhao, D-G., S. Côt, F. Jähnig, J. Haller, and H. Jäckle. 1988. zipper encodes a putative integral membrane protein required for normal axon patterning during *Drosophila* neurogenesis. *The EMBO Journal* 7:1115-1119.