



03062 2
24.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL CCH
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CLONACION DEL DNA_c QUE CODIFICA PARA LA
HORMONA INHIBIDORA DE LA MUDA DEL
ACOCIL MEXICANO *Procambarus bouvieri* (Ortmann)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
QUE PRESENTA :
BIOL. MA. DEL ROCIO AGUILAR GAYTAN

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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. Marco Antonio Cerbón Cervantes.
Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Biología,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Cotutor: Dr. Alberto Huberman Wajsman.
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador
Zubirán". SSA.

A Mi Familia

Por su eterno apoyo, paciencia y comprensión.

Papá, Mamá, Ernesto, Myrna, Karina, por siempre estar conmigo cuando más los necesito.

Al Dr. Marco A. Cerbón

Sé que una hoja quedaría muy corta para decirle MUCHAS GRACIAS POR TODO, así que brevemente, lo que quiero es darle las gracias por su apoyo para la realización de éste trabajo. Por su confianza, paciencia, comprensión y sus consejos en los momentos buenos y malos; pero sobre todo por haberme aceptado en su laboratorio.

Gracias por sus amables consejos y por permitirme conocerlo, porque para mí es una gran persona además de investigador.

Que este trabajo sea el final de una etapa, y el inicio de un buen, gran y largo camino de trabajo en el área de Biología de la Reproducción.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Huberman

Por el apoyo y la confianza que depositó en mí para la realización de éste trabajo. Sobre todo por darme ánimos siempre.

A los Drs. Francoise Van Herp y Dominique de Kleijn

Por su generosa aportación del DNAc de la HHG de *O. limosus* usado como control.

Al Dr. Miguel Angel Cavallos

Con todo mi respeto y cariño. Muchas gracias por darme tu confianza en Todo y principalmente por el gran apoyo y los comentarios hechos para la realización del trabajo.

Al laboratorio del Dr. Alejandro García Carrancá

Al Dr. Carrancá por las facilidades para trabajar en su laboratorio. Y a todo el grupo porque siempre me hecharon una mano cuando más la necesité. En especial a Gabriel Nave, Néstor, Laurita, Karla, Jorge, Víctor y Benito.

A la Dra. Marcela Lizano

Por tu apoyo siempre incondicional, por ser una excelente maestra, pero sobre todo por una hermosa amistad.

A la Biol. Miriam Guido

Por todo el apoyo incondicional que siempre tuviste conmigo y también por tu amistad.

Al Dr Roberto Coria y al Dr. Luis Servín

Por sus amables comentarios y sugerencias al mejoramiento de la presentación del trabajo.

A la Dra. Susana Kofman y al Dr. Lino Díaz de León

Gracias por su apoyo, confianza y ánimos para seguir adelante.

Al Dr. Ernesto García Rubí

Sólo puedo decirte todo con una palabra...Thanks

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN	
Generalidades de los crustáceos.....	5
Sistema neuroendocrino en crustáceos.....	6
Hormona concentradora del pigmento rojo (HCPR).....	11
Hormona de adaptación a la luz (HAL).....	11
Hormona neurodepresora (HND).....	11
Hormona inhibidora de la vitelogénesis (HIV).....	12
Hormona hiperglicemiante (HHG).....	12
Hormona inhibidora de la muda (HIM).....	13
ANTECEDENTES.....	19
OBJETIVO.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63
APÉNDICE I.....	78
APÉNDICE II.....	80
APÉNDICE III.....	81

RESUMEN

En los crustáceos, muchos procesos fisiológicos como la muda, la madurez sexual, la osmoregulación, la regulación de los niveles de glucosa, mantenimiento de ritmo circadiano y la actividad locomotora, entre otros, son regulados por factores hormonales que son liberados por exocitos del sistema de la glándula sinusal-órgano-X, un órgano neurohémico semejante al sistema hipotálamo-hipofisis en los mamíferos. Se han aislado varios péptidos activos de la glándula sinusal; entre ellos se encuentran la hormona inhibidora de la vitelogénesis (HIV), la hormona hiperglicemiante (HHG) y la hormona inhibidora de la muda (HIM). El efecto que tiene esta última hormona es la inhibición del proceso de muda hasta que estos animales pueden incrementar de tamaño cambiando el exoesqueleto. La similitud entre cualquiera de los péptidos antes mencionados varía de un 61 % a un 99 %. El objetivo de este trabajo fue la clonación del gen que codifica para la hormona inhibidora de la muda de la glándula sinusal del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* como una primera etapa en la clonación de otros genes de estas neurohormonas de la glándula sinusal, con el objeto de poder usar estos genes en el entendimiento de la fisiología, pero además, en aplicaciones biotecnológicas.

Se extrajo RNA total del tallo ocular. Se prepararon dos lotes en dos ocasiones distintas. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos con base en la secuencia de aminoácidos de la HHG de los acociles *P. bouvieri* y *O. limosus* por la alta similitud entre ellos (99%). Cada par se usó en cada uno de los lotes de RNA.

Después de llevar a cabo una reacción de transcripción reversa acoplada a una de PCR, el producto se identificó por electroforesis en gel de agarosa, como una banda de 225 pares de bases. El producto del PCR se subclonó en el vector pMOSBlue. Las clonas obtenidas se seleccionaron usando la técnica de SSCP-PCR. Se identificaron dos patrones de movilidad. Dos clonas distintas fueron identificadas, aisladas y amplificadas para confirmar su secuencia por el método de Sanger. Se extrajo RNA en dos experimentos distintos y la secuencia nucleotídica obtenida coincidió con la secuencia de aminoácidos parcial reportada para la HIM.

También se confirmó que esta hormona tiene un alto grado de identidad con la misma hormona de otros crustáceos decápodos (46-79%), pero es más alta la identidad (90%) al ser comparada con la HHG del mismo animal. Esto demuestra

que estas hormonas están muy conservadas dentro de este grupo de los artrópodos. Por otro lado, estudios sobre el sistema endocrino pueden permitirnos tener la capacidad de manipular el ciclo de la muda de estos animales y, por lo tanto, producir un crecimiento más acelerado en ellos. Estudios más recientes en estas áreas podrían dar como resultado un mejor entendimiento de estos animales y también como resultado un beneficio a la acuicultura de crustáceos.

SUMMARY

The crustacean neuroendocrine system synthesizes diverse regulatory neuropeptides. It consists of neurosecretory cell somata named the X-organ, whose clustered axon endings form a neurohaemal organ, the sinus gland (SG) and is the most important regulation and integration center of the animal.

External color changes, molt cycle, gonadal development, light adaptation and glucose levels in the hemolymph, among others, are regulated by hormonal factors released by exocytosis from the SG, situated in the optic ganglion of the eyestalk of decapod crustaceans. The SG of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann) contains a family of four neuropeptide hormones. One of these peptides has been shown to have molt-inhibiting hormone activity, which exerts its inhibitory effect *in vitro* upon ecdysteroid synthesis in Y-organs.

In this work, we isolated a cDNA that encodes the complete nucleotide sequence of the mature region of the MIH from the crayfish *P. bouvieri*.

P. bouvieri were collected in Uruapan, state of Michoacán, México. Animals in the intermolt stage were anesthetized with crushed ice. A total of 200 eyestalks were pooled and homogenized. Total RNA was prepared with Trizol according to the manufacturer's instructions. The total RNA recovered was dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water.

The reverse transcription reaction was carried out according to the protocol of Gibco, BRL. Oligonucleotides for the PCR amplifications were designed based on the homologous regions between crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) peptide sequences described previously by our group in *P. bouvieri* and the published information of the cDNA of CHH from the crayfish *Orconectes limosus*. The oligonucleotide sense strand was 5'-CAGGTGTTCCGACCAGG-3' and the antisense strand was 5'-CACCTTACTTGCCGAC-3'. A PCR product of 225 bp was detected and cloned into pMOSBlue vector, transformed and propagated in DH5 α cells. Recombinants were screened by PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) analysis. The selected clones were sequenced using the AmpliCycle Sequencing Kit. We found the complete sequence of two different clones to encode the mature region of MIH (GenBank U79964). The difference between these clones was a single nucleotide change at position 54 (G \rightarrow A). This change does not modify the encoded amino acid. Whether these two

clones represent gene isomorphs requires further investigation. The possibility that this difference could be a cloning artifact, such as an error introduced by the Taq polymerase, cannot be excluded.

The cDNA of MIH includes a region of 225 bp, with an open reading frame coding for a protein of 74 amino acids, plus a stop codon. This confirms our previous results that MIH is a peptide with a molecular mass of 8322 Da, containing six cysteine residues, in a similar manner to those of the CHH peptide family and probably forming three disulphide bridges in the mature peptide, as previously reported for *C. maenas* and *P. bouvieri*.

Comparison of the amino acid sequence of MIH with CHH from *P. bouvieri* revealed a high degree of similarity (90%). The nucleotide sequence of *O. limosus* CHH is 93% identical with MIH from *P. bouvieri*. The nucleotide sequence of MIH from *P. bouvieri* shares 79% identity with MIH/CHH reported for *H. americanus*, 50% with the MIH-like gene in *P. vannameli*, 46% with MIH of *C. maenas* and *C. sepidus*. All these values are very close to those reported previously for their amino acid sequences. In spite of the fact that MIH of *P. bouvieri* is very closely related with CHH in this species, it did not present any hyperglycemic activity.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Los langostinos pertenecen al orden Decápoda. Este orden es el grupo más grande de los crustáceos, pues tiene aproximadamente 1,200 géneros y unas 1,000 especies (1,2). Se conocen doce géneros de langostinos que pertenecen a la familia Cambaridae; once de ellos se encuentran naturalmente en América del Norte y América central (3). El género más prominente es *Procambarus* el cual cuenta con más de la mitad de las 300 especies de langostinos cambarinos. Estos ocupan diversos hábitats como: lugares subterráneos, campos húmedos, lugares pantanosos y fangosos, lagos y corrientes permanentes (4). Muchos de ellos tienen hábitos nocturnos. Durante el día se ocultan debajo de piedras o en lo más profundo de escumbros, o dentro de túneles que ellos mismos hacen para vivir.

Los cambarinos ocupan toda la parte Este de los Estados Unidos, desde las montañas Rocallosas hasta la vertiente del Atlántico, siguiendo todo el territorio de la República Mexicana, Guatemala, Honduras y Cuba (5).

El primer estudio de langostinos mexicanos fué realizado por Erichson en 1846 (6). En 1955 se llevo a cabo un trabajo titulado "Cambarinos de la Fauna Mexicana: Crustáceos Decápodos" (7). Estos se encuentran ampliamente distribuidos por casi toda la República Mexicana (Fig. 1). Se han encontrado en zonas montañosas especialmente en la Sierra Madre Oriental y en la Cordillera Volcánica Transversal.

Únicamente dos especies se encuentran en la vertiente del Pacífico, en los estados de Jalisco y Michoacán. En este último estado se encuentra la especie *Procambarus bouvieri*, la cual fue descrita por primera vez por Ortmann en 1909 (8) como *Cambarus bouvieri*, y en 1946 Villalobos (9) reporta a esta especie con el nombre de *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Este langostino es conocido vulgarmente como acocil, por lo que en adelante se usará este nombre para identificar a la especie mexicana *P. bouvieri* del estado de Michoacán.

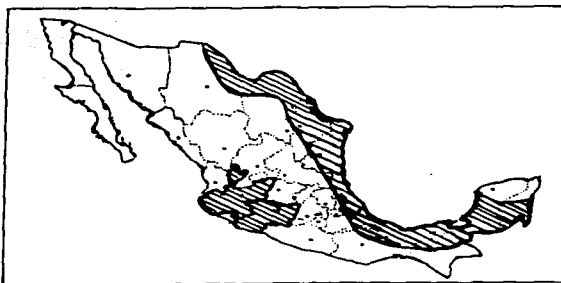


Fig. 1.- Distribución de los cambarinos en la República Mexicana (7).

SISTEMA NEUROENDOCRINO EN CRUSTÁCEOS

Los crustáceos para sobrevivir, necesitan la habilidad de adaptarse a cambios en su ambiente interno y externo. Para ello, dos sistemas importantes, los cuales están relacionados con la regulación, son el sistema nervioso y el sistema endocrino (10).

Los crustáceos tienen un sistema nervioso central el cual consta de un doble cordón ventral y una serie de ganglios. Muchos de ellos dan origen a tres pares de nervios con funciones principalmente motoras (Fig. 2). El cerebro (Fig. 3) está dividido en tres regiones de acuerdo con la evolución de los órganos sensoriales anteriores, en un protocerebro que inerva la región óptica, un deutocerebro que inerva las anténulas, y un tritocerebro que inerva a las antenas y al aparato digestivo (nervios estomatogástricos) (10).

El sistema neuroendocrino es el centro más importante de regulación e integración del animal y es el sitio de síntesis de diversos neuropéptidos con función regulatoria. Muchos de los procesos fisiológicos y de desarrollo en los crustáceos están bajo el control de hormonas. Las hormonas controlan procesos a largo término y actúan más lentamente que el sistema nervioso (11).

Tres principales tipos de hormonas se producen en el sistema endocrino en crustáceos decápodos: (a) neurohormonas que se liberan desde el sistema nervioso, (b) hormonas que se liberan desde las glándulas epiteliales, como las glándulas-Y y el ovario, y (c) feromonas (12).

Las neuronas que producen hormonas se conocen como células neuroendocrinas o peptidérgicas. Al microscopio electrónico estas células se caracterizan por la presencia de muchos gránulos de neurosecreción, los cuales son partículas esféricas, cuyo contenido es característicamente denso. Estos gránulos tienen generalmente de 100-300 μm de diámetro y están rodeados por una membrana simple (13).

El proceso de neurosecreción puede ser dividido en varias etapas: síntesis de neurohormonas, formación de los gránulos de neurosecreción, transporte a lo largo de los axones hacia las terminaciones axónicas, almacenamiento de los gránulos y liberación de las hormonas mediante exocitosis. Para permitir una descarga rápida de la secreción y a fin de que se alcancen las concentraciones hormonales requeridas que son del orden nanomolar, las células neurosecretoras presentan varias adaptaciones: a) hay un aumento en el número de células que intervienen en la secreción; b) cada célula tiene un número muy grande de terminaciones axónicas; c) las hormonas están muy concentradas en los gránulos neurosecretoras; d) las terminaciones axónicas se ensanchan (2-30 μm de diámetro), se ramifican, y están en contacto íntimo con el fluido circulatorio, separadas solamente de él por una membrana basal (separaciones de 1-4 μm) (12,13).

Las hormonas peptídicas producidas por células endocrinas neurosecretoras en el sistema nervioso central de los crustáceos ejercen un efecto biológico a distancia, semejante al encontrado en otras especies animales como los mamíferos.

En los crustáceos decápodos el sistema neurosecretor está formado por células que son neuronas modificadas (peptidérgicas) y tienen la capacidad de transmitir impulsos nerviosos. Difieren de otras neuronas en dos aspectos principales: a) sus axones no inervan a órganos efectores tales como músculos y tampoco hacen conexiones sinápticas con otras neuronas y b) producen hormonas peptídicas que son liberadas de las terminaciones axónicas.

Estas células neurosecretoras se encuentran agrupadas y forman una sola estructura, el órgano-X de la médula terminal. Están íntimamente asociadas al sistema circulatorio que transporta las hormonas neurosecretadas a todo el

organismo. Estas estructuras combinadas con el sistema circulatorio reciben el nombre de órganos neurohémicos (14).

Existen tres principales órganos neurohémicos en los crustáceos: 1) los órganos postcomisurales, localizados detrás de la comisura tritocerebral; liberan varios neuropéptidos cromatoforotrópicos (15,16) que son producidos por somas localizados putativamente en el ganglio cerebroide (17); 2) los órganos pericárdicos, en la vecindad del corazón (18,19), y algunas neuronas localizadas en los ganglios torácicos y subesofágico; liberan aminas y péptidos (20,21,22). Y 3) el complejo órgano-X de la médula terminal y la glándula sinusal, localizada en los tallos oculares en los crustáceos con ojos pedunculados, y dentro de la cabeza en las formas con ojos sésiles. Este complejo sintetiza y libera un gran número de péptidos que regulan muchos procesos fisiológicos.

El principal sitio de producción de neurohormonas (neuropéptidos) es el tallo ocular y la ablación de esta estructura tiene un efecto muy marcado en muchos aspectos de la fisiología y comportamiento de estos animales.

El sistema de órgano X-glándula sinusal (OX-GS) es el principal centro de control neuroendócrino de procesos tales como la muda, el crecimiento, la madurez sexual y la regulación del metabolismo entre otros. Las hormonas peptídicas que pasan a la circulación actúan sobre órganos blanco directamente así como sobre otras estructuras endocrinas.

Por estudios histológicos, se ha observado que el órgano-X es un agrupamiento de 150-200 somas neuronales en donde se sintetizan las neurohormonas. Estas células están situadas en el margen ventral y medio de la médula terminal (MT), sus axones forman un tracto nervioso a lo largo del cual se transportan estas neurohormonas y cuyas terminales constituyen la glándula sinusal, la cual se encuentra expuesta a la hemolinfa. (Fig. 4), (23,24).

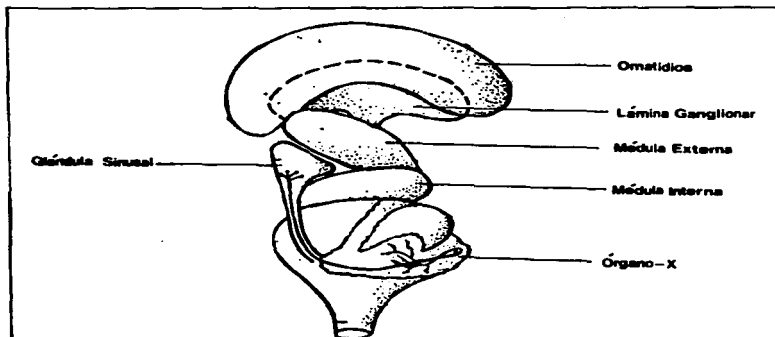


Fig. 4. Tálamo ocular de crustáceos decápodos. Consiste de omatidios y de cuatro ganglios: la médula terminal, la médula interna, la médula externa y la lámina ganglionar. El sistema neurosecretor está formado por somas neurosecretoras situadas principalmente en la médula terminal, denominado órgano-X; sus terminales axónicas están ensanchadas y se agrupan formando la glándula sinusal (24).

En 1931, se descubrió el sistema OXMT-GS como el primer órgano neurohémico encontrado en los crustáceos, caracterizado por tener agrupaciones de terminales axónicas ensanchadas adyacentes a senos circulatorios, sugiriendo una función endocrina. La glándula sinusal es el punto de almacenamiento y salida de varias hormonas que median adaptaciones entre funciones metabólicas y condiciones medioambientales. Entre algunas de sus funciones se incluyen la migración de pigmentos del exoesqueleto y del ojo, la regeneración de las extremidades dañadas o perdidas, la digestión, la regulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa, la osmoregulación; la adaptación a la luz, el desarrollo gonadal, la muda, y el mantenimiento del ritmo circadiano y la actividad locomotora (25,26).

El sistema OXMT-GS es un análogo funcional al eje hipotálamo-neurohipófisis de los vertebrados y del sistema ganglio cerebroide-corporis-cardiacum-corporis allatum

de los insectos (27,28), que son centros reguladores de primera importancia en dichos organismos.

Se han aislado varios péptidos activos de la glándula sinusal de algunos crustáceos y entre ellos se encuentran:

a) Homona Concentradora del Pigmento Rojo (HCPR)

Fue la primera neurohormona peptídica de crustáceo aislada y secuenciada, en el camarón *Pandalus borealis*, el cual es un octapéptido neutro que tiene sus extremos bloqueados (29). Controla el movimiento del pigmento rojo de los cromatóforos presentes en el tejido subhipodérmico.

b) Homona de Adaptación a la Luz (HAL)

También llamada hormona del pigmento distal retiniano encontrada en los cangrejos *Uca pugilator* y *Pandalus borealis*. Es un octadecapéptido con su extremo carboxilo amidado, y se caracteriza porque dispersa el pigmento de los cromatóforos epidérmicos en respuesta a la luz, bajo control de un ritmo diurno persistente. Controla los pigmentos retinianos que permiten la dispersión y la concentración de gránulos de pigmento dentro de las células retinianas y epidérmicas (30).

c) Homona Neurodepresora (HND)

Es un péptido pequeño (1200 Da) que tiene una acción directa sobre las células nerviosas (31). Por experimentos de eliminación del tallo ocular, se han visto cambios cualitativos y cuantitativos en la actividad locomotora de estos organismos. Se sugiere también que regula la actividad circadiana debido a que se han encontrado cambios cíclicos en el contenido de la HND en el tallo ocular de crustáceos (32,33,34,35,36).

d) Hormona Inhibidora de la Vitelogenesis (HIV) u Hormona Inhibidora de las Gónadas (HIG).

La vitelogenesis es la última fase para formar un huevo maduro y comprende la síntesis y/o captación, de la yema o vitelo, que es el material nutritivo para el futuro embrión (37). El componente principal del vitelo es la lipoproteína vitelina (38,39) que se genera a partir de su precursor, la vitelogenina, la cual puede ser producida en los ovarios (40) o en otros tejidos como el hepatopáncreas (41).

Diversos estudios han confirmado la presencia de la hormona inhibidora de la vitelogenesis (HIV) en el sistema neurosecretor del tallo ocular de los crustáceos: el desarrollo gonadal precoz resultante de la ablación de los tallos oculares se observó por primera vez en el camarón *Palaeomon serratus*. Se ha encontrado en una variedad de crustáceos que la eliminación bilateral de los tallos oculares indujo un hiperdesarrollo de ovarios y testículos (42).

La inhibición de la síntesis de proteínas ováricas *in vitro* por parte de extractos de tallos oculares demostró que la HIV puede actuar directamente en las gónadas de *Uca pugilator* (43); por otra parte, la HIV tiene también un efecto inhibitor sobre la unión de la vitelogenina a su receptor en las membranas de los ovocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (44).

Cabe mencionar que como la HIV puede afectar otros procesos reproductivos además de la vitelogenesis tanto en las hembras como en los machos, esta hormona se conoce también como hormona inhibidora de las gónadas (HIG) (45).

e) Hormona Hiperglicemiante de los Crustáceos (HHG)

La hormona hiperglicemiante es conocida como "factor diabetógeno". Esta actividad hiperglicemiante fue descrita hace 47 años, cuando se encontró un factor diabetógeno en extractos crudos de la glándula sinusal del cangrejo *Callinectes sapidus*. Se observó que la inyección de extractos de tallos oculares de este cangrejo, en animales destallados de la misma especie, producía un efecto hiperglicemiante notable. Este factor se llamó posteriormente como la Hormona Hiperglicemiante (HHG) de los crustáceos (46). Este neuropéptido está involucrado en la regulación de los niveles de glucosa y en el metabolismo de glucógeno, así como en la secreción de la amilasa del hepatopáncreas (10,47).

Se ha encontrado que la ablación de los tallos oculares o de las glándulas sinusales conduce a una gran disminución en la concentración de glucosa en la hemolinfa. En el acocil mexicano *Procambarus bouvieri*, la glucosa prácticamente no se puede detectar después de una semana de haber amputado los tallos oculares (48).

Se ha encontrado que la HHG puede intervenir en el metabolismo de los carbohidratos mediante la regulación de enzimas extracelulares. El hepatopáncreas que posee receptores para la hormona, interviene en la secreción del fluido digestivo, en la absorción del alimento digerido y en el almacenamiento de lípidos y carbohidratos (49).

Se han observado cambios en las actividades amilolítica y proteolítica del hepatopáncreas como consecuencia de la inyección de extractos de tallos oculares, inclusive en animales en ayuno (50) y también por la extirpación de los tallos oculares, así como durante las diferentes etapas del ciclo de la muda (51). La HHG purificada aumenta notablemente la secreción hepatopancreática de amilasa (52).

Hasta la fecha se cree que la secreción de amilasa es mediada por un aumento de la concentración interna de calcio intracelular y que es posible la intervención de nucleótidos cíclicos generados por ciclasas dependientes de calcio calmodulina (52).

e) Hormona Inhibidora de la Muda (HIM)

El proceso designado como muda o ecdisis es el desprendimiento periódico del exoesqueleto que recubre todo el cuerpo del animal y permite su crecimiento. Este proceso es continuo en la vida de los crustáceos (y de todos los artrópodos); es factible que un 90 % o más del tiempo que transcurre entre las mudas, esté destinado a la conclusión o preparación asociada con la muda anterior y la siguiente.

En muchos crustáceos como el langostino de río y la langosta *Homarus*, las mudas se van espaciando con el tiempo cada vez más. Estos animales pueden llegar a ser muy viejos y pueden alcanzar tamaños considerables. En otros, por ejemplo, en algunos cangrejos, la muda y el crecimiento cesan al alcanzar la madurez sexual o determinado tamaño, o después de determinado número de periodos (1, 53,54).

El exoesqueleto se secreta por una capa de células epiteliales llamada hipodermis. Esta capa está compuesta de una delgada epicutícula exterior y de una procutícula más gruesa.

La epicutícula está compuesta de proteínas. La procutícula ya desarrollada consta de una exocutícula externa y una endocutícula interna. Ambas están compuestas de quitina y proteínas ligadas para formar una glicoproteína compleja. La exocutícula está ausente en las articulaciones y a lo largo de las líneas por las que el exoesqueleto se abrirá durante la muda. En general, se reconocen cuatro fases diferentes en un ciclo de muda: proecdysis, ecdysis, posecdysis e intermuda (Fig. 5).

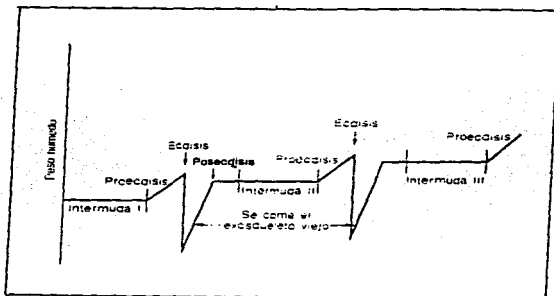


Fig. 5. Cambios de peso durante los estadios secuenciales en el ciclo de mudas en crustáceos. El peso aumenta durante la proecdysis como resultado de la absorción de agua y que se pierde temporalmente cuando se desprende el exoesqueleto viejo. Después del desprendimiento se comen el exoesqueleto como fuente de calcio. Gran parte de la endocutícula es secretada después de la ecdysis (49).

La fase preparatoria o proecdisis (premuda), se destaca por una continua acumulación de reservas alimenticias y un incremento en los niveles de calcio en la hemolinfa, quizá como resultado de la actividad del hepatopáncreas y la resorción de calcio de la cutícula. En algunos crustáceos como el langostino de río y los cangrejos terrestres, el epitelio estomacal secreta concreciones calcáreas, llamadas gastrolitos, que funcionan como centros de almacenamiento de calcio. Las capas membranosas y calcificada del viejo esqueleto se eliminan mediante la digestión enzimática. La resorción de calcio y la digestión de la capa calcificada son particularmente grandes en los lugares donde donde ocurrirá más adelante la hendidura o cuando el esqueleto viejo ha de extenderse o romperse para permitir la salida de una parte terminal grande de un apéndice, como una pinza (1,53,54).

Después de la separación de la cutícula vieja de la epidermis y de la secreción de epicutícula y exocutícula nuevas, el animal está listo para el proceso real de ecdisis, que es muy breve y para el cual busca algún refugio protector o permanece dentro de su agujero. El cuerpo se hincha debido a la absorción de gases y agua a través de las branquias y sale rápidamente del antiguo esqueleto que, por regla general, se come para obtener sales de calcio. La absorción de agua parece ser el resultado de un aumento de la presión osmótica de la sangre, que puede relacionarse a su vez con el aumento de calcio en ella. Durante la posecdisis o metecdisis, se secreta la endocutícula y tiene lugar la calcificación y endurecimiento del esqueleto. El animal permanece en reposo y no se alimenta durante la primera parte de esta fase. La intermuda es breve o prolongada, según si el animal muda estacionalmente o no, y aunque el esqueleto está completamente formado, se acumulan reservas alimenticias para la siguiente muda (1, 53, 54).

El tiempo del ciclo de la muda está bajo el control del sistema endocrino, y están relacionados los órganos -X y -Y, y la secreción de hormona crusecdisona o ecdisona (55).

La ecdisona (Fig.6) es el esteroide más estudiado de los artrópodos, aunque también se ha encontrado en plantas, céstodos, nemátodos y tremátodos (56,57), los crustáceos obtienen el colesterol de la dieta debido a que no tienen la capacidad de sintetizarlo. El colesterol es el precursor de la ecdisona.

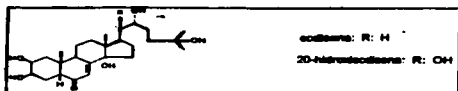


Fig. 6. Estructura de la ecdisona y 20-hidroxecdisona (56).

El sitio activo para la síntesis de ecdisona son los órganos-Y (53,54,58), los cuales están localizados cerca de la base de cada maxila. (Fig. 7). La ecdisona o α -ecdisona (que no puede tener efectos hormonales por sí misma), se transforma a 20-hidroxeecdisona (β -ecdisona) en varios tejidos como el hepatopáncreas, la epidermis, la hemolinfa y otros tejidos periféricos. La β -ecdisona se considera ser la forma activa de la hormona de la muda (59,60,61). Como muchas hormonas esteroides, la ecdisona se une a receptores nucleares y puede afectar la transcripción y/o la traducción (62,63,64,65). El nivel circulante de este esteroide es básicamente el mismo en crustáceos y en insectos, donde, inicialmente de una pequeña cantidad (10-50 ng/ml) de ecdisona aumenta (150-350 ng/ml) al final del ciclo de la muda. La cantidad total de ecdisona circulante durante el ciclo, parece ser variable en los crustáceos, aunque actualmente esto aún no ha sido explicado (62,66,67,68,69).

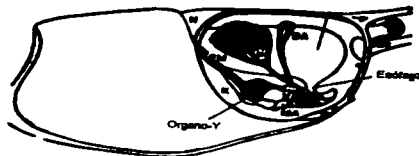


Fig. 7. Localización del órgano-Y en *O. imosus*. AN: antena; DA: músculo ventral dorsal anterior; EM: músculo epidermal; K: cámara branquial; M: músculo principal aductor de la mandíbula; MA: mandíbula, P: músculo aductor posterior de la mandíbula (58).

La idea de la existencia de un control neurohormonal de la muda surgió de la observación en muchas especies de crustáceos, de que la extirpación de los tallos oculares producía una aceleración en el ciclo de la muda. Muchos experimentos han apoyado este concepto: la eliminación de los tallos oculares produjo aumentos notables en los niveles de ecdisteroides circulantes y los animales entraron en la etapa de premuda; la inyección de extractos de tallos oculares en ejemplares destallados condujo a concentraciones bajas de ecdisteroides en la hemolinfa, la secreción de ecdisona a partir de los órganos Y *in vitro* se inhibió en un medio de cultivo que había sido incubado con glándulas sinusales, los órganos-Y de los animales a los que se les había inyectado extractos de glándulas sinusales mostraron, en cultivo, una producción disminuida de ecdisona. (53,56,70,71,72).

La esteroidogénesis de los órganos-Y se suprime por la hormona inhibidora de la muda, durante el período de intermuda. Esta hormona tiene un efecto significativo en el ciclo de la muda por inhibición de la secreción de ecdisona por el órgano-Y (73,74). El complejo proceso de la muda de los crustáceos (y de los insectos) requiere la producción de ecdisona en etapas bien definidas del ciclo de la muda (67,53).

Los efectos agudo (en minutos) y crónico (en días) de la HIM, no se conocen con exactitud. La salida de esta hormona es probablemente regulada por una gran variedad de factores internos y externos, incluyendo el estrés, el fotoperíodo, la temperatura y neuronas serotoninérgicas que median la respuesta de la HIM (75,76,77).

Los efectos crónicos de la HIM se hacen evidentes por la síntesis de esteroides *in vitro* por órganos-Y de animales en intermuda queda muy por abajo de la producción de animales en premuda.

Estudios *in vitro* han demostrado que durante la síntesis de ecdisteroides, hay síntesis de proteínas de novo en la premuda (78,79,80).

Varias proteínas parecen sintetizarse más activamente en la intermuda. La HIM de *O. limosus*, actúa principalmente por un incremento de GMPc, por lo que se ha propuesto que algunas proteínas reguladoras, como ciclasas y cinasas, estén relacionadas en la transducción de señales de la acción de HIM (79).

Con respecto a la regulación a corto término de la síntesis de ecdisteroides, se mostró el efecto de la cicloheximida en la esteroidogénesis, sugiriendo que proteínas de corta vida se requieren para la producción de ecdisteroides (77,79).

En otro estudio, en cangrejos, se observó que la inhibición de la síntesis de ecdisteroides por HIM es mediada por un incremento en los niveles de AMPc. Este efecto se vió usando agentes que incrementan los niveles de AMPc en órganos-Y (77).

Trabajos recientes en el cultivo de órganos-Y han conducido a la caracterización de la actividad de la HIM en la esteroidogénesis, y en la identificación de sistemas de segundos mensajeros mediando la acción de la HIM. En órganos-Y, el AMPc parece ser el regulador crítico de la esteroidogénesis y el calcio antagoniza el efecto del AMPc, activando una fosfodiesterasa de AMPc dependiente de calcio y calmodulina. Además se ha sugerido que el sitio principal de la acción de HIM mediado por AMPc es en la síntesis de proteínas a nivel de la traducción. Se cree que alguna proteína cinasa dependiente de AMPc media la inhibición inducida por HIM. Esto ha sido demostrado por el efecto de la cicloheximida que imita el efecto de la HIM o AMPc sobre la esteroidogénesis (77).

El efecto de la HIM sobre la síntesis de proteínas también ha sido demostrado por cambios ultraestructurales en las células de los órganos-Y en diferentes estadios del ciclo de la muda (81,82).

Los órganos-Y también son necesarios para el desarrollo del ovario y las características sexuales femeninas. Tanto los ovarios como los testículos producen hormonas sexuales esteroides que regulan el ciclo reproductivo. Los machos poseen una glándula androgénica localizada en los vasos deferentes y las hormonas producidas controlan el desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias (53,57).

Hay evidencia de la relación entre la muda y la reproducción, aunque los mecanismos endocrinos de control que generan estos patrones son complejos como se reporta en insectos. En decápodos, los ecdisteroides se han encontrado en tejido gonadal, pero su papel en la regulación de la reproducción todavía no está documentado (53,57).

ANTECEDENTES

En México se han identificado, purificado y caracterizado parcialmente a la HIV de *P. bouvieri*. Se demostró que la HIV pertenece a la misma familia de neuropéptidos que, en *P. bouvieri*, incluye a la HIM y a dos isómeros de la HHG (mayoritario, HHG-I, y minoritario, HHG-II). Con respecto a las HHGs, no se encontró diferencia significativa entre los dos isómeros en cuanto a su efecto hiperglicémico debido a la glucogenólisis en el hepatopáncreas y en el músculo (83,84,85,86).

Se determinó la secuencia de aminoácidos completa de la HHG-I (85) y de la HHG-II (86), parcialmente la HIV (83), y actualmente se conoce la de la HIM (87), mostrando que todas las hormonas consisten de una sola cadena polipeptídica formada por 72 residuos de aminoácidos. Las estructuras incluyen seis cisteínas características de estos neuropéptidos. Todas las hormonas tienen un residuo de ácido pirroglutámico como extremo amino. El extremo carboxilo es un residuo de valnamida. Las masas moleculares de las cuatro hormonas están comprendidas entre 8,300 y 8,400 Da, y se observó que esta familia de neuropéptidos no tiene parecido con ninguna proteína conocida.

La similitud en aminoácidos entre cualquier par de los neuropéptidos (HHG, HIM y HIV) antes mencionados entre las distintas especies de crustáceos decápodos, varía desde un 25 % hasta un 99 % y no muestran una semejanza significativa con otros neuropéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la HIM del cangrejo *C. maenas* (88) comparte un 25 % de similitud con la HIM de la langosta *H. americanus* (89), mientras que esta última muestra un 54 % de similitud con la HHG del cangrejo (90). De esta forma se considera que estas hormonas constituyen una nueva familia de neuropéptidos (103).

A pesar de la exitosa introducción de técnicas de biología molecular en la investigación neuroendocrina en crustáceos, la información sobre la estructura de estos neuropéptidos y sus precursores es todavía muy limitada, especialmente para las hormonas en especies de crustáceos mexicanos como *Procambarus bouvieri*.

Hasta ahora se ha publicado la clonación del DNAC que codifica un neuropéptido semejante a HIM en el camarón blanco *Panaeus vannamei* (91), un DNAC que codifica para un precursor putativo de HIM del cangrejo terrestre *Carcinus maenas* (92), el DNAC de la HIM del cangrejo azul *Callinectes sapidus* (93) y el gen para un péptido que tiene actividad hiperglicemiante e inhibidora de la muda HIM/HHG de la langosta *Homarus americanus* (94).

OBJETIVO

Clonación y secuenciación del DNAc que codifica para la hormona inhibidora de la muda en el tallo ocular del ecocil mexicano *Procambarus bouvieri*.

METAS

En este trabajo se clonará la HIM como una primera etapa en el aislamiento y clonación de otras neurohormonas del tallo ocular de crustáceos mexicanos, entre ellas la HHG, la HIV o HIG, con el objeto de poder usar estos genes en la investigación de la fisiología neuroendocrina de crustáceos, así como en aplicaciones biotecnológicas.

JUSTIFICACIÓN

La información sobre la estructura de estos neuropéptidos y sus precursores es todavía muy limitada, especialmente para las hormonas en especies de crustáceos mexicanos como *Procambarus bouvieri*, por lo que, con el presente trabajo se espera que la clonación de la HIM sea un inicio en la obtención de información en el estudio de la endocrinología molecular de crustáceos.

El conocimiento obtenido acerca de la estructura del gen que codifica para la HIM tendrá aplicaciones diversas, por un lado nos dará información acerca de como este neuropéptido está relacionado en la adaptación de éste crustáceo a un amplio espectro de condiciones naturales y por otro lado en la aplicaciones acuícolas.

HIPÓTESIS

Conociendo la estructura y secuencia de aminoácidos de algunas hormonas aisladas en la glándula sinusal de *Procambarus bouvieri*, además la secuencia nucleotídica de éstas hormonas en otras especies relacionadas de crustáceos, se permitirá diseñar oligonucleótidos que servirán en la clonación y secuenciación de HIM la cual presentará un alto grado de identidad con los neuropéptidos antes mencionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Procambarus bouvieri fue obtenido por pescadores locales en ríos y lagos alrededor de Uruapan, estado de Michoacán, México (7). Se utilizaron animales de ambos sexos, adultos, con un tamaño de 7 ± 1 cm, con un peso de 20 ± 5 g, y en estado de intermuda. Los animales se anestesiaron con hielo y los tallos oculares se cortaron según procedimiento descrito previamente (95). El RNA total se extrajo inmediatamente después de la ablación de todo el tallo ocular.

Extracción de RNA total

Todo el material utilizado fue esterilizado previamente y las soluciones preparadas con agua tratada con DEPC (dietilpircarbonato) al 0.1 % para la eliminación de las RNAsas.

El RNA total fue aislado de acuerdo al método modificado de Chomczynski and Sacchi (Trizol, Gibco, BRL) (96), el cual se basa en la extracción por una solución de guanidín-isotiocianato-fenol-cloroformo.

Se diseccionaron 200 tallos oculares para llevar a cabo la extracción del RNA total siguiendo las indicaciones del proveedor.

El RNA fue resuspendido en agua tratada con DEPC. La concentración del RNA se determinó espectrofotométricamente, por su absorbencia a 260 nm, teniendo en cuenta que $A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$.

La integridad del RNA se confirmó por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído desnaturante, al 1% (Sigma), en 20 mM de MOPS [3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico], 8 mM de acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7, y 6 % formaldehído (97).

Las muestras, así como el marcador de peso molecular de RNA (0.24-0.95 KB, Gibco, BRL), fueron tratadas de la siguiente forma, antes de ser colocadas en el gel desnaturalizante:

A 3 µg de RNA total se les adicionó lo siguiente para obtener una concentración final de:

6 % de formaldehído

50 % de formamida

1 X de MOPS

1X de amortiguador de carga para RNA (5 % de glicerol, 0.2 mM de EDTA pH 8, 0.05 % de azul de bromofenol, 0.05 % de Xilén-Cianol FF)

Se mezclaron estos componentes y para eliminar posibles estructuras secundarias en el RNA, las muestras se incubaron a 70°C por 15 minutos e inmediatamente enfriadas a 4°C por 5 minutos.

Una vez desnaturalizadas las muestras de RNA total, se les adicionó 2.5 µg/mL de bromuro de etidio y se colocaron en el gel.

Para un gel de agarosa desnaturalizante con un volumen de aproximadamente 50 mL, la electroforesis se realizó a un voltaje de 60 volts por 2 horas.

DNA complementario (DNAC) Control

El DNAC de la hormona hiperglicemiante del acocil *Oreocetes limosus* fue donado por el Dr. Dominique De Kleijn de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Nijmegen, Holanda (98).

Este DNAC se usó como control positivo durante la amplificaciones por PCR.

Síntesis de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para ser usados en la reacción de PCR, se diseñaron con base en la secuencia reportada del DNAC de la HHG en *O. limosus*, (98) y en la secuencia de aminoácidos reportada, de la región conservada de la HHG en *P. bouvieri* (85). Ver figura 8.

Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la figura 9 y su localización dentro de la secuencia de la HHG de *O. limosus* se muestra en la figura 10.

Cabe mencionar que el oligonucleótido sentido es aquel que se une a la cadena de DNA que dirige la síntesis del RNAm vía complementariedad de bases. El oligonucleótido antisentido es aquel que se une a la cadena de DNA que tiene la misma secuencia del RNAm (excepto porque contiene timidinas en lugar de uracilos).

Oligonucleótido 1 (Sentido)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	
5'-	CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	GCT	TGT	AAA	GG	-3'

Oligonucleótido 2 (Antisentido)

		75	74	73	72	71	70	
	3'.....	Fin	Lys	Gly	Val	Thr	Gln	
5'-	CC	TTA	CTT	GCC	GAC	AGT	TTG	-3'

Oligonucleótido 3 (Sentido)

	1	2	3	4	5	6	
	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	
5'-	CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	G	-3'

Oligonucleótido 4 (Antisentido)

		75	74	73	72		
	3'.....	Fin	Lys	Gly	Val		
5'-	C	ACC	TTA	CTT	GCC	GAC	-3'

Fig. 9. Secuencias de los cuatro oligonucleótidos usados como cebadores o iniciadores en las reacciones de PCR y secuenciación. En cada iniciador se muestra la secuencia nucleotídica, así como las posiciones aminoácidas, con base en lo reportado para la HHG en *O. limosus*, a partir de las cuales se diseñaron estos oligonucleótidos. Los pares de iniciadores usados fueron 1 y 2 para el primer grupo de RNA total; y 3 y 4 para el segundo grupo de RNA total. La localización exacta se muestra en la figura 10.

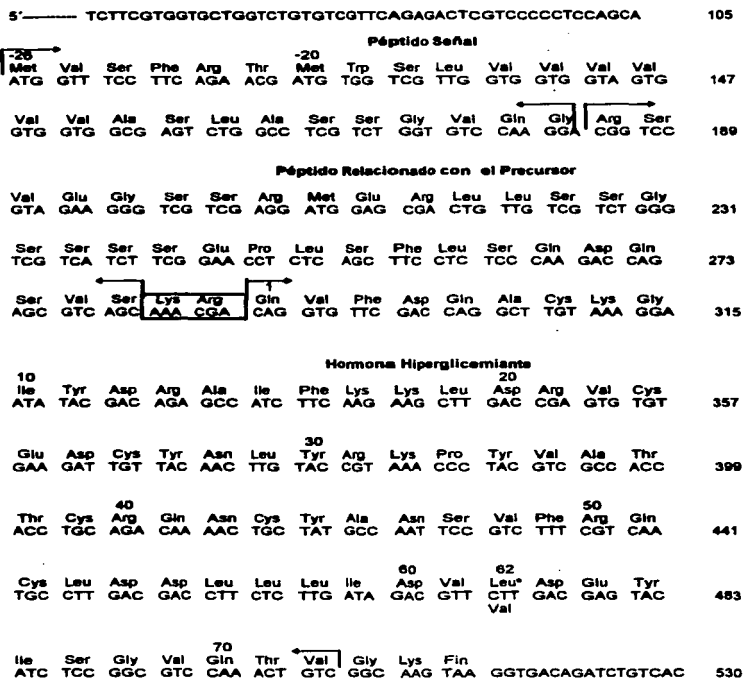


Fig. 6. Secuencias nucleotídica y aminoacídica completas de la HHG del acocil *Oreocetes thomasi*. El aminoácido señalado con asterisco (*), indica la diferencia (Leu62→Val62) entre esta secuencia y la reportada para *P. bouvieri* en esta misma hormona. (16).

1	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	10	Ile	Tyr	Asp	Arg	Ala	
	CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	GCT	TGT	AAA	GGA	ATA	TAC	GAC	AGA	GCC		42
	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	20	Asp	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Cys	Tyr	Asn	
	ATC	TTC	AAG	AAG	CTT	GAC	CGA	GTG	TGT	GAA	GAT	TGT	TAC	AAC		84
	Leu	30	Tyr	Arg	Lys	Pro	Tyr	Val	Ala	Thr	Thr	Cys	40	Arg	Gln	Asn
	TTG	TAC	CGT	AAA	CCC	TAC	GTC	GCC	GCC	ACC	ACC	TGC	AGA	CAA	AAC	126
	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Phe	50	Arg	Gln	Cys	Leu	Asp	Asp		
	TGC	TAT	GCC	AAT	TCC	GTC	TTT	CGT	CAA	TGC	CTT	GAC	GAC			185
	Leu	Leu	Leu	Ile	60	Asp	Val	Leu	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly		
	CTT	CTC	TTG	ATA	GAC	GTT	CTT	GAC	GAG	TAC	ATC	TCC	GGC			204
	Val	70	Gln	Thr	Val	Gly	Lys	75	Fin							
	GTC	CAA	ACT	GTC	GGC	AAG	TAA	GGTGACAGATCTGTCA								225

Fig.10. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región de la hormona madura de la HHG del acocil *Orconectes Nimous*. Se muestra la posición de los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR, SSCP y secuenciación. Con flecha delgada se muestra el par 1 y 2, y con flechas gruesas se indica el par 3 y 4. Arriba de la secuencia nucleotídica, se muestra la posición de los aminoácidos. Los números que están a la derecha, representan el número del nucleótido al final de cada renglón.

Síntesis del DNA complementario (DNAc)

La síntesis de DNAc se llevó a cabo por una reacción de transcripción reversa (TR) con base en el protocolo reportado por Gibco BRL.

Volumen final de reacción 20 µl:**Concentraciones finales:**

3 µg de RNA total

1X amortiguador (5mM Tris-HCl, pH 8.3, 7.5 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂).

10 mM 1,4 - ditiotretitol (DTT).

100 ng de oligonucleótido d(T)₁₇

500 µM de cada dNTPs

600 U de transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)

Tiempo de incubación: 1 hr a 37°C e inmediatamente después a 4°C.

10 µl de la reacción de TR se usaron directamente para la amplificación por PCR.

Amplificaciones del DNAc.**Volumen final de reacción, 50 µl:****Concentraciones finales:**

1 X amortiguador (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, Gibco, BRL)

1.5 mM MgCl₂ (Gibco, BRL)

500 pM de cada iniciador 1 y 2 ó 3 y 4.

200 µM de cada dNTP (Gibco, BRL)

2.5 U de Taq polimerasa (AmpliTaq, Perkin-Elmer, Cetus).

10 µl de la mezcla de reacción de la transcriptasa reversa

La amplificación se realizó en un DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer 9600). El programa usado con el par de iniciadores 1 y 2 fue el siguiente: 25 ciclos de desnaturalización a 95°C, 1 min; hibridación a 52°C, 1 min; extensión a 72°C 1 min. Con 5 min de desnaturalización previa a 95°C y una extensión final por 5 min a 72°C.

El programa usado con el par de iniciadores 3 y 4 fue el mismo, excepto que la temperatura de hibridación fue de 50° C.

Estrategia de clonación del producto de PCR

El DNAc amplificado se seleccionó con base en su tamaño por electroforesis en gel de agarosa al 1.6 %, usando como amortiguador, TBE 1X (0.09 M Tris-Borato, 0.002M EDTA). La clonación se llevó a cabo a partir de todo el producto de PCR, en el vector de expresión pMOSBlue (Amersham), usando las condiciones descritas por el proveedor. Este vector de expresión tiene extremos cohesivos con timidinas compatibles para los productos de PCR que presentan extremos cohesivos con adenosinas en su región 3'. Las características de este vector se muestran en la Fig. 11. Las clonas se obtuvieron y purificaron en células competentes DH5 α (Gibco, BRL). Siguiendo las indicaciones del proveedor.

Las clonas conteniendo los plásmidos recombinantes (clonas positivas) fueron identificadas usando como marcadores la carbenicilina (50 μ g/ml) y la α -complementación (97).

Análisis de clones por reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismos conformacionales de una sola cadena (PCR-SSCP)

Un total de 82 clones obtenidas de dos lotes distintos de RNA total extraído del tallo ocular de *P. bouvieri*, se analizaron por PCR-SSCP (99).

Los plásmidos obtenidos después de llevar a cabo las minipreparaciones, se amplificaron directamente por PCR-SSCP usando los mismos oligonucleótidos que se utilizaron para la TR-PCR, en cada uno de los lotes de RNA total.

Las condiciones de PCR para el análisis de SSCP fueron las siguientes:

30 ciclos de PCR, cada uno consistiendo de: 95°C, 30 segundos de desnaturalización; 52°C, 30 segundos de hibridación; a 72°C, 30 segundos como extensión, y 4°C indefinidamente.

Cada muestra a amplificar fue preparada en un volumen de reacción de 10 µl como a continuación se describe:

Concentración final de cada uno de los reactivos:

1 µg de plásmido

1X amortiguador [10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 0.001 % (p/v) gelatina]

1.5 mM MgCl₂;

0.1 mM de una mezcla de dCTP, dGTP, dTTP

0.08 mM dATP

10 pmol de cada iniciador

1 unidad de Taq polimerasa (Perkin Elmer-Cetus)

2 µCi de [³²P]dATP (6000 Ci/mmol, Amersham)

Después de la amplificación, cada producto de PCR de cada muestra se preparó de la siguiente manera, antes de ser colocado en el gel:

Por cada 1 µl de cada reacción de PCR de cada muestra se adicionaron 24 µl de amortiguador de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% de azul de bromofenol,

0.02 % Xilén-Cianol FF). Se desnaturalizaron 15 minutos a 95° C e inmediatamente a 4° C.

De esta mezcla, solo se tomaron 3µl para ser colocados en el gel.

Se usó como control, una de las muestras bajo condición no desnaturalizada:

Brevemente, a un 1 µl de muestra se adicionaron 24µl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 1 mM, pH8). De estos 25 µl, se tomaron 2 µl y se adicionaron 2 µl de amortiguador de carga (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilén-cianol FF, 30 % glicerol en agua). De esta última mezcla, 3 µl fueron usados para colocarse en el gel.

Los productos de PCR se analizaron en gel de poliacrilamida (Acrlamida: N,N'-metilbisacrilamida, 19:1) al 6% , sin glicerol. La comida del gel se llevó a cabo usando amortiguador TBE 1X, a 10 watts constantes y a temperatura ambiente.

Secuenciación

Las clones recombinantes obtenidas se secuenciaron en ambas cadenas, usando el método de terminación con dideoxinucleótidos (100) La secuenciación se llevó a cabo usando el kit AmpliCycle Sequencing Kit de Perkin-Elmer. Se siguieron las indicaciones del proveedor.

Brevemente a continuación se muestran las concentraciones finales de cada reactivo utilizado:

- 200 ng de templado (plásmido)
- 100 pmol de oligonucleótido
- 1X de la mezcla Cycling mix (10U AmpliTaq DNA polimerasa, CS, en 50 mM Tris-HCl, pH 8.9, 10 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.025% (v/v) Tween 20).
- 2 µCi de [³²P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham)

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

30 ciclos de amplificación de:

Desnaturalización a 95°C 30 segundos

Alineamiento a 50°C 30 segundos

Extensión a 72°C 1 minuto

Cabe mencionar que las condiciones de amplificación fueron las señaladas por el proveedor y que además se hizo un ciclo extra con las siguientes condiciones: Un minuto de desnaturalización a 95°C, un minuto de hibridación a 50°C y un minuto de extensión a 72°C. Se dejó una última extensión durante 5 minutos a 75°C. Se dejó al final que la temperatura bajara a 4°C.

El gel de secuencia fue 7 M de urea, 8 % de acrilamida - bis-acrilamida (29:1), todos las soluciones utilizadas para la preparación del gel, así como el persulfato de amonio y el TEMED fueron de Bio-Rad. Las muestras se corrieron a 70 watts constantes y a una temperatura aproximada de 50° C.

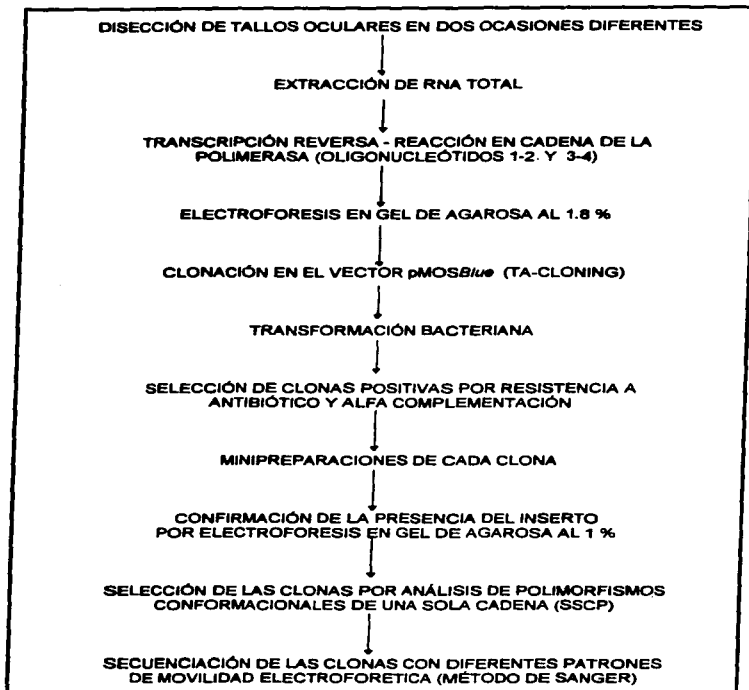


Fig. 12. Se muestra un diagrama de flujo de la metodología seguida durante este trabajo.

RESULTADOS

El uso de PCR con oligonucleótidos derivados de las secuencias reportadas de la HHG de *P. bouvieri* y la HHG de *O. limosus*, mostró ser una técnica exitosa, no solo después de la transcripción reversa, sino también después de llevar a cabo el análisis de polimorfismos conformacionales de una sola cadena o SSCP (99,101,102).

Se usó la reacción de PCR para la amplificación de DNAC. En este caso no se usaron oligonucleótidos degenerados debido al alto grado de similitud (99 %) entre las dos especies de ecocitas.

Esta técnica se utilizó en una secuencia de dos pasos para obtener la secuencia completa del DNAC que codifica la HIM de *P. bouvieri*.

Dentro de un primer paso, se diseñaron un par de oligonucleótidos 1 y 2 (Fig. 8 y 10). La secuencia de los oligonucleótidos usados en el PCR fueron diseñados con base en lo siguiente:

a.- Previamente se había reportado las secuencias parciales deducidas de las HIM, HHG y HIV en *P. bouvieri* (83,84,85,86). En estos trabajos se muestra que existe una alta similitud a nivel de aminoácidos entre las tres hormonas, especialmente en los extremos amino y carboxilo en esta especie de ecocil.

b.- De Kleijn et al. (98) por medio de la estrategia de PCR, reportaron la clonación y expresión de dos RNA mensajeros de la HHG en *O. limosus*.

c.- La alta similitud aminoacídica (99%) entre las HHGs de los ecocitos *P. bouvieri* y *O. limosus*. Ambas HHGs difieren únicamente en un cambio de residuo, Leu62 → Val62, (Fig.13).

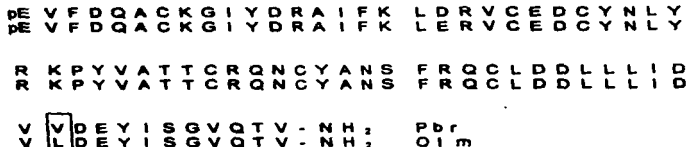


Fig. 13. Comparación de las secuencias de aminoácidos entre las MHG de *P. bouvieri* (Pbr) y *O. limosus* (OIm). La única diferencia se muestra en el recuadro. Ambas hormonas tienen un residuo de ácido pirrolidínico (pE) como extremo amino y en el extremo carboxilo presentan un residuo de valinamida (V-NH₂).

Con base en estos antecedentes, la estrategia seguida durante la clonación, fue que si a nivel de aminoácidos, la MHG entre ambas especies de escodias era muy semejante, las secuencias nucleotídicas tendrían una similitud muy alta también y más aún perteneciendo a la misma familia.

Por lo tanto, la técnica de PCR fue utilizada como una estrategia de clonación para amplificar el DNAC, basada en la información de la secuencia de aminoácidos de un gen homólogo de una especie relacionada (101).

Esta estrategia se pensó con vista en el posible aislamiento no sólo de una hormona, sino quizá de al menos tres hormonas, es decir, que posiblemente se podrían clonar los otros genes por ser miembros de una misma familia génica.

Durante el primer paso de la clonación, se obtuvo un fragmento de 225 pb, el cual se introdujo en un vector de expresión y se seleccionaron aquellas clonas que tuvieran el inserto. Algunas de estas clonas fueron secuenciadas para conocer su identidad. La secuencia de aminoácidos se dedujo a partir del DNAC obtenido y se vio que coincidía en su mayoría con la secuencia parcial reportada previamente para la HIM.

El peso molecular de la proteína deducida era de 8330 Da, y el reportado era de 8320 Da (84). Al hacer la comparación de las secuencias de aminoácidos entre ambas proteínas, se encontró que la diferencia de pesos se debía a un solo aminoácido en la posición 71. Aunque para entonces no se sabía con exactitud el aminoácido en esta posición, se reportaba que podía ser una leucina o una isoleucina (84), y en éste trabajo se encontró una treonina.

Al analizar los resultados, se vió que la treonina deducida, era resultado de una "mutación dirigida" que estaba siendo introducida debido al diseño de los oligonucleótidos usados durante la amplificación.

Por lo que como un segundo paso con base en lo obtenido anteriormente, se llevó a cabo de nuevo la clonación, pero esta vez se diseñó un nuevo par de oligonucleótidos, el 3 y el 4. El oligonucleótido 4 antisentido ocupó la misma posición que el oligonucleótido 2. El tamaño fue de 16 mer y la secuencia no incluía la treonina 71, sino que fue sintetizado a partir de Val 73 y ocupando unas bases del extremo 3' no codificante. El oligonucleótido 3, fue diseñado para unirse a la cadena sentido del DNA y ocupó la misma posición. Se diseñó con un tamaño de 16 mer para igualar la temperatura de hibridación (T_m) durante la amplificación por PCR (Fig. 8 y 10).

La estrategia seguida, como se muestra en la figura 12, durante la primera y la segunda clonación fue la misma y aún cuando en cada una, el RNA utilizado fue extraído de animales distintos en cada ocasión, el resultado, bajo estas condiciones fue la obtención del DNAc que codifica la región de la hormona madura de la HIM.

En ambas ocasiones se siguió la misma metodología de clonación, y los resultados que a continuación se presentan son los obtenidos después de llevar a cabo las amplificaciones con los oligonucleótidos 3 y 4.

Diseción de tallos oculares.

Extracción de RNA total.

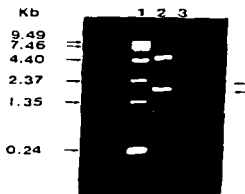


Fig. 14. Se muestra el RNA total extraído del tallo ocular de *P. bouvieri*. 1.-marcador de peso molecular de RNA (Gibco, BRL). 2.- RNA total de mamífero (rata, cepa Long-Evans), usada como referencia para la localización de los RNA ribosomales. 3.- RNA total de *P. bouvieri*. Las flechas indican la posición de las bandas correspondiente a los RNAs ribosomales.

Transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

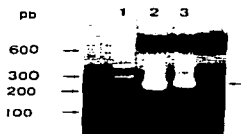


Fig. 15. DNAc obtenido por transcripción reversa apartir de RNA total extraído del tallo ocular de *Procamburus*. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando el par de iniciadores 3 y 4. En el carril no. 1.- marcador de peso molecular de RNA (Gibco). 2.- producto de TR-PCR con un tamaño de aproximadamente 225 pb. 3.- producto de amplificación del DNAc control.

Transformación y selección de clones

Se obtuvo un total de 82 clones que tenían el plásmido con el fragmento de 225 pb (colonias transformadas). Treinta en la primera y 50 en la segunda clonación.

Selección de clones positivas por análisis de SSCP

De las clones que se confirmó que tenían el inserto, se analizaron por polimorfismos conformacionales de una sola cadena (SSCP). Este método fue aprovechado, debido a su sensibilidad para la detección de cambios de bases en secuencias dadas del DNA, siendo amplificadas y marcadas por PCR. Este análisis se hizo pensando en separar y diferenciar, en forma muy general, aquellas clones que tuvieran el DNAc esperado y quizás algún otro DNAc relacionado, pensando en el alto grado de similitud reportado (83,84,85,86) para estos neuropéptidos.

Como se muestra en la figura 16, se pueden observar dos distintos patrones de movilidad obtenidos por SSCP: a).- el primer patrón se muestra en los carriles 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, y 12. Dentro de estas clones se encontró una banda mayoritaria y varias minoritarias o conformómeros, mostrando la misma migración. b).- el segundo patrón se muestra en los carriles 1, 2, 7 y 9. Dentro de estas clones encontramos una banda mayoritaria y varias minoritarias. Dentro de estas últimas bandas se encontraron distintos comientos entre la clona del carril 7 al compararse con las clones de los carriles 1, 2 y 9.

Por lo tanto, las clones que presentaron patrones de movilidad parecidos a la de las clones de los carriles 3, 7 y 9 fueron secuenciadas directamente para confirmar su identidad.

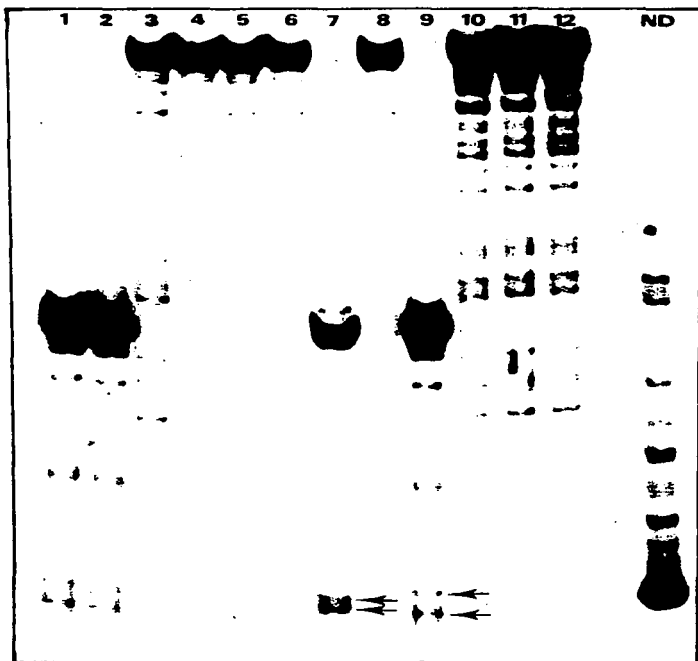


Fig. 16. Análisis de SSCP de las clonas recombinantes obtenidas. Se muestran dos patrones de movilidad. El patrón A: en los carriles 3, 4, 5, 6, 8, 11 y 12. El patrón B: se muestra en los carriles 1, 2, 7 y 9. Dentro de estas últimas clonas se muestran las diferencias encontradas en algunas bandas minoritarias, como lo señalan las flechas en el carril 7, con respecto a los carriles 1, 2 y 9. ND = muestra control No Desnaturalizada.

Secuenciación

La clona del carril 3, mostró que era un producto de amplificación incompleto de la HIM. Las clonas que presentaron un patrón de movilidad semejante al de los carriles 7 y 9 revelaron, de igual forma, la presencia de la secuencia completa que codifica para la región madura de la hormona de HIM. La secuencia nucleotídica del DNac que codifica la HIM en *P. bouvieri* se muestra en la figura 17.

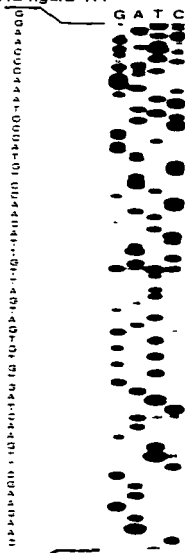


Fig. 17. Secuenciación de las clonas que presentaron distintos patrones de movilidad después del análisis de SSCP. Sólo se muestra una parte de una de las clonas que contenía la secuencia completa de la región madura de la HIM de *P. bouvieri*.

Se clonó el DNAC que codifica la HIM en el acocil mexicano *P. bouvieri*. Este es el primer DNAC aislado de una especie mexicana. Este DNAC tiene un tamaño de 225 pb y codifica para la región de la hormona madura, la cual consta de 74 aminoácidos más el codón de terminación, dando un peso molecular de 8320 ± 3 Da. (Fig. 18).

La secuencia aminoacídica deducida de la HIM contiene seis cisteínas, posiblemente formando tres puentes disulfuro entre los residuos I-V, II-IV, III-VI, como se ha descrito para el cangrejo de tierra *C. maenas*. Estos residuos son característicos de la familia de péptidos de la HHG (103).

Este péptido se encuentra flanqueado en su extremo amino por un residuo de glutamina, el cual se encuentra en el precursor y es consistente con el PiroGlu en el neuropéptido maduro. En su extremo carboxilo, el residuo deducido Gln73 es el donador esperado del grupo amida para la valina72 terminal (Val-NH₂). Sólo hay un residuo básico entre la Gln73 y el codón de terminación, y es una lisina74. La secuencia de HIM no tiene residuos de triptofano, histidina o metionina, un 13.5 % de la secuencia aminoacídica contiene residuos básicos, otro 13.5 % contiene residuos ácidos, un 31 % son residuos polares, y el 42 % esta formado por residuos no polares, lo que indica que esta molécula es de naturaleza moderadamente hidrofóbica.

Entre el análisis de secuencia de otras clonas recombinantes, sólo en una de ellas se encontró una diferencia de una sola base (Tyr11) fuera de la región de los oligonucleótidos, sin embargo, esta sustitución pudiera indicar la aparición de otra HIM o algún péptido relacionado, aunque no se descarta la posibilidad de un error de la Taq polimerasa. Por lo tanto, la secuencia peptídica deducida y las composiciones aminoacídicas coinciden completamente con lo reportado previamente, en cuanto a la caracterización química de la HIM de *P. bouvieri* (87).

1	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	10	Tyr	Asp	Arg	Ala	42
	CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	GCT	TGT	AAA	GGA	ile	TAC	GAC	AGA	GCC	
	Ile	Phe	Lys	Lys	20	Leu	Val	Cys	Asp	Asp	Cys	Tyr	Asn	84	
	ATC	TTC	AAG	AAG	Glu	CTA	GTG	TGT	GAT	GAT	TGT	TAC	AAC		
				A	GAA										
	Leu	30	Arg	Lys	Pro	Lys	Val	Ala	Thr	Thr	Cys	40	Glu	Asn	128
	TTG	Tyr	CGT	AAA	CCC	AAG	GTG	GCC	ACT	ACC	TGC	Arg	GAA	AAC	
	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Phe	50	Arg	Gln	Cys	Leu	Asp	Asp	165
	TGC	TAT	GCC	AAT	TCC	GTC	TTT	CGT	CAA	CAA	TGT	CTC	GAC	GAC	
	Leu	Leu	Leu	Ile	60	Val	Val	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	204	
	CTT	CTC	TTG	ATA	Asn	GTT	GTT	GAC	GAG	TAC	ATC	TCC	GGC		
					AAT										
	Val	70	Ile	Val	Gly	Lys	75	Fin							225
	GTC	Gln	ATT	GTC	GGC	AAG	TAA								
		CAA			---										

Fig. 18. Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida del DNAC que codifica para la región de la hormona madura de la HIM del cocodrilo mexicano *P. bovieri*. La secuencia de aminoácidos comienza en el residuo amino terminal y se muestra por arriba de la secuencia nucleotídica. La diferencia encontrada entre dos clones recombinantes, se muestra por abajo de la secuencia nucleotídica. Un sitio posible de amidación es en la Gly73 como se indica (—).

Al compararse la secuencia aminoacídica de la HHG y la HIM de *P. bouvieri* (Fig. 19), se encontró que comparten un 90 % de similitud, el 10 % de diferencia es debido a que hay siete cambios entre ambos péptidos, como se muestra en las tablas 1 y 2.

Hay dos cambios conservativos, hay un aminoácido que cambia de polaridad (Thr71 → Ile71), y otros cuatro cambian un residuo cargado, es decir, el codón 21 y el 60 cambian de un aminoácido básico y uno ácido respectivamente, por aminoácidos polares. Mientras que los codones 34 y 41 cambian dos aminoácidos sin carga por dos cargados, un básico y un ácido.

Quizás estos cambios de residuos sean importantes para la interacción con el receptor de HIM, además de darle especificidad y tener un efecto exclusivo sobre el receptor, debido a que se ha demostrado en bioensayos de inhibición de la síntesis de ecdisteroides *in vitro*, en órganos-Y, que la HIM no presenta actividad hiperglicemiante, a pesar del 90 % de similitud entre la HHG y la HIM en este ecocil (87). No se han probado otras posibles actividades fisiológicas de éste péptido.

		1									10
HHG	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	Phe	Ile
HIM	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	Ile	Ile
											20
HHG	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Asp	Glu
HIM	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Asp	Glu
											30
HHG	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Cys	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Tyr
HIM	<u>Leu</u>	Val	Cys	<u>Asp</u>	Asp	Cys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Tyr
											40
HHG	Arg	Lys	Pro	Tyr	Val	Ala	Thr	Thr	Cys	Arg	Arg
HIM	Arg	Lys	Pro	<u>Lys</u>	Val	Ala	Thr	Thr	Cys	Cys	Arg
											50
HHG	Gln	Asn	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Phe	Arg	Arg
HIM	<u>Glu</u>	Asn	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Phe	Phe	Arg
											60
HHG	Gln	Cys	Leu	Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	Asp	Asn
HIM	Gln	Cys	Leu	Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	<u>Asn</u>
											70
HHG	Val	Val	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Val	Gln	Gln
HIM	Val	Val	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Val	Val	Gln
											75
HHG	Thr	Val	Gly	Lys	Fin	Fin					
HIM	<u>Ile</u>	Val	Gly	Lys	Lys	Fin					

Fig. 19. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la HHG y la HIM de *Procamberus bouvieri*. Las diferencias están subrayadas.

Tabla 1. Se muestran los cambios de aminoácidos encontrados, apartir de la secuencia de nucleótidos entre la HIM de *P. bouvieri* y la HHG de *O. limosus* y *P. bouvieri*.

Codones en la HHG de <i>O. limosus</i>	Codones en la HIM de <i>P. bouvieri</i>	Posición del Codón	Cambio de aminoácido (<i>O. limosus</i> → <i>P. bouvieri</i>)	Característica del aminoácido cambiado	Tipo de cambio
CAC	GAA	20	Asp → Glu	ácido → ácido	conservativo
CGA	CIA	21	Arg → Leu	básico → no polar	cambia carga
GAA	GAT	24	Glu → Asn	ácido → ácido	conservativo
TTG	CTG	29	Leu → Leu	-----	conservativo
TAC	AAG	34	Tyr → Lys	polar → básico	cambia carga
GTC	GTG	35	Val → Val	-----	conservativo
ACC	ACT	37	Thr → Thr	-----	conservativo
AGA	AGG	40	Arg → Arg	-----	conservativo
CAA	GAA	41	Gln → Glu	polar → ácido	cambia carga
GTC	GTA	48	Val → Val	-----	conservativo
TGC	TGT	52	Cys → Cys	-----	conservativo
CTT	CTC	53	Leu → Leu	-----	conservativo
GAC	AAT	60	Asp → Asn	ácido → polar	cambia carga
CTT	GTT	62	Leu → Val	no polar → no polar	conservativo
ACT	ATT	71	Thr → Ile	polar → no polar	cambia polaridad

Se muestran los codones reportados para la secuencia de la HHG en *O. limosus* y a continuación los encontrados en la secuencia de la HIM de *P. bouvieri*. Se indica la posición del codón y el cambio de aminoácido al que da origen. La comparación entre la HIM y la HHG en *P. bouvieri* solo se puede hacer a nivel de aminoácidos. Son los mismo cambios, excepto Val62 que se encuentran presente en ambas hormonas.

Al compararse la secuencia nucleotídica encontrada de la HIM con la reportada para HHG de *O. limosus* (Fig. 20), se encontró que éstas comparten un 93 % de similitud, lo cual concuerda bastante bien con el 89 % de similitud que presentan a nivel de aminoácidos. Se encontraron 15 cambios de bases entre ambas secuencias. De estas 15, siete son cambios puntuales conservativos, es decir, que no se origina un nuevo aminoácido. De los ocho restantes, seis son cambios puntuales en donde cambia el sentido del codón por otro aminoácido. Los dos últimos cambios son cambios de dos bases en el codón, dando lugar a cambio de aminoácido también.

Con respecto a las diferencias aminoacídicas, se encontraron ocho cambios (Ver tabla. 2), estas son exactamente las mismas que se encontraron entre HHG y la HIM de *Procamberus*, la octava diferencia fue en el codón 62, es un cambio de Leu62 → Val62. Aunque este cambio fue por otro aminoácido, se consideró como un cambio conservativo, es decir, ambos aminoácidos son hidrofóbicos (Fig.21).

Tabla 2. Se muestran las catorce diferencias encontradas a nivel de secuencia nucleotídica, entre la HHG de *O. limosus* y la HIM de *P. bouvieri*.

Codones en la HHG de <i>O. limosus</i>	Codones en la HIM de <i>P. bouvieri</i>	Posición del Codón	Tipo de cambio	Posición del cambio en el codón
CAC	GAA	20	puntual	3a.
CGA	CTA	21	puntual	2a.
GAA	GAT	24	puntual	3a.
TTG	CTG	29	puntual	1a.
TAC	AAG	34	doble mutación	1a y 3a
GTC	GTG	35	puntual	3a
ACC	ACT	37	puntual	3a
AGA	AGG	40	puntual	3a
CAA	GAA	41	puntual	1a
GTC	GTA	48	puntual	3a
TGC	TGT	52	puntual	3a
CTT	CTC	53	puntual	3a
GAC	AAT	60	doble mutación	1a y 3a
CTT	GTT	62	puntual	1a
ACT	ATT	71	puntual	2a

Se muestran los codones encontrados en la secuencia de *P. bouvieri*. Las bases nucleotídicas marcadas en negrilla indican los cambios que se encontraron al compararse con la secuencia de *O. limosus*.

Ori	5'	---	CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	GCT	TGT	AAA	GGA	ATA	TAC		
Prb	5'	---	CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	GCT	TGT	AAA	GGA	ATA	TAC	33	
Ori		GAC	AGA	GCC	ATC	TTC	AAG	AAG	CTT	GAC	CGA	GTG	TGT		
Prb		GAC	AGA	GCC	ATC	TTC	AAG	AAG	CTT	<u>GAA</u>	<u>CIA</u>	GTG	TGT	69	
Ori		GAA	GAT	TGT	TAC	AAC	TTG	TAC	CGT	AAA	CCC	TAC	GTC	GCC	ACC
Prb		<u>GAT</u>	GAT	TGT	TAC	AAC	<u>CTG</u>	TAC	CGT	AAA	CCC	<u>AAQ</u>	<u>GTQ</u>	GCC	<u>ACT</u>
Ori		ACC	TGC	AGA	CAA	AAC	TGC	TAT	GCC	AAT	TCC	GTC	TTT	CGT	CAA
Prb		ACC	TGC	<u>AGQ</u>	<u>QAA</u>	AAC	TGC	TAT	GCC	AAT	TCC	<u>GTA</u>	TTT	CGT	CAA
Ori		TGC	CTT	GAC	GAC	CTT	CTC	TTG	ATA	GAC	GTT	CTT	GAC	GAG	TAC
Prb		<u>TGI</u>	<u>CTQ</u>	GAC	GAC	CTT	CTC	TTG	ATA	<u>AAI</u>	GTT	<u>QTT</u>	GAC	GAG	TAC
Ori		ATC	TCC	GGC	GTC	CAA	ACT	GTC	GGC	AAG	TAA	-- 3'			
Prb		ATC	TCC	GGC	GTC	CAA	<u>AIT</u>	GTC	GGC	AAG	TAA	-- 3'		225	

Fig. 20. Comparación de secuencias nucleotídicas entre la HHG de *O. limosus* (Ori) y la HIM de *P. bouvieri* (Pbr). Las bases subrayadas indican las diferencias entre ambas secuencias. Las bases subrayadas y en negrilla indican cambios que originan cambio de aminoácido, mientras que las que no están en negrilla indican cambios conservativos.

<i>O. limosus</i>		1									10
<i>P. bouvieri</i>		Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	Ile
		<u>Gln</u>	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	Ile
<i>O. limosus</i>											20
<i>P. bouvieri</i>		Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Asp
		Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	<u>Asp</u>
<i>O. limosus</i>											30
<i>P. bouvieri</i>		Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Cys	Tyr	Asn	Leu	Tyr
		<u>Leu</u>	Val	Cys	<u>Asp</u>	Asp	Cys	Tyr	Asn	<u>Leu</u>	Tyr
<i>O. limosus</i>											40
<i>P. bouvieri</i>		Arg	Lys	Pro	Tyr	Val	Ala	Thr	Thr	Cys	Arg
		Arg	Lys	Pro	<u>Lys</u>	<u>Val</u>	Ala	<u>Thr</u>	Thr	Cys	<u>Arg</u>
<i>O. limosus</i>											50
<i>P. bouvieri</i>		Gln	Asn	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Phe	Arg
		<u>Gln</u>	Asn	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	<u>Val</u>	Phe	Arg
<i>O. limosus</i>											60
<i>P. bouvieri</i>		Gln	Cys	Leu	Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	Asp
		Gln	<u>Cys</u>	<u>Leu</u>	Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	<u>Asp</u>
<i>O. limosus</i>											70
<i>P. bouvieri</i>		Val	Leu	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Val	Gln
		Val	<u>Val</u>	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Val	Gln
<i>O. limosus</i>						75					
<i>P. bouvieri</i>		Thr	Val	Gly	Lys	Fin					
		<u>Thr</u>	Val	Gly	Lys	Fin					

Fig. 21. Comparación de las secuencias aminoacídicas de la HHG de *O. limosus* y la HIM en *P. bouvieri*. Los aminoácidos subrayados indican los cambios encontrados a nivel de secuencias nucleotídicas. En negritas son cambios no conservativos. Sin negritas son cambios conservativos.

La estructura de la HIM en distintas especies de crustáceos decápodos ha sido determinada en la langosta *H. americanus* (94), el cangrejo de tierra *C. maenas* (92), el camarón blanco *P. vannamei* (91), y el cangrejo azul *C. sapidus* (93). Todas ellas comparten un alto grado de similitud y son muy parecidas a las HHGs de los mismos crustáceos.

El análisis de alineamiento (104) fue hecho dejando un espacio en el octavo residuo de la secuencia, excepto para las dos especies de cangrejos, para alinear los residuos de cisteína. En este caso, una máxima homología se alcanzó entre todas las secuencias. (Fig.22). Como se puede observar, la HIM es una molécula muy conservada. Catorce de setenta y ocho residuos ó 18 % (basado en la HIM más larga) son idénticos entre todas las HIM. Tomando en cuenta las sustituciones conservadas, el grado de similitud alcanza un 38 % (30 de 78 residuos) y la región mas conservada comprende de los residuos 13-53. Como se muestra en la tabla 3, los distintos porcentajes de similitud entre cualquier par de organismos, coincide con sus distancias filogenéticas calculadas con bases en criterio morfológico (3).

Tabla 3. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la HIM en distintas especies de crustáceos decápodos.

	Pbr	Hoa	Pev	Cam	Cas
Pbr	100	79.3	50	46	46
Hoa	79.2	100	53	46	45
Pev	44.4	49	100	39	34
Cam	32	30	27	100	62
Cas	32	30	25	79	100

En la parte superior derecha de la tabla esta el porcentaje de similitud aminoacídica de cada par de neuropéptidos. En la parte inferior izquierda se muestra el porcentaje de similitud nucleotídica de cada par de genes. Pbr=*P. bouvieri*, Hoa=*H. americanus*, Isoforma A, Pev=*P. vannamei*, Cam=*C. maenas*, Cas=*C. sapidus*.

Los posibles puentes disulfuro estan localizados en las mismas regiones entre los residuos 7-43, 23-29, 26-52 y están incluidos dentro de los aminoácidos conservados. Al parecer, la conectividad es del mismo tipo que en *C. maenas* y en la HHG de *P. bouvieri*. Quizá esta topología sea un rasgo común a toda esta familia de hormonas (90).

El extremo carboxilo, de los residuos 54 a 78, es una región con muy poca similitud, quizá estos residuos estén involucrados en la especificidad de cada especie o grupo de especies.

Por otro lado, a pesar de que el más alto porcentaje de similitud fue alcanzado entre *P. bouvieri* y *H. americanus* entre las HIM, la similitud encontrada, al compararse con la HHG de *O. limosus* y más aún con la HHG del mismo *Procambarus* fue más grande, lo que nos indica que no sólo estas hormonas son muy conservadas entre las distintas especies de crustáceos, sino también entre las distintas hormonas de una misma especie. La HHG de *O. limosus* está muy relacionada con la de *P. bouvieri*, en organización estructural, en tamaño y también en la falta de los residuos Trp, His y Met.

En esta especie mexicana, a pesar de la naturaleza conservada de la HHG y la HIM, su actividad biológica es diferente, como fue demostrado por bioensayos homólogos. (105,106,107).

Por comparación se vió que estas hormonas, HHG, HIM y HIV no revelaron ninguna similitud con cualquier otro péptido conocido. Al parecer son propios de los crustáceos.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de estas mismas especies de crustáceos descritas anteriormente, se llevó con cabo base en el alineamiento de las secuencias peptídicas, obteniéndose de igual forma la mas alta similitud. Como podemos observar en la figura 23, esta similitud es de un 25 %. Los porcentajes de las similitudes encontradas entre las HIM de los distintos organismos, se muestra en la tabla 3 (tomando en cuenta la secuencia más larga).

Prb	pE	V	F	D	Q	A	C	-	K	G	Y	D	R	A	Y	F	K	K	L	E	L	V	C	D	D	C	Y	N	L	Y	R	K	P	K	V	A	T	T	C	
HoaA	pE	V	F	D	Q	A	C	-	K	G	V	D	R	N	L	F	K	K	L	D	R	V	C	E	D	C	Y	N	L	Y	R	K	P	F	V	A	T	T	C	
Pev	D	T	F	D	H	S	C	-	K	G	I	D	R	E	L	F	R	K	L	D	R	V	C	E	D	C	Y	N	V	F	R	E	P	K	V	A	T	T	C	
Cam	R	V	I	N	D	E	C	P	N	L	I	G	N	R	D	L	Y	K	K	V	E	W	I	C	E	D	C	S	N	I	F	R	K	T	G	M	A	S	L	C
Cas	R	V	I	N	D	D	C	P	N	L	I	G	N	R	D	L	Y	K	K	V	E	W	I	C	D	D	C	A	N	I	Y	R	S	T	G	M	A	S	L	C

Prb	R	E	N	C	Y	A	N	S	V	F	R	Q	C	L	D	D	L	L	L	Y	N	V	D	E	Y	I	S	G	V	Q	Y	V	-	NH ₂			
HoaA	R	E	N	C	Y	S	N	W	V	F	R	Q	C	L	D	D	L	L	L	S	N	V	I	D	E	Y	V	S	N	V	Q	M					
Pev	K	S	N	C	F	V	N	K	R	F	N	V	C	V	A	D	L	R	H	D	V	S	R	F	L	K	M	A	N	S	A	L	S				
Cam	R	R	N	C	F	F	N	E	D	F	W	C	V	H	A	T	E	R	S	E	E	L	R	D	L	E	E	W	G	I	L	G	A	G	R	D	
Cas	R	K	D	C	F	F	N	E	D	F	W	C	V	R	A	T	E	R	S	E	D	L	A	Q	L	K	Q	W	V	T	I	L	G	A	G	R	I

Fig. 22. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la HIM en distintas especies de crustáceos decápodos. Los recuadros indican aminoácidos conservados. Prb= *P. bouvieri*, HoaA= *H. americanus*, Pev= *P. vannamei*, Cam= *C. maenas*, Cas= *C. sapidus*, v-NH₂= valina amidada.

El análisis de alineamiento fue hecho de la misma manera, dejando un espacio en el codón ocho, en la secuencia, excepto para las dos especies de cangrejos, para alinear los codones de los residuos de cisteína. En este caso, una máxima similitud se alcanzó entre todas las secuencias. Como se puede observar en la figura 23, la HIM es una molécula muy conservada. Sólo 58 de 234 nucleótidos ó 25 % (basado en la HIM más larga) son idénticos entre todas las HIM, siendo este valor muy parecido al encontrado al compararse los péptidos. La región más conservada comprende de los codones 3-53. Como se muestra en la tabla 3, los distintos porcentajes de similitud entre cualquier par de organismos, coincide con sus distancias filogenéticas calculadas en base a un criterio morfológico (3).

El extremo 3', a partir de los codones 54 a 78, se puede observar que es una región muy poco conservada.

A pesar de que el más alto porcentaje de similitud fue alcanzado entre *P. bouvieri* y *H. americanus* en las secuencias nucleotídicas de HIM, la similitud encontrada, al compararse con la HHG de *O. limosus*, y más aún, con la HHG del mismo *Procambarus* fue la más alta, lo que nos indica que también a nivel de nucleótidos, no sólo estas hormonas son muy conservadas entre las distintas especies de crustáceos, sino también entre las distintas hormonas de una misma especie.

Un análisis de comparación de la hormonas HHG, HIM y HIV en distintas especies de crustáceos decápodos mostró que esta familia de neuropéptidos puede ser dividida en dos subgrupos o subfamilias.

Por un lado el grupo de la HHG guarda un 55 % de similitud entre las distintas especies. El otro subgrupo es el formado por la HIM y la HIV, las cuales guardan un 53 % de similitud también entre las distintas especies. Pero al comparar el parecido entre estos dos subgrupos el porcentaje encontrado es de 19%.

En la tabla no. 4 se muestra un análisis del uso de codones. Ésta es no significativa debido a que no se han reportado otros genes en *P. bouvieri*.

Tabla 4. Frecuencia de uso de codones en *P. bouvieri*. Se analizó la secuencia de nucleótidos (225 pb) de HIM.

Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
Gly	GGG	0.00	0.00	0.00
Gly	GGA	1.00	13.33	0.33
Gly	GGT	0.00	0.00	0.00
Gly	GGC	2.00	26.67	0.67
Glu	GAG	1.00	13.33	0.33
Glu	GAA	2.00	26.67	0.67
Glu	GAT	2.00	26.67	0.67
Asp	GAC	5.00	66.67	0.71
Val	GTC	3.00	40.00	0.38
Val	GTA	0.00	0.00	0.00
Val	GTT	2.00	26.67	0.25
Val	GTG	3.00	40.00	0.38
Ala	GCG	0.00	0.00	0.00
Ala	GCA	0.00	0.00	0.00
Ala	GCT	1.00	13.33	0.25
Ala	GCC	3.00	40.00	0.75
Arg	AGG	1.00	13.33	0.25
Arg	AGA	1.00	13.33	0.25
Ser	AGT	0.00	0.00	0.00
Ser	AGC	0.00	0.00	0.00
Lys	AAG	4.00	53.33	0.67
Lys	AAA	2.00	26.67	0.33
Asn	AAT	2.00	26.67	0.50
Asn	AAC	2.00	26.67	0.50
Met	ATG	0.00	0.00	0.00
Ile	ATA	2.00	26.67	0.40
Ile	ATT	1.00	13.33	0.20
Ile	ATC	2.00	26.67	0.40
Thr	ACG	0.00	0.00	0.00
Thr	ACA	0.00	0.00	0.00
Thr	ACT	1.00	13.33	0.50
Thr	ACC	1.00	13.33	0.50
Trp	TGG	0.00	0.00	0.00
Trp	TGA	0.00	0.00	0.00
Cys	TGC	4.00	53.33	0.67
Cys	TGC	2.00	26.67	0.33
End	TAG	0.00	0.00	0.00
End	TAA	1.00	13.33	1.00
Tyr	TAT	1.00	13.33	0.20
Tyr	TAC	4.00	53.33	0.60

continuation Table 4.

Leu	TTG	2.00	26.67	0.29
Leu	TTA	0.00	0.00	0.00
Phe	TTT	1.00	13.33	0.33
Phe	TTC	2.00	26.67	0.67
Ser	TCG	0.00	0.00	0.00
Ser	TCA	0.00	0.00	0.00
Ser	TCF	0.00	0.00	0.00
Ser	TCC	2.00	26.67	1.00
Arg	CGG	0.00	0.00	0.00
Arg	CGA	0.00	0.00	0.00
Arg	CGT	2.00	26.67	0.50
Arg	CGC	0.00	0.00	0.00
Gln	CAG	2.00	26.67	0.50
Gln	CAA	2.00	26.67	0.50
His	CAT	0.00	0.00	0.00
His	CAC	0.00	0.00	0.00
Leu	CTG	0.00	0.00	0.00
Leu	CTA	1.00	13.33	0.14
Leu	CTT	2.00	26.67	0.29
Leu	CTC	2.00	26.67	0.29
Pro	CCG	0.00	0.00	0.00
Pro	CCA	0.00	0.00	0.00
Pro	CCT	0.00	0.00	0.00
Pro	CCC	1.00	13.33	1.00

DISCUSION

A principios del siglo 20, Koller (108) y Perkins (109) mostraron que en camarones, los movimientos pigmentarios de los cromatóforos eran controlados por hormonas derivadas del tallo ocular. Durante este mismo tiempo, Hanström (110,111) describió un complejo endocrino en el tallo ocular de crustáceos, el órgano-X y la glándula sinusal, y sugirió que este complejo endocrino podría jugar un papel en varias funciones fisiológicas del animal. Además, la eliminación del tallo ocular condujo a conocer más acerca de estos órganos en varios procesos fisiológicos como: el depósito de calcio en la cutícula (112), la aceleración del ciclo cardíaco (113), la contracción muscular (114), la inhibición de la vitelogenénesis (115), la glicemia (116) y la osmoregulación (117) entre otras.

Los estudios más recientes en el área de neurohormonas y su secreción desde el sistema órgano-X - glándula sinusal, se han enfocado principalmente a la caracterización de estos neuropéptidos por métodos bioquímicos. Durante los últimos años, se ha dado más atención a la HHG, HIM y a la HIV. Estas tres hormonas pertenecen a una familia de péptidos que hasta ahora sólo han sido encontradas en crustáceos. La HHG ha sido secuenciada en una especie de cangrejo (90), en una especie de langosta (aunque también tiene actividad de HIM) (94), en un isópodo (118) y en tres especies de langostinos (87,98,119). La HIM ha sido descrita en dos especies de cangrejos (93,92), en una especie de camarón (91) y la HIV (o HIG) sólo ha sido reportada en la langosta (120).

En México, los primeros reportes sobre la caracterización de una hormona neurodepresora en la glándula sinusal de *P.bouvieri* fue en 1977 (121) y no fue hasta 1986 que se describió una familia de neurohormonas en este acocil mexicano. Esto se apoyaba en la semejanza en hidrofobicidad de estos neuropéptidos, los bioensayos homólogos y heterólogos *in vivo* e *in vitro*, la semejanza de sus masas moleculares, los datos de composición de aminoácidos y la presencia de pares de isomorfos (122).

Los péptidos de HHG, HIM, y HIV constituyen no sólo una familia a nivel de las distintas especies, sino también dentro de una sola especie, como es el caso de *P.bouvieri*.

El conocimiento de las secuencias aminoácidos de las hormonas antes mencionadas ha contribuido enormemente al estudio de las mismas a nivel molecular para la investigación neuroendocrina en crustáceos. Las estructuras primarias de estas preprohormonas han sido deducidas a partir de la obtención de DNAc del tallo ocular y la creación de bibliotecas de DNAc. La selección de estas bibliotecas ha sido por hibridación usando como sonda oligonucleótidos degenerados (90), o por la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos degenerados para una primera amplificación, diseñados con base en una secuencia reportada para el mismo gen en otra especie. Con base en la secuencia obtenida se llevó a cabo una segunda amplificación con oligonucleótidos específicos (123,124,125,126).

Otra estrategia de PCR fue con el uso de dos pares de oligonucleótidos degenerados con base en la secuencia amino terminal y carboxilo terminal del mismo péptido. Con estas sondas o productos de PCR se hizo una selección de una biblioteca. La última estrategia de clonación fue por el método de RACE (rapid amplification of cDNA ends) (91).

En este trabajo se aprovechó la alta similitud entre la secuencia de aminoácidos de las distintas hormonas reportadas en *Procambarus*, así como la cercanía evolutiva que existe entre esta especie mexicana y el acocil *Orconectes limosus*. La estrategia de clonación que se siguió en este trabajo, fue a partir de PCR usando oligonucleótidos diseñados con base en una secuencia de un gen que pertenece a la misma familia peptídica y en una especie muy cercana filogenéticamente.

A pesar de que el péptido (85) más abundante encontrado en la glándula sinusal de *Procambarus* es la HHG (mas del 64%), del alto grado de similitud de las distintas hormonas en el acocil y de haberse realizado la clonación en dos ocasiones distintas utilizando dos lotes diferentes de RNA total, solamente se encontró la secuencia de DNAc que codifica la HIM en las distintas clonas recombinantes secuenciadas. Esto nos podría indicar que la expresión de la HIM es mayor que la de cualquiera de los otros péptidos.

Para la HHG, en un estudio realizado en Holanda (24), se vió que la expresión del RNA mensajero varía a lo largo de todo un día, lo cual coincide con la abundancia encontrada con respecto a la cantidad de proteína (24). Para la HIM aún no se ha reportado nada al respecto. Quizá la expresión del RNA mensajero de la HIM sea constante a lo largo del periodo de intermuda. Para *C. maenas* se ha visto que la expresión de HHG y de HIM no se lleva a cabo en las mismas células y tampoco coincide

su liberación de la glándula sinusal (126). Mientras que HHG parece estar involucrada en regulaciones a corto término y su liberación puede responder a varios estímulos ambientales (127,128), la secreción de la HIM parece ser activa en procesos a corto y largo término, como la prolongación de la Intermuda y hay evidencias de regulación durante la muda (129). Se ha demostrado en *C. maenas*, que tanto la liberación como la localización de la HIM difiere considerablemente de la HHG (126). Sería interesante estudiar la localización y expresión de estos péptidos bajo distintas condiciones naturales y experimentales, así como ver el nivel de transcripción de la HIM en distintos estadios del ciclo de la muda.

De Kleijn et al. han visto que la actividad de HHG cambia bajo condiciones como el estrés, la temperatura, el fotoperiodo y también durante los distintos ciclos de la muda (126).

Para la realización de este trabajo los animales utilizados fueron adultos y todos estaban en periodo de intermuda. Quizá las condiciones utilizadas para el manejo, transporte y mantenimiento de estos organismos en el laboratorio, así como otros factores como el fotoperiodo y el estrés sean condiciones predominantes a tomar en cuenta para la clonación de la HHG y la HIV.

Con respecto a la edad, se ha visto que desde el primer estado larval de las langostas (130), varía el nivel de ecdisteroides en la hemolinfa durante el ciclo de la muda. Hay cambios tanto en la ecdisona como en la 20-hidroxiecdisona, aunque estos cambios no se explican todavía. Se piensa que las larvas de crustáceos poseen órganos -X y -Y muy rudimentarios (131) y que quizá usen el mismo sistema de regulación endocrina para el control de la muda el cual es aparentemente desarrollado tempranamente en la vida de los artrópodos. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en animales adultos (54).

Aunque la secuencia que se reporta en este trabajo solo corresponde a la región de la hormona madura, la semejanza tan grande que guarda con la HHG del mismo *Procamberus* y de otras especies como *Orconectes*, nos muestra que este neuropéptido parece pertenecer más al grupo de HHG/HIM que al de la HIV. Para confirmar esto haría falta conocer la estructura completa de HIM incluyendo a la secuencia del péptido señal y quizá, si lo presenta, algún péptido relacionado con el precursor (PRP), que aún no ha sido demostrado en otras HIMs, y ni en la HIG (133). Se propone que el PRP está de un modo ubicuo en la estructura de todas las HHG de crustáceos. Hasta el momento no se

conoce la actividad biológica del PRP. Estas estructuras conservadas sugieren que: a) aseguran el correcto plegamiento de la proteína, exponiendo los sitios apropiados para el procesamiento por enzimas, b) aseguran la correcta asignación de los puentes disulfuro y c) pueden jugar un papel en la síntesis de diferentes isoformas de los péptidos (132,133).

Esto nos daría un acercamiento mayor a la relación que guarda esta familia peptídica no sólo dentro de *Procambarus*, sino dentro de los crustáceos y en general en los artrópodos.

Se encontró recientemente la presencia de dos isómeros para la HHG. Estos isómeros tienen la misma secuencia aminocídica y la diferencia se debe a que en el tercer residuo existe un aminoácido L o D. Esta característica se observó en especies como *H. americanus* (133), *Procambarus clarkii* (119), y *P. bouvieri* (84,85). En *P. bouvieri* la Fen en la tercera posición es la que cambia de L-Fen en HHG-I, a D-Fen en HHG-II. Para el caso de HIM, se encontró lo mismo.

Durante la secuenciación, en una de las clones se encontró un cambio de una base, fuera de la región de los oligonucleótidos (Fig.18). Este cambio se localiza dentro del codón 18 en la secuencia nucleotídica e implica un cambio de una guanina por una adenina (AAG → AAA) sin alterar el aminoácido codificado. Esto nos podría indicar la presencia de algún isómero o algún péptido relacionado a HIM. Hasta este momento no es posible decir cual es el origen de la diferencia de estas clones o si hay otro miembro de la familia de neurohormonas o si esto sea el resultado de otro gen. Aunque este cambio solo se encontró en una sola de las clones analizadas, tampoco se descarta la posibilidad de un error de la Taq polimerasa. Para explicar esto, sería necesario expresar ambos DNAs de HIM con y sin la sustitución presente en el codón 18 y analizar cada hormona en bioensayos *in vitro* sobre la síntesis de ecdisteroides, y quizás conocer si también existe alguna localización en la glándula sinusal en forma selectiva de los distintos péptidos.

Las diferencias encontradas entre la HHG y la HIM en *P. bouvieri* podrían indicar que son productos de diferentes genes y que estos pudieran estar expresados diferencialmente como se ha visto en otros crustáceos (123).

Los valores de similitud entre las HIMs de los distintos crustáceos concuerdan con las distancias filogenéticas entre ellos, establecidos de acuerdo a criterios morfológicos (3). Hasta ahora, no se ha reportado la presencia de intrones en estos genes.

El análisis de estos neuropéptidos en crustáceos está muy lejos de completarse. Aún se requiere trabajar en los neuropéptidos que son sintetizados en otras regiones endocrinas, además de la glándula sinusal en el tallo ocular. Las técnicas de biología recombinante no sólo están dirigidas al estudio del modo de acción y los sitios blanco de las hormonas respectivas, sino que también podrían permitir estudios de la relación estructura-función.

La combinación de técnicas de biología molecular con métodos bioquímicos e inmunoquímicos provee una elegante herramienta para el estudio de los neuropéptidos a nivel de RNA mensajero y péptidos en animales individuales en diferentes condiciones fisiológicas.

El conocimiento de las secuencias aminoacídicas de estos neuropéptidos ha contribuido enormemente a la introducción de técnicas de biología molecular en la investigación endocrina de crustáceos. La secuenciación y la clonación de los DNAs complementarios respectivos, hace posible deducir las estructuras primarias de varios precursores neurohormonales y proveer herramientas técnicas específicas para estudiar su expresión. Además, estas técnicas están disponibles para la producción de hormonas peptídicas recombinantes de crustáceos en sistemas eucarióticos, pudiendo producir así varias de las neurohormonas descritas en cantidades grandes y puras.

El conocimiento fundamental de las estructuras y funciones de estos neuropéptidos de crustáceos puede dar indicios interesantes para la crianza de animales bajo ambientes artificiales de acuicultura.

Sería interesante la aplicación del control de la muda en acuicultura. El gran tamaño y valor nutritivo y comercial de estos organismos puede ser una posible proposición viable.

No hay que olvidar que el proceso de la muda es un evento muy crítico en la vida de los acociles, ya que el animal, durante este período, es susceptible a la exposición a canibalismo y ataque por depredadores. Se tiene que tomar en cuenta la importancia de este fenómeno en el cultivo de acociles, lo cual afecta todos los aspectos de la vida del animal.

CONCLUSIONES

- Se clonó el DNAc que codifica la hormona inhibidora de la muda en el acocil *Procambarus bouvieri*. Es el primer neuropéptido clonado en una especie de crustáceo decápodo mexicano.
- Este DNAc es un fragmento de 225 pb que codifica la región de la hormona madura. Es una sola cadena peptídica constituida por 74 aminoácidos más el codón de terminación.
- Contiene los codones respectivos para seis residuos de cisteína, los cuales son característicos de esta familia de neuropéptidos. El codón 1 codifica una glutamina, la cual coincide con el piroglutámico reportado. El codón 73 codifica una glicina la cual es el donador del grupo amida donador para la valina terminal (Val-NH₂).
- La secuencia de aminoácidos y el peso molecular deducidos del DNAc donado, corresponden a lo reportado previamente.
- Por estudios previos se demostró que esta hormona sólo tiene actividad inhibidora de la muda y no actividad hiperglicemiante. Faltaría corroborar otras posibles funciones fisiológicas de esta hormona.
- Se encontraron dos isomorfos de la HIM. Para entender la importancia de estos isomorfos, se requieren otros estudios para corroborar este dato en la filogenia de este animal.
- La más alta similitud a nivel de secuencias de nucleótidos se encontró al comparar la HIM con la HHG (93%) del acocil *O. limosus*. Los grados de similitud fueron disminuyendo al compararse con la HIM de la langosta *H. americanus* (79%), con la HIM del camarón *P. vannamei* (50%), con la HIM de los cangrejos *C. sapidus* y *C. maenas* (46%), lo cual concuerda con sus distancias filogenéticas.
- La más alta similitud a nivel de secuencias de aminoácidos se encontró al comparar la HIM con la HHG de *Procambarus* (90%). Los grados de similitud fueron

disminuyendo al compararse con la HHG del acocil *O. limosus* (89%), con la HIM de la langosta *H. americanus* (79%), con la HIM del camarón *P. vannamei* (44%), con la HIM de los cangrejos *C. sapidus* y *C. maenas* (32%), lo cual concuerda con sus distancias filogenéticas.

- Se confirmó que la HIM en *P. bouvieri* es una molécula conservada tanto en su secuencia de aminoácidos como de nucleótidos.

- Por su alta similitud, se piensa que la HIM, HHG y HIV en *P. bouvieri* forman una familia de neuropéptidos intraespecie. Esta similitud es mayor que la encontrada interespecie.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Goldman, Ch. R. (1981). Freshwater crayfish. Fifth International Symposium on Freshwater crayfish. Davis California, USA. Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. pp.564.
- 2.- Huner, J.V. (1987). Crayfish- The heart of Louisiana. Sea food International. January. pp. 40-45.
- 3.- Browman, T.E. and Abele, L.G. (1982). Classification of the recent crustacea: Systematics, the fossil record and biogeography. In: The Biology of Crustacea (Bliss D.E. and Abele L.G., eds.). vol. 1. Academic Press, New York. pp. 1-27.
- 4.- Pennak, R.W. (1978). Freshwater invertebrates of the USA. Identification Manual no.9. For the Environmental protection agency. John Wiley and Son. 2nd. ed. New York. 955 pp.
- 5.- Horton, H. and Hobbs, Jr. (1972). Crayfishes (Astacidae) of north and middle America. Identification Manual no.9. Department of Invertebrate Zoology Smithsonian Institution, Washington, D.C. pp.173.
- 6.- Erichson, W. F. (1846). Uebersicht der arten der gattung *Astacus* vom herauseber. Arch. FurNaturges chichte, Zwolfter Jahrgang Erster Band mit Zwolf Knopferten. vol 12, pt.1, pp 86-103.
- 7.- Villalobos, A. (1955). Crayfish of Mexico (Crustacea:Decapoda) [Cambarinos de la fauna mexicana: crustacea decápoda]. Thesis. Fac. Ciencias, UNAM. México. pp 290.
- 8.- Ortmann, A. E. (1908). Une ecrevise nouvelle du Mexique.*Cambarus* (*cambarus*) *bouvieri* Ortmann, nov. sp. Ann. Sci. Nat. Zool. vol. VII. Ser. 9. pp. 159-166.
- 9.- Villalobos, A. (1948) *Procambarus bouvieri* (Ortmann). An. Inst. Biol. de la UNAM. vol. XVII, no. 1. pp. 219-220, 224-229.

- 10.- Sandeman, D.C. (1982). Organization of the Central Nervous System: Neurobiology: structure and function. In: The biology of crustacea (Atwood, H.L. and Sandeman, D.C., eds.), vol. 3., Academic Press. New York. pp. 1-61.
- 11.- Fingerman, M. (1967). Endocrine Mechanism in Crustaceans. *J. Crustacean Biol.* 7: 1-24.
- 12.- Beltz, B. S., Laufer, H. and Downer, R.G.H. (1982). Crustacean neurohormones (eds). In: Endocrinology of Selected Invertebrate type. (Bliss, A.R., ed.). Vol. 2. Academic Press, New York . pp. 255-258.
- 13.- Maddrell, S.H.P. and Normand, J.J. (1979). "Neurosecretion" / Tertiary level biology. Blackie and son Limited, London. 306 pp.
- 14.- Carlisle, D.S. and Knowles, F.G.W. (1953). Neurohaemal organs in crustaceans. *Nature* 172:404-406.
- 15.- Knowles, F.G.W. (1951). Hormone production within the nervous system of a crustacean. *Nature (London)* 167:564-570.
- 16.- Knowles, F.G.W. (1953). Endocrine activity in the crustacean nervous system. *Proc. R. Soc. Lond.* 141:248-267.
- 17.- Carlisle, D.B. and Knowles, F.G.W. (1959). Endocrine control in crustaceans. Cambridge University Press. London and New York. 178 pp.
- 18.-Alexandrowitz, J.S. (1953). Nervous organs in the pericardial cavity of the decapod crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 31: 563-580.
- 19.- Alexandrowitz, J.S. and Carlisle, D.B. (1953). Some experiments on the function of the pericardial organs in Crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 32: 175-192.
- 20.- Evans, P.D. , Kravits, E.A., Talamo, B.R. and Wallace, B.G. (1976). The association of octopamine with specific neurons along lobster nerve trunks. *J. Physiol. (London)* 262:51-70.

- 21.- Evans, P.D. , Kravits, E.A., Talamo, B.R. (1976). Octopamine release at two points along lobster nerve trunks. *J. Physiol* (London). 262: 71-89.
- 22.- Kravitz, E. A., Beltz, B., Glusman, S., Goy, M., Harris-Warrick, R., Johnston, M., Livingston, M., Schwartz, T. and Shwicki, K. (1965). The well modulated lobster: the roles of serotonin, octopamine and proctocolin in the lobster nervous system. In: *Model neural networks and behavior* (A. Selverston) Plenum Press, New York. pp. 39-369.
- 23.- Atwood, H. L. and Scandeman, D.C. (1982). Neurobiology: Structure and Function. In: *Endocrinology of Selected Invertebrate type*. (Bliss A.R., ed.). Vol. 3. Academic Press, New York. pp. 255-258.
- 24.- Kallen, J. (1965). The hyperglycemic hormone producing system in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*. Thesis. University of Nijmegen, Netherlands.
- 25.- Kleinholz, L.H. (1976). Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *Amer. Zool.* 16:151-166.
- 26.- Kleinholz, L.H. (1965). Biochemistry of crustacean hormones (D. Bliss y L.H. Mantel, eds). In: *The biology of crustacea* vol. 9. Academic Press, New York. pp 463-522.
- 27.- Cooke, I. and Sullivan, R.E. (1982). Hormones and neurosecretion: Neurobiology: structure and function. In: *The biology of crustacea*. (Bliss, D., ed.). Vol. 3. Academic Press, New York. pp. 205-290.
- 28.- Gabe, M. (1966). "Neurosecretion" . Pergamon Press, Oxford. 245 pp.
- 29.- Femlund, P. and Josefsson, L. (1968). Chromativating hormones of *Pandalus borealis*, isolation and purification of the red-pigment-concentrating hormone. *Biochem. Biophys. Acta.* 158:262-273.
- 30.-Welsh, W. (1941). The sinus gland and 24-hours cycles of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exp. Zool.* 86: 25-49.

- 31.- Arámburo de la Hoz, C. (1978). Aislamiento, purificación y caracterización de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del camarón *Penaeus vannamei* (Bonne). Tesis, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 97 pp.
- 32.- Naylor, E. and Williams, B.G. (1968). Effect of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in *Carcinus maenas*. J. Exp. Biol. 49: 107-116.
- 33.- Aréchiga, H., Cortes, J.L., García, U. and Rodríguez-Sosa, L. (1985). Neuroendocrine correlates of circadian rhythmicity in crustaceans. Am. Zool. 25: 265-274.
- 34.- Aréchiga, H., Cabrera-Peralta, C. and Huberman, A. (1979a). Functional characterization of the neurodepressing hormone in the crayfish. J. Neurobiol. 4: 409-422.
- 35.- Aréchiga, H. and Huberman, A. (1980). Hormonal modulation of circadian behavior in crustaceans. Front. Hormon. Res. 6: 16-34.
- 36.- Aréchiga, H., Williams, J., Pullin, R.S.V. and Naylor, E. (1979b). Cross-sensitivity to neuro-depressing hormone and its effect on locomotor rhythmicity in two different groups of crustaceans. Gen. Comp. Endocrinol. 37: 350-357.
- 37.- Adiyodi, R.G. (1985). Reproduction and its control. In the biology of crustaceans (Bliss, D.E. and Mantel, L.H. eds.). Vol. 9. Academic Press, New York. pp. 147-215.
- 38.- Lui, C.W. and O'Connor, J. D. (1976). Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. II. Characterization and *in vitro* incorporation of amino acids into purified subunits. J. Exp. Zool. 195: 41-52.
- 39.- Eastman-Reks, S. and Fingerman, M. (1985). *In vitro* synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab. *Uca pugilator*. J. Exp. Zool. 233: 11-116.

- 40.- Lui, C. W. and O'Connor, J.D. (1977). Biosynthesis of lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into purified lipovitellin of the crab, *Pachygrapsus crassipes*. J. Exp. Zool. 199: 105-108.
- 41.- Chamisoux-Cotton, H. (1985). Vitellogenesis and its control in malecostracean Crustacea. Am. Zool. 25: 197-208.
- 42.- Panouse, J. B. (1943). Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. C. R. Acad. Sci. Paris. 217: 553-555.
- 43.- Eastman-Reks, S. and Fingerman, M. (1984). Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. 79A: 679-684.
- 44.- Jugan, P. and Soyeux, D. (1985). Démonstration *in vitro* de l'inhibition de l'endocytose ovocytaire par un extrait de glandes du sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*. C. R. Acad. Sci. Paris. 300: 705-709.
- 45.- De Kleijn, D.P.V., Coenen, T., Laverdure, A.M., Tensen, C.P. and Van Herp, F. (1992). Hormones and neurosecretion. Neuroscience. 51: 121-128.
- 46.- Abramowitz, A. A., Hisaw, F. L. and Papandrea, D.N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. Biol. Bull. (Woods Hole, Mass) 86: 1-5.
- 47.- Sedlmeier, D. (1988). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. Regul. Pept. 20: 91-98.
- 48.- Aguilar, M. B. (1986). Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la hormona hiperglucemiante de *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis Profesional. Facultad de Química, Universidad Veracruzana, Xalapa.

- 49.-Chang, E.S. and O'Connor, J.D. (1988). Crustacea: molting. In: *Endocrinology of selected invertebrate types* (H. Laufer and R.G.H. Downer, eds.). Vol. 2. Alan R. Liss Inc. New York. pp. 235-258.
- 50.- Femlund, P. and Josefsson, L. (1972). Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* 177: 173-175.
- 51.-Van Wormhoudt, A., Bellon-Humbert, C. and Malcoste, R. (1976). Effects de l'ablation des glandes endocrines pédonculaires (glandes sinus, MEX, et organe de Bellonci) et de la lumière sur les variations des activités enzymatiques digestives de *Palaeomon serratus* (Pennant). *Arch. Zool. Exp.* 117: 451-458.
- 52.- Laverdure, A. M., Desmoucaelles-Carette, C., Breuzet, M. and Hayes, T.K. (1992). Combination of *in situ* hybridization and immunocytochemistry to detect peptide messenger RNAs in the X-organ of Penaeidae. Première Conférence européen sur les Crustacés (First European Crustacean Conference, Abstracts) agosto 31-septiembre 5, Paris.
- 53.- Skinner, D.E. (1985). Molting and regeneration. In: *The biology of crustacea* (D.E. Bliss and L.H. Mantel, eds.) vol. 9. Academic Press. New York, NY. pp. 43-145.
- 54.- Lechaise, F., Le Roux, Hubert, M. and Lafont, R. (1993). The molting gland of crustaceans: localization, activity and endocrine control (a review). *J. Crust. Biol.* 13(2): 198-234.
- 55.- Whitehead, D. L. (1983). Steroids, the earliest hormones. *Nature (Lond.)* 306:540.
- 56.- Kopec, S. (1992). Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull. (Woods Hole)*. 42: 323-42.
- 57.- Chang, E. S. (1993). Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 161-180.

- 58.- Quackenbush, L. S. (1986). Crustacean endocrinology, a review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 2271-2282.
- 59.- Jegla, T.C., Ruland, C., Kegel, G. and Keller, R. (1983). The role of the Y-organ and cephalic gland in ecdysteroid production and the control of molting in the crayfish *Orconectes limosus*. *J. Comp. Physiol.* 152: 91-95.
- 60.- Chang, E. S., Bruce, M. J. and Tamore, S. L. (1993). Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *Am. Zool.* 33: 324-329.
- 61.- Chang, E. S. and O'Connor, J. D. (1988) Crustacea: molting. in: *Endocrinology of selected invertebrates types* (Laufer, H., Downer, R.G.H., eds.). New York: Alan R. Liss. pp. 259-278.
- 62.- Otsu, T. and Hanaka, K.I. (1951). Relation between body weight and precocious differentiation of ova in eyestalkless crabs. *Bull. Yamagata Univ. (Nat. Sci.)* 1: 269-274.
- 63.- Londershausen, M. and Spindler, K. D. (1985). Uptake and binding of molting hormones in crayfish. *Am. Zool.* 25: 187-196.
- 64.- Raabe, M. (1982). *Insect neurohormones*. Plenum Press. New York, N.Y. 352 pp.
- 65.- Spindler, K. D., Keller, R. and O'Connor, D. (1980). The role of ecdysteroids in the crustacean molting cycle. p. 247-280. In: *Progress in ecdysone research* (Hoffman, J. A. ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- 66.- Aida, L., Porcheron, L., Coimbra, J. and Cassier, P. (1984). Ecdysteroids in the shrimp, *Palaemon serratus*: relations with the molt cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 437-443.
- 68.- Hopkins, P. M. (1983). Patterns of serum ecdysteroids during induced and uninduced proecdysis in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 350-356.

- 69.- Hopkins, P. M. (1986). Ecdysteroid titers and Y-organ activity during late intermolt and proecdysis in the fiddler crab *Uca pugilator*. Gen. Comp. Endocrinol. 63: 362-373.
- 70.- Bollenbacher, W. E., Vedeckis, W.V., Gilbert, L. I. and O'Connor, J. D. (1975). Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. Dev. Biol. 44: 46-53.
- 71.- Keller, R. and Schmid, E. (1979). *In vitro* secretion of ecdysteroids by Y-organs and lack of secretion by mandibular organs of the crayfish following molt induction. J. Comp. Physiol. 130: 347-352.
- 72.- Echallier, G. (1959). L'organe Y et le déterminisme de la croissance et de la mue chez *Carcinus maenas* (L), Crustacé Décapode. Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. 12:1-59.
- 73.- Zeleny, C. (1905). Compensatory regulation. J. Exp. Zool. 2: 1-102.
- 74.- Freeman, J. A. (1960). Hormonal control of chitinolytic activity in the integument of *Balanus amphitrite*, *in vitro*. Comp. biochem. Physiol. 65A: 13-17.
- 75.- Tamm, G. R. and Cobb, J.S. (1978). Behavior and the crustacean molt cycle: changes in aggression of *Homarus americanus*. Science (Wash., D.C.) 200:79-81.
- 76.- Mattson, M. P. and Spaziani, E. (1985a). Stress reduces hemolymph ecdysteroid levels in the crab: mediation by the eyestalks. J. Exp. Zool. 234: 319-323.
- 77.- Quackenbush, L.S. and Hemkind, C. (1981). Regulation of the molt cycle in the spiny lobster, *Panulirus argus*: effect of photoperiod. Comp. Biochem. Physiol. 78a: 259-263.
- 78.- Mattson, M. P. and Spazianni, E. (1986). Regulation the Y-organ ecdysteroidogenesis by molt-inhibiting hormone in crabs: involvement of cyclic AMP-mediated protein synthesis. Gen. Comp. Endocrinology. 63: 414-423.
- 79.- Chang, E., Bruce, M. J. and Tamone, S. L. (1993). Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. Amer. Zool. 33: 324-329.

- 80.- Dauphin-Villemant, C., Böcking, D. and Sdimmeler, D. (1995). Regulation of steroidogenesis in crayfish molting glands: involvement of protein synthesis. *Mol. Cell. Endocrinology*, 109:97-103.
- 81.- Hinsch, G. W., Spaziani, E. and Vensel, W.H. (1980). Ultrastructure of the Y-organ of *Cancer antennarius* in normal and de-eyestalked crabs. *J. Morphol.* 163: 167-174.
- 82.- Mattson, M. P. and Spaziani, E. (1985d). Characterization of molt-inhibiting hormone (MIH) action on crustacean Y-organ segments and dispersed cells in culture, and a bioassay for MIH activity. *J. Exp. Zool.* 236: 93-102.
- 83.- Aguilar, M., Quackenbush, L. S., Hunt, D. T., Shabanowitz, J. and Huberman, A. (1992). Identification, purification, and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B (3): 491-498.
- 84.- Huberman, A. and Aguilar, M. (1989). A neuropeptide with molt-inhibiting hormone activity from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B (2): 299-305.
- 85.- Huberman, A., Aguilar, M., Brew, K., Shabanowitz, J. and Hunt, D. (1993). Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison. *Peptides* 14: 7-16.
- 86.- Aguilar, M., Soyez, D., Falchetto, R., Amott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. T. and Huberman, A. (1995). Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): presence of a D-amino acid. *Peptides*, 16(8):1375-1383.
- 87.- Aguilar, M., Falchetto, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. T. and Huberman, A. (1996). Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Peptides*, 17(3): 367-374.

88. Webster, S.G. (1991). Amino acid sequence of a putative molt-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 244: 247-252.
- 89.- Chang, E.S., Prestwich, G. and Bruce, M. (1990). Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster *Homarus americanus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171: 818-826.
- 90.- Weidemann, W., Gromoll, J. and Keller, R. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. FEBS 257(1):31-34.
- 91.- Sun, P. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol. Mar. Biol. Biotech. 3(1):1-6.
- 92.- Klein, J.M., Mangerich, S., Klijn, D., Keller, R. and Weidemann W. M. (1993). Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. FEBS. 334(1): 139-142.
- 93.- Lee, K., Elton, T. S., Bej, A. K., Watts, S. A. and Watson, D. (1995). Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209(3): 1126-1131.
- 94.- De Kleijn, D. P. V., De Leeuw, E. P. H., Van Den Berg, M. C., Martens, G. J. M. and Van Herp, F. (1995). Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. Biochem. Biophys. Acta. 1260: 62-66.
- 95.- Huberman, A. and Aguilar, M. (1988). Single-step purification of two hyperglycemic neurohormones from the sinus gland of *Procambarus bouvieri*. J. Chrom. 443: 337-342.

- 96.- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162: 156-159.
- 97.- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edition edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 98.-De Kleijn, P. V. D., Janssen, K. P. C., Martens, G. J. M. and Van Herp, F. (1994). Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 224: 623-629.
- 99.- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5: 874-879.
- 100.- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- 101.- Gould, S. J., Subramani, S. and Scheffler, I. E. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1934-1936.
- 102.- Susuzi, S. and Naitoh, Y. (1990). *EMBO J.* 9:757-763.
- 103.- Kettler, R. (1992). Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia.* 48: 439-448.
- 104.- (1995) PILEUP. Programa de la paqueteria GCG. Genetic computer group. Wisconsin package. Version 8..
- 105.- Ferrich, R. (1987). Neuroendocrine regulation of the crayfish molting gland. Diploma thesis, University of Bonn.
- 106.-Huberman, A. and Aguilar, M. (1990). Hormonal control of molting in crustaceans. In: Epple, A., Scanes, C. G., Stetson, M. H., eds. *Progress in comparative endocrinology*, vol. 342 of *Progress in clinical and biological research*.

Proceeding of the eleventh international symposium on comparative endocrinology, 14-20 May, Málaga, Spain. New York: Wiley. pp 205-210.

107.- Huberman, A. and Aguilar, M. (1986). A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann), I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 85: 197-203.

108.- Koller, G. (1925). Farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. *Verhandlungen der deutschen zoologischen Gesellschaft* 30: 128-132.

109.- Perkins, E. B. (1928). Colour changes in crustaceans, especially in *Palaemonetes*. - *J. Exp. Zool.* 50: 71-9.

110.- Hanström, B. (1931). Neue Untersuchungen über Sinesorgane und nervensystem der crustacean I. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere.* 23: 80-236.

111.- Hanström, B. (1931). Neue Untersuchungen über Sinesorgane und nervensystem der crustacean II. *Zoologische Jahrbücher, Physiologie.* 56: 387-520.

112.- Koller, G. (1930). Weitere untersuchungen über farbwechsel und farbwechselhormon bei *Crangon vulgaris*. *Zeitschrift der vergleichenden physiologie.* 12: 632-667.

113.- Welch, J. H. (1937). The eyestalk hormone and rate of heart beat in crustaceans. *Proc. Natl. Acad. Sci, Washington.* 23: 458-460.

114.- Kalmus, H. (1938). Das Aktogramm des flusskrebse und sein beeinflussung durch organsextrakte. *Zeitschrift der vergleichenden physiologie.* 25: 788-802.

115.- Panouse, J. B. (1943). Influence de l'ablation du péduncule oculaire sur la croissance de l'ovarie chez la crevette *Leander serratus*. *Comptes rendus de l'Académie des sciences, Paris, France, Série D,* 217: 553-555.

- 116.- Abramowitz, A. A., Hsaw F. L., Papandrea, D.N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. Biol. Bull. (Woods Hole, Mass) 86: 1-5.
- 117.- Scudamore, W. (1947). The influence of the sinus gland upon molting and associated changes in the crayfish. Physiol. Zool. 20: 187-208.
- 118.- Martin, G., Sorokine, O. and Van Dorsselaer, A. (1993). Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (crustacea). Eur. J. Biochem. 211: 601-607.
- 119.- Yasuda, A., Yasuda Y., Fujita, T. and Naya, Y. (1994). Characterization of hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular steroidinversion and diverse functions. Gen. Com. Endocrinol. 95: 387-398.
- 120.- De Kleijn, D. P. V., Sleutels, F. J. G. T., Martens, G. J. M. and Van Herp, F. (1994). Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. FEBS Lett. 353: 255-258.
- 121.- De la Rosa Velez, J. (1977). Caracterización de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis Profesional, Fac. de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- 122.- Aguilar, M. (1993). Estudio estructural de varios neuropéptidos hormonales del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- 123.- Linck, B., Klein, J. M., Mangerich, S., Keller, R. and Weideman W. M. (1993). Molecular cloning of crustacean red pigment concentrating hormone precursor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 807-813.
- 124.- Klein, J. M., Mohrherr, C. J., Sleutels, F., Riehm, J. P. and Rang Rao, K. (1994). Molecular cloning of two pigment-dispersing hormone (PDH) precursors in the blue crab *Callinectes sapidus* reveals a novel member of the PDH neuropeptide family. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205: 410-416.

- 125.- Klein, J. M., De Kleijn, D. P. V., Keller, R. and Weidemann, W. M. (1992). Molecular cloning of crustacean pigment dispersing hormone precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1509-1514.
- 126.- Klein, J. M., De Kleijn, D. P. V., Hunemeyer, G., Keller, R. and Weidemann W. M. (1993a.) Demonstration of the cellular expression of genes for moulting inhibiting and crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the shore crab *Carcinus maenas*. *Cell Tissue Res.* 274: 515-519.
- 127.- Keller, R. and Sedimeier, D. (1988). A metabolic hormone in crustaceans: the hyperglycemic neuropeptide. In: *Endocrinology of selected invertebrate types* (Laufer, H. and Downer, R. G. H., eds.). vol. 2. *Invertebrate endocrinology*. Liss, New York, pp. 315-326.
- 128.- Keller, R. and Orth, H.P. (1990). Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: *Progress in comparative endocrinology*. (Epple, A., Scanes, C. G. and Stetson, M. H., eds.). Wiley-Liss, New York, pp. 265-271.
- 129.-Webster, S.G. and Keller, R. (1990). Molt-inhibiting hormone. In: *Ecdysone: from chemistry to mode of action*. (Koolman, J., ed.). Thieme, Stuttgart New York, pp. 211-216.
- 130.- Chan, E. and Bruce, M. (1981). Ecdysteroid titers of larval lobsters. *Comp. Biochem. Physiol.* 70A: 239-241.
- 131.- McConaughy, J. R. (1980). Identification of the Y-organ in the larval stages of the crab *Cancer anthonyi* (Rathbun). *J. Morphol.* 164: 83-88.
- 132.- Tensen, C. P., Verhoeven, A. H. M., Gaus, G., Janssen, K. P. C., Keller, R. and Van Herp, F. (1991). Isolation and amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone precursor-related peptides. *Peptides*. 12: 673-981.

133.-Soyez, D., Van Herp, F., Rossier J., Le Caer, J., Tensen, C.P., Lafont, R. (1994). Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. *J. Biol. Chem.* 269: 18295-18298.

APÉNDICE I

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Cam	<i>Carcinus maenas</i>
Ca	<i>Callinectes sapidus</i>
°C	Grados centígrados
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dATP- ³² P	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato marcado radiactivamente con fósforo 32 en la posición alfa.
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	Diethyl-pirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HAL	Hormona de adaptación a la luz
HCPR	Hormona concentradora del pigmento rojo
HHG	Hormona hiperglicemiante
HIG	Hormona inhibidora de las gónadas
HIM	Hormona inhibidora de la muda
HIV	Hormona inhibidora de la vitelogénesis
HND	Hormona neurodepresora
Hoa	<i>Homarus americanus</i>
Kb	Kilo bases
M	Molar
Mer	Número de bases nucleotídicas
MgCl ₂	Cloruro de magnesio

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMLV	Transcriptasa reversa (Moloney murine leukemia virus)
MT	Médula terminal
MOPS	3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico
ng	nanogramo
Oligo d(T)	Oligonucleótido formado por desoxitimidinas
Olm	<i>Orconectes limosus</i>
OXMT-GS	Órgano X-médula terminal-glándula sinusal
pb	pares de bases
Pbr	<i>Procambarus bouvieri</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pE	Piroglutámico
Pev	<i>Penaeus vannamei</i>
Piro-glu	Piroglutámico
pM	picomolar
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SSCP	Polimorfismos conformacionales de una sola cadena
TBE	0.09 M Tris-borato - 0.002 M ácido etilendiaminotetracético
TE	10 mM Tris - 1mM ácido etilendiaminotetracético
Tm	Temperatura de hibridación
TR-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
U	Unidades
Val-NH ₂	Valina amidada
% v/v	por ciento en volúmen
% p/v	por ciento en peso sobre volúmen
μM	Micromolar
μL	Microlitro
μCi/mmol	Microcuries por milimol

ESTA TESIS NO DEBE
SALAR DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE II

Abreviaciones de los L-aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gli	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lis	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tir	Y
Valina	Val	V

APÉNDICE III

Publicación

Aguilar-Gaytán, R., Cebón, M.A., Cevallos, M.A., Lizano, M., and Huberman, A. (1997). Sequence of cDNA encoding the molt-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Crustacea, Decapoda). A. P. J. Molec. Biol. Biotech. (accepted).

ASIA-PACIFIC JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Editors: T. Pang, C.L. Koh, F. Cui

From the desk of F. Cui: Instituto de Biotecnología UNAM, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62250, México

(for courier please use: Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México)

Fax: (52) (73) 33-8673 / Tel: (52) (73) 29 1065, 29-1027/ e-mail: ercuiwa@ibt.unam.mx

March 6, 1997.

Dr. Marco Antonio Cerbón
Departamento de Biología
Facultad de Química UNAM
Fax: (01) (5) 616-8010

Dear Dr. Cerbón:

Your manuscript (code ECAP9701) entitled "Sequence of a cDNA encoding the molt-inhibitor hormone from the Mexican crayfish *Procambarus boyleri* (Crustacea, Decapoda)", by Aguilar-Gaytán, R., Cerbón, M.A., Cevallos, M.A., Lizano, M., and Huberman, A., has been ACCEPTED for publication. The first version was received on December 20, 1996, to be considered as a Research Note; and in a revised form on February 24, 1997.

Yours sincerely,



cc. Prof. Tikki Pang, University of Malaysia

RESEARCH NOTE

Sequence of a cDNA encoding the Molt-Inhibiting Hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Crustacea, Decapoda).

Aguilar-Gaytán, R.¹, Cerbón, M. A. ^{1*}, Cevallos, M. A.², Lizano, M.¹ and Huberman, A.³

Facultad de Química¹ and Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno², UNAM, 04510 México, D.F.; Departamento de Bioquímica³, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Tlalpan, 1400 México, D.F.

*Corresponding Author: Dr. Marco A. Cerbón Cervantes, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, Coyocacán. C.P. 04510, México, D.F., México. Tel. (525) 6 22 30 98. Fax (525) 6 16 20 10. E-mail: macer@servidor.unam.mx

Running title: cDNA sequence of crayfish molt-inhibiting hormone

Abstract

The crustacean molt-inhibiting hormone (MIH) is a neuropeptide produced in the sinus gland which inhibits the biosynthesis of ecdysteroids in the Y-organ. In this work we describe the complete nucleotide sequence of the mature region of MIH from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri*, which was cloned using reverse transcription and polymerase chain reaction. The cloned cDNA encodes a region consisting of 225 bp including the stop codon. The sequence indicates the presence of six cysteines in conserved positions suggesting the presence of three disulfide bridges. The MIH nucleotide sequence shares some degree of identity to those reported for *H. americanus*, *P. vannamei*, *C. maenas* and *C. sapidus*.

Crustaceans possess a neurosecretory system, analogous to the vertebrate hypothalamus-neurohypophysis axis and to the insect cerebral ganglion-corpora cardiaca - corpora allata system. The crustacean neuroendocrine system synthesizes diverse regulatory neuropeptides and is the most important regulation and integration center of the animal. It consists of neurosecretory cell somata named the X-organ, whose clustered axon endings form a neurohaemal organ, the sinus gland (SG) (1,2).

External color changes, molt cycle, gonadal development, light adaptation and glucose levels in the hemolymph, among others, are regulated by hormonal factors released by exocytosis from the SG, situated in the optic ganglia of the eyestalk of decapod crustaceans (3).

The SG of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann) contains a family of four neuropeptide hormones (4). One of these peptides has been shown to have molt-inhibiting hormone activity, which exerts its inhibitory effect *in vitro* upon ecdysteroid synthesis in Y-organs (5).

The MIH primary structures of the lobster (*Homarus americanus*) (6,7), the crab (*Carcinus maenas*) (8), the white shrimp (*Penaeus vannamei*) (9), the blue crab (*Callinectes sapidus*) (10) and the Mexican crayfish (*Procambarus bouvieri*) (11) have been determined. Comparisons between the peptide sequences and deduced protein products from cDNAs indicate a high degree of similarity to the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from several crustaceans (12) and belong to the same neuropeptide family. The similarity in amino acid sequences of MIH, VIH (vitellogenesis-inhibiting hormone) and CHH suggest that these neuropeptides originated from the same gene family (13,14).

Despite rapid progress in molecular biology, information on the gene structure of these neuropeptides and their precursors is still very limited, specifically for MIH from *P. bouvieri*.

In this work, we isolated a cDNA that encodes the complete nucleotide sequence of the mature region of the MIH from the crayfish *P. bouvieri*.

P. bouvieri were collected in Uruapan, state of Michoacán, México (5). Animals in the intermolt stage were anesthetized with crushed ice. A total of 200 eyestalks were pooled and homogenized. Total RNA was prepared with Trizol according to the manufacturer's instructions (Gibco, BRL). The total RNA recovered was dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water.

The reverse transcription reaction was carried out according to the protocol of Gibco, BRL. Oligonucleotides for the PCR amplifications were designed based on the homologous regions between CHH, MIH and VIH peptide sequences described previously by our group in *P. bouvieri* (11,15,16) and the published information of the cDNA of CHH from the crayfish *Orconectes limosus* (17). The oligonucleotide sense strand was 5'-CAGGTGTTCCGACCAGG-3' and the antisense strand was 5'-CACCTTACTTGCCGAC-3'(see legend figure 1).

A PCR product of 225 bp was detected and cloned into pMOSBlue vector (Amersham), transformed and propagated in DH5 α cells. Recombinants were screened by PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) analysis (18). The selected clones were sequenced using the AmpliCycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Cetus).

Figure 1 shows the complete sequence of two different clones found to encode the mature region of MIH (GenBank U79764). The difference between these clones was a single nucleotide change at position 54 (G→A). This change does not modify the encoded amino acid. Whether these two clones represent gene isoforms requires further investigation. The possibility that this difference could be a cloning artifact, such as an error introduced by the Taq polymerase, cannot be excluded.

The cDNA of MIH includes a region of 225 bp, with an open reading frame coding for a protein of 74 amino acids, plus a stop codon (Fig. 1). This confirms our previous results that MIH is a peptide with a molecular mass of 8322 Da, containing six cysteine residues, in a similar manner to those of the CHH peptide family and probably forming three disulphide bridges in the mature peptide, as previously reported for *C. maenas* (19) and *P. bouvieri* (11,15,16).

Comparison of the amino acid sequence of MIH with CHH from *P. bouvieri* revealed a high degree of similarity (90%) (Fig.2). These hormones differ in seven amino acid residues; five differences are due to point mutations, whereas two of the seven are due to a double mutation. The nucleotide sequence of *O. limosus* CHH is 93% identical with MIH from *P. bouvieri* and shows fifteen base differences. Seven of these changes are due to point mutations that change the amino acid, two are due to double mutations which also change the amino acid and six are due to point mutations synonymous.

The nucleotide sequence of MIH from *P. bouvieri* shares 79% identity with MIH/CHH reported for *H. americanus*, 50 % with the MIH-like gene in *P. vannamei*, 46% with MIH of *C. maenas* and *C. sapidus*. All these values are very close to those reported previously for their amino acid sequences (Fig.3) (7,8,9,10).

It is interesting to note that the MIH sequences, previously reported, lack precursor-related peptides. In contrast, CHH, a very closely-related neuropeptide, possess a precursor peptide, and for this reason it is important to further elucidate the complete gene sequence of the preprohormone structure of *P. bouvieri* MIH.

It has been reported that the MIH from *H. americanus* also exhibits hyperglycemic activity (6). In spite of the fact that MIH of *P. bouvieri* is very closely related with CHH in this species, it did not present any hyperglycemic activity (11,20,21).

In our experimental conditions, only cDNAs encoding MIH were detected. This finding was surprising because in our previous studies the most abundant neuropeptide of the eyestalk was CHH (22). This suggests that possible postranscriptional mechanisms are involved in the synthesis of neuropeptides in *P. bouvieri* and deserve investigation.

Acknowledgements: Drs François Van Herp and Dominique de Kleijn for the generous gift of the *O. limosus*-CHH cDNA, used as a control. This work was made possible by grants from CONACyT and from the Mexico-USA Foundation of Science to A.H.

REFERENCES

- 1.- Bliss, D.E. 1951. Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Anat. Rec.* 111:502-503.
- 2.- Passano, L.M. 1951. The X-organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. *Anat. Rec.* 111:86-87.
- 3.- Kleinholz, L.H. 1985. Biochemistry of crustacean hormones. In: Bliss, D.E.; Mantel, L.H., eds. *The biology of crustacea*. vol.9: Integument, pigments and hormonal processes. New York. Academic Press. 463-522.
- 4.- Aguilar, M.B. 1993. Estudio estructural de varios neuropéptidos hormonales del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Ph.D. Thesis. Faculty of Chemistry, National University of Mexico, México.
- 5.- Huberman, A., Aguilar, M. B. 1989. A neuropeptide with molt-inhibiting hormone activity from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 299-305.

- 6.- Chang, E.S., Prestwich, G.D., Bruce, M. J. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171:818-826.
- 7.- Tensen, C. P., De Kleijn, D. P. V., Van Herp, F. 1991. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*. *Eur. J. Biochem.* 200:103-106.
- 8.- Webster, S. G. 1991. Amino acid sequence of putative molt-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* 244:247-252.
- 9.- Sun, P.S. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:1-6.
- 10.- Lee, K., Elton, T. S., Bej, A. K., Watts, S. A., Watson, R. D. 1995. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:1126-1131.
- 11.- Aguilar, M.B., Falchetto, Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Huberman, A. 1996. Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Peptides.* 17: 367-374.
- 12.- Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia.* 48:439-448.

- 13.-Chang, E.S. 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.* 38:161-180.
- 14.- De Kleijn, D. P. V., Van Herp, F. 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B:573-579.
- 15.- Huberman, A., Aguilar, M. B., Brew, K., Shabanowitz, J., and Hunt D.F. 1993. Primary structure of the mayor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison. *Peptides.* 14:7-16.
- 16.- Aguilar, M.B., Quackenbush, L.S., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Huberman, A. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 491-498.
- 17.-De Kleijn, D. P. V., Janssen, K. P. C., Martens, G. J. M., Van Herp, F. 1994. Cloning and expression of two hyperglycemic hormones (CHH) mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 224:623-629.
- 18.- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and the DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5:874-879.

- 19.- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J. Keller, R. 1989. Amino acid sequence of a crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett.* 255:10-14.
- 20.- Huberman, A., 1990. Hormonal control of molting in crustaceans . *In:Progress in comparative endocrinology*, vol. 342 of *Progress in clinical and biological research. Proceedings of the eleventh international symposium on comparative endocrinology*, 14-20 May, 1989 (Epple, A., Scanes. C.G., Stetson, M. H. eds) New York:Wiley, Málaga, Spain, pp. 205-210.
- 21.- Jegla, T. C., Ruland, C., Kegel, G., Keller, R. 1983. The role of the Y-organ and cephalic gland in ecdysteroid production and control of molting in the crayfish, *Orconectes limosus*. *J. Comp. Physiol.* 152:91-95.
- 22.- Huberman, A., Aguilar, M.B. 1986. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B:197-203.

Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Ala	Cys	Lys	Gly	Ile	Tyr	Asp	Arg	Ala		
CAG	GTG	TTC	GAC	CAG	GCT	TGT	AAA	GGA	ATA	TAC	GAC	AGA	GCC		42
Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu	Leu	Val	Cys	Asp	Asp	Cys	Tyr	Asn		
ATC	TTC	AAG	AAG	CIT	GAA	CTA	GTG	TGT	GAT	GAT	TGT	TAC	AAC		84
Leu	Tyr	Arg	Lys	Pro	Lys	Val	Ala	Thr	Thr	Cys	Arg	Glu	Asn		
CTG	TAC	CGT	AAA	CCC	AAG	GTG	GCC	ACT	ACC	TGC	AGG	GAA	AAC		126
Cys	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Cys	Leu	Asp	Asp	Leu		
TGC	TAT	GCC	AAT	TCC	GTC	TTT	CGT	CAA	TGC	CTT	GAC	GAC	CTT		168
Leu	Leu	Ile	Asn	Val	Val	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Val	Gln		
CTC	TTG	ATA	AAT	GTT	GTT	GAC	GAG	TAC	ATC	TCC	GGC	GTC	CAA		210
Ile	Val	Gly	Lys	End											
ATT	GTC	GGC	AAG	TAA											225

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences from a cDNA encoding the mature region of *P. bowdleri* MH. The cDNA nucleotide sequence was obtained from a RT-PCR product. Briefly, 3 μ g of eyestalk total RNA was reverse transcribed with 100 ng Oligo d(T)₁₈ (Gibco, BRL) using 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco, BRL), for 1 hr at 37° C, in a final reaction volume of 20 μ L, containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 500 μ M each dNTPs and 10 mM 1,4-dithiothreitol. Ten microliters of total reverse transcriptase reaction mixture were added to 40 μ L of PCR reaction solution containing a final concentration of 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 pM of each primer sense and antisense, 200 μ M of each 5'-nucleotide triphosphate, and 2.5 U Taq DNA polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer, Cetus). Amplification was performed in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer 9600), for 25 cycles as follows: denaturation at 95° C, 1 min; annealing at 52° C, 1 min; extension at 72° C, 1 min; with 5 min of initial denaturation at 95° C and final extension for 5 min at 72° C. The PCR product was sequenced as indicated in the text. An asterisk indicates a nucleotide change (G→A) found in one of the sequenced clones

pE V F D Q A C K G I Y D R A I F K K L **D R** V C **E** D C Y N L Y
 pE V F D Q A C K G I Y D R A I F K K L **E L** V C **D** D C Y N L Y

 R K F **Y** V A T T C R **Q** N C Y A N S V F R Q C L D D L L L L **D**
 R K F **K** V A T T C R **E** N C Y A N S V F R Q C L D D L L L L **N**

 V V D E Y I S G V Q **T** V - N H₂ C H H
 V V D E Y I S G V Q **I** V - N H₂ M I H

Figure 2. Comparison between the CHH and MIH of the Mexican crayfish *P. bowleri*. The differences are shown in boxes.

<i>C. sapidus</i>	RVINDDCPNL	IGNRDLVQKV	EWICDDCANI	YRSTGMASLC	RKDCFFNEDF	50
<i>C. maenas</i>	RVINDDCPNL	IGNRDLVQKV	EWICEDCSNI	FRKTGMASLC	RRNCFFNEDF	50
<i>H. americanus</i>	QVFQACIKGV	Y--DRNLFKGL	DRVCEDCYNL	YRKPFVATTC	RENCYSNWVF	49
<i>P. bouvieri</i>	EVFDQACIKGI	Y--DRAIFKGL	ELVCEDCYNL	YRKPFVATTC	RENCYANSVF	49
<i>P. vannamei</i>	DTFDISCKGI	Y--DRELFKGL	DRVCEDCYNV	FRKPFVATEC	KSNCFVAKRF	49
Consensus	.VFD..CKG.	Y-DR.LFKGL	E.VCEDCYN.	YRKP.VAT.C	R.NCF.N..F	50
<i>C. sapidus</i>	LNCVHATERS	EDLAQLKQWV	TILGAGRI			78
<i>C. maenas</i>	VNCVHATERS	EELRDLQWV	GILGAGR			78
<i>H. americanus</i>	RQCLDLLLL	D---VIDEYV	SNVQIVGK			74
<i>P. bouvieri</i>	RQCLDLLLL	N---VDEYI	SGVQIVGK			74
<i>P. vannamei</i>	NVCVADL--R	H---DVSRL	KMANSALS			72
Consensus	..CV.DL..S	-----E.V			78

Fig. 3. Comparison among MIH of the crayfish *P. bouvieri*, from the lobster *H. americanus*, the shrimp *P. vannamei*, the shore crab *C. maenas* and the blue crab *C. sapidus*.