

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Participación de la glándula antenal en la osmorregulación del camarón blanco

Penaeus vannamei

TESIS

que como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias presenta:

Biol. Aleyka Yolanda Barraza Alvarez

Ensenada B.C., octubre del 2017.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE
CIENCIAS MARINAS INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Participación de la glándula antenal en la osmorregulación del camarón blanco
Penaeus vannamei

TESIS QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:


Biol. Aleyka Yolanda Barraza Alvarez



Dra. Ivone Giffard Mena

Directora de tesis

Aprobada por:



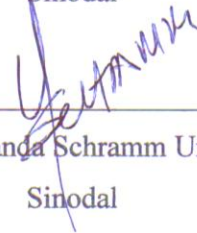
Dra. Jennyfers Chong Robles

Sinodal



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Sinodal



Dra. Yolanda Schramm Urrutia

Sinodal

Resumen

La salinidad es uno de los factores más importantes que afectan la fisiología, el crecimiento y la distribución del camarón. La tolerancia y supervivencia de *P. vannamei* a variaciones de salinidad están estrechamente relacionadas con los mecanismos de osmorregulación. Dicho proceso se lleva a cabo en órganos específicos que cuentan con un mecanismo molecular especializado para el transporte iónico. Entre las proteínas implicadas en el transporte de iones, la ATPasa Na^+/K^+ (ANK) juega un papel central y es considerada la más importante, es utilizada para reconocer a los principales órganos efectores de la osmorregulación. En esta especie no existe ningún trabajo que evalúe detalladamente la participación de la glándula antenal (GA), la cual es un órgano vital en la adaptación salina en crustáceos. Por tal motivo, el objetivo principal de este estudio fue caracterizar el desarrollo y la función osmorreguladora de la GA en Postlarva (PL15) y juveniles de *P. vannamei*. Para ello se aclimataron camarones a 34 UPS y se mantuvieron en tres salinidades de prueba (5, 32 y 45 UPS). Se obtuvieron cortes histológicos, para localizar la ANK en la GA por medio de inmunofluorescencia y determinar su morfología. Se analizó el reconocimiento específico de la ANK por el anticuerpo $\alpha 5$ (anti ANK de *Gallus gallus*) mediante un análisis bioinformático que permitió conocer los porcentajes de similitud y la relación evolutiva entre las subunidades α de la ANK y la ANK y se verificó su especificidad por Western blot. En esta especie la GA está compuesta por el celomosaco, el laberinto y la vejiga. El inmunomarcaje fue positivo en PL15 y juveniles en las tres salinidades prueba con intensidad diferencial. Se discute sobre los mecanismos de adaptación de este camarón a la salinidad circundante mediante la regulación de la expresión de ANK en la GA.

En este estudio se proporciona evidencia experimental que contribuye a explicar la adaptación de *P. vannamei* en ambientes de salinidad baja y alta. Además se aportan nuevos conocimientos con respecto al epitelio especializado en la osmorregulación de esta especie, en particular resalta la importancia de la GA en PL15 para osmorregular en alta y baja salinidad y en juveniles para la osmorregulación a baja salinidad.

Palabras clave:

ATPasa Na^+/K^+ , inmunofluorescencia, salinidad, histología, morfología, juvenil, postlarva.

Agradecimientos

Aprovecho este espacio para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Agradezco a la **Dra. Ivone Giffard Mena** por confiar en mí y brindarme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de tesis bajo su dirección. Le agradezco enormemente por el esfuerzo, dedicación y paciencia con la que desarrolló su labor. Gracias por darme la oportunidad y las bases para crecer académica y profesionalmente.

Agradezco también a la **Dra. Jennyfers Chong Robles** y a la **Dra. Rosa Reyna Mourriño Pérez** por brindarme su confianza y su apoyo; por compartir conmigo sus conocimientos, por motivarme y brindarme la orientación necesaria para terminar mis estudios con éxito. De igual forma estoy agradecida con la **Dra. Yolanda Schramm Urrutia**, por su participación en el proceso de revisión del escrito de la tesis.

Gracias al **Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes** por sus consejos e instrucción en el área de biología molecular. Gracias por la dedicación y entrega con la que realiza su trabajo, sin lugar a dudas su labor es fundamental para el funcionamiento del laboratorio.

De la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California quiero agradecer a la **MC. María Isabel Montes Pérez** por siempre mostrarse atenta y colaborativa, y a la **Biol. Deyanira Rodarte Venegas** por su valiosa instrucción y asesoría en el área de histología.

De CICESE, Departamento de Acuicultura, quiero agradecer a la **Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez** y a la **MC. Constanza del Mar Ochoa Saloma** por el acceso y asesoría para el uso de microscopio de epifluorescencia. Dentro de la misma institución, Departamento Biotecnología Marina, agradezco a la **Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez** y a la **Dra. Edna Sánchez Castrejón**, por permitirme hacer uso de su equipo de laboratorio.

Del Instituto de Investigaciones Oceanológicas agradezco al **Dr. Eugenio Carpizo Ituarte** y al **Oc. Alberto Gálvez** por permitirme hacer uso de los equipos de microscopía.

Agradezco también al a la **Facultad de Ciencias Marinas** de la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo administrativo y docente y al **Consejo Nacional**

de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que recibí durante el desarrollo de mis estudios de maestría.

A mi familia ofrezco mi más profunda y sincera gratitud.

Gracias a mis padres **Graciela** y **Francisco**, por sentar en mí las bases de responsabilidad y deseo de superación. Ustedes son un pilar fundamental en mi vida, estoy eternamente agradecida por el amor, la confianza y apoyo que me brindan en todo momento.

Agradezco también a Paloma por ser un modelo a seguir y mi fuente de inspiración, hermana nunca dejas de sorprenderme, con el paso del tiempo descubro en ti virtudes y cualidades que me llevan a admirarte cada día más.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mis **abuelos, tíos y primos**.

Gracias **Maricela Cortez** por el apoyo incondicional que me has brindado a lo largo de este camino. Muchísimas gracias por hacer de tu familia una familia para mí, sin lugar a dudas eres una excelente "compañera de batalla" y amiga. Gracias **Sra. Amelia García** por abrirme las puertas de su hogar, ahora no podrá deshacerse de mí, debido a usted aprendí que cuando las cosas van mal, nada es tan reconfortante como un rico plato de mole con arroz.

Diana, Ana, Karina, Ricardo, Daniela y Silvia, gracias por brindarme su amistad y por hacerme compañía en estos últimos años. Siempre tendré presente los buenos momentos que hemos compartido.

Dedicatoria

A mi familia... por su apoyo constante, por su amor infinito.

Contenido

RESUMEN	I
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	IV
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN TEXTOS Y FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABLAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Mecanismos osmorreguladores en crustáceos	13
1.2. Descripción de la glándula antenal	17
1.3. La ATPasa Na ⁺ /K ⁺	20
2. ANTECEDENTES.....	23
2.1. Osmorregulación en <i>P. vannamei</i>	23
2.2. La glándula antenal como órgano osmorregulador.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS	30
5.1. Objetivo General.....	30
5.2. Objetivos particulares	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Manejo de organismos, aclimatación y toma de muestras.....	31
6.2. Preparación de cortes histológicos	32
6.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos $\alpha 5$ y 1211/1212 para detectar la ANK.....	32
6.3.1. Análisis bioinformático	32
6.3.2. Inmunolocalización de la ANK en branquiosteguito de <i>P. vannamei</i>	35
6.3.3. Western blot con el Ac $\alpha 5$	35
6.4. Análisis celular de la glándula antenal (tinción HE)	37
6.5. Localización celular y abundancia de la ANK en la glándula antenal.....	38
7. RESULTADOS	39
7.1. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos primarios $\alpha 5$ y 1211/1212	39
7.1.1. Análisis bioinformático	39
7.1.2. Inmunolocalización de la ANK utilizando los anticuerpos $\alpha 5$ y 1211/1212.	45
7.1.3. Western blot.....	46
7.2. Topología de la GA.....	47

7.3. Localización celular y abundancia de la ANK en la GA	51
8. DISCUSIÓN	56
8.1. Especificidad del anticuerpo primario $\alpha 5$	56
8.2. Estructura-Función de la GA	58
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVA	67
11. LITERATURA CITADA.....	68
12. ANEXOS.....	74
Anexo 1. Deshidratación en Alcohol – Benceno en Histoquinet.....	74
Anexo 2. Preparación de Laminillas Poli-L-lisina (0.1%).....	74
Anexo 3. Desparafinación.....	75
Anexo 4. Tinción Hematoxilina-Eosina para tejido de camarón <i>P. vannamei</i>	75
Anexo 5. Protocolo para la preparación de colorantes.....	76
Anexo 6. Medición del lumen del epitelio del laberinto utilizando el software ImageJ ..	77
Anexo 7. Protocolo para la Inmunofluorescencia Indirecta.....	78
Anexo 8. Medición de intensidad de fluorescencia utilizando el software ImageJ	80

Abreviaturas utilizadas en textos y figuras

Abreviación	Significado
Ac α 5	Anticuerpo Anti-ANK de <i>Gallus gallus</i>
Ac 1211/1212	Anticuerpo Anti-ANK de <i>Peneaus vannamei</i>
ACI	Anticuerpo primario
ACII	Anticuerpo secundario
AD	Agua dulce
Agb	Vejiga de la glándula antenal
Agn	Laberinto de la glándula antenal
Agt	Túbulo de la glándula antenal
AHK	ATPasa de H ⁺ /K ⁺ (ATPasa de hidrógeno y potasio)
AM	Agua de mar
ANK	ATPasa Na ⁺ /K ⁺ (ATPasa de sodio y potasio)
Br	Branquiosteguito
BSA	Albúmina de suero bovino
Cut	Cutícula
Cnf	Tejido conjuntivo fibroso
Crf	Fibras de colágeno y reticulina
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
EB	Mezcla de epipoditos y branquiosteguitos
ECL	Enhanced chemiluminescence
Ep	Epipodito
Epl	Epitelio del laberinto de la GA
Epcs	Epitelio del celomosaco de la GA
Eso	Esófago
G	Branquias
GA	Glándula antenal
Hem	Hemocito
Hep	Hepatopáncreas

HRP	horseradish peroxidase
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LPEA	Laboratorio de Patología Experimental Acuicola
Lco	Lumen del celomosaco
Lul	Lumen del laberinto
Lum	Lumen
M	músculo
NaCl	Cloruro de Sodio
Nuc	Núcleo
Nuu	Nucléolo
PL	Postlarva
PLs	Postlarvas
PL1	Postlarva 1
PL4	Postlarva 4
PL5	Postlarva 5
PL7	Postlarva 7
PL15	Postlarva 15
PL22	Postlarva 22
PL30	Postlarva 30
PBS	Posphate Buffered Saline
PBST	Phosphate buffered saline + tween20
qPCR	PCR en tiempo real
Sen	Seno de hemolinfa
UPS	Unidades prácticas de salinidad
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
VHA	ATPasa H ⁺ de tipo vacuolar/ bomba te protones de tipo vacuolar
WB	Western blot

Lista de figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	12
Figura 2. Ciclo de vida típico de un camarón peneido.	13
Figura 3. Comportamiento fisiológico hipotético de un crustáceo marino en ambientes de alta y baja salinidad.....	15
Figura 4. Esquema de la glándula antenal de <i>Astacus</i> sp. (Cangrejo de río).....	18
Figura 5. Dibujo esquemático de los modelos de la regulación de iones y la ultraestructura de los tres tipos de células de la glándula antenal del cangrejo <i>Ocypode stimpsoni</i>	19
Figura 6. Esquema de la estructura secundaria de la ANK	22
Figura 7. Alineamiento de la ANK y la AHK indicando la zona teórica del epítipo del anticuerpo monoclonal AntiANK $\alpha 5$ de <i>Gallus gallus</i>	39
Figura 8. Perfiles de hidrofobicidad de las ATPasas ANK y AHK.	42
Figura 9. Perfil de hidrofobicidad ampliado de la pos.615-750 de la ANK de <i>Gallus gallus</i>	43
Figura 10. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la ANK $\alpha 1$ y de la AHK $\alpha 1$ de organismos de diversos taxa.....	44
Figura 11. Localización celular de la ANK en branquiosteguito de <i>P.vannamei</i>	45
Figura 12. Expresión proteica la ATPasa de Na^+/K^+ en <i>P. vannamei</i> expuesto a 5, 32 y 45 UPS.....	46
Figura 13. Glándula antenal de juvenil de <i>P. vannamei</i>	47
Figura 14. Vista longitudinal del complejo laberinto/celomosaco de la glándula antenal de <i>P.vannamei</i>	48
Figura 15. Vista longitudinal magnificada del complejo laberinto/celomosaco de la glándula antenal de <i>P.vannamei</i>	48
Figura 16. Vista longitudinal magnificada del celomosaco y del laberinto de la glándula antenal de <i>P. vannamei</i>	49
Figura 17. Vista longitudinal de la Vejiga de la glándula antenal de <i>P. vannamei</i>	50
Figura 18. Morfología de la glándula antenal de <i>P.vannamei</i>	50
Figura 19. Medición del ancho de los túbulos de la glándula antenal de juveniles de <i>P. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades (5, 32 y 45 UPS).....	51

Figura 20. Localización celular de la ANK en la glándula antenal de <i>P.vannamei</i> expuestos a 5, 32 y 45 UPS.	52
Figura 21. Inmunolocalización baso-lateral de la ANK en la glándula antenal de juvenil de <i>P. vannamei</i> expuesto a 5 UPS.	53
Figura 22. Localización celular de la ANK en las tres secciones de la glándula antenal de juvenil de <i>P.vannamei</i> expuesto a 45 UPS.	54
Figura 23. Expresión de la ANK en glándula antenal de <i>P. vannamei</i> en diferentes salinidades (5, 32 y 45 UPS).	55

Lista de tablas

Tabla 1. Investigaciones en crustáceos donde se utilizó el anticuerpo monoclonal Anti-ANK α 1 de <i>Gallus gallus</i> (Ac α 5) para estudiar a la ANK.	17
Tabla 2. Resumen de algunas investigaciones en crustáceos donde se ha estudiado a la glándula antenal como órgano osmorregulador	26
Tabla 3. Especie y número de acceso de las secuencias de la subunidad α de la ANK y la AHK utilizadas en el análisis de secuencias.	33
Tabla 4. Especie y número de acceso de las secuencias de la subunidad alfa de la ANK y la AHK utilizadas en la elaboración del árbol filogenético	34
Tabla 5. Similitudes, máximas (+) y mínimas (-), encontradas al comparar secuencias completas de la ANK y la AHK.	40
Tabla 6. Similitudes, máximas (+) y mínimas (-), encontradas al comparar secuencias de la ANK y la AHK en la zona del epítipo.	40

1. INTRODUCCIÓN

La industria del cultivo de camarón es una actividad económica relevante a nivel mundial y nacional ya que el camarón es uno de los productos pesqueros con mayor demanda en el mundo. En México el cultivo de camarón se encuentra sostenido por la especie *Penaeus vannamei* (Fig.1). Esta especie pertenece al grupo de los camarones penaeidos, los cuales se desarrollan en diversas etapas larvales (seis nauplios, tres protozoa, tres mysis) y varias etapas postlarvales antes de alcanzar la etapa de juvenil, para posteriormente madurar y convertirse en adultos (Kitani, 1986).

Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Superorden	Eucarida
Orden	Decapoda
Suborden	Dendrobranchiata
Superfamilia	Penaeoidea
Familia	Penaeidae
Género	<i>Penaeus</i>
Especie	<i>Penaeus vannamei</i>
Sinónimo	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)



Figura 1. Clasificación taxonómica del camarón blanco *Penaeus vannamei* (Fofonoff *et al.*, 2017).

El camarón blanco es nativo de la costa occidental del continente americano; su distribución natural abarca desde los mares de Sonora, México hasta el norte de Perú (Huong *et al.*, 2010; Valdez *et al.*, 2008). Su ciclo de vida se divide en una fase oceánica y otra estuarina (Cid y Guzmán, 2011). En el ambiente oceánico se efectúan la reproducción y el desarrollo larval, mientras que en el ambiente estuarino se desarrollan las postlarvas y juveniles (Fig. 2) (Cid y Guzmán, 2011; Ramos-Cruz, 2000; Walker *et al.*, 2009).

La fisiología de los camarones se modifica durante su desarrollo, madurando en particular sus facultades de osmorregulación, lo cual está ligado al hecho de que los camarones emigran a lo largo de su vida a través de diversos biotopos que se caracterizan por su gradiente de salinidad (FAO, 1987).

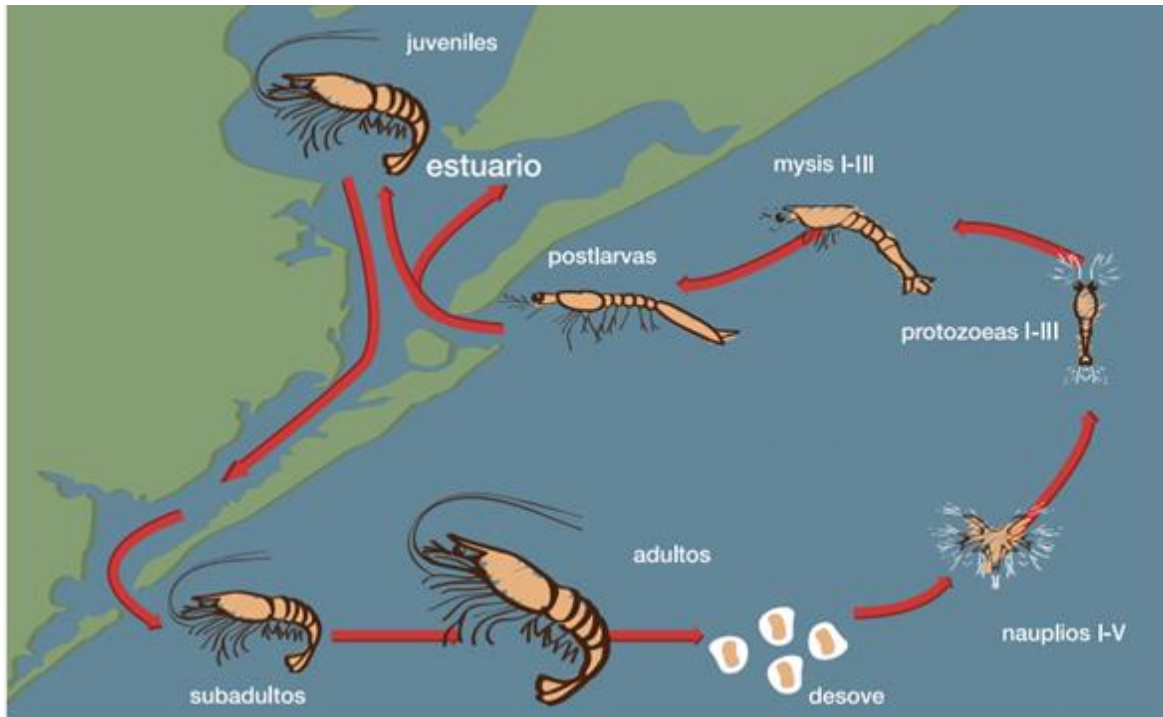


Figura 2. Ciclo de vida típico de un camarón peneido. Modificado de Cid y Guzmán (2011).

La salinidad es un factor ambiental que afecta directamente la supervivencia, el crecimiento y la fisiología del camarón (Pan *et al.*, 2014; Pequeux, 1995). Las postlarvas (estadio alcanzado al concluir las etapas larvales, corresponden al número de días después de la metamorfosis) y juveniles (después de PL30, de aproximadamente 1 g, los organismos son considerados juveniles) están adaptadas para efectuar una activación rápida de los mecanismos osmorreguladores para sobrevivir a los cambios abruptos en la salinidad que ocurren en los sistemas (Hurtado *et al.*, 2007).

1.1. Mecanismos osmorreguladores en crustáceos

La osmorregulación es un proceso fisiológico de adaptación esencial para la mayoría de los crustáceos acuáticos ya que les permite hacer frente a los cambios de salinidad que suceden en los medios acuáticos que habitan (Romano y Zeng, 2012). Para asegurar su supervivencia en el hábitat acuático, los animales deben garantizar la estabilización de sus fluidos internos, tanto en volumen de agua como en concentración iónica (Chong-Robles, 2015). Si la osmolalidad del medio extracelular cambia a lo largo

del tiempo, todas las células serán desafiadas osmóticamente y se verán obligadas a regular su volumen, esto es sumamente importante ya que una perturbación significativa del volumen compromete el rendimiento fisiológico de las células por lo que es necesario emplear transportadores de membrana para promover el flujo de solutos (absorción o excreción de iones) que dará como resultado movimientos correctivos del agua (Freire *et al.*, 2008a). Así, la osmorregulación implica la absorción o excreción de iones a través de órganos específicos (Tsai y Lin, 2014) con la finalidad de mantener la homeostasis osmótica y de volumen del medio extracelular (Tsai y Lin, 2014; Freire *et al.*, 2008a). En los animales acuáticos este proceso involucra una serie de mecanismos epiteliales que son eficaces para mantener gradientes osmóticos significativos entre su medio interno y el agua circundante (Freire *et al.*, 2008a).

Los crustáceos eurihalinos pueden presentar alguno de los tres patrones de osmorregulación dependiendo el medio en el cual se encuentren: iso-osmótica u osmoconformismo (cuando la osmolalidad de la hemolinfa es igual a la osmolalidad del ambiente externo), hiper-osmorregulación (cuando la osmolalidad de la hemolinfa es mayor a la osmolalidad del ambiente externo) o hipo-osmorregulación (cuando la osmolalidad de la hemolinfa es menor a la osmolalidad del ambiente externo) (Chen *et al.*, 2015; Lignot *et al.*, 2000; Romano y Zeng, 2012).

En condiciones de hiper-osmorregulación (baja salinidad) el organismo absorbe agua y pierde sales por difusión, para compensar estos movimientos pasivos, produce abundante orina diluida y gana iones de manera activa. De manera inversa, en un ambiente hiper-osmótico (alta salinidad), el organismo pierde agua y gana iones por medio de difusión pasiva, en este caso debe producir una orina limitada e isosmótica a la hemolinfa (Fig. 3) (Mantel y Farmer, 1983), esto presumiblemente ocurre a través de la glándula antenal (GA).

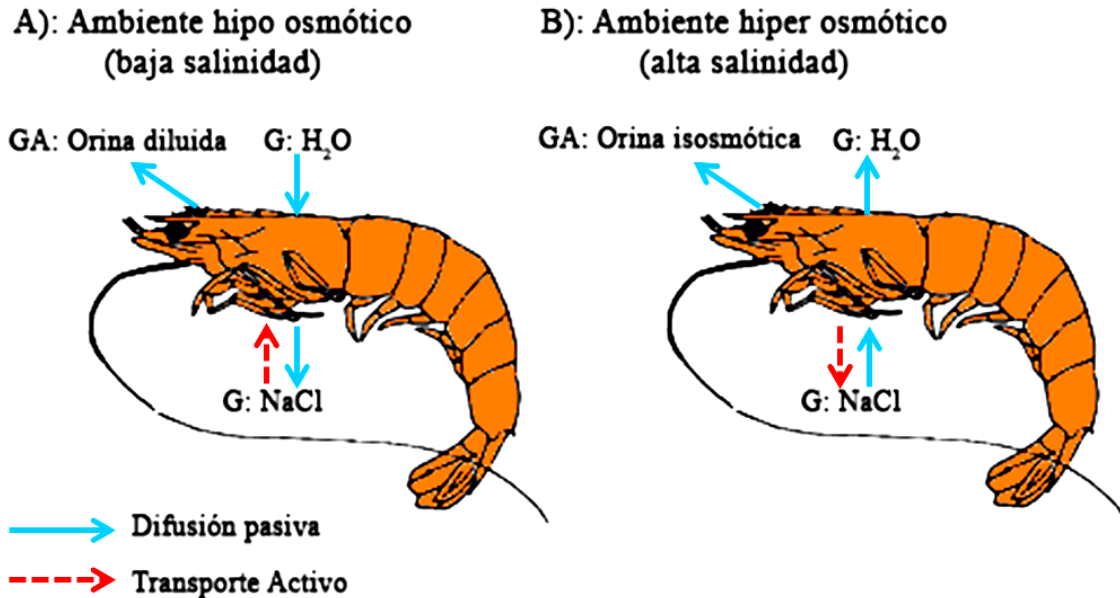


Figura 3. Comportamiento fisiológico hipotético de un crustáceo marino en ambientes de diferente salinidad. A, ambiente dulceacuícola o de baja salinidad y B, ambiente marino o de alta salinidad. Se indican los flujos de absorción y excreción de iones y agua en branquias (G) y la glándula antenal (GA). Modificado de Mantel y Farmer (1983).

Los crustáceos hipo e hiper-osmorreguladores osmorregulan mediante dos estrategias adaptativas; por “proceso de limitación” y por “proceso de compensación”. El proceso de limitación es una estrategia en la cual el mantenimiento de la osmolalidad y la regulación iónica de la hemolinfa se llevan a cabo mediante el ajuste de la permeabilidad de las membranas sin el requerimiento de energía, este método es altamente eficaz para reducir la difusión de iones y la entrada de agua al organismo (Romano y Zeng, 2012). En contraste, el proceso de compensación es una estrategia en la que el mantenimiento de la osmolalidad y la regulación de concentración iónica de la hemolinfa se lleva a cabo a través del movimiento activo de solutos hacia dentro o fuera de la hemolinfa mediante la participación de los órganos osmorreguladores y de manera específica a nivel celular mediante transportadores, canales y poros altamente selectivos (Romano y Zeng, 2012).

Los principales órganos implicados en la osmorregulación en crustáceos son las branquias, las glándulas antenales, el intestino (Pequeux, 1995; Tsai y Lin, 2014) así como los epipoditos y los branquiosteguitos (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013; Chong-Robles, 2015). De manera notable, estos órganos (branquiales o extrabranquiales) están revestidos por epitelios diferenciados que contienen células osmorreguladoras o ionocitos, nombre que

hace referencia a su función como células transportadoras de iones (Khodabandeh *et al.*, 2005a).

Los ionocitos se caracterizan por poseer una ultraestructura muy particular: su membrana basal y apical tiene pliegues, hay un gran número de mitocondrias asociadas (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013; Freire *et al.*, 2008b; Henry *et al.*, 2012; Lucu y Towle, 2003) con concentraciones y actividad elevada de proteínas que participan en el transporte de iones (Henry *et al.*, 2012). Estas características de los ionocitos son congruentes con la función de la célula, los pliegues de las membranas permiten aumentar el área superficial disponible para el transporte y las mitocondrias proveen la energía para el bombeo de iones (Henry *et al.*, 2012).

Las principales proteínas implicadas en el transporte de iones son la ATPasa de Na^+/K^+ (ANK), la ATPasa H^+ tipo V (AHV), la ATPasa $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, ATPasa $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, la ATPasa Na^+/H^+ , la Anhidrasa Carbónica (AC) y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC) (Freire *et al.*, 2008b; McNamara y Faria, 2012; Romano y Zeng, 2012). Entre estos, la ANK se considera la más importante porque regula las concentraciones de iones Na^+ y K^+ y genera el gradiente eléctrico necesario para que otros transportadores funcionen activando el flujo de Cl^- y el resto de elementos.

Dada su importancia en el proceso de osmorregulación, la ANK ha sido ampliamente utilizada como marcador molecular en las investigaciones relacionadas con la osmorregulación de diversas especies de crustáceos (Tabla 1). Dichas investigaciones se centran en la evaluación de la actividad enzimática, en la expresión proteica y en la transcripción de la subunidad α de la ANK. En las metodologías que implican la inmunodetección de la ANK (inmunofluorescencia y western blot) el anticuerpo utilizado en la mayoría de crustáceos (Tabla 1) es el anticuerpo monoclonal $\alpha 5$, que está dirigido hacia un epítipo citosólico altamente conservado de la subunidad $\alpha 1$ de la ANK del pollo *Gallus gallus* (Lebovitz *et al.*, 1989).

Tabla 1. Investigaciones en crustáceos donde se utilizó el anticuerpo monoclonal Anti-ANK $\alpha 1$ de *Gallus gallus* (Ac $\alpha 5$) para estudiar a la ANK.

Especie (nombre comun)	Metodología	Referencia
<i>Astacus leptodactylus</i> (Cangrejo de río)	ANK-IFI	Khodabandeh <i>et al.</i> , 2005c; Lignot <i>et al.</i> , 2005
<i>Carcinus maenas</i> (cangrejo verde europeo)	ANK-IFI	Cieluch <i>et al.</i> , 2004
	ANK-WB	Lucu y Flik, 1999
<i>Callinectes sapidus</i> (Jaiba o cangrejo azul)	ANK-IFI y WB	Towle <i>et al.</i> , 2001
<i>Homarus gammarus</i> (Bogavante o lubigante)	ANK-IFI	Khodabandeh <i>et al.</i> , 2005b
<i>Penaeus vannamei</i> (Camarón blanco)	ANK-IFI y WB	Uranga-Solís, 2012
	ANK-IFI	Chong-Robles, 2015
	ANK-WB	Liu <i>et al.</i> , 2009
	ANK-IFI y WB	Pan <i>et al.</i> , 2014
<i>Macrobrachium olfersii</i> (Zurdito)	ANK-WB	Furriel <i>et al.</i> , 2000
<i>Ocypode stimpsoni</i> (Cangrejo fantasma)	ANK-IFI	Tsai y Lin, 2014
<i>Palaemon adspersus</i> (Camarón báltico)	ANK-IFI	Martinez <i>et al.</i> , 2005
<i>Penaeus monodon</i> (Langostino jumbo)	ANK-IFI	Chaudhari <i>et al.</i> , 2015
<i>Rimicaris exoculata</i> (Camarón enjambre)	ANK-IFI	Martinez, <i>et al.</i> , 2005
<i>Scylla paramamosain</i> (Cangrejo de barro)	ANK-WB	Chung y Lin, 2006
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (Camarón siete barbas)	ANK-IFI y WB	Leone <i>et al.</i> , 2015

IFI, Inmunolocalización o Inmunofluorescencia Indirecta; WB, Western blot.

1.2. Descripción de la glándula antenal

La glándula antenal (GA), conocida también como glándula verde o renal, constituye el principal órgano excretor en los crustáceos decápodos (Freire *et al.*, 2008b). Tiene un papel funcional análogo al de los riñones de los vertebrados, es decir, participa en el mantenimiento del volumen de líquido extracelular y en la regulación de la concentración de iones, osmolitos, nutrientes, y otros solutos presentes en el líquido extracelular (Khodabandeh *et al.*, 2005a ;Tsai y Lin, 2014).

La GA tiene una organización estructural semejante a la de una nefrona de vertebrado, está formada por cuatro partes: celomosaco, laberinto, túbulo y vejiga (Fig. 4) (Khodabandeh *et al.*, 2005a; Freire *et al.*, 2008b; Tsai y Lin, 2014). La filtración de la hemolinfa se produce a través del epitelio que recubre la pared del celomosaco (1), el primer filtrado se conoce como orina primaria, la cual en su recorrido hacia el poro excretor se ve modificada por los procesos de reabsorción y secreción (Fuentes y Moreno, 2008). La orina primaria viaja a través de las diversas partes del laberinto (2), en donde ocurren los procesos de absorción y secreción. El laberinto está conectado por un túbulo (3) a la vejiga (4), en la cual se acumula la orina para su posterior excreción al ambiente a través del nefridioporo (5) (Freire *et al.*, 2008b). La GA carece del túbulo intermedio entre el laberinto y la vejiga en algunas especies de decápodos marinos como son braquiuros, anomuros, la mayoría de macruros y peneidos (Freire *et al.*, 2008b).

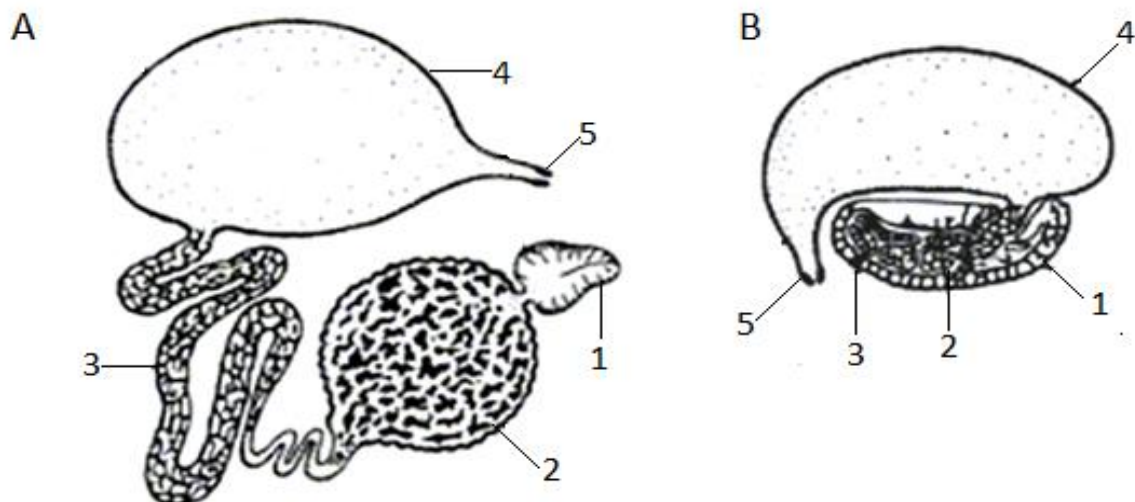


Figura 4. Esquema de la glándula antenal de *Astacus* sp. (Cangrejo de río). A, desdoblada; B, en su disposición natural. 1, celomosaco; 2, laberinto; 3, túbulo; 4, vejiga y 5, nefridioporo (modificado de Marchal, 1892).

Es importante mencionar que existen diferencias en la ultraestructura de las células y la distribución de las proteínas reguladoras de iones en cada región de la glándula antenal (Fig. 5) (Tsai y Lin, 2014).

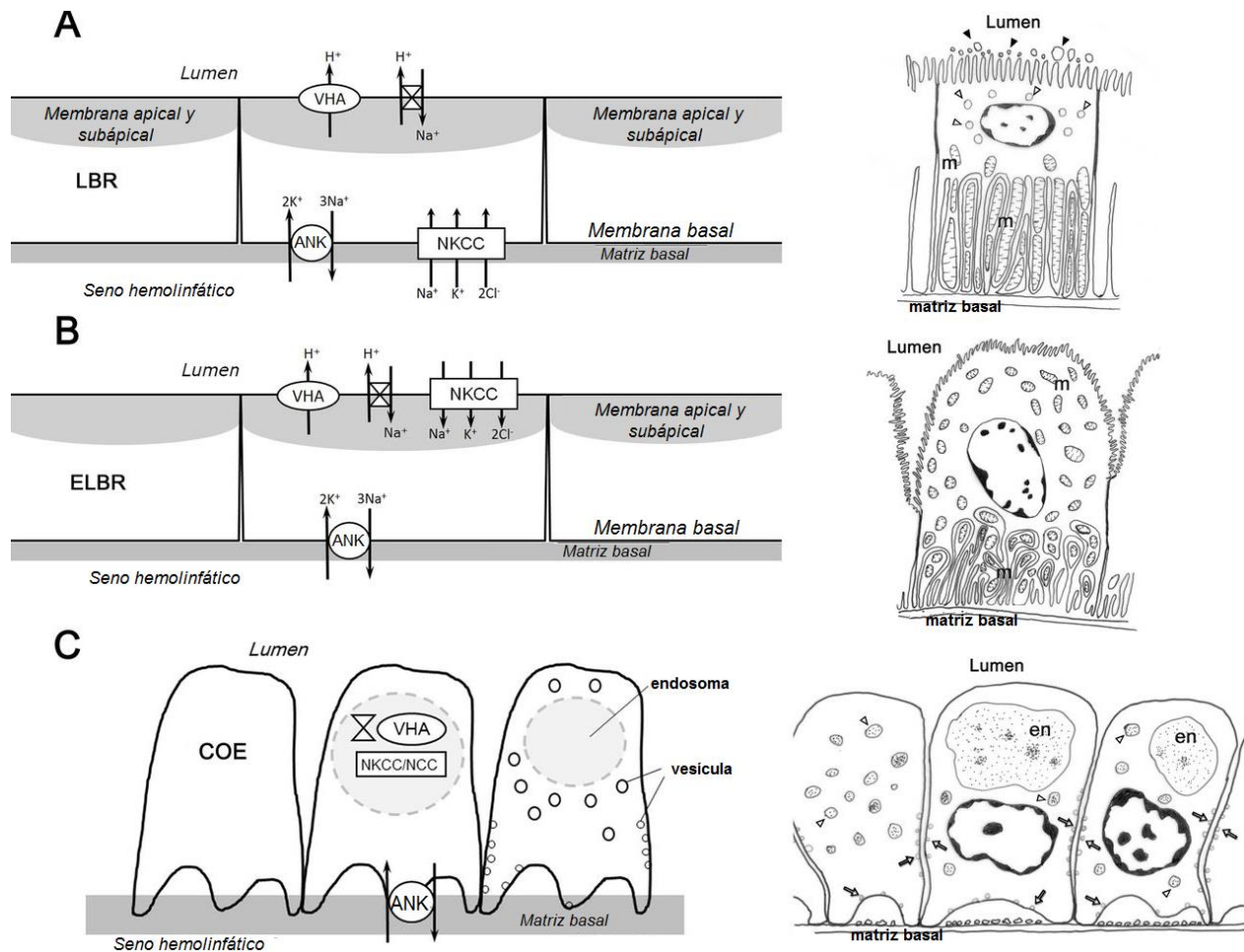


Figura 5. Dibujo esquemático de los modelos de la regulación de iones y la ultraestructura de los tres tipos de células de la glándula antenal del cangrejo *Ocypode stimpsoni*. A, las células laberínticas (LBR) tienen microvellosidades en forma de peine localizadas en la zona apical de la célula, el espacio subapical presenta vesículas (triángulo abierto) y el plegado basal tiene mitocondrias en abundancia (m). En el lado exterior de las microvellosidades apicales de las LBRs presentan numerosos aposomas (inclusiones citoplasmáticas) (triángulo cerrado). El cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) y ANK se localizan en la membrana basolateral. Y la VHA y los intercambiadores de Na^+/H^+ (NHE) se localizan en la membrana apical y en la región sub-apical. B, las células localizadas al final del laberinto (ELBR) tienen una membrana apical irregular y sus mitocondrias están distribuidas en todo el citoplasma. La ANK se localiza en la membrana basolateral, mientras que el NKCC en la membrana apical. La VHA y NHE están en la membrana apical y en la región subapical. C, las células celómicas (COE) tienen dos tipos de vesículas; unas pequeñas (flecha) y otras de mayor tamaño (triángulo abierto), también presentan un gran endosoma (en). La ANK se localiza en la membrana basal mientras que NKCC, NHE y VHA en el centro de las COE (Tsai y Lin, 2014).

1.3. La ATPasa Na⁺/K⁺

La capacidad de un animal para regular la concentración iónica de sus líquidos corporales depende en gran medida del movimiento controlado de iones entre los líquidos intracelulares y el ambiente externo al que está expuesto. En los crustáceos la captación de iones del ambiente se atribuye principalmente a la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ (ANK) (Li *et al.*, 2015).

La ANK o bomba de sodio y potasio es una proteína integral transmembranal (Buranajitpirom *et al.*, 2010) que se concentra en la membrana basolateral de la mayoría de las células epiteliales (Dunbar y Caplan, 2001). Esta proteína es responsable de establecer y mantener los gradientes electroquímicos de iones de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) a través de la membrana plasmática de la mayoría de los eucariotas superiores (Kaplan, 2002).

La ANK utiliza la energía de una molécula de ATP para bombear activamente tres iones de sodio fuera de la célula, y dos iones de potasio hacia dentro de la misma (Dunbar y Caplan, 2001), dicha energía se deriva de la hidrólisis del enlace fosfato terminal del ATP. Durante la hidrólisis el fosfato terminal del ATP se une a la ANK a través de un residuo de aspartato; como producto de la reacción se forma fosfato de acilo, el cual es un sello distintivo de los miembros de la familia de las ATPasas de tipo P. Esta familia está conformada por más de 300 miembros, entre los cuales la ANK es una de las más estudiadas (Kaplan, 2002).

La familia de las ATPasas de tipo P se puede clasificar considerando la especificidad de las proteínas al sustrato. De acuerdo a esta clasificación, en la familia de ATPasas de tipo P hay 5 tipos y 9 subtipos de proteínas. La ANK se ubica en el tipo II junto con la ATPasa de H⁺/K⁺ (AHK), ambas son los únicos miembros de la familia de ATPasas de tipo P que son heterodiméricas, es decir se distinguen por estar compuestas por una subunidad α y una subunidad β en estequiometría 1:1 (Kaplan, 2002). Estas dos proteínas comparten otras similitudes, pero en particular, la subunidad α de la AHK y la ANK tienen una estructura primaria muy parecida (idénticas en más del 60%) (Poulsen *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2009), además de una estructura tridimensional muy similar cuando se analizan por microscopía electrónica (Poulsen *et al.*, 2010). Es muy importante mencionar que a pesar de la homología existente entre la ANK y la AHK, estas bombas

tienen una localización celular diferente. La ANK está concentrada en la membrana basolateral de la mayoría de tipos de células epiteliales mientras que el AHK se acumula en la superficie apical (Dunbar y Caplan, 2001; Kaplan, 2002).

La ANK está compuesta por tres subunidades (Fig. 6). La subunidad α se encuentra predominantemente en el lado citoplasmático de la célula y proporciona la función catalítica a la proteína a través de la unión Na^+ , K^+ , ATP y ouabaína al dominio P, además contiene un sitio importante para la hidrólisis del ATP (dominio N) (Buranajitpirom *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015; Jorgensen *et al.*, 2003).

En el caso de la subunidad α , se han identificado cuatro isoformas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y su distribución es por tejido y son específicas del desarrollo, lo que sugiere que pueden desempeñar papeles específicos, ya sea durante el desarrollo o acoplado a procesos fisiológicos específicos (Lingrel *et al.*, 2003).

En algunas especies de mamíferos y peces como son la trucha arco iris *Onchorynchus mykiss*, el austrobacalao esmeralda *Trematomus bernacchii*, el fúndulo *Fundulus heteroclitus* y el pez cebra *Danio rerio*, las isoformas de subunidad α tienen diferentes patrones de distribución tisular que probablemente reflejan la función fisiológica (Chaudhari *et al.*, 2015). En el camarón rojo *Artemia franciscana* se han detectado dos isoformas de la subunidad α ; $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Chaudhari *et al.*, 2015; Chung y Lin, 2006). La función de la $\alpha 1$ en *A. franciscana* puede ser osmorreguladora según lo sugerido por su presencia principalmente en órganos osmorreguladores como son la glándula de sal, la glándula antenal y el intestino medio (Chaudhari *et al.*, 2015). Sin embargo, las isoformas se distribuyen de manera diferente entre los órganos en *Artemia salina* (Chung y Lin, 2006). No se encontró ninguna isoforma de la subunidad α de la ANK en branquias de la jaiba *C. sapidus* (Towle *et al.*, 2001) ni en las branquias (anterior y posterior), la glándula antenal y el intestino medio del cangrejo *S. paramamosain* (Chung y Lin, 2006). En *P. vannamei* la subunidad α de la ANK se compone de 1038 residuos de aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 115.4 kDa (Sun *et al.*, 2015) y se ha reportado en el epitelio de epipoditos y branquiosteguitos (Chong-Robles, 2015), pero se desconoce su presencia en otras regiones como la glándula antenal.

La subunidad β es una glicoproteína (Buranajitpirom *et al.*, 2010) de membrana tipo II (tiene un solo cruce en la membrana y su extremo amino terminal se encuentra en el

citoplasma) (Béguin *et al.*, 1997; Kaplan, 2002); esta subunidad se localiza en el exterior de la célula (Buranajitpirom *et al.*, 2010) y se compone de alrededor de 370 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 55 kDa con 4 isoformas (Kaplan, 2002). Es vital y necesaria para la maduración estructural y funcional de la subunidad α (Béguin *et al.*, 1997).

La subunidad γ o proteína FXYD, se localiza en el espacio intermembranal, es la más pequeña de las tres subunidades y hasta la fecha se desconoce su función (Buranajitpirom *et al.*, 2010); no obstante, evidencias experimentales sugieren que modula la actividad de la ANK en tejidos específicos y participa en las modificaciones postraduccionales de la subunidad α (Geering, 2008).

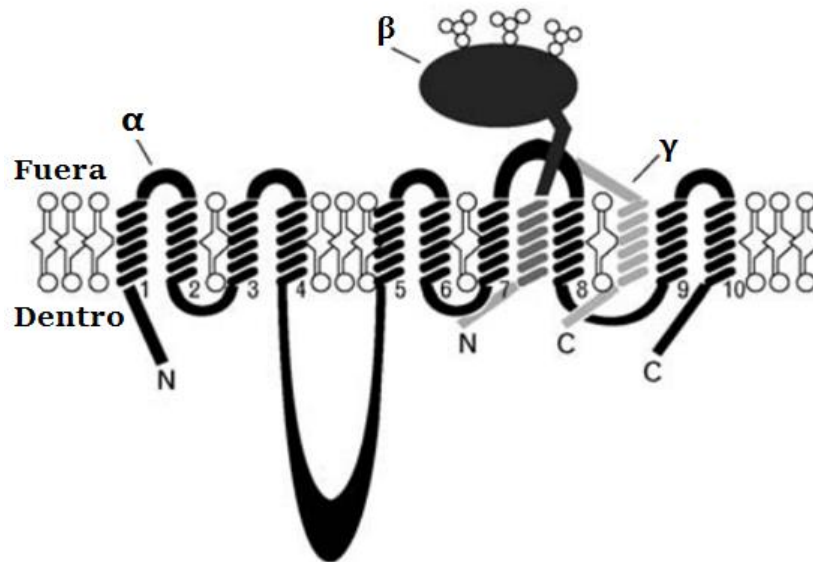


Figura 6. Esquema de la estructura secundaria de la ANK. La ANK está compuesta por una subunidad α (negro), una subunidad β (negro y gris oscuro) y una subunidad γ (gris claro). La subunidad α tiene 10 segmentos transmembranales, en esta subunidad se hidroliza el ATP (es fosforilado en el bucle citoplasmático grande, dominio N) y transporta los iones de sodio y potasio. La subunidad β es una glicoproteína de tipo II que interactúa con su bucle extracelular entre los segmentos transmembranales 7 y 8 de la subunidad α . La subunidad γ (proteína FXYD) es una proteína de membrana tipo I que interactúa con el segmento transmembranal 9 de la subunidad α , así como con la superficie intracelular de lípidos y con el dominio citoplasmático de la subunidad α . N y C representan los grupos amino terminal y carboxilo terminal respectivamente. Modificado de Geering (2008).

2. ANTECEDENTES

2.1. Osmorregulación en *P. vannamei*

P. vannamei es considerado un buen osmorregulador para un amplio intervalo de salinidad (Arzola-González *et al.*, 2008). Tiene un patrón de osmorregulación de tipo III, exhibe un patrón de regulación híper-osmótico en bajas salinidades y un patrón de regulación hipo-osmótico en altas, su punto iso-osmótico varía entre 25-26 UPS (735.29-764.70 mOsm.Kg⁻¹) dependiendo de la etapa de desarrollo (Chong-Robles, 2015).

Los epipoditos y branquiósteguitos son las principales estructuras involucradas en la osmorregulación de esta especie, dichas estructuras tienen una participación activa a partir de PL15 cuando se encuentran desarrolladas y presentan ionocitos bien diferenciados con presencia de la ANK (Chong-Robles, 2015).

La actividad osmorreguladora de *P. vannamei* se ha evaluado midiendo la diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa y la osmolalidad del medio externo (Huong *et al.*, 2010; Perez-Velazquez *et al.*, 2012; Chong-Robles *et al.*, 2014), midiendo la cantidad de iones disueltos en la hemolinfa (Liu *et al.*, 2008; Huong *et al.*, 2010), la actividad enzimática de alguna proteína osmorreguladora como la ANK (Álvarez *et al.*, 2004; Hongyu *et al.*, 2014; Huong *et al.*, 2010; Hurtado *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007), estimando el nivel de transcritos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa por tiempo real (qPCR) (Hu *et al.*, 2015; Chong-Robles, 2015), por medio de la localización de las proteínas osmorreguladoras en las células mediante inmunolocalización (Liu *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2014; Chong-Robles, 2015) y caracterización de la ultraestructura celular de epitelios especializados (Chong-Robles, 2015).

Gran parte de los trabajos que han analizado a nivel molecular la actividad osmorreguladora de *P. vannamei*, han empleado como marcador la subunidad α de la ANK (generalmente no se especifica la isoforma), y en los trabajos donde se ha realizado inmunodetección de la ANK en la especie (Tabla 1) el anticuerpo utilizado es el anticuerpo $\alpha 5$ (Takeyasu *et al.*, 1988; DSHB Product $\alpha 5$, depositado por D. M. Fambrough; Departamento de Biología de la Universidad Johns Hopkins). El anticuerpo $\alpha 5$ es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG hecho en ratón dirigido hacia la ANK $\alpha 1$ del pollo

Gallus gallus. La inmunolocalización de la ANK en *P. vannamei* se ha realizado en branquias de juveniles, postlarvas (Uranga-Solís, 2012; Chong-Robles, 2015) y adultos (Pan et al., 2014), así como el branquioesteguito y epipodito de postlarvas, juveniles y adultos (Chong-Robles, 2015).

El Ac $\alpha 5$ se ha utilizado ampliamente para localizar la proteína en diversos organismos, no obstante, con base en lo explicado anteriormente acerca de la similitud entre ANK y AHK, existe la posibilidad de que en ciertas especies el Ac $\alpha 5$ reconozca al transportador AHK en lugar del ANK o a ambos cuando sus secuencias son muy similares. Cabe aclarar que su nombre no se refiere a que es específico a la isoforma $\alpha 5$, ya que de acuerdo con el fabricante reconoce todas las isoformas de la ANK (el 5 pudiera corresponder a un código interno del fabricante, se desconoce el significado). Un anticuerpo, por definición, debe ser diseñado con alta especificidad por un epítopo, ya que los anticuerpos reconocen la configuración total del antígeno en lugar de tan sólo su composición química. Este mecanismo de reconocimiento específico permite a los anticuerpos el distinguir entre ligeros cambios en la estructura primaria, la carga, la configuración óptica, y la conformación estérica de un antígeno (Elgert, 2009). Así sólo unas pocas diferencias en la secuencia de aminoácidos pueden afectar la reacción de unión epítopo-paratopo, resultando en la falta de reconocimiento hacia la proteína de interés (Lavoie *et al.*, 1999).

Es importante para estudios de inmunolocalización verificar que los anticuerpos utilizados sean específicos hacia la proteína diana. Una cuestión a considerar al utilizar el Ac $\alpha 5$ es que a pesar de ser monoclonal, no se conoce con exactitud el epítopo que reconoce y siendo la ANK y la AHK tan similares (idénticas en más del 60%), es posible que se den falsos positivos al realizar el inmunomarcage. Algunos estudios reportan presencia abundante de la ANK en branquias de penaeidos por lo cual se han considerado como órgano osmorregulador importante (Bouaricha *et al.*, 1991; Chaudhari *et al.*, 2015; Leone *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 1992; Uranga-Solís, 2012). Sin embargo al utilizar el Ac $\alpha 5$ para detectar la ANK en *P. vannamei* se han obtenido inmunomarcajes distintos, Uranga-Solís (2012) obtuvo inmunomarcaje positivo en el epitelio branquial, mientras que Chong-Robles (2015) detectó negativos, y sin presencia de ionocitos.

Uranga-Solís en 2012 sintetizó un anticuerpo policlonal diferente al Ac $\alpha 5$, dirigido de manera específica al extremo 5' de la subunidad $\alpha 1$ de la ANK de *P. vannamei* (el Anti-ANK 1211/1212). Estudios preliminares sugieren que el Anti-ANK 1211/1212 es más efectivo para detectar la ANK que el Ac $\alpha 5$ ya que cuando se comparan los resultados utilizando ambos anticuerpos en *P. vannamei*, el patrón de expresión celular es diferente (Uranga-Solís, 2012). Por tal motivo, uno de los retos para localizar acertadamente una proteína y asociarla a la función de los de órganos específicos es determinar la especificidad de los anticuerpos usados, por esto es necesario realizar ensayos en los que se compare la especificidad de los anticuerpos Ac $\alpha 5$ y Ac 1211/1212 y validar su uso para el estudio de la ANK en *P. vannamei*.

2.2. La glándula antenal como órgano osmorregulador

En comparación con el conocimientos que se tiene sobre la función de los órganos branquiales (branquias epipoditos y branquioestegitos), existe poca información sobre la GA, incluyendo su función y la identificación de los transportadores de iones como la ANK, y su localización precisa (Freire *et al.*, 2008b).

La mayoría de los estudios de la GA se han centrado en los efectos de los cambios en la salinidad y la función del órgano excretor en varias especies de crustáceos (Tabla 2). Ambos tipos de trabajo utilizan diversas metodologías (Tabla 2), siendo una de las más populares la inmunolocalización de la ANK. Cabe resaltar que ninguna de ellas se ha realizado en *P. vannamei*.

A pesar de la importancia de la GA en el proceso de osmorregulación, esta ha recibido poca atención en las investigaciones, quizás porque la GA posee un tamaño reducido y una accesibilidad restringida que dificulta, e incluso impide la realización de ciertos análisis (Freire *et al.*, 2008b). Hasta el momento no existen trabajos publicados que evalúen la función osmorreguladora de la GA en *P. vannamei*, pese a que es una especie eurihalina con un ciclo de vida complejo, donde la participación de la GA puede ser vital.

Tabla 2. Resumen de algunas investigaciones en crustáceos donde se ha estudiado a la glándula antenal como órgano osmorregulador.

	Especie	Salinidad	Metodología	Resultados principales	Referencia
Especies dulciacuícolas	<i>A. leptodactylus</i> Varias etapas	AD	Caracterización de epitelios especializados	La ultraestructura de la GA sugiere que el órgano está implicado en el transporte activo. La GA es, probablemente, funcional justo antes de la eclosión.	Khodabandeh <i>et al.</i> , 2005a
		AD	Midiendo la osmolalidad de hemolinfa y la orina. ANK-IFI	La AG participa en la osmorregulación mediante la producción de orina diluida hipotónica a la hemolinfa. La ANK estaba presente en la GA Durante el desarrollo embrionario, se detectó ANK en los ionocitos que recubren el túbulo y la vejiga. En todas las regiones, la fluorescencia se localizó principalmente en el lado basolateral de las células	Khodabandeh <i>et al.</i> , 2005c
	<i>Macrobrachium amazonicu</i> Dos poblaciones en varias etapas	5 y 25 ppt	ANK-IFI	La ANK se detectó en diversas partes de GA, la vejiga y el túbulo, sin variación entre poblaciones o salinidades. Se observaron las características típicas de los epitelios osmorreguladores en la GA.	Boudour-Bouchecker <i>et al.</i> , 2013
	<i>Palaemonetes argentinus</i> Varias etapas	1, 15 y 25‰	ANK-IFI	La inmunotinción de la ANK fue más fuerte en las células de la vejiga que en el túbulo. Por otra parte, la ANK se localiza a través de las células de la vejiga, mientras que parecía más concentrada en la parte basal de las células de los túbulos. La GA contribuye en la osmorregulación desde etapas tempranas del desarrollo.	Ituarte <i>et al.</i> , 2016
	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	AD	Midiendo la actividad y concentraciones de ANK y CA	El nivel de actividad de ambas enzimas es extremadamente alto en la AG, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de producir una orina hiposmótica.	Wheatly y Henry, 1987

Especies marinas	<i>H. gammarus</i> Adulto	AM	ANK-IFI en conjunto con la caracterización de epitelios especializados	La ANK se detectó en la parte basal de las células del laberinto y de la vejiga. Las células del laberinto y de la vejiga presentan características morfológicas y enzimáticas de los ionocitos. La GA de la langosta posee capacidades activas de intercambio iónico.	Khodabandeh <i>et al.</i> , 2005b
	<i>H. gammarus</i> Varias etapas	AM	ANK-IFI	La organización definitiva de la glándula antenal encontrada en los adultos se logra en la etapa postlarva V. La ANK se detectó en el lado basolateral de los ionocitos que recubren el epitelio de la glándula antenal	Khodabandeh <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. monodon</i> Juveniles	Trasladado de agua de mar a 45 ppt a agua de mar a 15 ppt	Midiendo la tasa de producción urinaria y cuantificando la concentración iónica en la orina y la hemolinfa	Las concentraciones de sodio y potasio son reguladas por la GA después de un cambio brusco de salinidad en el medio. La tasa de producción urinaria de <i>P. monodon</i> disminuyó a medida que aumentó la salinidad, lo que sugiere que las glándulas antenales también regulan el volumen corporal.	Lin <i>et al.</i> , 2000
		7, 15 o 30 ppt	ANK-IFI en conjunto con la caracterización de epitelios especializados	Hay cambios ultraestructurales importantes en la GA de los camarones criados en 7 ppt. La expresión y la actividad de la ANK en la GA son mayores a bajas salinidades.	Buranajitpirom <i>et al.</i> , 2010
	<i>S. paramamosain</i> Adulto	5, 25 y 45 ppt	ANK-qPCR	Los niveles de expresión la ANK en las branquias posteriores y la glándula antenal son más altos que los de las branquias anteriores y el intestino anterior.	Chung y Lin, 2006
Hábitat semiterrestre	<i>O. stimpsoni</i>	5% de agua de mar	ANK-IFI en conjunto con la caracterización de epitelios especializados	Se identificaron tres tipos de células osmorreguladoras en la GA. Se encontró una distribución no uniforme de ANK. La GA es uno de los órganos responsables de la osmorregulación a corto plazo en la especie.	Tsai y Lin, 2014

AD, Agua dulce; AM, Agua de mar; IFI, Inmunolocalización o Inmunofluorescencia Indirecta; qPCR, PCR en tiempo real

3. JUSTIFICACIÓN

La GA es un órgano excretor importante en los crustáceos decápodos, su función es regular la composición iónica y el volumen de los líquidos extracelulares. Su papel es vital para mantener constante la concentración iónica y el volumen de los fluidos internos, ya que un desajuste conlleva a un daño celular y la consecuente muerte de los animales (Khodabandeh *et al.*, 2006). Este órgano, en sincronía con la cámara branquial (epipoditos, branquiosteguitos y branquias) y el tubo digestivo, forman el principal circuito osmorregulador que le permite a los crustáceos eurihalinos sobrevivir exitosamente en su hábitat.

Actualmente se sabe poco acerca de la histología y los mecanismos moleculares de la GA en el camarón blanco. Hasta el momento se ha descrito la presencia de ionocitos y/o de la ANK en la GA de pocas especies, los datos de la inmunolocalización de la ANK y la presencia de epitelios especializados han permitido, entre otras cosas, conocer cuáles son las regiones de la GA que participan en los procesos osmorreguladores, identificar bajo qué condiciones este órgano funciona y comprender aspectos fisiológicos de las especies, pero se desconocen los detalles en *P. vannamei*.

Las investigaciones enfocadas a la osmorregulación de *P. vannamei* se han centrado en las branquias como principal órgano osmorregulador. Sin embargo, recientemente se ha documentado que en esta especie, los epipoditos y branquiosteguitos son las principales estructuras involucradas en la osmorregulación, mientras que las branquias tienen una participación menor. El papel de la GA aún no está definido para la especie ni ha sido descrita su estructura a nivel celular.

Considerando que esta especie presenta un ciclo de vida complejo, en el cual los organismos están expuestos de manera natural a salinidades variables, y tomando en cuenta que la GA es parte del circuito osmorregulador en la mayoría de los crustáceos; es muy probable que la GA esté involucrada en la osmorregulación de *P. vannamei*. Por tal motivo, el estudio de la GA en nivel celular y molecular resulta indispensable para comprender cómo sucede la osmorregulación en condiciones controladas de salinidad y para tener una mejor aproximación a la respuesta de los animales a los cambios de salinidad a los que podrían exponerse en condiciones de cultivo.

4. HIPÓTESIS

Los anticuerpos Ac $\alpha 5$ y Ac 1211/1212 son específicos para la ANK de *P. vannamei*.

La ANK participa en la absorción de iones y se expresa en la glándula antenal con una mayor participación en salinidades inferiores al punto isosmótico.

La glándula antenal participa en la osmorregulación de *P. vannamei* en PL15 y juveniles. La intervención de la glándula antenal en el proceso de osmorregulación depende de la etapa de desarrollo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Caracterizar la función osmorreguladora de la glándula antenal mediante el estudio de su morfología y la localización de la ATPasa Na^+/K^+ en postlarva 15 y juvenil del camarón blanco *P. vannamei* expuestos a baja y alta salinidad.

5.2. Objetivos particulares

1. Describir la morfología de la glándula antenal de *P. vannamei*.
2. Evaluar la especificidad de dos anticuerpos (Ac $\alpha 5$ y Ac 1211/1212) diseñados para la localización celular de la ANK.
3. Determinar la localización celular y abundancia de la ANK en la glándula antenal de postlarva 15 y juvenil de *P. vannamei* expuestos a baja (5 UPS) y alta (32 y 45 UPS) salinidad.
4. Establecer la participación de la glándula antenal en la osmorregulación con respecto a otras estructuras osmoreguladoras del camarón y su adaptación al medio ambiente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Manejo de organismos, aclimatación y toma de muestras

Para caracterizar la glándula antenal de *P. vannamei* se evaluaron organismos de dos etapas: PL15 y juvenil (de aproximadamente 12 cm de longitud y 10 g de peso), expuestos a tres salinidades (5, 32 y 45 UPS). Las muestras de PL15 se obtuvieron de un bioensayo realizado durante 2011 y 2012 (detalles en Chong-Robles, 2015), mientras que los juveniles se obtuvieron a partir de un bioensayo realizado en el Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC durante diciembre de 2016.

Los juveniles de *P.vannamei* fueron adquiridos en la granja de camarones Campo Mosqueda, localizada en Mexicali B.C., México. Los organismos se mantuvieron en agua de mar a 25 ± 1 °C durante 15 días y posteriormente se realizó el bioensayo. Brevemente: se colocaron 27 camarones juveniles en recipientes de plástico con agua a una salinidad de 34 UPS para aclimatarlos a una temperatura de 25 ± 1 °C durante 5 días, posteriormente fueron transferidos directamente desde la salinidad de 34 UPS a las salinidades de prueba (5, 32 y 45 UPS) donde permanecieron por 48 h. El agua con las salinidades experimentales se preparó un día antes de ser utilizada. La salinidad de 45 se obtuvo añadiendo sal marina de Guerrero Negro al agua de mar y las salinidades bajas se obtuvieron diluyendo el agua de mar con agua purificada. La salinidad fue ajustada en mOsm.Kg^{-1} con un osmómetro de punto de congelación (Advanced Instruments 3320, Massachusetts). El experimento se realizó en condiciones de aireación constante, fotoperiodo 12 h luz: 12 h oscuridad y temperatura de 25 ± 1 °C la cual fue ajustada y mantenida con calentadores de titanio. Los camarones no fueron alimentados durante las 48 h que duró el experimento. Una vez concluida la etapa experimental los organismos fueron disectados e inmediatamente se fijaron en solución Davidson por 24 h, posteriormente se preservaron en etanol 70% hasta su utilización.

6.2. Preparación de cortes histológicos

Las muestras preservadas en alcohol al 70% fueron transferidas a casetes de 4.1 cm x 2.85 cm para su deshidratación en un Histoquinet (Leica) (procedimiento detallado en Anexo 1). Las muestras fueron incluidas manualmente en paraplast (Paraplast® Embedding Media, McCormick Scientific) con la finalidad de orientar adecuadamente los tejidos y obtener cortes sagitales. Se realizaron cortes histológicos seriados (A y B) de 4 μ m de espesor con un micrótopo (Leica RM2125RT). Los cortes de la serie A fueron colectados en un baño de albumina y una vez montados, las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos días. Los cortes correspondientes a la serie B fueron utilizados para la IFI, por lo cual fueron colectados directamente en laminillas previamente preparadas y cubiertas con poli-L-lisina 0.1% (Anexo 2).

6.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos α 5 y 1211/1212 para detectar la ANK

Como se mencionó anteriormente, existe evidencia teorica que sugiere que la especificidad del Ac α 5 podría ser errónea en el camaron blanco, este anticuerpo podría estar reconociendo a la AHK y/o a la ANK si ambas secuencias son similares en la zona del epítopo del anticuerpo. Por tanto, para evaluar la especificidad de los anticuerpos disponibles (AC α 5 y Ac 1211/1212) se realizaron: un análisis bioinformático, la inmunolocalización de la ANK en branquia y branquioesteguito (control positivo para el Ac α 5) utilizando ambos anticuerpos y un Western blot.

6.3.1. Análisis bioinformático

Se realizaron alineamientos de secuencias de aminoácidos, perfiles de hidrofobicidad y análisis filogenéticos con la finalidad de evaluar los porcentajes de similitud y la relación evolutiva entre la isoforma 1 de la subunidad α de la ANK y la AHK. Para el análisis se incluyen secuencias de crustáceos, peces, anfibios, aves y mamíferos (Tabla 3) que se obtuvieron a partir de NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla 3. Especie y número de acceso de las secuencias de la subunidad α de la ANK y la AHK utilizadas en el análisis de secuencias.

Proteína	Especie	Número de acceso NCBI
AHK	<i>Dasyatis sabina</i>	<u>AAP35241</u>
AHK	<i>Siniperca chuatsi</i>	<u>ADK25708</u>
AHK	<i>Homo sapiens</i>	<u>P20648</u>
AHK	<i>Mus musculus</i>	<u>Q64436</u>
AHK	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<u>P27112</u>
AHK	<i>Xenopus laevis</i>	<u>Q92126</u>
AHK	<i>Macaca mulatta</i>	<u>EHH29928</u>
AHK	<i>Chelonia mydas</i>	<u>EMP24795</u>
ANK	<i>Drosophila melanogaster</i>	<u>AAC05260</u>
ANK	<i>Homarus americanus</i>	<u>AAN17736</u>
ANK	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	<u>ABA02167</u>
ANK	<i>Penaeus monodon</i>	<u>ABV65906</u>
ANK	<i>Takifugu obscurus</i>	<u>ADD60471</u>
ANK	<i>Penaeus vannamei</i>	<u>ADM87522</u>
ANK	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	<u>AEX07319</u>
ANK	<i>Callinectes sapidus</i>	<u>AAG47843</u>
ANK	<i>Pagrus major</i>	<u>ALA65287</u>
ANK	<i>Gallus gallus</i>	<u>P09572</u>
ANK	<i>Equus caballus</i>	<u>P18907</u>
ANK	<i>Pongo abelii</i>	<u>Q5RDR3</u>
ANK	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<u>Q9N0Z6</u>
ANK	<i>Rhinella marina</i>	<u>P30714</u>
ANK	<i>Anguilla anguilla</i>	<u>CAA53714</u>
ANK	<i>Camponotus floridanus</i>	<u>EFN66583</u>
ANK	<i>Xenopus laevis</i>	<u>NP_001084064</u>
ANK	<i>Aedes aegypti</i>	<u>XP_001662217</u>

ANK, ATPasa Na⁺/K⁺; AHK, ATPasa H⁺/K⁺

Las secuencias fueron alineadas con el software Geneious (versión 8.0.5, método Geneious), el cual generó la matriz de similitudes entre las especies por número de residuos. Los perfiles de hidrofobicidad se obtuvieron utilizando el método de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) con la versión BioEdit Sequence Alignment Editor Software ver. 7.2.5. De acuerdo con la información proporcionada por el fabricante (DSHB), el Ac $\alpha 5$ (registro en DSHB **AB_2166869**) reconoce un epítipo citosólico localizado en la subunidad $\alpha 1$ (pos. 615-750) de la ATPasa de Na⁺/K⁺ de *Gallus gallus* (acceso en el NCBI **P09572**); por tal motivo la secuencia de la ANK $\alpha 1$ de *G. gallus* fue usada como referencia para detectar la similitud en la zona del epítipo.

El análisis filogenético se construyó a partir del alineamiento de múltiples secuencias de la ANK isoforma $\alpha 1$ y la AHK isoforma $\alpha 1$ (Tabla 4) con la herramienta Geneious *tree building* (Geneious) usando el método UPGMA, el cual es un método de reconstrucción basado en matrices de distancias por lo que realiza un agrupamiento que refleje las similitudes entre las secuencias analizadas.

Tabla 4. Especie y número de acceso de las secuencias de la subunidad α de la ANK y la AHK utilizadas en la elaboración del árbol filogenético.

Proteína	Especie	Número de acceso NCBI
ANK	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	<u>ABA02167</u>
ANK	<i>Xenopus laevis</i>	<u>NP_001084064</u>
ANK	<i>Ophiophagus Hannah</i>	<u>ETE67008</u>
ANK	<i>Larimichthys crocea</i>	<u>KKF17284</u>
ANK	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<u>Q9N0Z6</u>
ANK	<i>Mus musculus</i>	<u>Q8VDN2</u>
ANK	<i>Homo sapiens</i>	<u>P05023</u>
ANK	<i>Gallus gallus</i>	<u>P09572</u>
ANK	<i>Bos Taurus</i>	<u>Q08DA1</u>
ANK	<i>Dasyatis sabina</i>	<u>AAU29551</u>
ANK	<i>Sus scrofa</i>	<u>1210234A</u>
ANK	<i>Ophiophagus Hannah</i>	<u>ETE66743</u>
ANK	<i>Canis lupus familiaris</i>	<u>AAA67372</u>
ANK	<i>Anas platyrhynchos</i>	<u>NP_001297314</u>
ANK	<i>Penaeus monodon</i>	<u>ACQ99366</u>
ANK	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	<u>AEX07319</u>
ANK	<i>Drosophila melanogaster</i>	<u>AAC05260</u>
ANK	<i>Callinectes sapidus</i>	<u>AAG47843</u>
ANK	<i>Penaeus vannamei</i>	<u>ADM87522</u>
ANK	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	<u>ABG88081</u>
AHK	<i>Xenopus laevis</i>	<u>Q92126</u>
AHK	<i>Ophiophagus Hannah</i>	<u>ETE66743</u>
AHK	<i>Larimichthys crocea</i>	<u>KKF32592</u>
AHK	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<u>P27112</u>
AHK	<i>Mus musculus</i>	<u>2112199B</u>
AHK	<i>Homo sapiens</i>	<u>AAB50172</u>
AHK	<i>Gallus gallus</i>	<u>AGF69187</u>
AHK	<i>Bos Taurus</i>	<u>NP_001137561</u>
AHK	<i>Dasyatis sabina</i>	<u>AAP35241</u>
AHK	<i>Sus scrofa</i>	<u>NP_999456</u>
AHK	<i>Ophiophagus Hannah</i>	<u>ETE66743</u>
AHK	<i>Canis lupus familiaris</i>	<u>NP_001003342</u>
AHK	<i>Anas platyrhynchos</i>	<u>EOA98548</u>

AHK	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	AAD56285
-----	--------------------------------------	-----------------

ANK, ATPasa Na⁺/K⁺; AHK, ATPasa H⁺/K⁺

6.3.2. Inmunolocalización de la ANK en branquiosteguito de *P. vannamei*

Para estandarizar y determinar la especificidad de los anticuerpos primarios (ACI) se realizaron diversos ensayos con los anticuerpos primarios $\alpha 5$ (DSHB, anticuerpo monoclonal dirigido hacia la ANK $\alpha 1$ de *G. gallus*) y 1211/1212 (anticuerpo policlonal específico a la ANK de *P. vannamei*; diseñado por Uranga-Solís, 2012) y respectivamente los anticuerpos secundarios (ACII) Alexa fluor 488 (que es un anti-IgG de ratón expresado en chivo el cual está unido al fluorocromo Alexa fluor que fluoresce a una longitud de onda de 488 nm; Invitrogen™) y el anti IgG (H+L) CFL405 (este ACII está unido al fluorocromo CFL que fluoresce a una longitud de onda de 405 nm; Santa Cruz Biotechnology, Inc). La IFI se realizó por separado con cada uno de los anticuerpos, utilizando como control positivo muestras de branquiosteguito de *P. vannamei* expuesto a salinidad control (32 UPS). Cada ensayo se realizó en dos laminillas (negativo, positivo) que se protegieron con un cubreobjetos y resina especial para IFI (Fluoromount; Sigma). La laminilla negativa no incluyó el ACI. Las laminillas fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss a 488 nm con un tiempo de exposición de 200 ms y objetivos de 10x, 20x y 40x. Además se tomaron fotografías de las zonas de interés utilizando una cámara Media Cybernetics Evolution VF.

Con base en los resultados obtenidos se determinó cuáles anticuerpos primario y secundario (y en qué concentraciones) se utilizarían para determinar la localización celular y abundancia de la ANK en la glándula antenal.

6.3.3. Western blot con el Ac $\alpha 5$

Para evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal $\alpha 5$ se realizó un Western blot en muestras de epipodito, branquiosteguito, glándula antenal, branquias y músculo abdominal de juveniles de *P. vannamei* expuestos a 5, 32 y 45 UPS. En este experimento el branquiosteguito y epipodito también fueron los órganos positivos. Para obtener las proteínas se utilizó el método de extracción de Liu *et al.* (2009). Brevemente, se

homogenizaron 150 mg del tejido de interés en 500 μ L amortiguador de lisis (sacarosa 200 mM, EDTA-Na₂ 5 mM, Tris 10 mM, DTT 1 mM y desoxicolato de sodio al 0.1%). Los homogenizados se centrifugaron a 13,000 g a 4 °C durante 20 min y los sobrenadantes se usaron para determinar la concentración de proteínas totales y realizar la inmunotransferencia como se describe a continuación.

La concentración de proteína de cada sobrenadante se determinó mediante el ensayo Bradford. Se usó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific™) a una longitud de onda de 595 nm. Las proteínas de cada tejido se diluyeron en agua para obtener una concentración de 50 μ g/ μ L, y posteriormente se colocaron en proporción 1:1 en amortiguador de carga (15 mL de Tris-HCl a 0.5 M, pH 6.8; SDS a 10%; Glicerol a 15%; 300 μ L de β -mercaptoetanol, azul de bromofenol a 0.05%). Las muestras se calentaron a 37 °C durante 15 min, se cargaron 20 μ L de cada una en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 5% y separador 8%) preparados de acuerdo con el método de Sambrook *et al.* (1989). Se separaron por tamaño mediante electroforesis en tres geles idénticos (A, B, y C). En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular de Bio-Rad (No. de catálogo 161-0363). La electroforesis se realizó a 80 V durante 2 horas en amortiguador de electroforesis Tris-glicina 1X (preparado a 5X, pH 8.3 con Tris base a 0.125 M; Glicina a 0.96 M; SDS a 0.5%). Uno de los geles (A) se tiñó con azul de Coomassie para verificar calidad de la extracción y de la migración, el segundo y tercer gel (B y C) se utilizaron para el Western blot (B para inmunomarcaje positivo y C como control negativo).

Para el Western blot se utilizaron membranas de PVDF (Millipore, USA), las cuales fueron humedecidas durante 5 min en metanol absoluto y posteriormente se incubaron durante 15 min en solución amortiguadora de transferencia (Glicina a 49 mM; Tris base a 60 mM; SDS a 0.046%). De igual forma se incubaron el gel, la fibra absorbente y el papel. La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó en una cámara de transferencia durante una hora a 200 mA constantes. Ya transferidas las proteínas, las membranas se incubaron en la solución bloqueadora (BSA 3% en PBST, PBS1X- Tween 20 0.1%,) durante 2 horas con agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBST. Después de los lavados, la membrana B (inmunomarcaje positivo) se

incubó durante dos horas con el anticuerpo primario ANK Ac5 diluido 1:100 en PBST mientras que la membrana C (control negativo) sin ACI, en su lugar, se incubó en PBST. Después de la incubación se realizaron los lavados con PBST (3 lavados de 5 min). Posteriormente se incubaron las membranas durante 2 horas en anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, Inc., vinculado a la enzima HRP) diluido 1:2,500 en solución PBST, después de la incubación las membranas se lavaron de nuevo con PBST y se reveló incubando la membrana con el sustrato quimioluminiscente ECL (Pierce ECL western blotting substrate, Thermo Scientific™) que permite una detección basada en luminol, las fotografías se obtuvieron con un fotodocumentador (ChemiDoc™ MP; Bio-Rad) después de 120s de exposición al sustrato. Se espera una proteína de 112.3 kDa, que corresponde al tamaño esperado de la subunidad α de la ANK.

6.4. Análisis celular de la glándula antenal (tinción HE)

La topografía celular de la GA se diferenció mediante la observación de las muestras teñidas con la tinción Hematoxilina-Eosina. Los cortes histológicos de la serie A fueron desparafinados (Anexo 3) y teñidos con la tinción Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo 4). Las laminillas teñidas fueron observadas y analizadas en un microscopio óptico con objetivos 10, 20, 40x (Zeiss Axioskop 40; Carl Zeiss). Se evaluó la forma celular y la organización del epitelio de PL15 y juveniles expuestos a baja (5 UPS) y alta (32 y 45 UPS) salinidad. De cada etapa se examinaron 2 organismos y 2 laminillas con 3 cortes histológicos de cada uno.

Se tomaron fotografías a 10, 20 y 40x con una cámara digital (AxioCam MR3; Carl Zeiss). Todas las imágenes fueron editadas con la escala y anotaciones usando el software Zen 2.3 Blue edition para Windows XP (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

Con la finalidad de detectar cambios evidentes en el epitelio de la GA al exponer a los organismos a diferentes salinidades, se analizaron cuidadosamente los cortes histológicos y se midió el lumen de los túbulos del laberinto de la GA de juveniles (Anexo 6) con el programa ImageJ versión 10.2.

6.5. Localización celular y abundancia de la ANK en la glándula antenal

La localización celular y abundancia de la ANK se evaluó por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Como se describió previamente, se realizaron cortes histológicos de organismos de dos etapas (PL15 y juvenil) expuestos a tres salinidades (5, 32 y 45 UPS). Para cada tratamiento (n=2) se realizó el inmunomarcaje (Anexo 7) en 2 laminillas (con 3 cortes histológicos de cada una). De acuerdo a los resultados obtenidos acerca de la especificidad de los anticuerpos, el Ac $\alpha 5$ es la mejor opción para inmunocalizar a la ANK de *P. vannamei*, pues este anticuerpo no tiene interacciones inespecíficas con otras proteínas (WB) y permite inmunocalizar (IFI) a la ANK de forma precisa. Por tal motivo para el inmunomarcaje positivo se utilizó el anticuerpo primario (ACI) Ac $\alpha 5$ [15 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y el anticuerpo secundario (ACII) Alexa fluor 488 [30 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Como control positivo se utilizó tejido de branquiosteguito y epipodito de *P. vannamei*. Los controles negativos se realizaron omitiendo el ACI.

Las laminillas fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss a 488 nm y objetivos de 10x, 20x y 40x, todas con un tiempo de exposición de 200 ms. Se tomaron fotografías de las zonas de interés utilizando una cámara Media Cybernetics Evolution VF. De igual forma se observaron y fotografiaron algunas muestras utilizando el microscopio Axio observer z1/7 (Carl Zeiss) equipado con microscopia confocal LSM 800 con Airyscan (Carl Zeiss).

Para estimar la abundancia de la ANK en la GA de *P. vannamei* se cuantificó la intensidad de fluorescencia con el software ImageJ (versión 10.2) utilizando imágenes de alta resolución no modificadas y siguiendo la metodología descrita por McCloy *et al.* (2014) (Anexo 8). Se cuantificaron las tres réplicas de cada organismo y una vez obtenidos los datos se utilizó el software Microsoft Excel 2010 para realizar las gráficas y los análisis estadísticos. Para determinar diferencias significativas se realizaron pruebas paramétricas de tipo t (t de Student) y un valor de $\alpha = 0.05$ (intervalo de confianza de 95%).

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos primarios $\alpha 5$ y 1211/1212

7.1.1. Análisis bioinformático

La similitud entre la α ANK y la α AHK en la zona del epítipo (pos. 615-750) se detectó mediante el alineamiento de ambas proteínas (Fig. 7), incluyendo secuencias de peces, anfibios, aves, mamíferos y crustáceos (ANK).

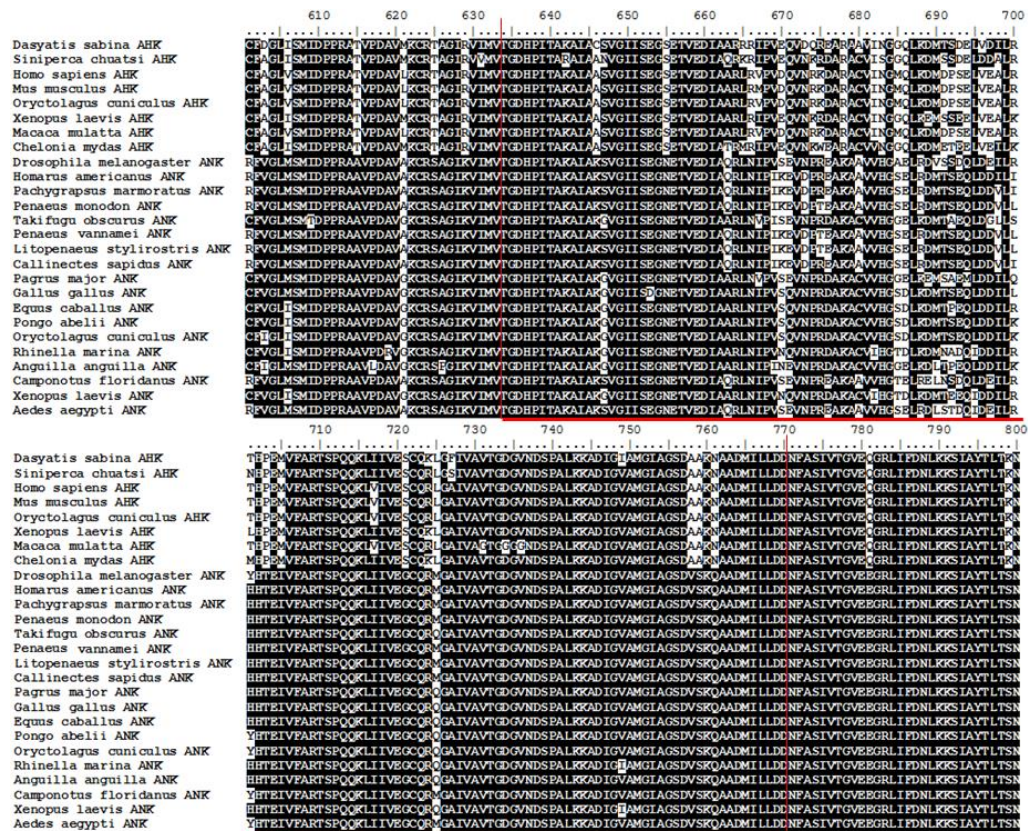


Figura 7. Alineamiento de la ANK y la AHK indicando la zona teórica del epítipo (entre líneas rojas) del anticuerpo monoclonal AntiANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (615-750 aa) (información otorgada por los fabricantes). Se incluyen 18 secuencias (vertebrados e invertebrados) de la ATPasa de Na^+/K^+ $\alpha 1$ (ANK $\alpha 1$) y ocho secuencias (vertebrados) de la ATPasa de H^+/K^+ $\alpha 1$ (AHK $\alpha 1$). El negro enmarca aminoácidos similares al 100% entre especies, el blanco las diferencias. Las secuencias fueron alineadas con el software Geneious (ver. 8.0.5, método Geneious). Los números de acceso de las secuencias utilizadas para este análisis se incluyen en la Tabla 3.

El análisis de secuencias completas demuestra que la secuencia de la ANK es muy similar a la AHK (60% promedio; Tabla 5) en especies como *P. vannamei* y *D. sabina*. Por otra parte, en la zona del epítipo el porcentaje de similitud máximo entre la ANK y la AHK es de 80.88% y el porcentaje de similitud menor fue de 71.32% (Tabla 6). El mayor porcentaje de similitud entre las ANK analizadas es del 100% y el menor es del 84.56%, al comparar las AHK ocurre algo similar, obteniendo similitudes máximas de 100% y mínimas de 83.88%.

Tabla 5. Similitudes, máximas (+) y mínimas (-), encontradas al comparar secuencias completas de la ANK y la AHK (extracto de matriz generada por el software de análisis).

Proteínas comparadas	Especies	% de similitud	Similitud en número de aminoácidos
ANK vs. ANK	<i>L. stylirostris</i> <i>P. vannamei</i>	99.85% +	672/673
	<i>R. marina</i> <i>P. Monodon</i>	72.59% -	774/1055
AHK vs. AHK	<i>H. sapiens</i> <i>M. mulatta</i>	99.42% +	1029/1035
	<i>M. mulatta</i> <i>D. sabina</i>	80.49% -	825/1025
ANK vs. AHK	<i>P. vannamei</i> (ANK) <i>D. sabina</i> (AHK)	64.99% +	438/674
	<i>H. americanus</i> (ANK) <i>M. musculus</i> (AHK)	58.26% -	603/1038

ANK, ATPasa Na⁺/K⁺; AHK, ATPasa H⁺/K⁺

Tabla 6. Similitudes, máximas (+) y mínimas (-), encontradas al comparar secuencias de la ANK y la AHK en la zona del epítipo.

Proteínas comparadas	Especies	% de similitud	Similitud en número de aminoácidos
ANK vs. ANK	<i>H. sapiens</i> <i>O. cuniculus</i> <i>P. abelii</i>	100% +	136 /136
	<i>P. monodon</i> <i>L. stylirostris</i> <i>P. vannamei</i>	100% +	136 /136
	<i>R. marina</i> <i>P. monodon</i>	84.56% -	115/136
	<i>R. marina</i> <i>L. stylirostris</i>	84.56% -	115/136
	<i>R. marina</i>	84.56% -	115/136

	<i>P. vannamei</i>		
AHK vs. AHK	<i>H. sapiens</i> <i>O. cuniculus</i>	100% +	136 /136
	<i>M. mulatta</i> <i>D. sabina</i>	83.88% -	114/136
ANK vs. AHK	<i>O. cuniculus</i> (ANK) <i>R. marina</i> (AHK)	80.88% +	110/136
	<i>P. abelii</i> (ANK) <i>R. marina</i> (AHK)	80.88% +	110/136
	<i>P. monodon</i> (ANK) <i>H. sapiens</i> (AHK)	71.32% -	103/136
	<i>L. stylirostris</i> (ANK) <i>H. sapiens</i> (AHK)	71.32% -	103/136
	<i>P. vannamei</i> (ANK) <i>H. sapiens</i> (AHK)	71.32% -	103/136

ANK, ATPasa Na⁺/K⁺; AHK, ATPasa H⁺/K⁺

Así mismo, por medio de los perfiles de hidrofobicidad (Figs. 8 y 9) se pueden observar las similitudes y diferencias en la topología de ambas proteínas. Además, se puede establecer que el epítipo del Ac $\alpha 5$ se localiza en el bucle intramembranal 4 (Fig. 8).

En el árbol filogenético (Fig. 10) pueden observarse dos clados principales; uno agrupa a la ANK $\alpha 1$ y otro a la AHK $\alpha 1$. En el clado de la ANK $\alpha 1$ los vertebrados e invertebrados están separados en dos grupos distintos. El grupo de los invertebrados tiene su raíz con la secuencia de la ANK de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*, **AAC05260**) y el grupo de los vertebrados tiene como raíz la ANK del pez plano *Pseudopleuronectes americanus* (**ABG88081**). *P. vannamei* (**ADM87522**; flecha negra) se posiciona en el grupo de los invertebrados teniendo a *L. stylirostris* (**AEX07319**) y *P. monodon* (**ACQ99366**) como las especies con mayor relación filogenética. Por su parte, el clado de las AHK $\alpha 1$ tiene su raíz con el pato *Anas platyrhynchos* (**EOA98548**).

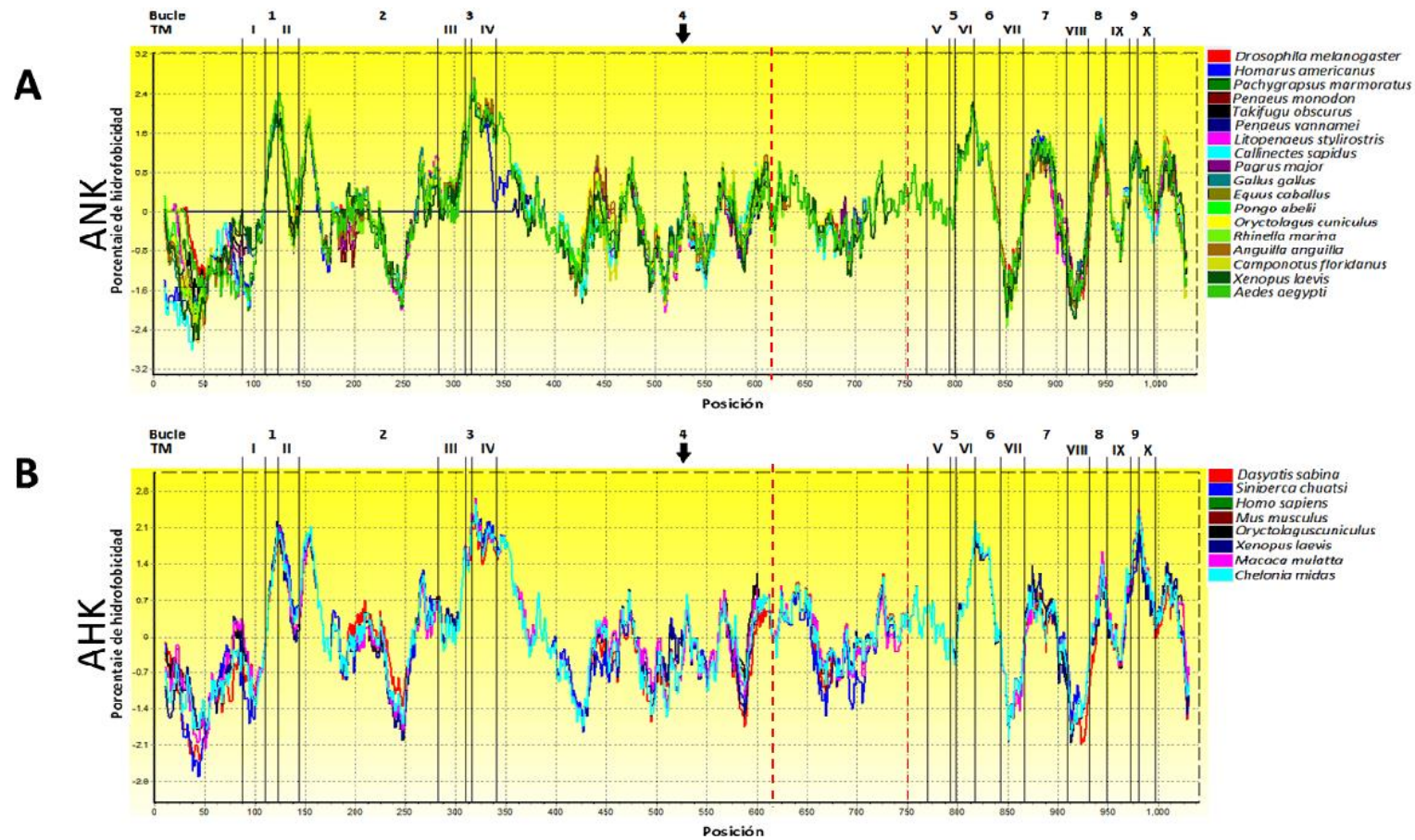


Figura 8. Perfiles de hidrofobicidad de las ATPasas ANK y AHK. A) ATPasa de Na^+/K^+ $\alpha 1$ (ANK $\alpha 1$) y B) ATPasa de H^+/K^+ (AHK $\alpha 1$). Este análisis proporciona una predicción de los dominios transmembranales (TM) y los bucles de conexión intramembranales (bucle 2, 4, 6 y 8) y extramembranales (1, 3, 5, 7 y 9). Entre las flechas se indica la posible posición de la secuencia que reconoce el anticuerpo Ac $\alpha 5$. Los números de acceso de secuencias usadas en el análisis son los mismos que los utilizados en la Figura 1. Los perfiles se elaboraron con el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) en el programa Bioedit con tamaño de ventana 20. Las zonas transmembranales (TM I-X) y los bucles (1-9) se determinaron tomando en consideración la topología de membrana propuesta por Blanco y Mercer (1998).

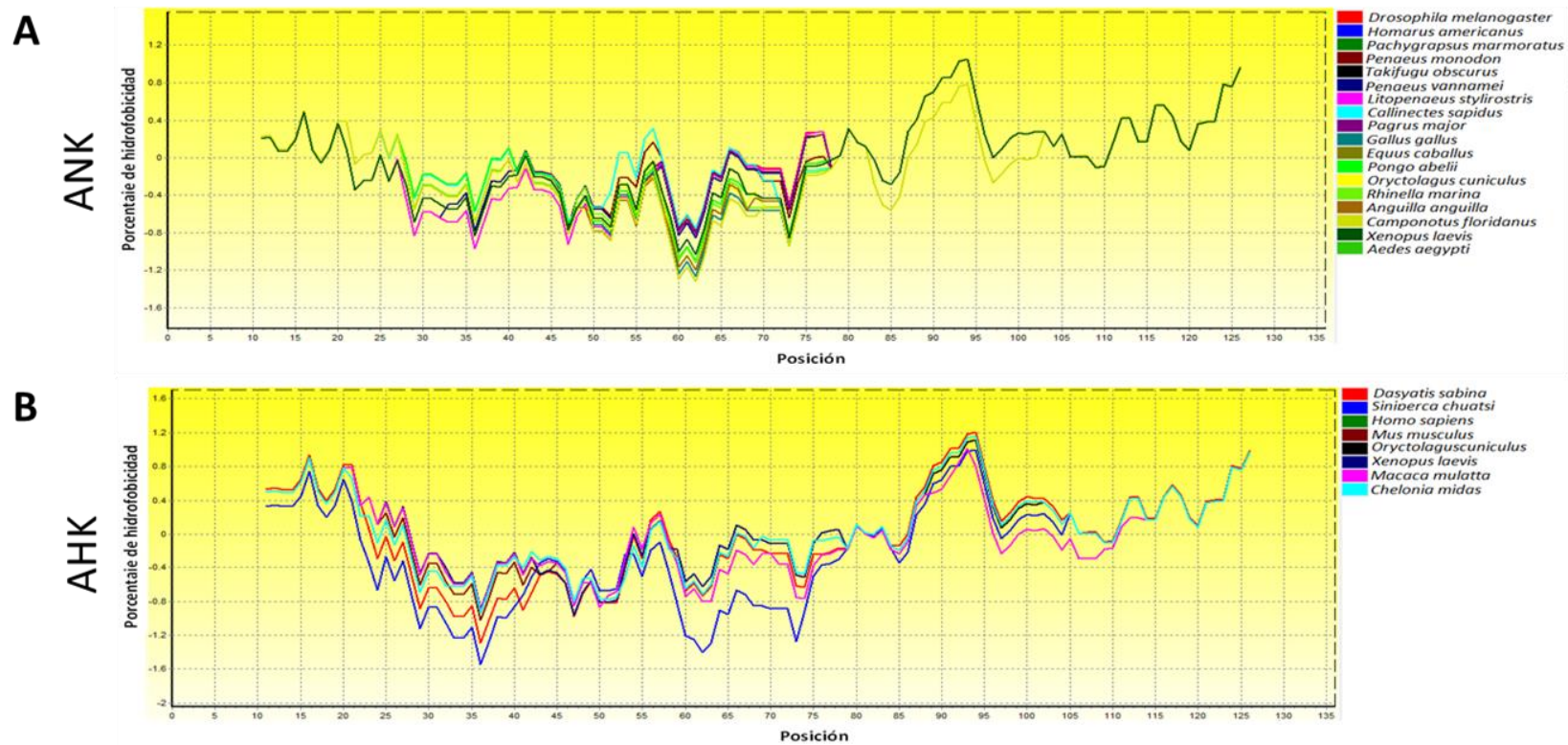


Figura 9. Perfil de hidrofobicidad ampliado de la pos.615-750 de la ANK de *Gallus gallus*. A) ANK $\alpha 1$, B) AHK $\alpha 1$. Las secuencias y los números de acceso son los mismos que los utilizados en la Figura 1. Los perfiles se elaboraron con el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) en el programa Bioedit con tamaño de ventana 2.

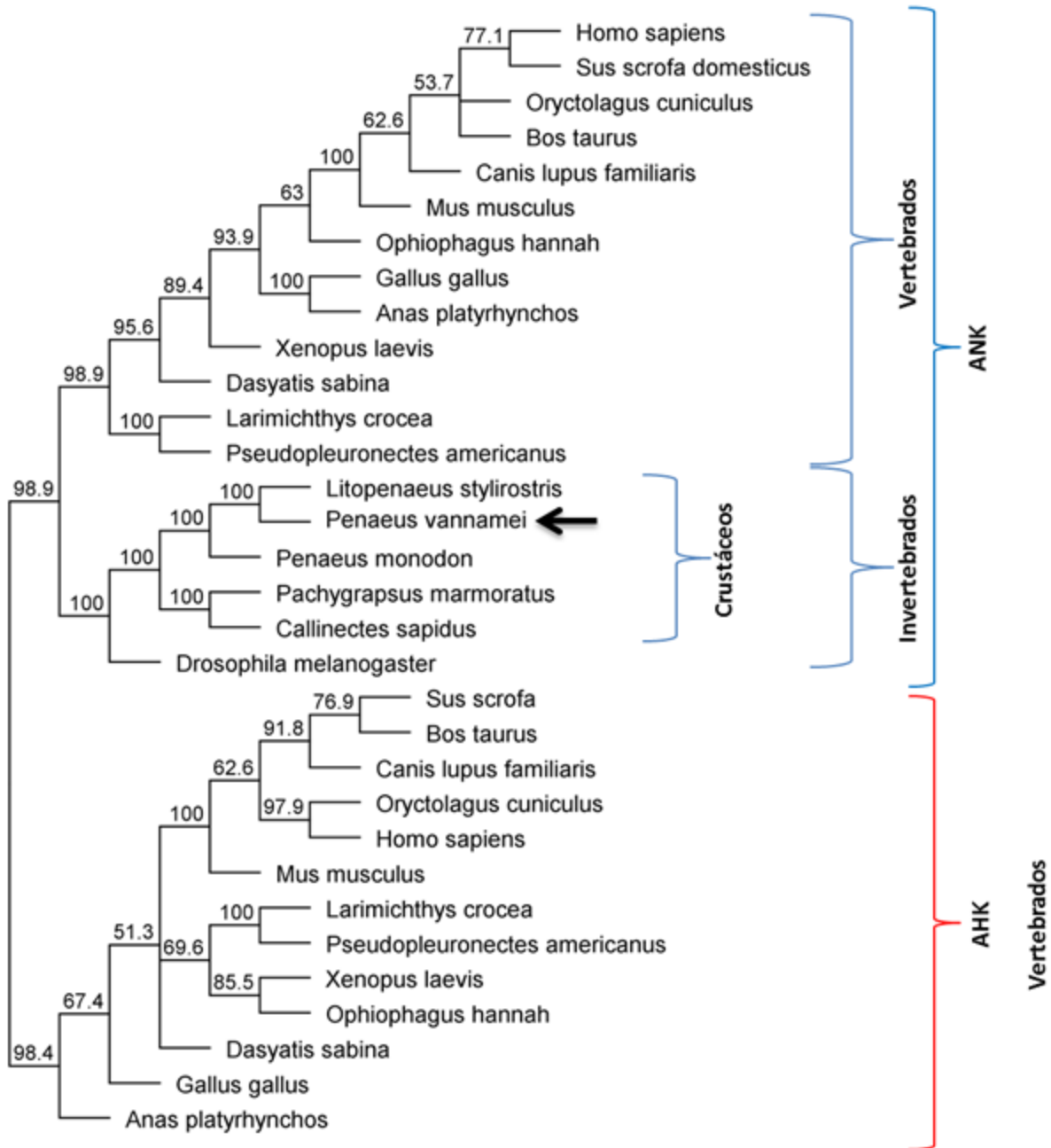


Figura 10. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la ANK $\alpha 1$ y de la AHK $\alpha 1$ de organismos de diversos taxa. El árbol fue construido con la herramienta *Geneious tree building* (software Geneious, versión 8.0.5) usando el método UPGMA. La flecha indica la posición de *P. vannamei*. Los números sobre las ramas indican el valor en % de bootstrap (después de 1000 repeticiones). Los números de acceso de las secuencias utilizadas para este análisis se incluyen en la Tabla 4.

7.1.2. Inmunolocalización de la ANK utilizando los anticuerpos $\alpha 5$ y 1211/1212

No se observó inmunomarcaje evidente ni diferencias entre los controles negativo y positivo (Fig. 11A y B respectivamente) en ninguno de los ensayos realizados por IFI con el ACI 1211/1212 en branquias y branquiosteguito de *P. vannamei*. Sin embargo, al utilizar el ACI $\alpha 5$ se observa un inmunomarcaje positivo muy evidente en la membrana basal de las células epiteliales del branquiosteguito de *P. vannamei* (Fig. 11D), además hay una clara diferencia entre el control negativo y el control positivo (Fig. 11C y D respectivamente).

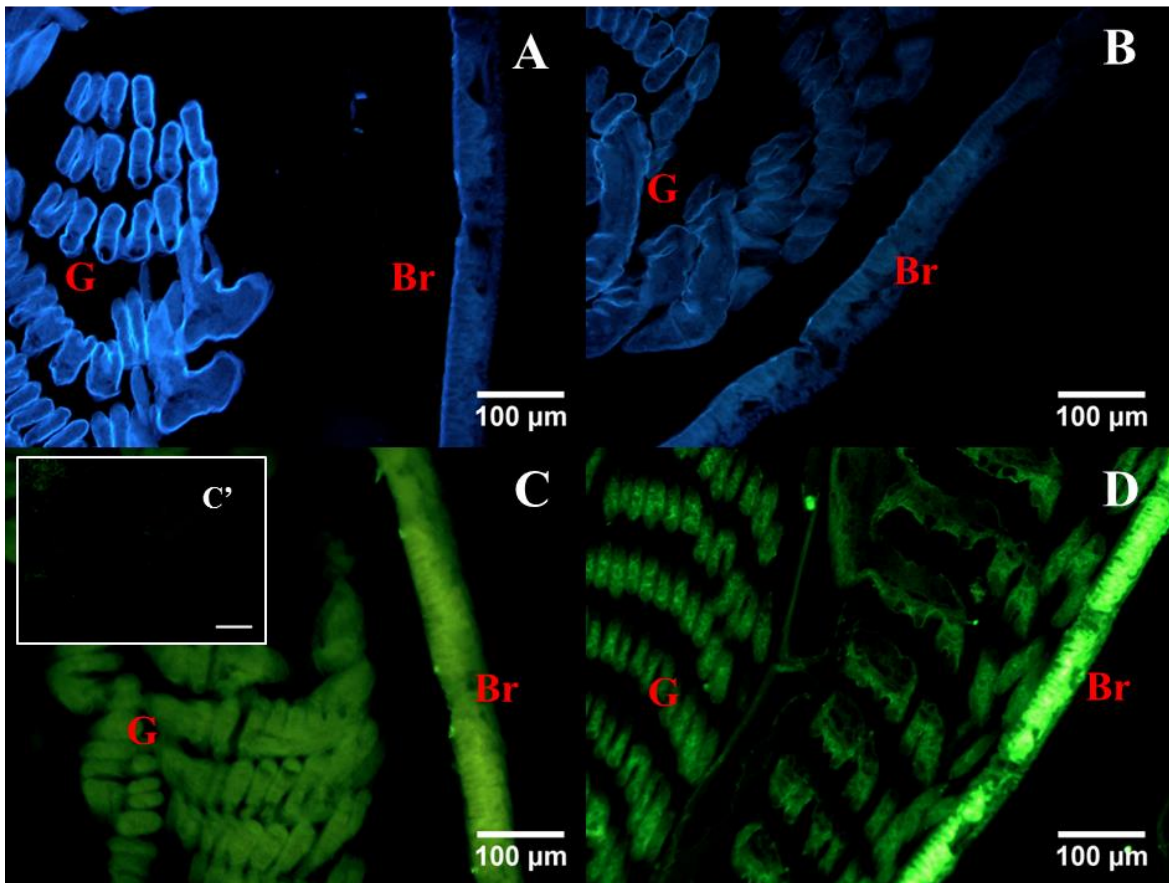


Figura 11. Localización celular de la ANK en branquiosteguito de *P. vannamei*. A, control negativo que incluye el ACII anti IgG (H+L) CFL405. B, marcaje que incluye ACI 1211/1212 y el ACII anti IgG (H+L) CFL405. C, control negativo que incluye el ACII Alexa fluor 488. D, marcaje que incluye el ACI $\alpha 5$ y el ACII Alexa fluor 488. La felcha indica la fluorescencia positiva, es decir la localización de la ANK. ANK, ATPasa Na^+/K^+ . Br, branquiosteguito. ACI [15 $\mu\text{g}/\text{mL}$], ACII [30 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. G, branquia. A, B, C' y D tiempo de exposición 200 ms; C tiempo de exposición de 800 ms. Escala 100 μm .

7.1.3. Western blot

El gel de proteínas teñido con azul Coomassie reveló la presencia de bandas de interés con un tamaño esperado de aproximadamente 100 kDa, el cual corresponde al peso molecular de la ANK (Fig. 12A). El inmunomarcaje con el Ac $\alpha 5$ revela bandas nítidas en las extracciones proteicas correspondientes a la glándula antenal, epipodito y branquiosteguito (Fig. 12B), de acuerdo con la escalera de peso molecular estas bandas tienen un tamaño muy cercano a los 100 kDa lo cual corresponde con el tamaño esperado de la ANK. En control negativo (Fig. 12C) no hubo inmunomarcaje positivo.

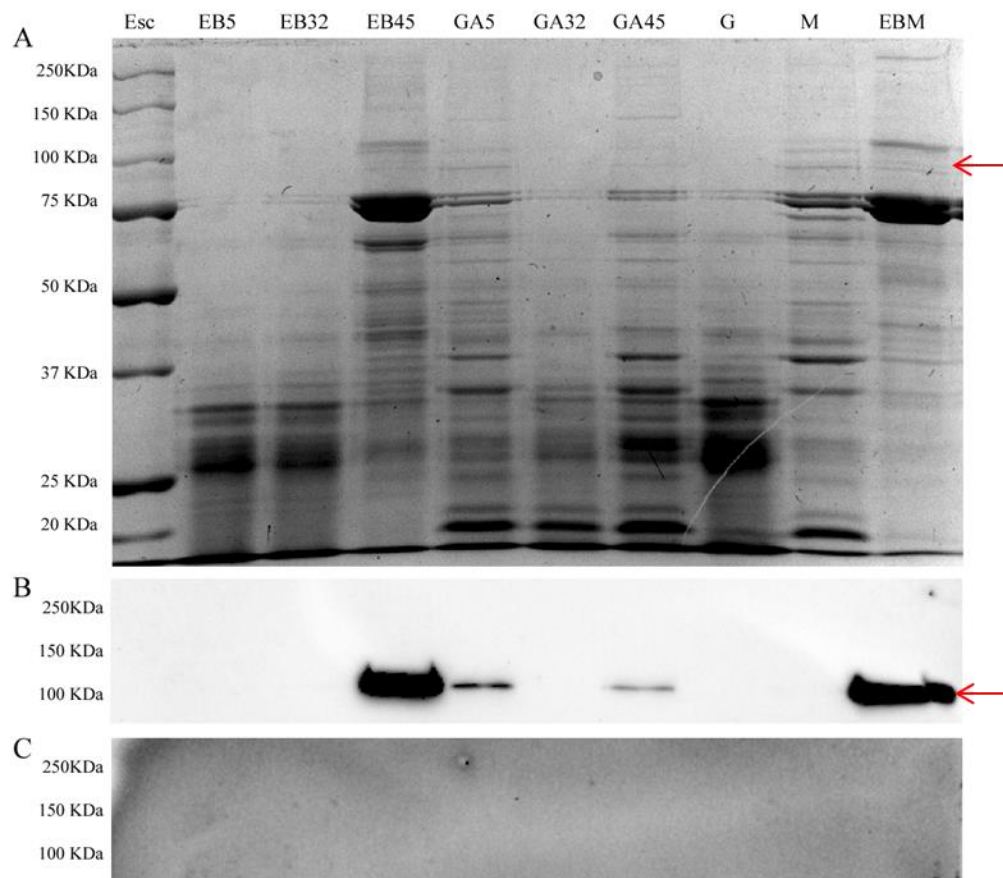


Figura 12. Expresión proteica de la ATPasa de Na^+/K^+ en *P. vannamei* expuesto a 5, 32 y 45 UPS. A, tinción de las proteínas con azul coomassie; B, WB inmunomarcaje positivo, se incluyeron los anticuerpos Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* y AcII-HRP; C, WB control negativo sin Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*, pero con AcII-HRP. EB, mezcla de epipoditos y branquiosteguitos; G, branquia; GA, glándula antenal; M, músculo. Los números enseguida de las letras indican la salinidad a la que los camarones estuvieron expuestos durante 48h (n=2). EBM epipoditos y branquiosteguitos de organismos mantenidos en agua de mar por más de 21 días. La flecha señala a las bandas que pesan aproximadamente 100 kDa. WB, Western blot revelado con el sustrato ECL (Thermo Scientific™).

7.2. Topología de la GA

La glándula antenal de *P. vannamei* se encuentra a lo largo del cefalotórax anterior. Se compone por el celomosaco, los túbulos de la GA o laberinto y la vejiga (Fig. 13).

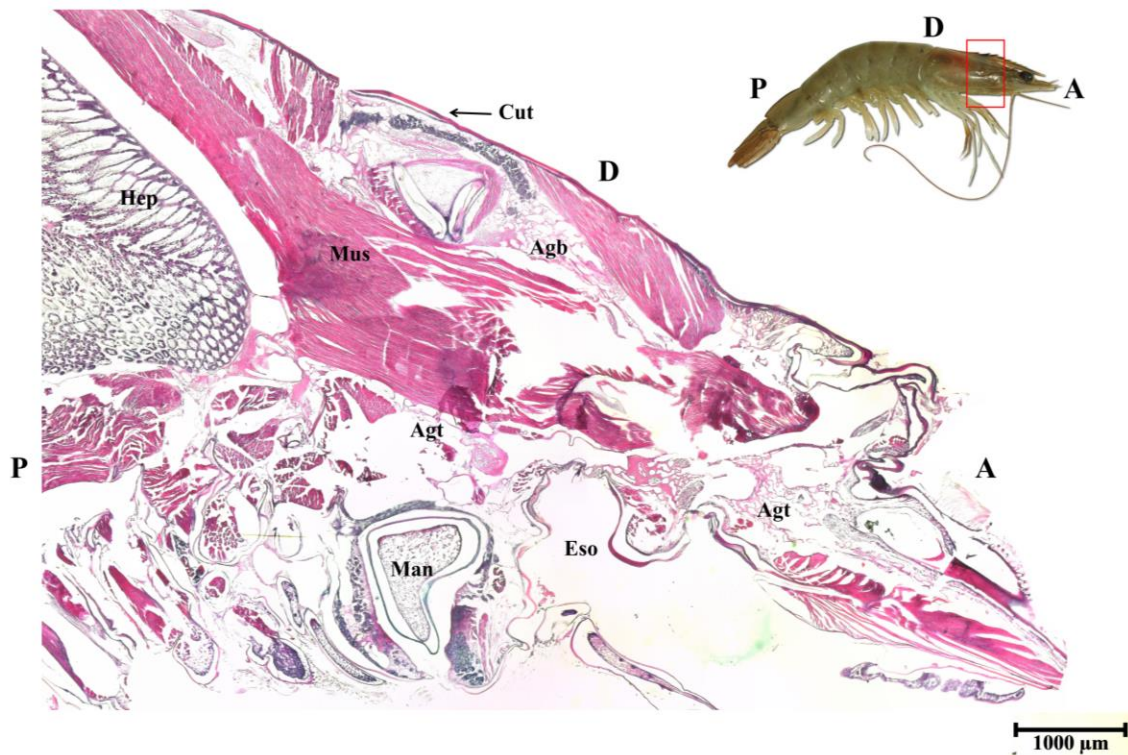


Figura 13. Glándula antenal de juvenil de *P. vannamei*. Vista longitudinal de la región cefalotorácica (región enmarcada en cuadro rojo). Agb, vejiga de la GA; Agt, túbulos del laberinto de la GA; Cut, cutícula; Eso, Esófago; Hep, hepatopáncreas; Man, mandíbula; Mus, músculo. A, región anterior; D, región dorsal; P, región posterior. Sección de parafina de 4 µm, tinción H-E, escala 1000 µm.

En la Figura 14 se observa como los túbulos del laberinto (Agt) y el celomosaco (Sc) se encuentran íntimamente yuxtapuestos formando el complejo laberinto/celomosaco (Lcc). Interesantemente es posible apreciar diferencias en la coloración de cada sección al realizar la tinción H-E, lo que sugiere que ambas secciones tiene epitelios característicos y el lumen del celomosaco tiende a ser más irregular que el lumen del laberinto (Fig. 15).

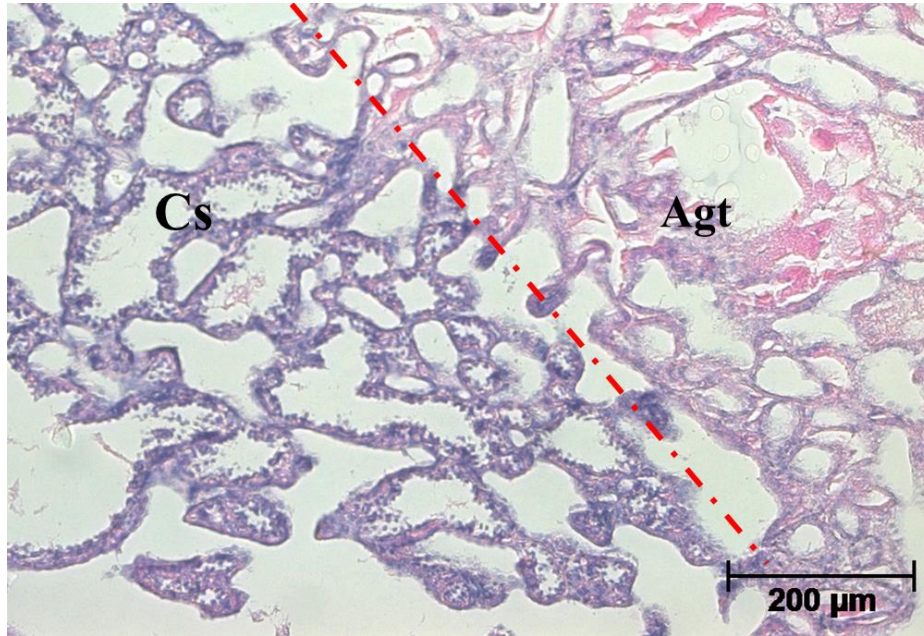


Figura 14. Vista longitudinal del complejo laberinto/celomosaco (Lcc) de la glándula antenal de *P.vannamei*. Cs, celomosaco; Agt, túbulos del laberinto de la GA; Epcs, epitelio del celomosaco; Epl, epitelio del laberinto; Sin, seno hemal. La línea punteada indica el límite entre las dos secciones. Sección de parafina de 4 μm , tinción H-E, escala 200 μm .

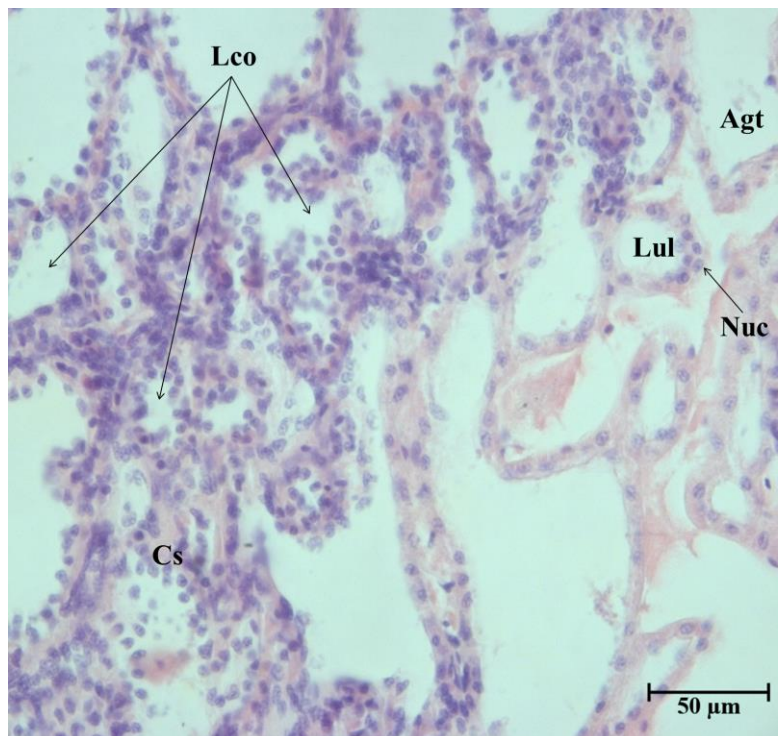


Figura 15. Vista longitudinal magnificada del complejo laberinto/celomosaco (Lcc) de la glándula antenal de *P.vannamei*. Cs, celomosaco; Agt, túbulos del laberinto de la GA; Luc, lumen del celomosaco; Lul, lumen del laberinto; Nuc, núcleo. Sección de parafina de 4 μm , tinción H-E, escala 50 μm .

El epitelio del celomosaco está formado por células muy similares a los podocitos de las branquias de invertebrados y a los podocitos de las nefronas glomerulares de los vertebrados (Bell y Lightner, 1988), los podocitos se localizan cercanos al lumen y tienen núcleos eosinofílicos (Fig. 16A). Las células epiteliales del laberinto de la GA son típicamente cuboideas, con un núcleo medial y un nucléolo bien definido (Fig. 16B).

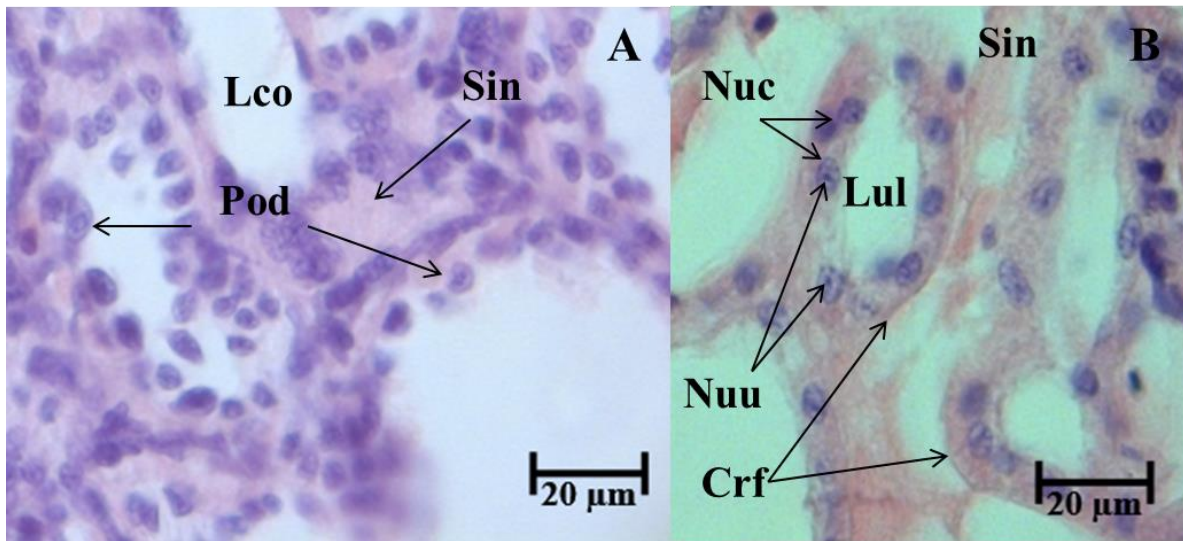


Figura 16. Vista longitudinal magnificada del celomosaco y del laberinto de la glándula antenal de *P. vannamei*. A, epitelio del celomosaco (Epcs) de la glándula antenal de *P. vannamei*. B, laberinto de la glándula antenal. Lco, lumen del celomosaco; Pod, podocito; Lul, lumen del laberinto; Nuc, núcleo; Nuu, nucléolo; Cnf, tejido conjuntivo fibroso; Crf, fibras de colágeno y reticulina; Sin, seno de hemolinfa. Sección de parafina de 4 µm, tinción H-E, escala 20 µm.

En la región anterior del cefalotórax, cercana a la superficie dorsal, se localiza la vejiga de la GA (Agb) (Fig. 13). Es multilobulada y se observa claramente que posee un epitelio cúbico, muy similar al del laberinto de la GA que se localiza sobre una capa de tejido conectivo fibroso (Cnf) (Fig. 17). Aunque el epitelio de la vejiga es predominantemente cúbico comúnmente se encuentran cambios en el epitelio de esta sección, por ejemplo, se puede encontrar epitelio plano o capas de células de no más de dos capas (Fig. 17B). Alrededor del epitelio de la vejiga se observaron hemocitos (Hem) en los senos de hemolinfa (Sen).

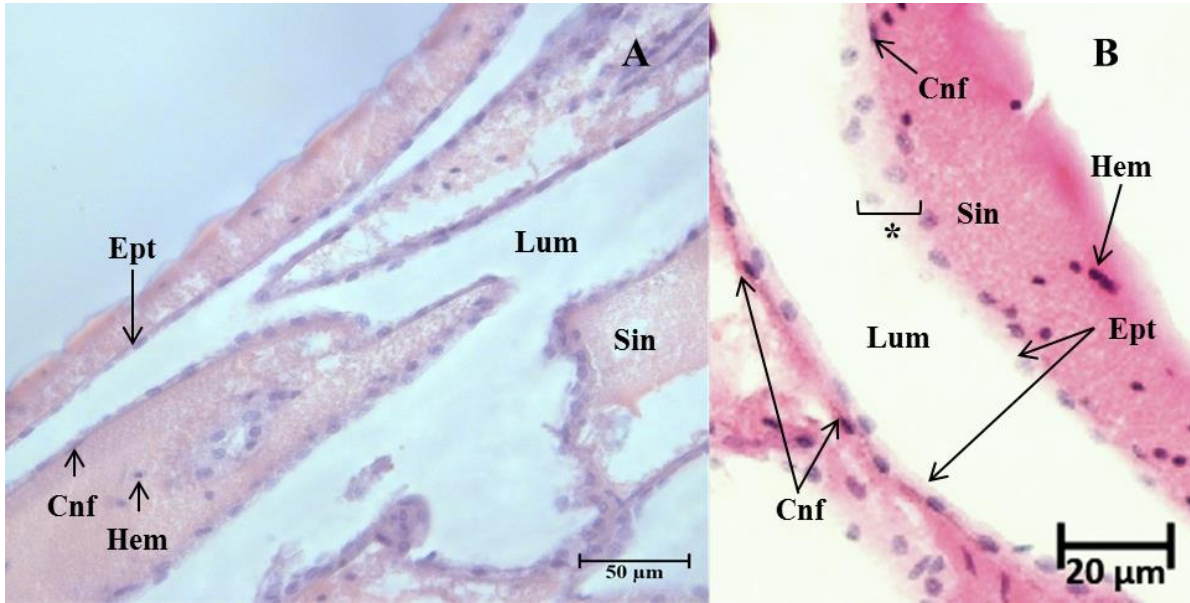


Figura 17. Vista longitudinal de la Vejiga (Agb) de la glándula antenal de *P. vannamei*. A, vista general de la vejiga de la GA. B, acercamiento a la vejiga de la GA. Ept, epitelio; Lum, lumen; Sin, seno de hemolinfa; Hem, hemocito; Cnf, tejido conectivo fibroso. El asterisco indica la presencia de una cama de dos capas de células. Sección de parafina de 4 µm, tinción H-E, escala 50 µm.

Tomando en cuenta las características estructurales observadas mediante el análisis histológico, se propone un esquema donde se representa la morfología de la GA de *P. vannamei* (Fig. 18). Las proporciones de cada sección también se representan en esta figura, pues el celomosaco es la región más pequeña y la vejiga es la sección más voluminosa.

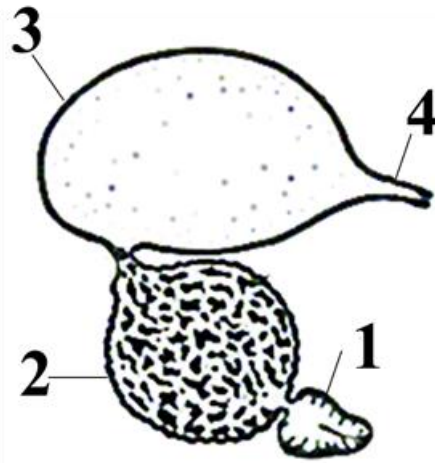


Figura 18. Morfología propuesta de la glándula antenal de *P. vannamei*. 1, celomosaco; 2, laberinto; 3, vejiga y 4, nefridioporo. Adaptado para esta especie a partir de observaciones histológicas y del esquema de *Astacus* sp., propuesto por Marchal, 1892.

Al analizar la GA de juveniles expuestos a las salinidades prueba (5, 32 y 45 UPS), por medio de microscopia óptica, no se encontraron cambios morfológicos evidentes en las distintas secciones de la GA. El ancho del lumen de los túbulos del laberinto de la GA de juveniles (Fig. 19) no presenta diferencias significativas atribuibles a la salinidad a pesar de que en promedio son más anchos en alta salinidad.

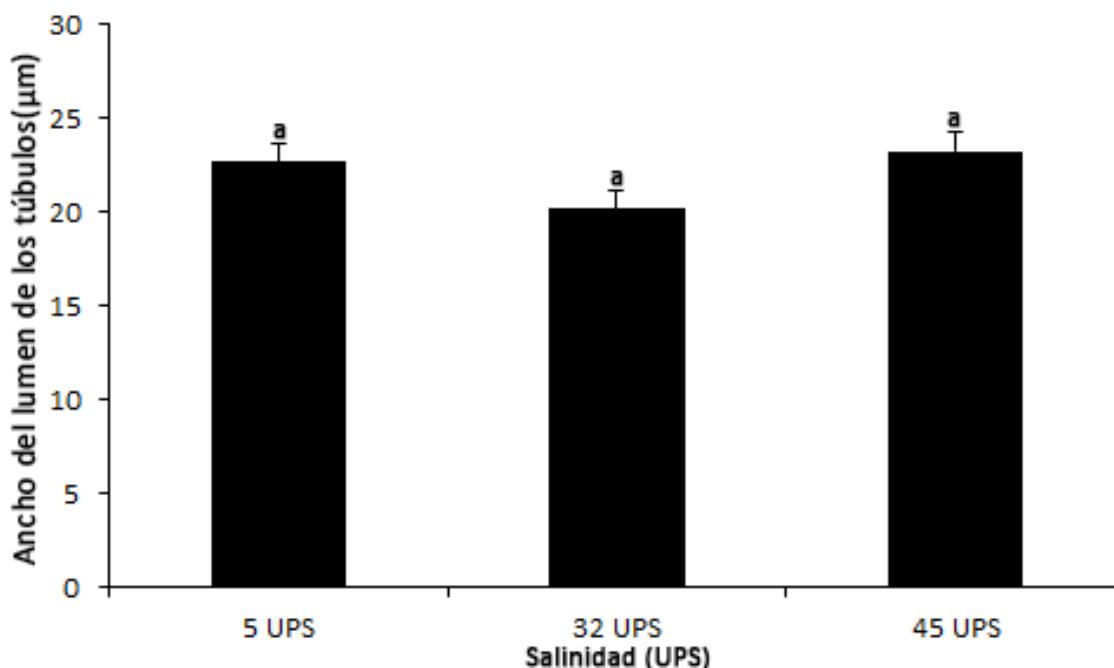


Figura 19. Medición del ancho de los túbulos de la glándula antenal de juveniles de *P. vannamei* expuestos a diferentes salinidades (5, 32 y 45 UPS). Los valores fueron determinados midiendo el ancho de los túbulos utilizando el software ImageJ. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($n=2$, $\alpha=0.05$).

7.3. Localización celular y abundancia de la ANK en la GA

Se observó un inmunomarcage positivo de la ANK en la GA en las dos etapas y salinidades evaluadas (Fig. 20). La ANK se localiza en el epitelio basal de la GA tanto en PL15 como en juveniles (Fig. 21). En juveniles la ANK se localizó en las tres secciones de la GA (celomosaco, laberinto y vejiga). Sin embargo, el nivel de expresión de la ANK no es uniforme entre estas secciones (Fig. 23). El inmunomarcage de la ANK fue mayor en el epitelio del laberinto de la GA (Fig. 22C), seguido por la vejiga (Fig. 22D) mientras que la sección que presentó menor intensidad fue el celomosaco (Fig. 22C).

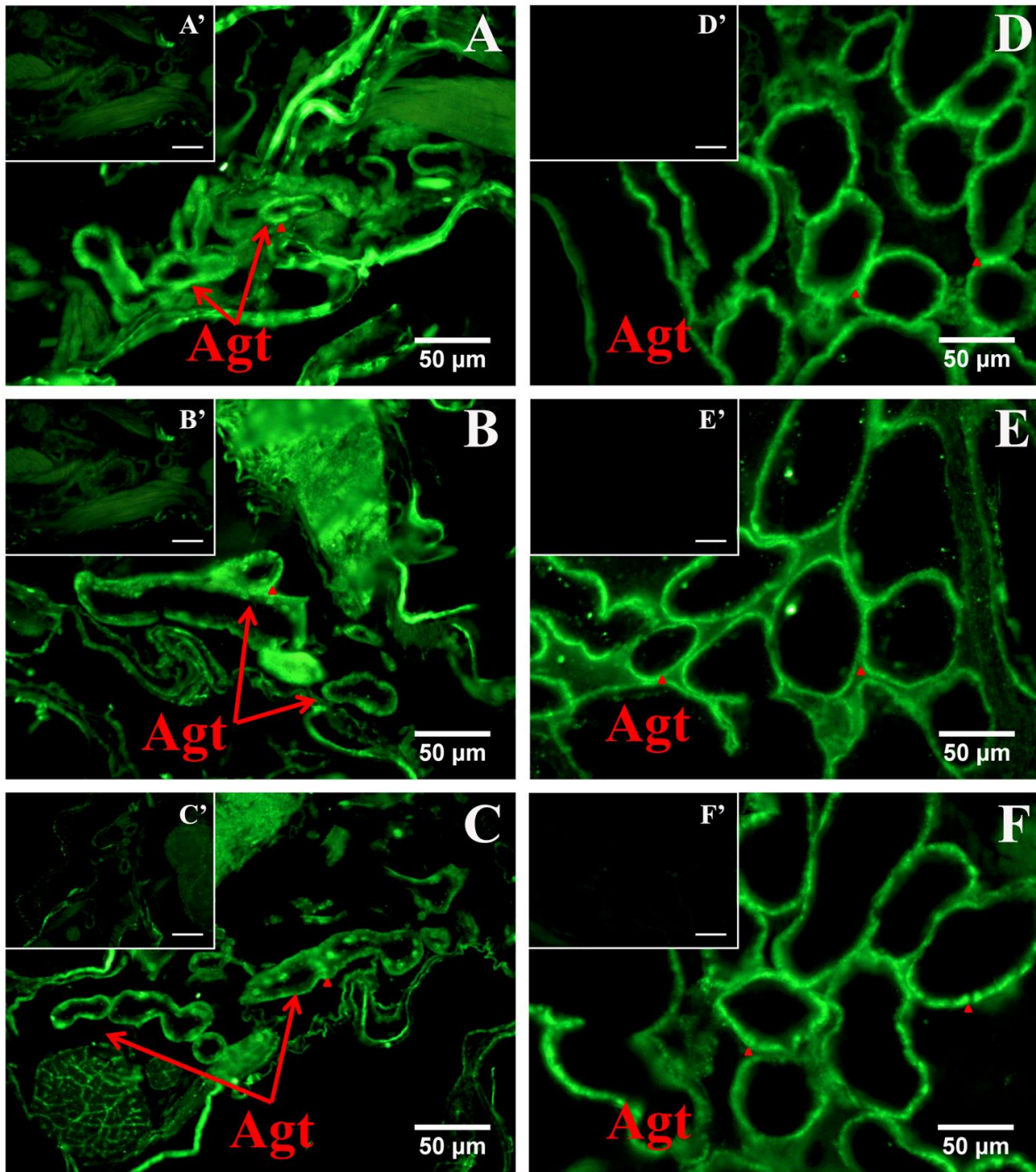


Figura 20. Localización celular de la ANK en la glándula antenal de *P. vannamei* expuestos a 5, 32 y 45 UPS. Localización celular de la NKA (ACI $\alpha 5$) en A-C, PL15 y D-F, juvenil de *P. vannamei* expuestos a diferentes salinidades A y D, 5 UPS; A y E, 32 UPS; C y F, 45 UPS. A'-E' son controles negativos correspondientes a cada tratamiento. Agt, túbulos de la glándula antenal. El triángulo indica fluorescencia (ANK). Tiempo de exposición de 200 ms. Escala 50 μm .

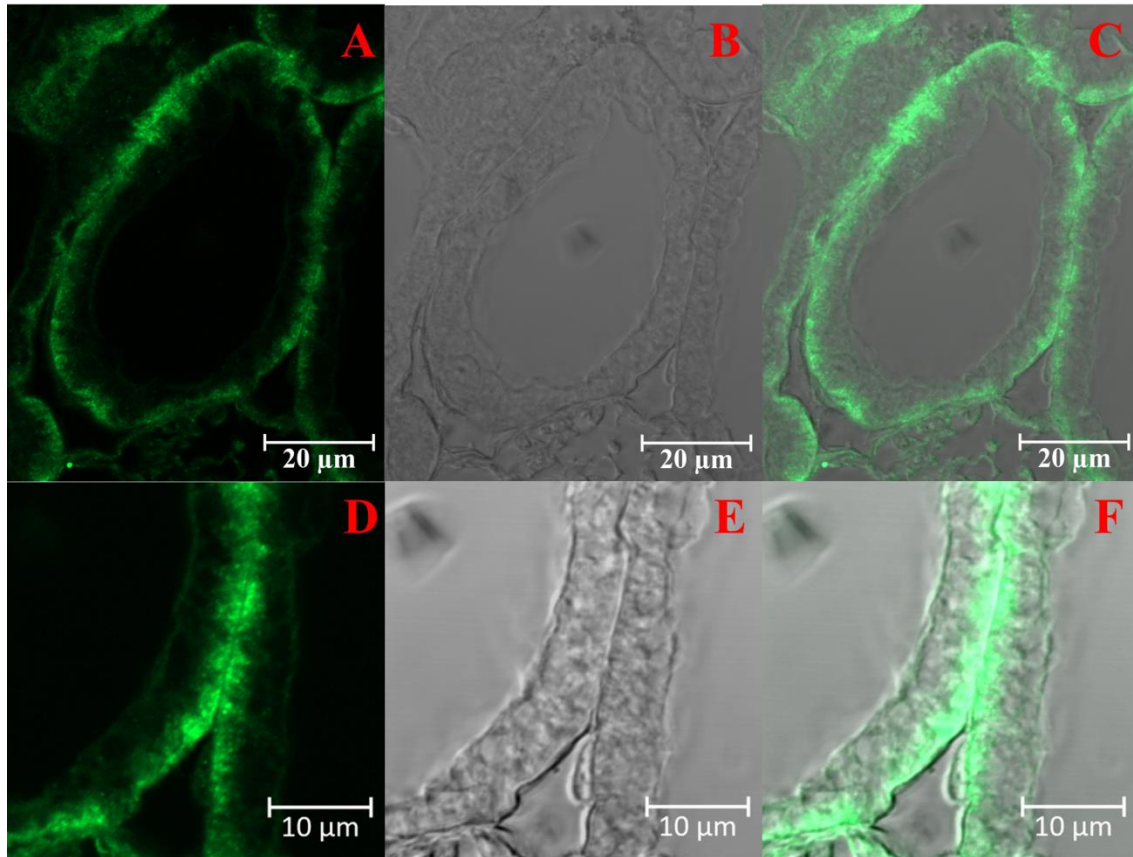


Figura 21. Immunolocalización baso-lateral de la ANK en la glándula antenal de juvenil de *P. vannamei* expuesto a 5 UPS. A y D, imágenes con fluorescencia. B y E, imágenes de contraste de fase correspondientes. C y F; imágenes combinando fluorescencia y contraste de fases. A; B; C, escala 20 μm . D; E; F. escala 10 μm . Imágenes capturadas utilizando Microscopio Confocal LSM 800 con Airyscan de Carl Zeiss (Pinhole, 36 μm , longitud de onda del láser 488 nm e intensidad de láser 0.20%).

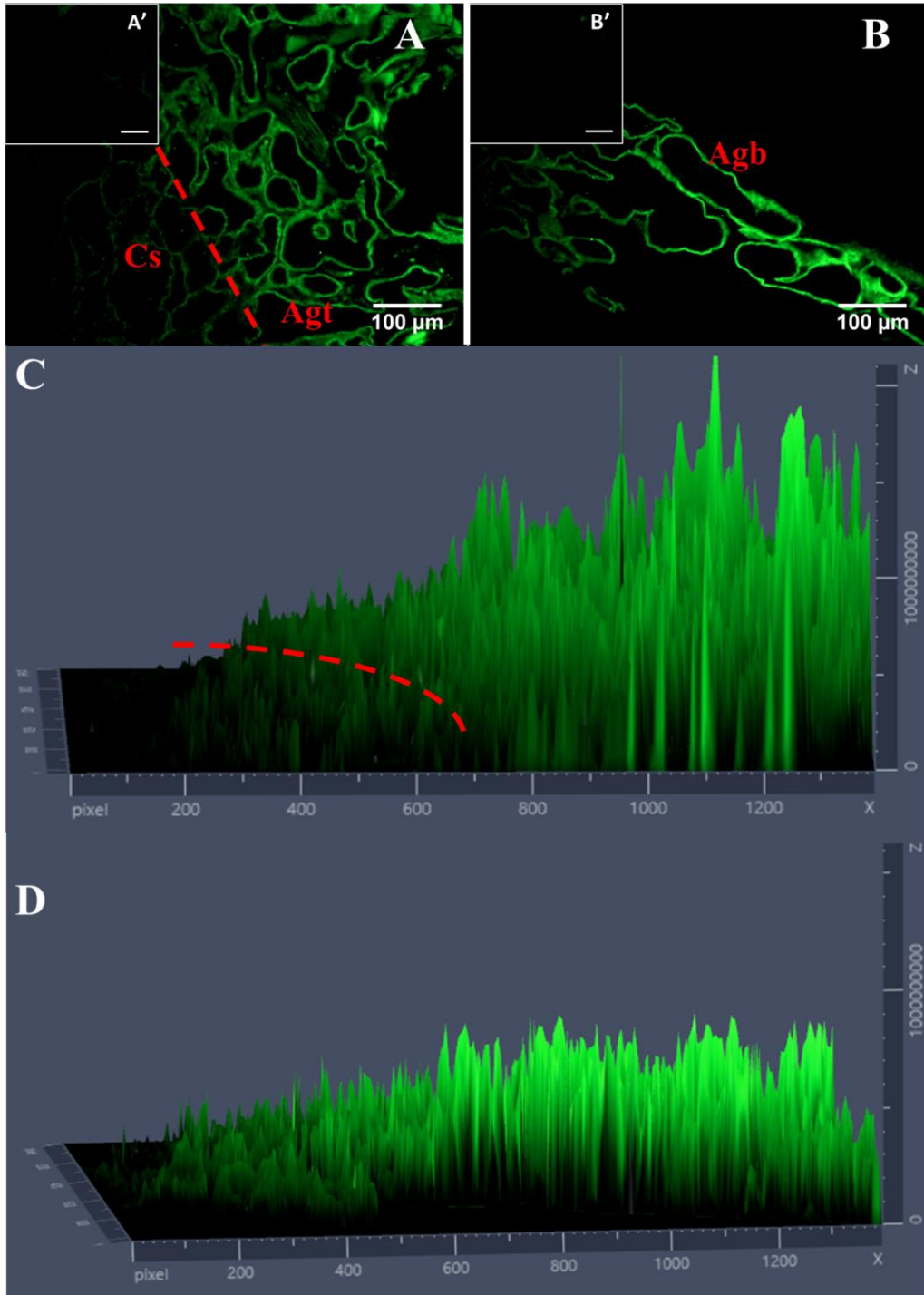


Figura 22. Localización celular de la ANK en las tres secciones de la glándula antenal de juvenil de *P. vannamei* expuesto a 45 UPS. A, complejo laberinto/celomosaco (Lcc). B, vejiga. A' y B' corresponden a los controles negativos. Cs, celomosaco; Agt, túbulos del laberinto; Agb, Vejiga. La línea punteada indica el límite entre las dos secciones. Escala 100 µm. C, intensidad de fluorescencia en el complejo laberinto/celomosaco (eje z). D, intensidad de fluorescencia en la vejiga (eje z). Las gráficas se obtuvieron con el software Zen 2.3 Blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

Se cuantificó la expresión de la ANK en las dos etapas y en las tres salinidades evaluadas (Figs. 21 y 23). En la etapa PL15 la expresión de la ANK a 5 UPS fue 119.26% mayor que a 32 UPS y 50.16% mayor que a 40 UPS (Fig. 23A). En los juveniles la expresión a 5 UPS fue 14.51% mayor que a 32 UPS y 35% mayor que a 45 UPS (Fig. 23B).

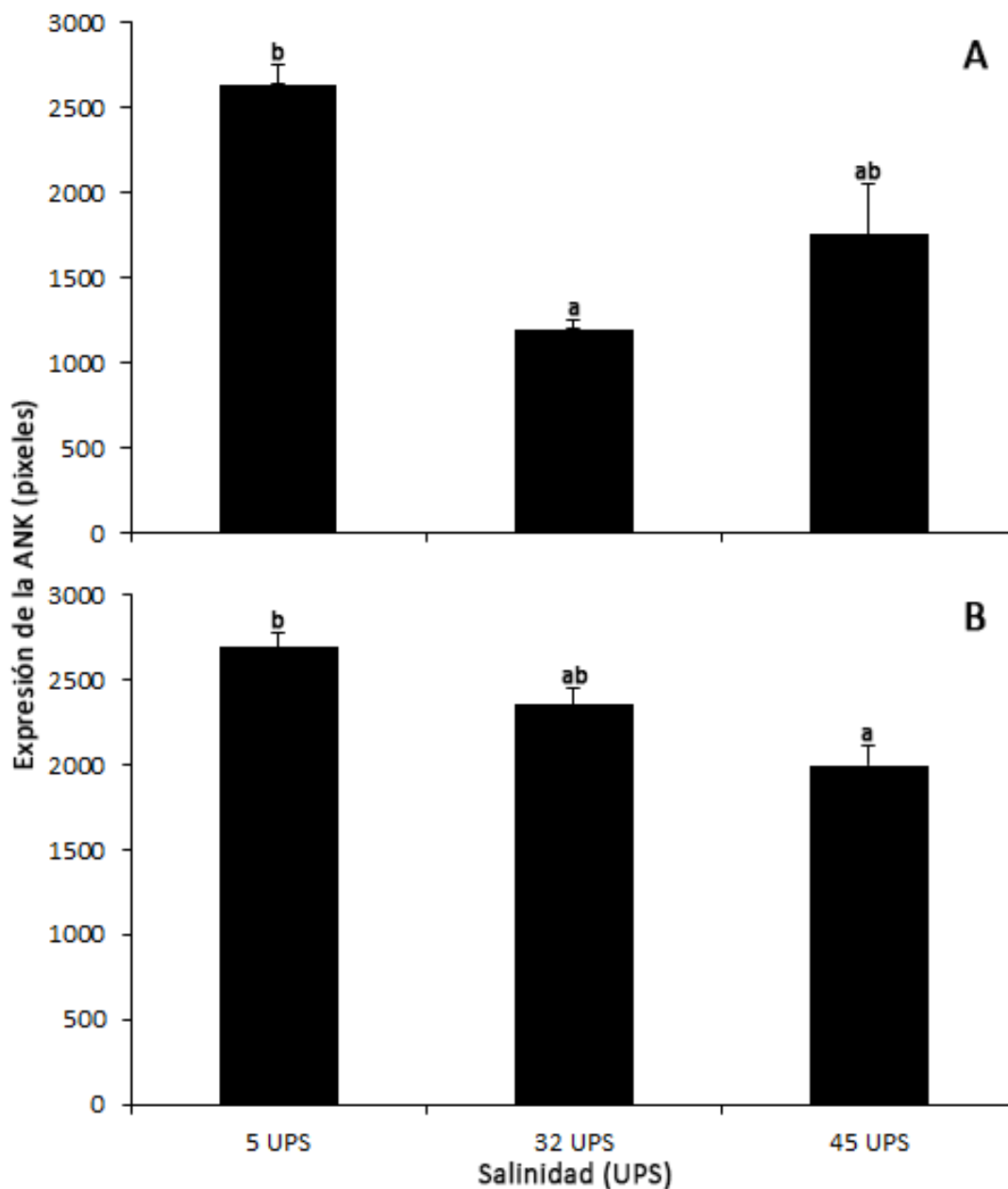


Figura 23. Expresión de la ANK en glándula antenal de *P. vannamei* en diferentes salinidades (5, 32 y 45 UPS). Los valores fueron determinados mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia utilizando el software ImageJ. A, juveniles y B, PL15. Letras diferentes muestran diferencias significativas (n=2, $\alpha=0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1. Especificidad del anticuerpo primario $\alpha 5$

El análisis de secuencias completas demuestra que la secuencia de la ANK es altamente conservada entre especies (80% promedio) y muy similar a la AHK (60 % promedio). En contraste, al analizar la zona del epítipo, resalta el hecho de que el porcentaje de similitud máximo encontrado al comparar ANK contra AHK (80.88%) es menor que los porcentajes mínimos obtenidos al comparar ANK contra ANK (84.56%) y AHK contra AHK (83.88%). Lo cual significa que la secuencia de la zona del epítipo no está altamente conservada entre estas dos proteínas, pero sí está altamente conservada entre secuencias de una misma proteína (se obtuvieron resultados hasta del 100%), esto explica que el Ac $\alpha 5$ tenga una reactividad positiva en diversas especies de aves, mamíferos, ranas, insectos y crustáceos (hoja de datos del anticuerpo, DSHB). Por otra parte, de acuerdo con los perfiles de hidrofobicidad generados en este estudio podemos establecer que el epítipo se localiza en el bucle intramembranal 4. Así, nuestro análisis está en conformidad con la información aportada por Lebovitz y colaboradores (1989).

Cabe destacar que al analizar los perfiles de hidrofobicidad de ambas proteínas se observa que estas tienen perfiles muy parecidos. De hecho, se sabe que los dominios transmembranales de las ATPasas de tipo P que comparten una especificidad del ion común tienden a ser altamente conservados (Crowson y Shull, 1992), no obstante, al analizar los perfiles de hidrofobicidad en la zona teórica del epítipo se pueden apreciar diferencias evidentes entre los perfiles de las dos proteínas. El análisis filogenético también revela la existencia de diferencias entre la ANK y la AHK, es decir, dos secuencias de la misma especie no se agrupan una cerca de la otra sino que se segregan en dos ramas distintas (una de cada proteína).

El hecho de que se hagan evidentes las diferencias entre ambas proteínas es importante, pues es conocido que el reconocimiento anticuerpo-epítipo es una reacción de complementariedad que se efectúa a través de múltiples enlaces, entre los aminoácidos del antígeno y los aminoácidos del epítipo. El acoplamiento estructural entre las dos macromoléculas está dado por varias fuerzas como son los puentes de hidrógeno, las

fuerzas de Van Der Waals, las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas (Bautista-Juárez, 2005). En general, las interacciones hidrofóbicas representan la mayor parte de la energía de enlace entre anticuerpo y el epítipo y en general, las fuerzas hidrofóbicas operan sobre dos superficies que son complementarias (Janeway *et al.*, 2001). Así entre más diferencias haya entre las proteínas disminuye la posibilidad de que el Ac $\alpha 5$ reconozca a la AHK.

Por otra parte, al realizar la IFI con el Ac $\alpha 5$ en tejido de branquiosteguito de *P. vannamei* se observó inmunomarcaje positivo muy evidente en la membrana basolateral de las células epiteliales. Tal como ocurre en *P. vannamei*, los estudios previos de inmunolocalización donde se ha utilizado el Ac $\alpha 5$ para marcar la ANK en diversos crustáceos como son: la langosta *H. gammarus* (Khodabandeh *et al.*, 2005b), el camarón marino *P. monodon* (Chaudhari *et al.*, 2015) la langosta *A. leptodactylus* (Khodabandeh *et al.*, 2005c; Lignot *et al.*, 2005), el camarón pelágico *X. kroyeri* (Leone *et al.*, 2015), la jaiba *C. sapidus* (Towle *et al.*, 2001) y *P. vannamei* (Chong-Robles, 2015), indican que se localiza en la zona basolateral de la célula, no apical (AHK), lo cual sugiere que el Ac $\alpha 5$ no reconoce a la AHK en esas especies.

En complementariedad con lo anterior, el hecho de que sólo se obtuviera una banda en WB refleja que no hay interacciones inespecíficas del Ac $\alpha 5$ con otras proteínas. El marcaje positivo en branquiosteguito-epipodito y glándula antenal era esperado debido a la función osmorreguladora que se le atribuye a estos órganos. La falta de inmunomarcaje en algunas de las muestras de branquiosteguito-epipodito, glándula antenal y branquias puede deberse a la ausencia o poca abundancia de la ANK. La falta de marcaje específico en el músculo era esperado pues este no tiene función osmorreguladora y por tanto no tiene altas concentraciones de la ANK. La especificidad de este anticuerpo se ha descrito previamente (Lebovitz *et al.*, 1989; Lucu y Flik, 1999; Furriel *et al.*, 2000; Towle *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; Leone *et al.*, 2015) en todos los casos al realizar WB el $\alpha 5$ inmunomarcó una única banda proteica de aproximadamente 100 kD relacionada con la subunidad α de la ANK.

De acuerdo a nuestros resultados el Ac $\alpha 5$ puede ser utilizado para localizar la ANK en *P. vannamei* de manera específica. Entre los dos anticuerpos disponibles el Ac $\alpha 5$ es la mejor opción para localizar por IFI a la ANK de *P. vannamei* pues no tiene interacciones inespecíficas y proporciona un inmunomarcaje intenso y correctamente localizado en la

membrana basolateral del epitelio. Es importante mencionar que a pesar de realizar un gran número de ensayos no fue posible determinar las condiciones óptimas para realizar IFI con el Ac 1211/1212. De igual manera es prudente aclarar que no se probaron otras técnicas de inmunomarcaje utilizando este anticuerpo, por lo que no se puede descartar su uso para el estudio de la ANK de *P. vannamei*.

8.2. Estructura-Función de la GA

En *P. vannamei* la GA está formada por el celomosaco, por los túbulos de la GA o laberinto y por una voluminosa vejiga y carece del túbulo intermedio entre el laberinto y la vejiga. La morfología de la GA no es igual en todas las especies de crustáceos. La falta de este canal nefridial que conecta al laberinto y a la vejiga se ha observado en diversas especies de decápodos marinos como son braquiuros, anomuros, la mayoría de macruros y penaeidos (Freire *et al.*, 2008b). Dentro de los braquiuros podemos mencionar al cangrejo eurihalino *C. Maenas* (Binns, 1969) y al cangrejo semiterrestre *O. stimpsoni* (Tsai y Lin, 2014). Entre los macruros tenemos por ejemplo a la langosta *H. gammarus* (Khodabandeh *et al.*, 2005b; 2006) y entre los penaeidos además de *P. vannamei* se encuentra *P. monodon* (Buranajitpirom *et al.*, 2010).

Por otra parte, el canal nefridial presumiblemente sólo se puede encontrar en organismos de agua dulce (Tsai y Lin, 2014) entre los cuales se encuentra el cangrejo de río *A. leptodactylus* cuya GA tiene dicho segmento extra entre el laberinto y la vejiga (Khodabandeh *et al.*, 2005a; 2005c).

La relación estructura-función de la glándula antenal en la osmorregulación en crustáceos rara vez ha sido examinada (Freire *et al.*, 2008b; Tsai y Lin, 2014) y la falta de información de la estructura y función de la glándula antenal dificulta la comparación de estas características entre los crustáceos (Tsai y Lin, 2014).

Los resultados de diversos estudios sugieren que la GA tiene una organización estructural análoga a un nefrón de vertebrados (Khodabandeh *et al.*, 2005a; Freire *et al.*, 2008b; Tsai y Lin, 2014). Las nefronas son las unidades funcionales de los riñones, cada

nefrona consta de dos partes: un corpúsculo renal, donde se filtra el plasma sanguíneo, y un túbulo renal, hacia el cual pasa el líquido filtrado (Peñuela *et al.*, 2009).

La función principal de la GA en los crustáceos es la regulación del volumen y composición del fluido extracelular (Péqueux, 1995; Lin *et al.*, 2000) aunque también se realizan procesos como la reabsorción de glucosa y aminoácidos (Lin *et al.*, 2000). La regulación de volumen se asocia presumiblemente con el primer paso en la formación de orina, cuando se realiza la filtración de la hemolinfa a la GA por los podocitos del celomosaco (Freire *et al.*, 2008b). Así, la función del celomosaco es similar a la función del corpúsculo renal, de las nefronas de vertebrados.

Por otra parte, aunque la absorción es la función principal de los túbulos del laberinto estas estructuras son también de naturaleza secretora (Freire *et al.*, 2008b). Se sabe que las células epiteliales que recubren los túbulos renales en vertebrados desempeñan un papel clave en la absorción y excreción de iones Na^+ a través de la regulación dependiente de la ANK (Peñuela *et al.*, 2009; Buranajitpirom *et al.*, 2010).

En *P. vannamei* hubo una mayor inmunotinción en las células del laberinto lo cual sugiere que, al igual que en los túbulos renales de vertebrados, el laberinto es el sitio de la GA en el que se lleva a cabo la mayor reabsorción de iones. Por otra parte, debido al bajo inmunomarcaje en la zona del celomosaco se puede decir que la función principal de esta región de la GA es la de filtrar el líquido al órgano.

Por otro lado, los resultados de la expresión de la ANK en la vejiga de la GA de *P. vannamei* están en concordancia con la información que se tiene sobre la función de la vejiga de la GA pues según Freire y colaboradores (2008b) en los decápodos, el epitelio de la vejiga participa en los procesos de absorción y secreción y en la modificación ulterior de la orina en lugar de funcionar simplemente como un compartimiento de almacenamiento.

Al analizar la presencia y distribución de la ANK en la GA de juveniles de *P. vannamei* se localizó un inmunomarcaje positivo en las tres áreas de la GA: túbulos, vejiga y celomosaco, sin embargo la intensidad no es uniforme, la inmunotinción fue más fuerte en el laberinto mientras que el inmunomarcaje más débil se localizó en el epitelio del celomosaco. En otros estudios también se ha reportado que la distribución y la intensidad de la ANK no es uniforme en la GA, los datos de la inmunolocalización de la ANK en la langosta de río *A. leptodactylus* (Khodabandeh *et al.*, 2005c), en el cangrejo *O. stimpsoni*

(Tsai y Lin, 2014), la langosta marina *H. gammarus* (Khodabandeh *et al.*, 2005b), el langostino de agua dulce *P. argentinus* (Ituarte *et al.*, 2016) y el langostino *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013). En *A. leptodactylus* y *O. stimpsoni* se localizó la ANK en tres regiones de la GA (laberinto, túbulo y vejiga), presentando el túbulo distal una mayor intensidad. En juveniles y adultos del langostino de agua dulce *P. argentinus* también se localizó la ANK en las tres regiones: vejiga, túbulos proximal y distal encontrándose una inmunotinción más fuerte en las células de la vejiga (Ituarte *et al.*, 2016). En la langosta *H. gammarus* la ANK se localizó en la parte basal de las células del laberinto y en las células de la vejiga (no se detectó inmunoreactividad en el celomosaco) con una inmunofluorescencia creciente del laberinto a la vejiga (Khodabandeh *et al.*, 2005b) lo cual es consistente con el papel de la GA en la producción de orina diluida. Por otro lado, la ANK del langostino *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013) exhibió baja inmunotinción en el túbulo distal y alta en el túbulo proximal y vejiga. Los resultados tanto de la localización como de la intensidad de la ANK en la GA sugieren que la capacidad osmorreguladora de cada una de las partes de la GA puede variar en distintas especies.

Con base en los resultados tanto morfológicos como inmunohistológicos se puede decir que hay una diferenciación funcional entre las distintas regiones de la glándula antenal en *P. vannamei*, el celomosaco es el responsable de filtrar el líquido de la hemolinfa a la GA, en el laberinto se llevan a cabo la mayor parte de los procesos del transporte iónico y en la vejiga también se realiza absorción iónica aunque ocurren en menor proporción que en el laberinto. De igual forma, los resultados reafirman el hecho de que la GA y las nefronas de los vertebrados son estructural y funcionalmente equivalentes.

Cabe destacar que la morfología y ultraestructura celular en la GA de una especie puede variar de acuerdo a factores biológicos como lo es la etapa de desarrollo del organismo estudiado, o por factores externos como los cambios en la salinidad a la que se exponen los organismos. Al utilizar microscopía óptica para analizar la GA de *P. vannamei* no se detectaron cambios morfológicos evidentes de la GA con respecto a las salinidades, sin embargo es probable que si haya cambios en la ultraestructura celular del órgano, lo cual podría corroborarse con estudios de microscopía electrónica.

La etapa de desarrollo y la salinidad a la que se exponen los organismos, además de generar diferencias morfológicas también pueden provocar diferencias bioquímicas en la GA de una misma especie, por ejemplo en diversas ocasiones se ha reportado que la expresión y actividad enzimática de la ANK en la GA de una especie determinada se ve influenciada por la etapa de desarrollo o por la salinidad a la que se exponen los organismos.

En el presente estudio los patrones de abundancia de la ANK en *P. vannamei* fueron diferentes según la etapa y la salinidad de prueba. En PL15 se detectó un patrón de abundancia decreciente de la ANK en las salinidades 5, 45 y 32, lo cual sugiere que durante este estadio la GA tiene una participación activa principalmente en baja y alta salinidad. En juveniles el patrón de abundancia de la ANK varía ligeramente, pues son en orden decreciente con las salinidades 5, 32 y 45 UPS. Estos resultados sugieren que en esta etapa a menor salinidad, mayor será la abundancia de la ANK y por tanto un mayor gasto energético ocurre a bajas salinidades.

En general la abundancia de la ANK en el epitelio de la GA fue mayor cuando los organismos (PL15 y juvenil) fueron expuestos a baja salinidad. Esto se ha observado en varias especies de crustáceos, Buranajitpirom *et al.* (2010) informaron que al estimar por ensayo enzimático y Western blot, la expresión y actividad de la ANK en la GA de juveniles del camarón tigre *P. monodon* fue mayor cuando los animales fueron criados bajo condiciones de 7 ppt de agua de mar y menor en los camarones criados bajo condiciones de 30 ppt de agua de mar. Por otra parte en *S. paramamosain* los organismos que permanecieron en 5 ppt de agua de mar durante 12 h, 24 h y 14 días mostraron una mayor actividad enzimática de la ANK que en la salinidad de 25 o 45 ppt (Chung y Lin, 2006). En el cangrejo de mangle, *Ucides cordatus*, la actividad de la ANK en la GA de los animales criados en 9 ppt de agua de mar es mayor que la de los cangrejos mantenidos en agua de mar a 26 ppt (Harris y Santos, 1993).

Los resultados obtenidos sugieren que la GA participa en el comportamiento hipo-osmorregulador de PL15 y juvenil. Esto posiblemente se debe a que cuando el organismo se encuentra en agua dulce o agua de mar diluida es necesario mantener la actividad de la ANK a un nivel alto para reabsorber K^+ de forma activa a través de las células del laberinto y compensar la pérdida pasiva al medio ambiente diluido, produciendo entonces abundante

orina diluida, pobre en iones (Freire *et al.*, 2008b). Esto es congruente con lo observado por Lin y colaboradores (2000) quienes midieron la tasa urinaria y las concentraciones osmóticas e iónicas tanto en la orina como en la hemolinfa en juveniles de *P. monodon* que se transfirieron abruptamente de 45 ppt de agua de mar a 15 ppt de agua de mar, los resultados indican que el sodio fue mayor en la orina que en la hemolinfa durante las primeras 24 h después de la transferencia, mientras que el potasio fue menor en la orina que en la hemolinfa hasta 72 h después de la transferencia, lo que sugiere que las concentraciones de sodio y potasio son reguladas por la glándula antenal después de un cambio abrupto en los medios. Además, los autores observaron que la tasa de producción de orina en *P. monodon* aumenta durante la aclimatación a baja salinidad lo cual es consistente con la propuesta de que las glándulas antenales funcionan en la regulación de volumen, excretando el exceso de agua que es ganado por osmosis.

Los niveles de abundancia de la ANK al exponer a PL15 a altas salinidades indican que en esta etapa la GA no sólo participa en la hiper-osmorregulación si no que tiene una importante participación en la hipo-osmorregulación. Chong-Robles *et al.* (2014) reporta una sobrevivencia de PL4 de 50% en las salinidades de 5 y 10 UPS y tanto Jayasankar *et al.* (2009) como Chong-Robles *et al.* (2014) reportan alta sobrevivencia en PL15 en 5 UPS. Lo mismo sucede a la salinidad de 45 UPS pues PL5 tiene sobrevivencias cercanas al 60% mientras que las sobrevivencias de PL7 a PL22 son superiores al 80% (Chong-Robles, 2015). Estos porcentajes de sobrevivencia indican que desde etapas tempranas *P. vannamei* realiza procesos de osmorregulación. Chong-Robles (2015) sugiere que aunque las estructuras osmorreguladoras (branquiostegito y epipodito) se establecen desde etapas iniciales del desarrollo, su mayor participación en la osmorregulación ocurre en etapas avanzadas del desarrollo (de PL15 en adelante) debido a que no se localizó la ANK en el epipodito ni branquiosteguito de postlarvas iniciales (PL1 y PL4); ni en pleura de etapas iniciales (zoea, mysis-PL1 y PL4), ni durante el desarrollo de las branquias.

Considerando la ausencia de la ANK y el poco desarrollo de las estructuras de la cámara branquial en las etapas larvales y postlarvales tempranas, la participación del mecanismo molecular en la osmorregulación en etapas tempranas debe estar relacionado a la participación de otras estructuras como lo es la GA o el tubo digestivo (este último organo no ha sido evaluado). Dicho esto, es muy probable que la GA intervenga desde

etapas tempranas del desarrollo permitiendo a *P. vannamei* sobrevivir a exposiciones de altas y bajas salinidades.

En distintas especies de crustáceos, se ha documentado que la GA participa en los procesos de osmorregulación desde etapas tempranas del desarrollo. En *M. amazonicum* la ANK estuvo presente en las glándulas antenales de todos los estadios de desarrollo posteriores a la eclosión (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013), en la langosta *H. gammarus* la organización definitiva de la glándula antenal encontrada en adultos se logra en la etapa postlarvaria V y la ANK se detectó desde los estadios embrionarios tempranos (Khodabandeh *et al.*, 2006). Por otra parte, estudios realizados con *A. leptodactylus* muestran que los organismos cuentan con la presencia de ANK desde su eclosión, gracias a lo cual desde etapas tempranas son capaces de producir orina diluida hipotónica a la hemolinfa (Khodabandeh 2005c).

Consecuentemente los resultados indican que en juveniles de *P. vannamei* la GA tiene una menor participación en el comportamiento hipo-osmorregulador. En condiciones de alta salinidad el organismo gana iones por medio de difusión pasiva y pierde agua, por lo tanto para regular la osmolalidad bajo estas condiciones el organismo debe excretar iones de manera activa de la hemolinfa y es necesario que la GA produzca orina limitada y lo más concentrada posible, en esta condición el camarón produce una orina isosmótica a la hemolinfa (Mantel y Farmer, 1983). La disminución en la producción de orina en un ambiente hiper-osmótico se ha reportado anteriormente, según Lin *et al.* (2000) en el camarón *P. monodon* la tasa de producción urinaria disminuye a medida que aumenta la salinidad.

El hecho de que la participación de la ANK en la GA disminuya cuando se expone al organismo a altas salinidades puede deberse a que otros órganos como lo son el epipodito y branquioesteguito participan en la excreción de iones de la hemolinfa (Chong-Robles, 2015). Para formar la orina el líquido se filtra de la hemolinfa a la GA (Fuentes y Moreno, 2008), entonces puede ser que cuando la hemolinfa llega a la GA ya se encuentra muy concentrada y por tanto la participación de la GA no resulta tan abundante como lo es en ambientes hipo-osmóticos.

Con base en lo anterior, podemos decir que el proceso de osmorregulación en *P. vannamei* no se ajusta completamente al modelo, propuesto Mantel y Farmer (1983), sobre

el comportamiento fisiológico de los crustáceos expuestos a ambientes de distinta salinidad. Si bien, la participación de la GA propuesta es acertiva (se indica que esta produce orina diluída en ambientes hipo-osmóticos y orina isosmótica a la hemolinfa en ambientes hiper-osmóticos), en dicho modelo se indica que la mayor parte del transporte activo se realiza en las branquias, sin embargo este no es el caso de *P. vannamei*. Por lo tanto, para *P. vannamei* habrá que mejorar el modelo de Mantel y Farmer (1983) tomando en cuenta a la GA, epipoditos, y branquiosteguitos que son los órganos que intervienen en el transporte activo de iones en esta especie.

Considerando los resultados obtenidos y la información previa que se tiene sobre los epitelios especializados en la osmorregulación de *P. vannamei*, podemos decir que la capacidad que tiene PL15 para tolerar y hacer frente a las exposiciones a bajas y altas salinidades está estrechamente relacionada con el desarrollo de epipoditos y branquiosteguitos (Chong Robles, 2015), de la GA y posiblemente con el desarrollo de estructuras que no han sido estudiadas como lo es el tubo digestivo. De igual forma se sugiere que la capacidad que tienen los juveniles para osmorregular a bajas salinidades está estrechamente relacionada con el desarrollo de los epipoditos y la GA. Mientras que los branquiosteguitos parecen tener una mayor participación en el comportamiento hipo-osmorregulador.

El ciclo de vida natural de *P. vannamei* implica tanto fases marinas como estuarinas; en estadio de postlarva (PL) migra de hábitos planctónicos marinos a estuarinos, donde termina la transformación de postlarva hasta alcanzar la etapa de juvenil (Cid y Guzmán, 2011). Es bien conocido que los ambientes estuarinos están sujetos a grandes variaciones de salinidad que influyen en la supervivencia de postlarvas (PLs) y juveniles.

En este trabajo se ha discutido la capacidad que poseen las etapas postlarvales iniciales para responder al estrés salino. De hecho, de acuerdo a Chong-Robles (2015) la primera postlarva mantiene la osmolalidad de su hemolinfa igual a la de los juveniles y adultos, esto y los porcentajes de sobrevivencia de estas etapas hacen referencia a que es posible que el reclutamiento a los estuarios suceda en etapas postlarvales tempranas.

Por otra parte, considerando que el éxito de sobrevivencia de las PLs a los cambios de salinidad aumenta con la edad (los porcentajes de sobrevivencia son mayores en etapas postlarvales avanzadas) (Chong-Robles *et al.*, 2014) y tomando en cuenta el esfuerzo

fisiológico que requiere el organismo para osmorregular, es más probable que el reclutamiento al sistema estuarino ocurra en las etapas postlarvales más avanzadas. Chong-Robles (2015) menciona que quizá el reclutamiento ocurra después de PL15 ya que a partir de esta etapa los epipoditos y branquiosteguitos están desarrollados y tienen una importante participación de la ATPasa Na^+/K^+ . Cabe mencionar que la migración de las PLs a los ambientes estuarinos en etapas postlarvales tardías se ha observado en otros camarones, por ejemplo las PLs de *Penaeus setiferus* ingresan al ambiente estuarino a los 12 días de edad (PL12) (García, 1989). Así mismo, se ha reportado que los primeros estadios postlarvales de *Farfantepenaeus aztecus* y *P. setiferus* son planctónicos en altamar y al alcanzar una longitud total entre 10 y 14 mm las PLs migran hacia los sistemas lagunares (DOF, 2014).

Gracias a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede reafirmar el hecho de que las etapas postlarvales avanzadas son, sin lugar a dudas, estadios clave en el proceso de osmorregulación de la especie, pues a partir de estas etapas del desarrollo los organismos están anatómicamente y molecularmente preparados para hacer frente a los cambios de salinidad, pues además de contar con los epipoditos y los branquiosteguitos, también cuentan con la participación de la GA para osmorregular ya sea a baja o alta salinidad. Esto es importante puesto que cuanto más preparado esté el organismo mayor será la probabilidad de adaptarse y colonizar ambientes de salinidad variable como son los estuarios, esteros y lagunas costeras. Por otro lado, los camarones también se exponen a grandes cambios en la salinidad en condiciones de cultivo. Este trabajo resulta importante ya que el conocer las habilidades osmorreguladoras con las que está equipada la especie permite mejorar las condiciones de cultivo, por ejemplo de acuerdo con lo reportado en este trabajo se podría sugerir que las etapas postlarvales avanzadas (de PL15 en adelante) serían una buena opción para comenzar el cultivo de *P. vannamei*. Así, la información generada en este trabajo es útil para comprender aspectos Eco-fisiológicos de la especie y aporta información que podría ser útil para hacer mejoras en la acuicultura de la especie.

9. CONCLUSIONES

- La GA de *P. vannamei* está compuesta por el celomosaco, el laberinto y la vejiga; los resultados morfológicos e inmunohistológicos indican que existe una diferenciación de la capacidad osmorreguladora entre las distintas regiones de la GA.
- El Ac $\alpha 5$ comercial reconoce de manera específica la ANK (ATPasa sodio potasio) de *P. vannamei*.
- La GA participa en la osmorregulación de PL15 y juveniles de *P. vannamei*.
- Se observaron diferencias en la expresión de la ANK en la GA al someter a los camarones a diferentes salinidades tanto en PL15 como en juveniles, por lo que la expresión y la actividad de la ANK en la glándula antenal están correlacionadas con el ambiente circundante.
- Aún cuando se probaron distintas condiciones para estandarizar el uso del Ac 1211/1212, no fue posible determinar las condiciones óptimas para realizar inmunofluorescencia con este anticuerpo. Antes de descartar su uso como marcador molecular para el estudio de la ANK de *P. vannamei* es recomendable probar su utilización en Western blot u/o inmunohistoquímica.
- La abundancia de la ANK en la GA de PL15 aumentó al someter a los organismos a salinidad menor (baja) y mayor (alta) que el agua de mar, lo cual sugiere que en esta etapa la GA tiene una participación activa en los procesos de hiper e hiposmorregulación.
- El nivel de abundancia de la ANK en la GA fue mayor en juveniles cuando se expusieron a baja salinidad (cuanto menor es la salinidad, mayor es la expresión de la ANK), por tal motivo se puede inferir que en esta etapa la GA tiene una mayor participación en el comportamiento hiper-osmorregulador.
- Uno de los mecanismos de adaptación de este camarón a los cambios de salinidad es la regulación de la abundancia de la ANK en la glándula antenal, epipoditos y branquiostegitos. Los epipoditos y la GA son las estructuras más involucradas en la osmorregulación a bajas salinidades por lo que muy probablemente llevan a cabo procesos de absorción de iones.

- La capacidad para osmoregular que aporta la GA desde etapas tempranas del desarrollo de *P. vannamei* (PL15) muy probablemente facilite a la especie colonizar ambientes de salinidad variable.

10. PERSPECTIVA

Se recomienda realizar microscopia electrónica para caracterizar la ultraestructura celular en la GA. Así mismo, es recomendable corroborar la osmolalidad de la orina en *P. vannamei*, pues de esta forma podemos reforzar más aún el nuevo conocimiento sobre la función de la GA. Además de realizar análisis de la GA en etapas de desarrollo menores a PL15 para conocer con mayor precisión el desarrollo ontogénico de la GA en la especie. De igual forma sería interesante estudiar la expresión de otros transportadores (como el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC), anhidrasa carbónica (AC), los intercambiadores de Na^+/H^+ (INH) y/o la VHA) involucrados en el proceso de osmorregulación, ya que su localización y actividad permitirán determinar con mayor precisión la función osmorreguladora de la GA.

11. LITERATURA CITADA

- Álvarez, A. L., Racotta, I. S., Arjona, O., y Palacios, E. (2004). Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 237(1–4), 237–249.
- Arzola-González, J. F., Flores-Campaña, L. M., Izabal-Ceja, A., y Gutierrez-Rubio, Y. (2008). Crecimiento de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en un estanque rústico a baja salinidad Introducción Materiales y métodos. *AquaTIC*, 28(1), 8–15.
- Bautista-Juárez, J. (2005). Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo y clasificación antigénica eritrocitaria. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 43 (1), 9–12.
- Béguin, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, a, Claeys, D., Horisberger, J. D., y Geering, K. (1997). The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *The EMBO journal*, 16(14), 4250–60.
- Bell, T.A., y Lightner, D.V. (1988). Manual de Histología del camarón peneido normal. Kansas: Allen Press, Inc.
- Binns, R. (1969). The Physiology of the Antennal Gland of *Carcinus Maenas* (L.): II. Urine Production Rates. *The journal of experimental biology*, 51(1), 11–16.
- Blanco, G., y Mercer R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J physiol Renal Physiol*, 275(5), 633-650.
- Bouaricha, N., Thuet, P., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., y Trilles, J.-P. (1991). Na⁺-K⁺ ATPase and carbonic anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda, Penaeidea). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 100(2), 433–437.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo, V., Lorin-Nebel, C., Elguero, C., Grousset, E., Anger, K., y Charmantier, G. (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell and Tissue Research*, 353(1), 87–98.
- Buranajitpirom, D., Asuvapongpatana, S., Weerachatanukul, W., Wongprasert, K., Namwong, W., Poltana, P., y Withyachumnarnkul, B. (2010). Adaptation of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, to different salinities through an excretory function of the antennal gland. *Cell and Tissue Research*, 340(3), 481–489.
- Chaudhari, A., Tripathi, G., Sabnis, S., Dhamotharan, K., y Vardarajan, R. (2015). Expression studies on NA + / K + -ATPase in gills of *Penaeus monodon* (Fabricius) acclimated to different salinities. *Journal of Experimental Biology*, 53(May), 273–280.
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Wang, X., Lin, H., y Chen, L. (2015). Transcriptome and Molecular Pathway Analysis of the Hepatopancreas in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* under Chronic Low-Salinity Stress. *Plos One*, 10(7). e0144889.
- Chong-Robles, J. (2015). *Ontogenia de la capacidad osmorreguladora del camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California.
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L.

- M., y Giffard-Mena, I. (2014). Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*, 422–423, 261–267.
- Chung, K.F., y Lin, H.C. (2006). Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, Part A*, 144(1), 48–57.
- Cid, A., y Guzmán, A. (2011). Alternativas de manejo en la Pesquería de Camarón en las lagunas de Tamiahua y Madre. *Biodiversitas, CONABIO*, 95, 1–7.
- Cieluch, U., Anger, K., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Daures, M., y Charmantier, G. (2004). Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Biology*, 207(2), 325–336.
- Crowson, M. S., y Shull, G. E. (1992). Isolation and Characterization of a cDNA Encoding the Putative Distal Colon H⁺, K⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19), 13740–13748.
- DOF. (2014). Acuerdo por el que se da a conocer el Plan de Manejo Pesquero de Camarón Café (*Farfantepenaeus aztecus*) y Camarón Blanco (*Litopenaeus setiferus*) en las costas de Tamaulipas y Veracruz. 12 de marzo de 2014. 58 p.
- Dunbar, L. A., y Caplan, M. J. (2001). Ion Pumps in Polarized Cells: Sorting and Regulation of the Na⁺,K⁺- and H⁺,K⁺-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 29617–29620.
- Elgert, K. D. (2009). *Immunology: Understanding The Immune System* (2nd Edition). New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Fofonoff P.W., Ruiz G.M., Steves B., Simkanin C., y Carlton J.T. (2017). National Exotic Marine and Estuarine Species Information System. <http://invasions.si.edu/nemesis/>. Access Date: 17-Sep -2017
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1987). Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros, FAO Documentos Técnicos de Pesca y Acuicultura 203. Roma.
- Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P. T., Vitule, J. R. S., Souza, M. M., y Prodocimo, V. (2008a). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative biochemistry and physiology, Part A*, 149(4), 435–46.
- Freire, C. A., Onken, H., y McNamara, J. C. (2008b). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 151(3), 272–304.
- Fuentes, B., y Moreno, E. (2008). La glándula antenal de los crustáceos. En M. L. Fanjul y M. Hiriart (Eds.), *Biología funcional de los animales I* (2^a Ed., p. 209). México: Siglo XXI.
- Furriel, R. P. M., McNamara, J. C., y Leone, F. A. (2000). Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 126(3), 303–315.
- García, A. (1989). Impacto de la explotación de postlarvas sobre la pesquería del camarón blanco *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767). *Anales del del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 10(2), 255-262
- Geering, K. (2008). Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17(5), 526–532.

- Harris R. R., y Santos M.C.F. (1993) Sodium uptake and transport (Na^+K^+) ATPase changes following Na^+ depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.). *Comp Biochem Physiol*, 105, 35–42.
- Henry, R. P., Lucu, Č., Horst, O., y Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*, 3(November), 1–33.
- Hongyu, L. I. U., Beiping, T. A. N., y Jinfang, Y. (2014). Effect of various Na/K ratios in low-salinity well water on growth performance and physiological response of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* *, 32(5), 991–999.
- Hu, D., Pan, L., Zhao, Q., y Ren, Q. (2015). Transcriptomic response to low salinity stress in gills of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine Genomics*, 24(3), 197-403.
- Huong, D. T., Jasmani, S., Jayasankar, V., y Wilder, M. (2010). Na/K-ATPase activity and osmo-ionic regulation in adult whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to low salinities. *Aquaculture*, 304(1–4), 88–94.
- Hurtado, M. A., Racotta, I. S., Civera, R., Ibarra, L., Hernández-Rodríguez, M., y Palacios, E. (2007). Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na^+/K^+ -ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets. *Comparative biochemistry and physiology, Part A*, 147(3), 703–10.
- Ituarte, R. B., Lignot, J. H., Charmantier, G., Spivak, E., y Lorin-Nebel, C. (2016). Immunolocalization and expression of Na^+/K^+ -ATPase in embryos, early larval stages and adults of the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Cell and Tissue Research*, 364, 527–541
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., y Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th edition). New York: Garland Science.
- Jayasankar, V., Jasmani, S., Nomura, T., Nohara, S., Huong, D.T.T., y Wilder, M.N. (2009). Low Salinity Rearing of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Acclimation, Survival and Growth of Postlarvae and Juveniles. *JARQ*. 43, 345-350.
- Jorgensen P.L., Hakansson K.O., y Karlish S.J.D. (2003). Structure and Mechanism of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annual Review of Physiology*, 65, 817-849.
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 511–535.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G., Blasco, C., Grousset, E., y Charmantier-Daures, M. (2005a). Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): Anatomical and cell differentiation. *Cell and Tissue Research*, 319(1), 153–165.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G., y Charmantier-Daures, M. (2005b). Ultrastructural Studies and Na^+ ,K^+ -ATPase Immunolocalization in the Antennal Urinary Glands of the Lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry y Cytochemistry*, 53(10), 1203–1214.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G., y Charmantier-Daures, M. (2006). Immunolocalization of Na^+,K^+ -ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster *Homarus gammarus*. *Journal of Crustacean Biology*, 26(4), 515–523.
- Khodabandeh, S., Kutnik, M., Aujoulat, F., Charmantier, G., y Charmantier-Daures, M. (2005c). Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus*

- (Crustacea, Decapoda): Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase. *Cell and Tissue Research*, 319(1), 167–174.
- Kitani, H. (1986). Larval Development of the White Shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the Statistical Observation of its Naupliar Stages. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(7), 1131–1139.
- Kyte, J., y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105–132.
- Lavoie T. B., Mohan S., Lipschultz C. A., Grivel J.-C., Li Y., Mainhart C. R., Kam-Morgan L. N. W., Drohan W. N., y Smith-Gill S. J. (1999). Structural differences among monoclonal antibodies with distinct fine specificities and kinetic properties. *Molecular Immunology*, 36(17), 1189–1205.
- Lebovitz, R. M., Takeyasu, K., y Fambrough, D. M. (1989). Molecular characterization and expression of the (Na⁺ + K⁺)-ATPase alpha-subunit in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal*, 8(1), 193–202.
- Leone, F. A., Lucena, M. N., Rezende, L. A., Garçon, D. P., Pinto, M. R., Mantelatto, F. L., y McNamara, J. C. (2015). A Kinetic Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase Activity in the Gills of the Pelagic Seabob Shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae). *The Journal of Membrane Biology*, 248(2), 257–272.
- Li, J., Ma, P., Liu, P., Chen, P., y Li, J. (2015). The roles of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in response to salinity stresses. *Fish y shellfish immunology*, 42(2), 264–71.
- Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, C., y Charmantier, G. (2000). Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1–3), 209–245.
- Lignot, J. H., Susanto, G. N., Charmantier-Daures, M., y Charmantier, G. (2005). Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell and Tissue Research*, 319(2), 331–339.
- Lin, H.-P., Charmantier, G., Thuet, P., y Trilles, J. P. (1992). Effects of turbidity on survival, osmoregulation and gill Na⁺-K⁺ ATPase in juvenile shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Ecology Progress Series*, 90, 31–37.
- Lin, S.-C., Liou, C.-H., y Cheng, J.-H. (2000). The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 127(2), 121–129.
- Lingrel, J., Moseley, A., Dostanic, I., Cougnon, M., HE, S., James, P., y Neumann, J. (2003). Functional Roles of the α Isoforms of the Na,K-ATPase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 986(1), 354–359.
- Liu, H.-Y., Pan, L.-Q., y Zheng, D.-B. (2009). Effects of injection of biogenic amines on expression of gill related ion transporter mRNA and alpha-subunit protein in *Litopenaeus vannamei*. *Comparative biochemistry and physiology, Part A*, 154(1), 29–36.
- Liu, H., Pan, L., y Zheng, D. (2008). Injection of biogenic amines modulates osmoregulation of *Litopenaeus vannamei*: response of hemolymph osmotic pressure, ion concentration and osmolality effectors. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and integrative physiology*, 151(2), 191–7.
- Lucu, C., y Flik, G. (1999). Na⁺ -K⁺ -ATPase and Na⁺ / Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 276:490–499

- Lucu, Č., y Towle, D. W. (2003). Na⁺⁺K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 135(2), 195–214.
- Mantel, L.H., y Farmer, L. L. (1983). Osmotic and ionic regulation. in Mantel, L. H. (Ed.), *The biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation* (pp. 53–161). New York, London: Academic Press, Inc.
- Marchal, P. (1892). Recherches anatomiques et physiologiques sur l'appareil excréteur des crustacés décapodes. *Arch. Zool. Exp. Gén., Ser. II*, 10, 57–275.
- Martinez, A. S., Charmantier, G., Compère, P., y Charmantier-Daures, M. (2005). Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: The epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal. *Rimicaris exoculata*. *Tissue and Cell*, 37(2), 153–165.
- McNamara, J. C., y Faria, S. C. (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), 997–1014.
- NCBI-BLAST, National Center for Biotechnology Information, accedido junio-octubre, 2016. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Pan, L.-Q., Zhang, L.-J., y Liu, H.-Y. (2007). Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 273(4), 711–720.
- Pan, L., Liu, H., y Zhao, Q. (2014). Effect of salinity on the biosynthesis of amines in *Litopenaeus vannamei* and the expression of gill related ion transporter genes. *Journal of Ocean University of China*, 13(3), 1–7.
- Peñuela, R., López Rivera, J., Serrano, M., Zerpa, W., Pereira, L., Dorante, R., Ramírez, L., Zapata, J., y Peñuela, T. (2009). Papel del riñón en la patogenia de la hipertensión arterial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 4(1), 32–38
- Pequeux, A. (1995). Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1), 1–60.
- Perez-Velazquez, M., Davis, D. A., Roy, L. A., y González-Félix, M. L. (2012). Effects of water temperature and Na⁺:K⁺ ratio on physiological and production parameters of *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity water. *Aquaculture*, 342–343, 13–17.
- Poulsen, H., Morth, P., Egebjerg, J., y Nissen, P. (2010). Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS letters*, 584(12), 2589–95.
- Ramos-Cruz, S. (2000). Composición por tallas, edad y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* (Natantia: Penaeidae), en la laguna Mar Muerto, Oaxaca-Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical*, 48(4), 873–882.
- Romano, N., y Zeng, C. (2012). Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334–337, 12–23.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2 nd Edition, pp. 18.51-18.71.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shin, J. M., Munson, K., Vagin, O., y Sachs, G. (2009). The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 457(3), 609–622.
- Sun, H., Dong, J., Ren, C., Zhang, L., Dan, X., Chen, C., Zhang Y., y Hu, C. (2015). Cloning and differential expresion of NA, K-ATPase in *Penaeus vannamei*. *Marine*

- Biology Research*, 11(9), 983-989.
- Takeyasu, K., Tamkun, M.M., Renaud, K.J., y Fambrough, D.M. (1988). Ouabain sensitive (Na⁺,K⁺)-ATPase activity expressed in mouse L cells by transfection with DNA encoding the α -subunit of an avian sodium pump. *J. Biol. Chem.* 263, 4347–4354.
- Towle, D. W., Paulsen, R. S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J. H., y Spanings-Pierrot, C. (2001). Na⁽⁺⁾+K⁽⁺⁾-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of alpha-subunit mRNA and protein. *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 22), 4005–4012.
- Tsai, J.-R., y Lin, H.-C. (2014). Functional anatomy and ion regulatory mechanisms of the antennal gland in a semi-terrestrial crab, *Ocypode stimpsoni*. *Biology open*, 3, 409–417.
- Uranga-Solís, C. C. (2012). *Localización y expresión de la ATPasa Na⁺/K⁺ en branquias de Litopenaeus vannamei aclimatado a diferentes salinidades y temperaturas*. Universidad Autónoma de Baja California.
- Valdez, G., Díaz, F., Re, A. D., y Sierra, E. (2008). Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica*, 18(2), 105–115.
- Walker, S. J., Neill, W. H., Lawrence, A. L., y Gatlin, D. M. (2009). Effect of salinity and body weight on ecophysiological performance of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 380(1–2), 119–124.
- Wheatly, B. Y. M. G., y Henry, R. P. (1987). Branchial and antennal gland Na⁺/K⁺-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Experimental Biology*, 133, 73–86.

12. ANEXOS

Anexo 1. Deshidratación en Alcohol – Benceno en Histoquinet (23 hrs)

Solución	Tiempo
1. Alcohol 70%	1 h
2. Alcohol 96%	1 h
3. Alcohol 96%	1 h
4. Alcohol 96%	2 hrs
5. Alcohol 100%	1 h
6. Alcohol 100%	1 h
7. Alcohol 100%	2 hrs
8. Alcohol-benceno 1:1 (v/v)	3 hrs
9. Benceno	2 hrs
10. Benceno	2 hrs
11. Benceno-parafina 1:1 (v/v)	3 hrs
12. Parafina	4 hrs

Anexo 2. Preparación de Laminillas Poli-L-lisina (0.1%)

1. Sumergir las laminillas durante 15 min en etanol absoluto.
2. Con unas pinzas retirar una por una y envolver todas en papel aluminio.
3. Secar en una mufla durante 60 min a 300 °C.
4. Dejar enfriar las laminillas 60 min a temperatura ambiente.
5. Sumergir las laminillas durante 15 min en una solución filtrada de Poli L lisina (0.1%) preparada con agua destilada estéril.
6. Sacar las laminillas una por una, colocarlas verticalmente y dejar que se sequen a temperatura ambiente.
7. Una vez secas, colocar las laminillas en gradillas de vidrio forradas con papel aluminio y dejar toda la noche a 50 °C.
8. Tapar las gradillas y conservar las laminillas a 4 °C.

Anexo 3. Desparafinación

Solución	Tiempo
1. Precaentar las laminillas a 50 °C	30 min
2. Sumergir en xileno	10 min
3. Sumergir en xileno	5 min
4. Sumergir en xileno	5 min
5. Sumergir en alcohol 96%	5 min
6. Sumergir en alcohol 96%	5 min
7. Sumergir en alcohol 80%	5 min
8. Sumergir en alcohol 70%	5 min
9. Sumergir en alcohol 50%	5 min
10. Sumergir en agua formolada preparada diluyendo 1mL e formol en 99 mL de agua destilada	Hasta la tinción (no más de 48 h)

Anexo 4. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E). Tinción Hematoxilina y Eosina para tejido de camarón *P. vannamei* (Estandarizado en el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias por Jennyfers Chong y Deyanira Rodarte (Chong-Robles, 2015)

Solución filtrada	Tiempo
Hematoxilina de Harris	2 min
Lavar con agua de la llave	3 o 5 veces, hasta eliminar hematoxilina.
Alcohol ácido. Preparar diluyendo 1mL de ácido acético en 99 mL de etanol absoluto.	Virar a rosa
Lavar con agua de la llave	3 o 5 veces
Carbonato de litio saturado. Preparar agregando el carbonato de litio poco a poco en agua destilada, agitando constantemente hasta que ya no se pueda disolver más.	Virar a violeta

Lavar con agua destilada	3 o 5 veces
Sol. Eosina Y-Floxina B	30 segundos
Alcohol 96	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol-xileno	10 min
Xileno	Hasta montar
Montar en resina sintética (Cytoseal™ 60; Thermo Scientific™)	Dejar secar a temperatura ambiente

Anexo 5. Protocolo para la preparación de colorantes

Hematoxilina de Harris

Disolver (a temperatura ambiente) 1 g de hematoxilina en 10 mL de etanol absoluto.

1. Disolver (en calor) 20 g de alumbre de potasio en 200 mL de agua destilada.

Cuando la solución comience a ebulir se agregan la solución preparada en el paso 1. La solución se deja ebulir por dos min más y se agregan 0.5 g de Óxido de mercurio. Por último la solución se coloca en hielo.

2. Se agregan 2 mL de ácido acético glacial.

Eosina Y-Floxina B

1. Se prepara una solución de eosina Y 1 al % agregando 0.4 g de eosina Y en 40 mL de agua destilada.
2. Se prepara una solución de floxina B al 1% agregando 0.1 g de eosina Y en 10 mL de agua destilada.
3. Mezclar la solución de eosina Y 1% y la solución de floxina B 1% en 312 mL de etanol al 70%
4. Se agregan 1.5 mL de ácido acético glacial.
5. El colorante se filtra antes de ser utilizado.

Anexo 6. Medición del lumen del epitelio del laberinto utilizando el software ImageJ

1. Descargar el software ImageJ en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>
2. Abrir el software ImageJ.
3. Abrir la imagen a analizar utilizando "Archivo" → "Abrir".
4. En el menú "Análisis" seleccione "Establecer mediciones" y seleccionar la opción de distancia.
5. Seleccionar la opción "línea recta" en la barra de herramientas de dibujo y se traza una línea a lo largo del lumen que se desea medir.
6. Seleccionar "medida" en el menú "analizar" (o presionar control + M) enseguida se abrirá un cuadro emergente con una pila de valores de la primera medición.
7. Una vez obtenida la primera medición se minimiza el cuadro emergente y se dibuja otra línea en una nueva zona de interés, una vez que se ha trazado la nueva línea se realiza la medición (Paso 6) y el nuevo valor parecerá debajo del valor de la primera medición.
8. En cada fotografía se repitió este paso seleccionando cada vez una zona de interés (lumen) distinta en total se obtuvieron 20 mediciones.
9. Seleccione todos los datos en la ventana de resultados, y copiar (Control + C) y pegar (Control + V) en una hoja de cálculo (Excel).

Anexo 7. Protocolo para la Inmunofluorescencia Indirecta. Adaptado de Chong-Robles (2015).

Preparación de soluciones, preparar el día en que serán utilizadas.

Solución PBS 1X (2 L). Disolver 10 tabletas de PBS en 2000 mL de agua destilada.

Ajustar pH a 7.3 con HCl o NaOH.

Solución A. Agregar 1.75 g de NaCl y 40 μ l de Tween 20 a 200 mL de PBS 1X. Ajustar pH a 7.3 (HCl o Na OH).

Solución PBS-R 5%. Agregar 10 g de leche descremada (Svelty®) en 200 mL de PBS 1X. Disolver a 45 °C. Utilizar la solución a temperatura ambiente de 25° C.

Solución PBS-R 0.5 % (1 mL). Diluir 100 μ l PBS-R 5% en 900 μ l de PBS.

PBST. Agregar 20 μ l de Tween 20 en 200 mL de PBS.

Solución ACI. 15 μ g/mL de anticuerpo preparados con PBS-0.5%. ACI: Anti-ANK α 1 Gallus gallus/ Anti-IgG de ratón hecho en chivo (DSHB).

Solución ACII. 30 μ g/mL de anticuerpo preparados con PBS 1X. ACII: Anti-IgG de ratón expresado en chivo, unido al fluorocromo Alexa Fluor 488.

Desparafinación:

1. Precaentar las laminillas por 30 min a 45 °C.
2. Xileno, 10 min
3. Xileno, 10 min
4. Butanol, 5 min
5. Alcohol 100%, 5 min
6. Alcohol 95 %, 5 min
7. Alcohol 90 %, 5 min
8. Alcohol 70%, 5 min
9. Alcohol 50%, 5 min
10. PBS 1X, 5 min

Bloqueo:

1. Solución A, 10 min
2. PBS-R 5%, 20 min
3. PBS 3 baños de 3 min cada uno.

Marcaje:

1. Acomodar las laminillas una por una en la base de la cámara húmeda.
2. Colocar 100 μ l de la Solución ACI a cada laminilla.
3. Tapar la cámara e incubar durante 2 h en el agitador a nivel lento. Se deja a temperatura ambiente. Proteger del exceso de luz
4. Lavar las laminillas en PBST (3 baños de 5 min).
5. Acomodar las laminillas en la cámara húmeda y poner 100 μ l la solución AC II. A partir de este momento Trabajar en oscuridad o utilizar luz roja de baja intensidad.
6. Incubar una hora a temperatura ambiente y agitación suave.
7. Lavar las laminillas en PBST (3 baños de 5 min).
8. Montar las laminillas y colocarlas vertical u horizontalmente para que se sequen a temperatura ambiente
9. Almacenar las laminillas en condiciones de completa oscuridad

Anexo 8. Medición de intensidad de fluorescencia utilizando el software ImageJ

1. Descargar el software ImageJ en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>
2. Abrir el software ImageJ.
3. Abrir la imagen a analizar utilizando "Archivo" → "Abrir".
4. Seleccionar el menú "editar" elegir la opción "selección" seguido de la opción "especificar" para dibujar un área de selección de tamaño y forma específico.
5. En el menú "Análisis" seleccione "Establecer mediciones" y seleccionar las opciones: ÁREA densidad integrada y valor de gris promedio.
6. Seleccionar "medida" en el menú "analizar" (o presionar control + M) enseguida se abrirá un cuadro emergente con una pila de valores de la primera medición.
7. Una vez obtenida la primera medición se minimiza el cuadro emergente y se mueve el área de selección a una nueva zona de interés, una vez que se ha seleccionado una nueva área de interés se realiza la medición (Paso 6) y el nuevo valor parecerá debajo del valor de la primera medición.
8. En cada fotografía se repitió este paso seleccionando cada vez una zona de interés (inmunomarcaje positivo) distinta en total se obtuvieron 20 mediciones (para todas las mediciones se utilizó la misma área y forma).
9. Mover el área de selección hasta una región no tratada (sin fluorescencia) que expresa un ruido básico de fluorescencia (ruido de fondo). Una vez que se ha seleccionado una nueva área de interés se realiza la medición (Paso 6) y el nuevo valor parecerá debajo de los 20 valores correspondientes a las mediciones de inmunomarcaje positivo.
10. En cada fotografía se repitió este paso 20 veces, seleccionando cada vez una zona de interés (ruido de fondo) distinta. Para todas las mediciones se utilizó la misma área y forma.
11. Seleccione todos los datos en la ventana de resultados, y copiar (Control + C) y pegar (Control + V) en una hoja de cálculo (Excel).
12. Calcular la fluorescencia total corregida (FTC).
$$FCT = \text{Media de Densidad Integrada} - (\text{Media del área de selección} \times \text{Fluorescencia media de las lecturas de fondo}).$$