

Universidad Autónoma De Baja California

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas



Localización y expresión de la ATPasa Na^+/K^+ en branquias de *Litopenaeus vannamei* aclimatado a diferentes salinidades y temperaturas.

Tesis de Maestría

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Presenta

Carla Cristina Uranga Solís

Octubre, 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Localización y expresión de la ATPasa Na^+/K^+ en branquias de *Litopenaeus vannamei* aclimatado a diferentes salinidades y temperaturas.

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Carla Cristina Uranga Solís

Aprobada por:



Dra. Ivone Giffard Mena
Directora de tesis



MC Roberto Escobar Fernández
Sinodal



Dr. Faustino Camarena Rosales
Sinodal

Resúmen de la tesis de **Carla Cristina Uranga Solis**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias**, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, BC, Mexico. Octubre, 2012.

Localización y expresión de la ATPasa Na^+/K^+ en branquias de *Litopenaeus vannamei* aclimatado a diferentes salinidades y temperaturas.

La ATPasa de Na^+/K^+ (ANK) es una enzima de suma importancia en la regulación iónica de todos los organismos, por lo que es altamente conservada entre invertebrados y vertebrados. El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es un organismo económica y nutricionalmente importante para México y el mundo. El hecho de que sea un organismo eurihalino lo hace una especie ideal para la acuicultura, porque se adapta a agua de alta y baja salinidad, lo que refleja una gran capacidad para osmoregular, y en la cual toma una parte importante la ANK. Se estudió la expresión de esta enzima en branquias de *L. vannamei* expuesto a diferentes salinidades y temperaturas mediante Western blot, Dot blot, e inmunofluorescencia para comprender la especificidad de un anticuerpo comúnmente utilizado para estudiarla (Ac $\alpha 5$) y uno diseñado y sintetizado *de novo* en este trabajo (Ac1211/1212) específico a la ANK de *L. vannamei*. Los niveles de expresión de transcritos codificando esta enzima se estudiaron mediante PCR cuantitativo en tiempo real en branquias expuestas a diferentes niveles de salinidad y temperatura. Los resultados revelaron nuevas implicaciones e ideas para el entendimiento de la localización anatómica de la ANK en camarón blanco y la osmoregulación en extremos de salinidad y temperatura.

Palabras clave: Camarón blanco, eurihalino, osmoregulación, anticuerpos, inmunofluorescencia, PCR en tiempo real.

Abstract of the thesis presented by **Carla Cristina Uranga Solis**, as a partial requirement to obtain the degree of **Master of Science**, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, BC, Mexico. October, 2012.

Localization and expression of the Na⁺/K⁺ ATPase in gills from *Litopenaeus vannamei* acclimated to different temperatures and salinities.

The Na⁺/K⁺ ATPase (NKA) is an enzyme of utmost importance in all organisms, and is highly conserved in both invertebrates and vertebrates. The Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is an economically and nutritionally important organism in Mexico and the world. The fact that it is a euryhaline organism makes it an ideal species for aquaculture, because it can adapt to water of both low and high salinity, which reflects a great capacity for osmoregulation, and in which the NKA takes a great role. The expression of this enzyme was studied in gill tissue from *L. vannamei* acclimated to different salinities and temperatures via Western blot, Dot blot and immunofluorescence in order to assess the specificity of a commonly used antibody (Ac α 5) and another designed and synthesized *de novo* in this work (Ac1211/1212) specific to the NKA from *L. vannamei*. Expression levels of transcripts coding this enzyme were studied by quantitative real time PCR in gills from this organism exposed to different salinity and temperature levels. Results obtained revealed new implications and ideas regarding our understanding of the anatomical localization of the NKA in white shrimp, as well as regarding osmoregulation in low and high salinity and temperature conditions.

Keywords: White shrimp, osmoregulation, euryhaline, immunofluorescence, antibody, real time quantitative PCR.

Agradecimientos

Le doy gracias a Dios por todas las bendiciones en mi vida, por mi padre que sin su apoyo tanto moral como económico no estaría aquí. Gracias a mi madre, que en paz descansa, sin ella no estaría aquí, trabajando y estudiando. Gracias a mi esposo Claudio, que sin su apoyo moral y amor no podría trabajar aquí en México querido. Gracias a mis hijos Samantha, Ansel y Camila por ser fuente de tanta alegría en mi vida. Gracias a mis hermanos Victor, Ana y Carlos. Gracias a la Dra. Ivone Giffard Mena por esta oportunidad de trabajar con el camarón, un tema tan emocionante e importante para el futuro de México, y por ser excelente directora de tesis, que sin su apoyo, valiosa ayuda con redacción en español y generosidad de darme esta oportunidad tan grande no se hubiera logrado este trabajo. Gracias a la gente que trabaja en la producción de camarón. Los tacos de camarón de Ensenada están deliciosos y son los mejores que he probado en mi vida. Gracias al Dr. Luis Enríquez Paredes por su apoyo, y su instrucción valiosa en Ecología molecular e instrucción indispensable del funcionamiento del laboratorio. Gracias a la Dra. Elizabeth Ponce del CICESE por su apoyo con organismos, reactivos y muestras. Gracias al Dr. Eduardo Carpizo Ituarte por el uso del laboratorio de PCR en tiempo real y a la Dra. Guillermina Chi Barragán por el uso del microtomo y el laboratorio de histología. Gracias a la Dra. Rosa Mouriño Pérez del CICESE por el uso del microscopio de fluorescencia. Gracias al Oc. Carlos Granados Machuca por la donación tan generosa de camarones. Gracias a la Dra. Maria Teresa Viana Castrillón por la donación de tilapia (*Oreochromis niloticus*), a la Dra. Yolanda Schramm-Urrutia, a la Dra. Graciela Guerra Rivas, al Dr. Francisco Correa Sandoval, al Dr. Alejandro Cabello Pasini, y a la Dra. Irma Soria Mercado por instrucción valiosa y bien recibida. Gracias a Fernando Anastacio Leggs Lopez por su ayuda con inmunofluorescencia. Gracias al Maestro Roberto Escobar Fernández y al Dr. Faustino Camarena Rosales por su instrucción y por ser sinodales pacientes en el proceso de aprendizaje. Agradezco al CONACyT por su apoyo económico durante este tiempo. Nunca se acaba de aprender en la vida. Ha sido un placer y ¡GRACIAS!

Carla Uranga Solís

Ensenada, BC México, Octubre 2012

Contenido

	Resumen en español	i
	Resumen en inglés	ii
	Agradecimientos	iii
I.	Lista de Figuras	vi
II.	Lista de Tablas	viii
III.	Introducción	
	III.1 Detección de Proteínas Osmoreguladoras.....	7
IV.	Antecedentes	9
V.	Justificación	10
VI.	Objetivos	11
	V.1 Objetivo General.....	11
	V.2 Objetivos Particulares.....	11
VII.	Hipótesis	11
VIII.	Materiales y Métodos	
	VIII.1 Manejo de organismos.....	12
	VIII.2 Secuenciación de la <i>ANK</i>	13
	VIII.3 Western blot.....	15
	VIII.4 Modelaje estructural de epítomos para anticuerpo Ac $\alpha 5$ y Ac1211/1212.....	18
	VIII.5 Optimización de Dot blot.....	18
	VIII.6 Inmunolocalización celular de la ATPasa de Na^+/K^+	19
	VIII.7 Niveles de expresión de la <i>ANK</i> en camarones aclimatados a salinidades y temperaturas diferentes	20
	VIII.8 Estadísticas.....	21
IX.	Resultados	
	IX.1 Análisis de anticuerpos disponibles en el mercado.....	22
	IX.2 Evaluación de nivel de similitud de la <i>ANK</i> entre especies.....	22
	IX.3 PCR de punto final y secuenciación de la <i>ANK</i> de <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
	IX.4 Modelos estructurales de epítomos.....	27
	IX.5 Western blot.....	29
	IX.6 Dot blot.....	30

IX.7	Inmunolocalización celular de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ con Ac α5 y Ac 1211/1212	31
IX.8	Niveles de expresión de transcritos de la ANK en camarones aclimatados a diferente temperatura y salinidad.....	36
X.	Discusión	39
XI.	Conclusiones	47
XII.	Perspectivas	50
XIII.	Literatura Citada	51
XIV.	Anexos	61
	1. Método para extracción de ARN, método basado en Chomczynski (1987).....	61
	2. Método para extracción fenólica de proteínas totales.....	62
	3. Protocolos de inmunofluorescencia para Anti-ANK α5 de <i>Gallus gallus</i> y Anti-ANK 1211/1212 de <i>Litopenaeus vannamei</i>	63
	4. Protocolo para la síntesis de ADNc de camarones aclimatados a diferentes salinidades y temperaturas utilizados para PCR cuantitativo.....	64
	5. Reporte final de la síntesis del anticuerpo Anti-ANK 1211/1212 de <i>Litopenaeus vannamei</i> de la compañía Enogene®.....	65

Lista de Figuras

Figura 1.	Modelo de mecanismo de regulación de iones en ionocitos de <i>Danio rerio</i>	4
Figura 2.	Esquema estructural de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ (ANK).....	6
Figura 3.	Alineación de la secuencia proteica de varias especies, y la región del epítipo de la Anti-ANK de <i>Gallus gallus</i> , incluyendo la secuencia de la ATPasa de H ⁺ /K ⁺ (AHK).....	13
Figura 4.	Secuencias utilizadas para producir anticuerpos policlonales en conejos, específicos para la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ (ANK) de <i>Litopenaeus vannamei</i>	17
Figura 5.	Alineación de la secuencia nucleotídica de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ (ANK) subunidad α, de varias especies.....	24
Figura 6.	Optimización de PCR con gradiente de temperaturas para completar secuencia de la ANK.....	25
Figura 7.	Secuencia nucleotídica del fragmento de PCR amplificado de cADN de branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺	26
Figura 8.	Secuencia peptídica parcial de la ANK amplificada y secuenciada de branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i>	27
Figura 9.	Expresión proteica de la ANK en branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> mediante Western Blot con anticuerpo anti-ANK α5 de <i>Gallus gallus</i>	29
Figura 10.	Expresión proteica de la ANK en branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> mediante Dot Blot con anticuerpo Anti-ANK 1211/1212.....	30
Figura 11.	Inmunolocalización de la ANK en branquias de <i>Pachygrapsus crassipes</i> con Anti-ANK α5 de <i>Gallus gallus</i> y Anti-ANK 1211/1212.....	31
Figura 12.	Inmunolocalización de la ANK en branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> y <i>Pachygrapsus crassipes</i> con Anti-ANK α5 de <i>Gallus gallus</i>	32
Figura 13.	Inmunolocalización de la ANK en branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> con Anti-ANK 1211/1212.....	33
Figura 14.	Estandarización de PCR en tiempo real para la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ . Curva de calibración y de disociación de PCR cuantitativo.....	35

Figura 15.	Nivel de expresión de la ATPasa Na^+/K^+ (<i>ANK</i>) en branquias de camarón aclimatado a diferentes temperaturas.....	37
Figura 16.	Nivel de expresión de la ATPasa Na^+/K^+ (<i>ANK</i>) de cADN total en branquias de camarones aclimatados a diferentes salinidades.....	38

Lista de Tablas:

Tabla 1.	Organismos estudiados hasta la fecha con el anticuerpo primario Anti-ANK $\alpha 5$ de <i>Gallus gallus</i>	8
Tabla 2.	Condiciones experimentales de aclimatación de <i>L. vannamei</i> a diferentes salinidades y temperaturas.....	12
Tabla 3.	Cebadores diseñados para amplificar el extremo 5' de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ de <i>L. vannamei</i>	14
Tabla 4.	Condiciones PCR para amplificar el fragmento de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
Tabla 5.	Secuencias peptídicas seleccionadas para producir anticuerpos primarios específicos a la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Litopenaeus vannamei</i>	17
Tabla 6.	Cebadores utilizados y ciclo térmico para PCR cuantitativo de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Litopenaeus vannamei</i>	20
Tabla 7.	Fórmula para calcular el número de moléculas (copias) del plasmido + el fragmento ANK utilizado para la curva de calibración.....	21
Tabla 8.	Anticuerpos dirigidos a la subunidad α de varios organismos disponibles en el mercado.....	23
Tabla 9.	Modelos predictivos de la estructura terciaria de los epítomos teóricos de los anticuerpos utilizados para detectar la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Litopenaeus vannamei</i>	28
Tabla 10.	Análisis estadístico de tamaños de estructuras posiblemente ionocitos en cada salinidad detectados por Ac1211/1212.....	34

III. Introducción

El camarón eurihalino *Litopenaeus vannamei* es un organismo de importancia económica en México ya que es uno de los productos pesqueros más solicitados en el mundo. El mercado más grande para camarón de esta especie es el de Estados Unidos, seguido por el mercado de la Unión Europea. En el 2005 se importaron 477,000 toneladas a los EEUU, con un valor de 3.1 mil millones de dólares, y 1.8 veces más de lo que se importó en el año 2000 (FAO, 2012). En México se reportó una producción de 167,015 toneladas de camarón en el 2010, de las cuales 104,612 toneladas (el 69%) de *L. vannamei* se produjeron a través de la acuicultura (Ávila, 2012). Esta especie tiene la capacidad de habitar diferentes ambientes acuáticos con un amplio rango de niveles de sal variables sin cambios o efectos en su crecimiento (Balbi et. al., 2005). Esta plasticidad lo hace un organismo excelente para la acuicultura. La eurihalinidad que tiene éste camarón es una característica muy importante porque implica una habilidad de regular y balancear la concentración de iones en la hemolinfa (regulando su *presión osmótica*) en ambientes extremos de salinidad (bajos o altos). Cabe señalar que ya se están realizando esfuerzos para cultivarse en agua de baja salinidad (2.5 – 3 psu) en Tailandia, Brasil, México, Ecuador y EUA (Boyd y Clay, 2002; Rosas et. al., 2005; Valenzuela-Quñones et. al., 2010). Debido a esto ha surgido un gran interés por comprender los procesos enzimáticos osmoreguladores en organismos expuestos a baja salinidad, con el fin de determinar cuáles son los factores proteicos e iónicos que aumentan o disminuyen la actividad osmoreguladora (Huong et. al., 2010).

La actividad osmoreguladora es una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas de un organismo que surgen para mantener en homeostásis el contenido de agua en sus fluidos. La osmoregulación previene que se diluyan o se concentren demasiado los fluidos del organismo para mantener el volumen celular estable, también mantiene gradientes electroquímicos dentro de las células, y permite que se realicen algunas funciones fisiológicas dependientes de estas. La presión osmótica (PO) representa la presión ejercida por solutos diluidos en solvente, (como iones metálicos) y por lo tanto, la concentración iónica en el agua y fluidos (hemolinfa) de los tejidos. El agua tiende a fluir a compartimentos de alta concentración de solutos. La actividad osmoreguladora de un organismo como *L. vannamei* se puede establecer midiendo la diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa y la osmolalidad del medio externo medida en miliosmoles por kg de hemolinfa (Lignot et. al., 2000). También se puede evaluar midiendo la cantidad de iones disueltos en la hemolinfa; o bien por actividad enzimática de alguna proteína osmoreguladora como la ATPasa Na^+/K^+ (Huong

el.al., 2010), así como por el nivel de transcritos mediante la reacción en cadena de la polimerasa por tiempo real (Towle y Weihrauch 2001); incluso por localización de la proteína en las estructuras celulares, donde se evalúa la ubicación anatómica de la proteína mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia (Towle et. al., 2001 y Cieluch et. al., 2004).

La principal actividad osmoreguladora en *L. vannamei* se realiza a través de las branquias, con mayor actividad en las branquias posteriores (Chung y Hui-Chen, 2006). Buckle et. al., (2006) realizaron experimentos exponiendo poblaciones de esta especie a cambios drásticos de salinidades (de 10-40 psu) para encontrar el punto iso-osmótico (aquel donde las osmolalidades de la hemolinfa y la del agua de cultivo son iguales) y para observar cambios en la PO como respuesta a cambios de salinidad. Se encontró que la PO se mantuvo entre 717 - 823 mmol/kg en agua de cultivo con osmolalidad entre 10 y 40 psu respectivamente. El hecho de que los organismos sobrevivieron y mantuvieron su PO relativamente estable en esos intervalos extremos salinos indica que es un organismo eurihalino hiperosmoregulador. Lemaire et. al., (2002) encontraron que el punto iso-osmótico de *Litopenaeus stylirostris* es 26.2 psu (735 mosmol/kg).

En crustáceos los movimientos activos de Na^+ y K^+ ocurren principalmente a nivel de las branquias durante la osmoregulación (Jayasundara et. al., 2007). La adaptación a salinidades extremas ocurre pero a un costo energético para el organismo, porque aumenta la actividad (Huong et. al., 2010) y el gasto de ATP. Está documentado que el estrés debido a alteraciones en temperatura en su ambiente acuático resulta en cambios fisiológicos neuromusculares, causando un desequilibrio total y pérdida de la respuesta normal de re-establecerse, causando eventualmente la muerte del organismo (Re-Araujo et. al., 2012).

La enzima ATPasa Na^+/K^+ (ANK) juega un papel importante durante la adaptación fisiológica de *L. vannamei* en agua hipertónica (de alta salinidad) e hipotónicas (baja salinidad). En el pez cebra *Danio rerio*, se ha encontrado que se expresa la ANK en células especializadas para la osmoregulación llamadas ionocitos (Liao et. al., 2009). También conocidas como células ricas en mitocondrias o células de cloruro por su estructura celular y su función (se caracterizan por contener un alto número de mitocondrias y su función de transportar cloro y otros iones). En *D. rerio*, se encontraron tres tipos de ionocitos (Liao et. al., 2009 y Hwang, 2009) con ayuda de reguladores iónicos moleculares que se expresan de manera diferencial y en gran cantidad en cada tipo de ionocito como la ATPasa de H^+ (de tipo vacuolar), el co-transportador de Na^+/Cl^- (NCC), el

transportador de Na^+ , K^+ , y 2Cl^- (NKCC) y un canal pasivo de Ca^{2+} . El estudio de Liao et. al., (2009) en *Danio rerio*, demostró por medio de hibridación in situ que ciertas isoformas de ANK se co-localizan con los reguladores de los ionocitos mencionados, encontrándose algunas de las isoformas en los tres tipos de ionocitos: HR, NaR, y NCC (Figura 1). También se han localizado ionocitos en el salmón *Salmo trutta caspius*. El tamaño promedio de los ionocitos en el salmón es de $54.7 \pm 2.3 \mu\text{m}^2$ (Kazerouni y Kodabandeh, 2011).

La ANK pertenece a un grupo de enzimas de transporte de cationes de tipo P, subfamilia Tipo IIC. Las enzimas tipo P son proteínas en las que se autofosforila un aspartato altamente conservado dentro de su secuencia de aminoácidos denominado el dominio “P” de la proteína. Las ATPasas de tipo P se agrupan en 5 subfamilias de acuerdo a los átomos catiónicos que transportan (la gran mayoría metales), y existen más de 300 variedades en el reino animal (Martin, 2005). Las ATPasas de la subfamilia II están divididas por el tipo de ión que transportan. Las de tipo IIA y IIB transportan calcio (ATPasa de Ca^{2+} , también conocido como PMCA o su versión muscular SERCA). Las de tipo IIC incluyen las ATPasas Na^+/K^+ e H^+/K^+ . La ATPasa de H^+/K^+ (AHK) también es un transportador muy importante, que tiene una versión gástrica que actúa en el sistema digestivo de organismos, inclusive en humanos es el blanco bioquímico del antiácido omeprazol, y sólo se ha estudiado y caracterizado bien en mamíferos. También existe una versión no-gástrica. Ambas versiones de este transportador se conservan al 65% (Jaisser y Beggah, 1999). Este transportador contiene un dominio P muy similar al de la ANK (Figuras 2 y 4). Inclusive, la AHK y ANK son los únicos transportadores de tipo P que requieren una subunidad β (Martin, 2005). El peso molecular de las subunidades α de la AHK y la ANK es similar, midiendo aproximadamente entre 114 y 113 kDa, respectivamente. El peso molecular de la subunidad α de PMCA es de entre 129-135 kDa dependiendo de la isoforma y la especie (Gao y Wheatly, 2004), y el peso molecular de SERCA en mamíferos es de 110 kDa (Sacchetto et. al., 2012). Tanto la acumulación de calcio intracelular como el PMCA en crustáceos se asocia con ciclos de muda (Gao y Wheatly, 2004).

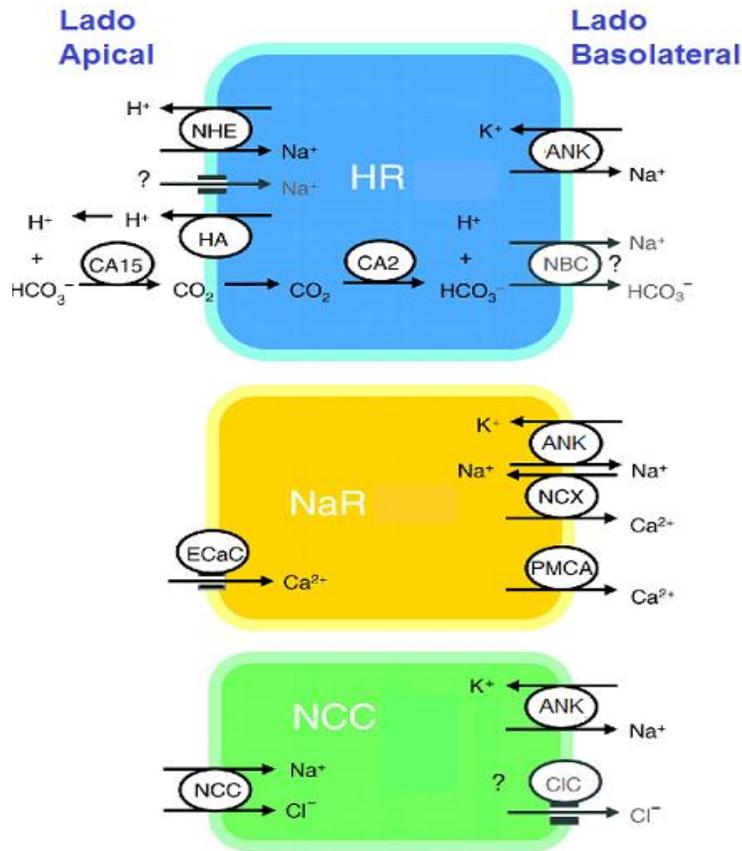


Figura 1. Modelo del mecanismo de regulación de iones en los ionocitos de branquias y piel del pez cebra *Danio rerio*. Existen tres tipos de ionocitos: ricos en ATPasa de H^+ (HR); ricos en ATPasa de Na^+/K^+ (NaR); y los que contienen el co-transportador de Na^+ y Cl^- (NCC), todos ellos expresan conjuntos diferentes de transportadores de iones y/o enzimas. Un signo de interrogación indica un proceso desconocido. CA2, parecido a anhidrasa carbónica-2; CA15, anhidrasa carbónica 15ª; CIC, canal de Cl^- ; ECaC, canal de Ca^{2+} del epitelio; HA, ATPasa de H^+ ; NBC, co-transportador de Na^+ y HCO_3^- ; NCC, co-transportador de Na^+/Cl^- ; NCX, intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 1b; NHE, intercambiador de Na^+/H^+ ; NKA, ATPasa de Na^+/K^+ ; PMCA, ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática. (Adaptado de Hwang, 2009).

La función de la ANK en el camarón es la de ayudar a mantener el balance osmótico (la presión osmótica) en el sistema linfático. Enzimáticamente, la ANK transporta tres átomos de sodio del espacio intracelular hacia el espacio extracelular e importando dos átomos de potasio al lumen celular, utilizando la energía libre de Gibbs producida con la hidrólisis de ATP (Morth et. al., 2007). Este transporte de iones permite que las células establezcan y mantengan el gradiente electroquímico necesario para conservar en homeostásis el volumen y el pH celular (Kriete y Higgins-Luthman, 2011). Otro transportador de Na^+ del citosol hacia el espacio extracelular es la anhidrasa carbónica. La ANK trabaja en concierto con la anhidrasa carbónica en sacar Na^+ de la célula, y se ha encontrado que en baja salinidad se aumenta la expresión de la anhidrasa carbónica en cangrejos eurihalinos como *Callinectes sapidus* y *Carcinus maenas*. (Towle y Weihrauch, 2001; Henry et. al., 2003). En el

sentido opuesto trabaja el NKCC, el cual transporta K^+ , Na^+ y $2Cl^-$ hacia al citosol, y también el intercambiador de Na^+ e H^+ , que transporta Na^+ del espacio extracelular hacia el citosol intercambiando un H^+ . Tanto el NKCC y el intercambiador de Na^+ e H^+ transportan por medio de gradientes electroquímicos, y no con la hidrólisis de ATP.

Estructuralmente, la ANK está conformada por tres subunidades, las subunidades α , β , y γ . La subunidad α forma enlaces importantes para el reconocimiento del sodio, potasio y el ATP, específicamente en su dominio P (Jorgensen et.al., 2003). El dominio N contiene sitios de fosforilación importantes y también se localiza en la subunidad α , uno de los ya conocidos y más importantes es la secuencia proteica DKTGT. El aspartato (D) es el aminoácido que se fosforila. Además de ser una región altamente conservada entre vertebrados e invertebrados, gran parte de la subunidad α se localiza en el espacio citosólico de la célula (Figura 2).

La subunidad β de la ANK está localizada en el espacio extracelular. La subunidad β es necesaria para que la subunidad α se ancle a la membrana y actúe en la oclusión de los átomos de sodio mediante cambios de conformación y transporte (Morth et. al., 2007). También se postula que ayuda a vincular al K^+ , siendo la subunidad necesaria para las ATPasas de la subfamilia IIC (ATPasas de H^+/K^+ y de Na^+/K^+), las cuales co-transportan K^+ (Martin, 2005).

La subunidad γ , también conocida como la proteína FXYP, es una pequeña secuencia que forma parte de la estructura cuaternaria de la ANK. Se ha postulado que se encarga de regular la expresión de la ANK en tejidos específicos y se localiza en el espacio intermembranal (Kriete y Higgins-Luthman, 2011). Es parte de una familia de proteínas de tipo FXYP. Se ha encontrado que, dependiendo del tipo de tejido en la cual se expresa, se modula la fuerza de vinculación del Na^+ a la subunidad α (Blanco, 2005; Geering, 2008).

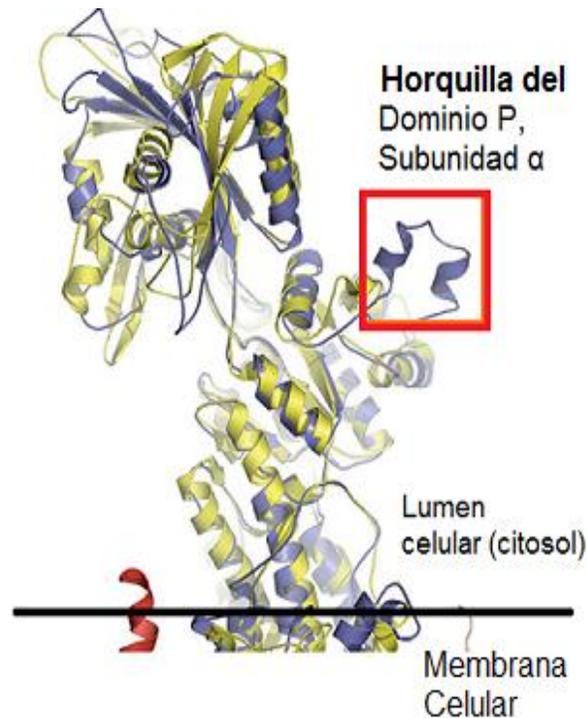


Figura 2. Esquema estructural de la ATPasa Na^+/K^+ (ANK) subunidad alfa porcina (azul) sobreimpuesto en la estructura de la ATPasa de Ca^+ (PMCA) (amarillo) para demostrar conservación de la estructura entre los dos tipos de ATPasa de cationes. La horquilla del dominio P está delineada en un cuadro en rojo. La secuencia de aminoácidos de la horquilla del dominio P son los aminoácidos I626-V656, y es única a la ANK y la ATPasa de H^+/K^+ (AHK). El dominio P forma parte del epítipo del anticuerpo específico a la ANK $\alpha 5$ dirigida contra *G. gallus* y es el sitio de fosforilación por ATP (Adaptada de Morth et. al., 2007).

De acuerdo con el modelo Albers-Post (Martin, 2005), la ANK realiza su función modificándose bioquímica y estructuralmente entre dos estados conformacionales; E1 y E2. El estado E1 resulta en el enlace con tres átomos de sodio, con la ANK abierta hacia el citósol, y el estado E2 con el enlace de dos átomos de potasio, abierta hacia al espacio extracelular (Kriete y Higgins-Luthman, 2011).

La regulación de la ANK ocurre a nivel transcripcional y a nivel proteico. La ANK está anclada a la membrana y se ha postulado que tiene interacciones directas o indirectas con proteínas del citoesqueleto tales como la ankirina, espectrina, aducina y actina (Therien y Blostein, 2000). Esta interacción se atribuye a la necesidad de procesar y transportar correctamente la ANK a compartimientos membranales. En cuanto a la regulación directa a corto plazo, se encontró que actina monomérica (no polimerizada), activa la ANK mediante una quinasa dependiente (PKA) del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La ANK también se activa a corto plazo con quinasa de la

proteína C, y quinasa de tirosina (Dunbar y Caplan, 2001). La regulación transcripcional de la ANK se considera regulación a largo plazo, ésta consiste en activación o degradación de transcritos, y ocurre principalmente por hormonas como los corticoesteroides, catecolaminas y hormonas peptídicas.

Un cambio significativo en la temperatura del agua puede tener efectos drásticos sobre los procesos fisiológicos de los organismos marinos. Uno de los principales procesos que se ven afectados es la osmoregulación, se ha identificado que un incremento en la temperatura causa un aumento en el movimiento pasivo de iones y agua en los tejidos, generando pérdidas de estos elementos y por lo tanto incrementa aún más la actividad osmoreguladora para compensarlos (Metz et. al., 2003). Se ha estudiado detalladamente la actividad y la expresión celular de la ANK en branquias del pez *Cyprinus carpio* expuesto a diferentes temperaturas (baja, óptima y alta). Se encontró que comparado con alta temperatura, a baja temperatura la actividad de la ANK incrementa, así como la cantidad y tamaño de los ionocitos (Metz et.al., 2003).

III.1 Detección de proteínas osmoreguladoras en camarón.

Al día de hoy no existen estudios que determinen la localización en estructuras celulares de la expresión de la ANK ni otra proteína osmoreguladora de *L. vannamei* durante cambios salinos, sin embargo, se supone que se encuentra en general en las branquias, en el tubo digestivo, y en la glándula antenal principalmente (Péqueux et. al, 2006). Esto de acuerdo a estudios sobre la actividad de la ANK en branquias (Huong et. al., 2010) y tubo digestivo de teleostos como *Dicentrarchus labrax* (Giffard-Mena et. al., 2006) o *Sparus aurata* (Bodinier et. Al., 2010).

Lignot et. al., (2005) reportaron que el anticuerpo dirigido hacia la ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (Ac $\alpha 5$) reaccionó de manera específica con branquias del langostino *Astacus leptodactylus*. La mayoría de los estudios de localización anatómica con este anticuerpo, han consistido en pruebas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal Ac $\alpha 5$, con la idea que, siendo la ANK una proteína muy conservada, reconocerá todas las isoformas en todos los organismos. Respecto a la similitud entre secuencias ANK de crustáceos, existen algunos fragmentos secuenciados de la ANK de *L. vannamei*, pero aún no se dispone de la totalidad de la secuencia y mucho menos se han caracterizado sus posibles isoformas. Existen publicaciones describiendo la

expresión de la ANK en branquias y en tubo digestivo en diversos crustáceos y peces utilizando el anticuerpo Ac $\alpha 5$ (Tabla 1).

Tabla 1. Organismos estudiados hasta la fecha donde se estudió la ATPasa de Na^+/K^+ con el anticuerpo monoclonal Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (Ac $\alpha 5$).

Organismo	Referencia
<i>Aedes aegypti</i>	Patrick et. al., 2006
<i>Astacus leptodactylus</i>	Khodabandeh, 2005; Lignot, et. al., 2005
<i>Carcinus maenas</i>	Cieluch et. al., 2004
<i>Drosophila melanogaster</i>	Bauman, 2001
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Nebel et. al., 2005; Giffard-Mena et. al., 2006
<i>Gallus gallus</i>	Huotari et. al., 1995
<i>Homarus gammarus</i>	Khodabandeh et. al., 2005b
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Pham, 2011
<i>Morone saxatilis</i>	Tipsmark et. al., 2004
<i>Mus musculus</i>	Shakibaei y Mobasheri, 2003
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tang et. al., 2008
<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Spanings-Pierrot et. al., 2000b,
<i>Palaemon adspersus</i>	Martinez et. al., 2005
<i>Rimicaris exoculata.</i>	Martinez et. al., 2005
<i>Salmo trutta</i>	Tipsmark et. al., 2002
<i>Scylla paramamosain</i>	Chung y Hui-Chen, 2006
<i>Scylliorhinus canicula</i>	Ferrando et. al., 2006
<i>Sparus aurata</i>	Bodinier et. al., 2010

Actualmente, varios anticuerpos están contruidos para reconocer el dominio P de la subunidad α de la ANK para varios organismos, por ejemplo el Anti-ANK $\alpha 1$, 2, 3, y Ac $\alpha 5$. Sin embargo, el epítopo de la mayoría consiste en una localización preliminar y no exacta, en un rango de más de 100 aminoácidos, lo cual dificulta su estudio ya que los epítopos de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales reconocen secuencias peptídicas de entre 6-15 aminoácidos (Geysen, 1984). El principal inconveniente que se detecta radica en que la secuencia de la ANK en general es altamente conservada entre especies y muy similar a otros transportadores iónicos, por ejemplo la AHK (Dunbar y Caplan, 2001) y el transportador de Ca^{2+} (Morth et. al., 2007 y 2009).

Se ha utilizado el extremo 5' de la subunidad α para diseñar anticuerpos específicos a la ANK, pero ni uno para *L. vannamei* o géneros relacionados. La terminal N en el extremo 5' es un sitio que en general está muy poco conservado entre proteínas, tanto de vertebrados como invertebrados. Incluso entre miembros del mismo orden (*Pachygrapsus marmoratus*) se han encontrado dos isoformas de la ANK. La isoforma D de *P. marmoratus* tiene una inserción en la terminal N del extremo 5' completamente diferente a la otra isoforma más corta (la C) de la ANK de *P. marmoratus* (Jayasundara et. al., 2007) (Figura 4). La poca similitud de las terminales N en el extremo 5' en proteínas aumenta las posibilidades de que un anticuerpo dirigido hacia esa región, detecte lo que se quiere estudiar, en este caso la ANK de *L. vannamei*.

IV. Antecedentes

A pesar de los numerosos estudios en *L. vannamei*, aún existen dudas acerca del lugar de expresión de ANK, lo que también ocurre con otros crustáceos. En estudios de localización de expresión de la ANK en branquias de cangrejo *Callinectes sapidus* (Towle et. al., 2001) ubicaron la ANK en el epitelio basolateral utilizando el Ac $\alpha 5$. Lignot et. al., (2005) también reportaron localización basolateral en branquias de langosta *Astacus leptodactylus* usando este mismo anticuerpo (Ac $\alpha 5$), y el mismo marcaje se detectó en cangrejo *Carcinus maenas* (Cieluch et. al., 2004). En estos trabajos el marcaje fue ubicuo en los tejidos mencionados, e incluye marcaje en lamelas branquiales. Para detectar la expresión de un gen se requieren herramientas cuantitativas y precisas. Actualmente para detectar la expresión proteica de la ANK se utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido hacia la ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (Ac $\alpha 5$) y este ha arrojado resultados mediante Western blot e Inmunofluorescencia. El PCR cuantitativo es otra herramienta necesaria para evaluar el nivel de expresión de transcritos de la ANK en los organismos. Actualmente los

estudios que se han hecho para estudiar la ANK en camarones expuestos a baja salinidad (Huong et. al., 2010) han consistido en medir la actividad enzimática, siguiendo la hidrólisis de ATP en tejido branquial de camarones expuestos a baja salinidad.

V. Justificación

El anticuerpo que se ha utilizado recientemente por múltiples autores y en diversas especies fue desarrollado para detectar de manera específica la ANK del pollo *Gallus gallus*, isoforma $\alpha 5$ (Ac $\alpha 5$). Sin embargo, no se ha probado si dicho anticuerpo reconoce también, de manera específica, la ANK de *L. vannamei* debido a que se desconoce su epítipo y su secuencia completa. El anticuerpo Ac $\alpha 5$ está dirigido hacia los aminoácidos de la subunidad α de la ANK de *G. gallus* entre posiciones 615 y 750, que incluye el dominio P de la proteína. Este es altamente conservado entre el reino animal y entre transportadores de la misma familia, por lo que se pretende sintetizar un anticuerpo nuevo dirigido al extremo 5' de la ANK de *L. vannamei*. Así, se podrá comparar la localización celular entre ambos anticuerpos en organismos aclimatados a diferentes salinidades (baja, iso-osmótica y alta), considerando que la intensidad de la expresión puede variar en función de este parámetro. Para determinar cambios en su expresión se evaluarán los niveles de transcritos mediante PCR cuantitativo.

VI. Objetivos

VI.1 Objetivo general:

Establecer dónde y de qué manera se expresa la ATPasa Na^+/K^+ en branquias de juveniles de *Litopenaeus vannamei* aclimatado a diferentes salinidades.

VI.2 Objetivos particulares:

1. Completar la secuencia nucleotídica de la ANK de *L. vannamei* mediante PCR de punto final y secuenciación.
2. Corroborar si el anticuerpo diseñado para la ANK de *G. gallus* es específico para la ANK de *L. vannamei* mediante Western blot y Dot blot.
3. Diseñar un anticuerpo específico a la ANK de *L. vannamei* y evaluar si reconoce la proteína mediante Dot blot.
4. Determinar la localización celular de la ANK en branquias de *L. vannamei* mediante inmunofluorescencia y su nivel de expresión en diferentes salinidades.
5. Cuantificar los niveles de expresión de la ANK en branquias de camarón aclimatados a diferentes salinidades y temperaturas mediante PCR en tiempo real.

VII. Hipótesis

La secuencia nucleotídica del gen de la ANK del camarón blanco tiene alta similitud con las secuencias de la ATPasa Na^+/K^+ de *Peneaus monodon* y otros crustáceos excepto en el extremo N terminal. El anticuerpo diseñado para la ATPasa Na^+/K^+ $\alpha 5$ del pollo *Gallus gallus* (Ac $\alpha 5$) no es específico para la ANK de *L. vannamei*. El anticuerpo desarrollado en este trabajo y dirigido hacia el extremo 5' de la ANK del camarón es específico y detecta únicamente esta enzima, con la ventaja de reconocer dos epítomos dentro de la secuencia del extremo 5' de la ANK. La ANK se localiza a nivel de las branquias, en el epitelio del sistema circulatorio y de manera diferencial según la

salinidad de aclimatación. Sus niveles de expresión se incrementan en salinidades mayores o menores al punto iso-osmótico.

VIII. Materiales y Métodos

VIII.1 Manejo de organismos

Los camarones (*Litopenaeus vannamei*) fueron proporcionados por el Oc. Carlos Granados (UABC-FCM). Se aclimataron grupos de 15 individuos a salinidad 10, 26 o 40 psu. La salinidad se redujo gradualmente, diluyendo agua de mar filtrada con agua de la llave desclorinada, o se aumentó agregando sal de mar (Guerrero Negro[®]). La tasa de aclimatación fue de 3 psu/día. Después de aclimatación, los organismos se mantuvieron en su condición experimental durante 7 días, a temperatura constante (20 °C). Los organismos se sacrificaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se utilizaron para realizar la extracción de ARN. Para obtener la secuencia completa del gen de la ANK de *L. vannamei* se disectaron branquias de 9 camarones, 3 por cada salinidad (10 psu, 26 psu y 40 psu) y se extrajo el ARN total con Trizol (Invitrogen)[®] basado en el método de Chomczynski y Sacchi, (1987) (Anexo 1). Se repitió el proceso de aclimatación con organismos frescos para extraer proteínas. Para determinar los niveles de expresión de la ANK, se extrajeron las branquias de 9 camarones aclimatados en cada condición experimental que consistió en salinidades de 10, 26 y 40 psu y temperaturas de 20 °C, 23 °C, 26 °C, 29 °C, y 32 °C (Tabla 2)(Sigala-Andrade, 2010).

Tabla 2. Condiciones experimentales de aclimatación de organismos a diferente salinidad y temperatura (Sigala-Andrade, 2010)

Temperatura Salinidad	20 °C	23 °C	26 °C	29 °C	32 °C
10 ppt	12	12	12	12	7*
26 ppt	12	12	12	12	12
40 ppt	12	12	12	12	12(R)

*Alta tasa de mortalidad a estas condiciones experimentales.

R: Experimento repetido.

VIII.2 Secuenciación de la ANK

Para corroborar si las secuencias de la ANK son similares entre varias especies, e identificar las diferencias en el epítipo entre organismos que reconoce el anticuerpo Ac $\alpha 5$, se alinearon varias secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la ANK encontradas en el banco de datos Genbank (NCBI-BLAST). Se evaluó el grado de similitud entre diversos invertebrados y vertebrados con el programa GeneDoc[®] (versión 2.7.00), sólo en la secuencia nucleotídica y de aminoácidos donde se encuentra el epítipo del anticuerpo monoclonal Ac $\alpha 5$ (Fig. 3).

		*	640	*	660	*	680														
G.gall	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSVQVNP					RD	AKACV	VH	:	664										
O.moss	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNVPVSE					VN	PR	CAKACV	VH	: 666										
O.cun	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSVQVNP					RD	AKACV	VH	: 666											
D.rer	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 666										
S.scrof	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSVQVNP					RD	AKACV	VH	: 663											
L.van	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 434										
P.mon	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 681										
P.crass	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 653										
C.sap	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 682										
H+/K+ (pez)	:	KCRTAGIRVVMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 664										
H+/K+H.sap	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 659										
H+/K+O.cun	:	KCRSAGIKVIMV TGDHPITAKAIAGVGIISDGNETVEDIAARLNIPVSE					VN	PR	EAKACV	VH	: 681										
		*	700	*	720	*	740														
G.gall	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	:	726									
O.moss	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 728										
O.cun	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 728										
D.rer	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 728										
S.scrof	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 725										
L.van	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 496										
P.mon	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 743										
P.crass	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 715										
C.sap	:	GSDLKDMTSEQLDDILLHHTTEIVFARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 744										
H+/K+ (pez)	:	GGQLKDMSSDELDDALRNHPHFVARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 726										
H+/K+H.sap	:	GMLKDMSSDELDDALRNHPHFVARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 721										
H+/K+O.cun	:	GMLKDMSSDELDDALRNHPHFVARTSPQCKLIIVEGCQRQGAIVAVT					GD	GV	NDSP	ALKKA	: 743										
		*	760	*	780	*	800														
G.gall	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	T	P	F	:	788
O.moss	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	S	P	F	:	790
O.cun	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	T	P	F	:	790
D.rer	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	M	S	P	F	:	790
S.scrof	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	T	P	F	:	787
L.van	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	S	P	F	:	558
P.mon	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	S	P	F	:	805
P.crass	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	S	P	F	:	777
C.sap	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	I	S	P	F	:	806
H+/K+ (pez)	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	L	T	P	:	788	
H+/K+H.sap	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	L	T	P	:	783	
H+/K+O.cun	:	DIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA					Y	T	L	T	S	N	I	P	E	L	T	P	:	805	

Figura 3. Alineamiento de la ATPasa de Na^+/K^+ indicando la zona del epítipo del anticuerpo primario monoclonal Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*. Se incluyen dos secuencias de la ATPasa de H^+/K^+ (AHK). La región donde se encuentra el epítipo se resalta con negro, siendo aminoácidos conservados al 100% entre especies. Este alineamiento indica que existe alto nivel de similitud entre la ATPasa de H^+/K^+ y la ATPasa de Na^+/K^+ de *Gallus gallus*. Alineado con Genedoc[®] (Nicholas y Nicholas, 1997). Números de acceso NCBI (en orden): NM205521.1, U82549.2, NM001163074, BC095306.1, NM001171541, HM626274, EF672699.1, DQ173925.2, AF327439, HM165261.1, NM001676.5, NM001082027.1

A partir de las extracciones de ARN de branquias del camarón, se sintetizó la primera cadena de ADNc con transcriptasa reversa. Para ello se utilizaron cebadores específicos Oligo dT y RACE dt del método de 5'/3' RACE (Sambrook et. al., 1989) adaptado del kit comercial de Roche®. Se incubó el ARN (350 ng) con 1.5 µM de cebador RACE dT, y dNTP's a 0.5 mM por 5 min a 65 °C para deshacer estructura secundaria del ARN. Se colocaron en hielo y se agregaron 1.25 µL de RNaseOUT® (Invitrogen) y el amortiguador de la 1^{era} cadena (First strand buffer) a 1x (Sigma-Aldrich). Esto se incubó 2 min a 37 °C. Se agregaron 1.25 µL de la enzima M-MLV RT (transcriptasa en reversa de Sigma-Aldrich), se incubaron a 37 °C por 60 minutos, y después a 70 °C por 15 min. Se colocaron en hielo y se agregó 1 µL de Ribonuclease H (Invitrogen). El cADN se purificó con kit comercial de Invitrogen® y se eluyó con 50 µL de agua purificada. Después, se amplificó por PCR el cADN con un cebador SP6 o SP7 de ancla y un cebador interno SP2 (Tabla 3) de la ANK de *L. vannamei*. Se optimizaron las cantidades de MgCl₂ y cADN de las reacciones.

Tabla 3. Cebadores diseñados para amplificar el extremo 5' de la ATPasa Na⁺/K⁺ de *L. vannamei* con sus temperaturas de anillado.

Nombre del cebador	Secuencia	%GC	Tm
SP2	5'-GAGGTCTTGTCATAC TGG-3'	50 %	58 °C
SP6	5'-ATGGCCGATTCTAA GAAAAAGCCC-3'	50 %	62 °C
SP7	5'-CGTCGCCGTTGTTC GTGGATAC-3'	50 %	58 °C

GC=Contenido de nucleótidos guanidina y citosina, Tm=Temperatura de desnaturalización de los cebadores.

Las condiciones de PCR para cada fragmento se presentan en la Tabla 4. Fueron analizados los productos PCR en geles de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados de esta manera se purificaron mediante kit de purificación de fragmentos ADN (Invitrogen®) y se enviaron a secuenciar (SeqXCell®, San Diego, CA, USA). Las secuencias obtenidas se alinearon con los fragmentos existentes en la base de datos del NCBI con el programa Geneious® para verificar su identidad, finalmente la nueva secuencia se sometió a la base de datos Genbank del NCBI-BLAST.

Tabla 4. Condiciones del PCR para completar la secuencia nucleotídica la subunidad α de la ATPasa Na^+/K^+ de *Litopenaeus vannamei*.

Reactivo	Fragmento SP6/SP2 o SP7/SP2	Condiciones del Termociclador SP6/SP2 o SP7/SP2
Agua ppi	14.8 μL	35 ciclos de: 95°C 5 min 94°C 30 seg. 54°C 40 seg. 72°C 1 min con 30 seg. Seguido por: 72°C 10 min
Amortiguador Promega [®] 5x	5 μL	
MgCl ₂ 25 mM	2 μL	
dNTP 25 mM	0.5 μL	
Cebador F (SP6 o SP7) 10 μM	1 μL	
Cebador R (SP2) 10 μM	1 μL	
cADN purificado con columna	0.5 μL	
Taq Polimerasa Promega [®]	0.2 μL	

VIII.3 Western blot

Para evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal de ANK $\alpha 5$ de *G. gallus* actualmente utilizado en inmunofluorescencia se realizó un Western blot sobre muestras de branquias y músculo abdominal de *L. vannamei*, utilizando como control positivo branquias del cangrejo *Pachygrapsus crassipes* (que teóricamente sí reacciona con este anticuerpo). Para obtener las proteínas, se utilizó el método de extracción común con SDS-Tris en conjunto con una extracción fenólica (Anexo 2). Brevemente, para la extracción SDS-Tris, se homogenizaron 150 mg de branquias y músculo en 500 μL amortiguador de lisis (Tris-HCl a 10 mM y pH 7.8, EDTA a 10 mM, SDS 1.5%, y PMSF a 2 mM). Estos se hirvieron 3 min y se centrifugaron 15 min a 12000 g y a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se volvieron a centrifugar para remover material insoluble a 12000 g, 15 min a 4 °C. Se determinó la concentración de proteína de cada sobrenadante mediante el ensayo Bradford utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar en un espectrofotómetro Nanodrop[®], a una longitud de onda de 595 nm.

Se prepararon geles discontinuos de poliacrilamida para separar las proteínas con un gel concentrador (5%) y separador (8%) preparados de acuerdo con el método de Sambrook et. al., (1989). Se diluyeron las proteínas de cada tejido a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ primero en agua, y después se diluyeron 1:2 en amortiguador de carga para la muestra (Tris-HCl a 0.5 M, pH 6.8; SDS a 10%; Glicerol a 15%; 300 μL de β -mercaptoetanol, azul de bromofenol a 0.05%) y se añadió 20 μl de cada muestra

por pozo en dos geles idénticos (A y B). En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular de Fermentas[®] (No. de catálogo SM0671) o Invitrogen[®] (Multi-Mark, No. de catálogo LC5725). Se migraron los geles con 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%). La electroforesis se realizó a 100 v durante 1.5 a 2 horas. Uno de los geles (A) se tiñó con azul de Coomassie, el segundo gel (B) se utilizó para el Western blot. Para el Western blot, se incubaron el gel, la fibra absorbente y el papel filtro 15 min en la solución amortiguadora de transferencia. La membrana de nylon se humedeció en solución amortiguadora de transferencia. Las proteínas del gel B se transfirieron a la membrana nylon mediante una corriente eléctrica y un amortiguador de transferencia (Glicina a 49 mM; Tris base a 60 mM; SDS a 0.046%) durante una hora a 21 V. Ya transferidas las proteínas, se incubó la membrana de nylon en la solución bloqueadora (leche descremada 5% en PBS 20 mM) durante 30 min y agitación constante enjuagando con agua destilada. Una vez transferido, el gel B se colocó en azul de Coomassie para verificar la eficiencia de transferencia. La membrana nylon se bloqueó una hora en solución bloqueadora (leche descremada al 5% en PBS), y luego se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti-ANK de *G. gallus* ó ANK α 5 (DSHB) diluido 1:40 en la solución bloqueadora. Para revelar la membrana se utilizó un anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) producido en chivo que reconoce el IgG del anticuerpo ratón anti-ANK *G. gallus*. El anticuerpo secundario contiene vinculada la enzima HRP (horse radish peroxidase), la cual cataliza la formación de un pigmento azul utilizando el substrato TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidene) (Larson, 1992). Después de incubar en anticuerpo secundario diluido 1:1000 en solución bloqueadora, se lavó de nuevo con solución bloqueadora y se reveló incubando la membrana con el TMB. Se espera una proteína de tamaño 112.3 kD, lo cual representará la subunidad α de la ANK.

Utilizando la secuencia de nucleótidos completa y de acuerdo con la información que se tiene sobre la localización celular de esta sub-unidad, para el anticuerpo sintetizado *de novo* se seleccionaron dos péptidos de la región 5' de ésta secuencia proteína. (Figura 4 y Tabla 5), en base de su antigenicidad determinada por el programa Geneious[®] (versión 2.7.000) el primero como sitio único para la especie de interés (*L. vannamei*) y el segundo para obtener reactividad en otros crustáceos relacionados filogenéticamente. Los anticuerpos fueron sintetizados y purificados por la compañía ENOGENE[®] en China (Anexo 5). Enogene asignó números a los dos péptidos que sintetizaron e inyectaron en conejos (1211/1212, Anexo 5) las cuales se utilizaron para nombrar el anticuerpo de la ANK de *L. vannamei* Anti- ANK 1211/1212 ya que fueron inyectados ambos en un

mismo animal (Anexo 5).

Tabla 5. Secuencias peptídicas seleccionadas y sintetizadas en este trabajo para obtener anticuerpos policlonales en conejo, producidos comercialmente por ENOGENE®.

Anticuerpo 1211/1212	Secuencias Peptídicas	Posición en Secuencia de Aminoácidos
		MADSKKKPQKAKGKKG
	RIERDGPNALTPPK	Aminoácidos 59-72



Figura 4. Alineamiento de secuencias peptídicas para seleccionar péptidos y producir anticuerpos Ac1211/1212 específicos a la ATPasa de Na⁺/K⁺ de *Litopenaeus vannamei* en el extremo N terminal. Los dos péptidos se inyectaron juntos en un mismo conejo (Anexo 5) para maximizar el marcaje en el dot blot y en inmunofluorescencia y superar el hecho de que sea una proteína con baja expresión basal. La secuencia marcada en posición 28-43 se escogió para conferir especificidad a la ANK de *L. vannamei*. El péptido en posición 86-100 se escogió para aumentar el marcaje de la ANK en inmunofluorescencia y dot blot y para que reaccione posiblemente con otros crustáceos. No. acceso Genbank: JQ996559, NM205521.1, U82549.2, NM001163074, BC095306.1., NM001171541, HM626274, EF672699.1, DQ173925.2, AF327439, HM165261, 1, NM001676.5, NM001082027.1.

VIII.4 Modelaje estructural de los epítomos de los anticuerpos ANK α 5 y Ac 1211/1212

Para comparar que tan conservada esta la estructura del epítomo del Ac α 5, observar si se conserva y compararlo con las estructuras de los epítomos de Ac1211/1212, se utilizó el programa de modelación de proteínas llamado Phyre[®] (Kelley y Sternberg, 2009). Este programa funciona con la secuencia de aminoácidos que uno somete en línea. El programa realiza modelos probables a base de información tanto bioquímica y comparativa con modelos de las mismas proteínas ya conocidas (homólogas). Este programa es muy útil en la proteómica porque también predice que tipo de estructura secundaria se observa (hélices α o pliegues β), aparte del nivel de desorden en la estructura terciaria de la proteína. Es capaz, además, de predecir si una secuencia se encuentra en el espacio intramembranal o si algún aminoácido queda expuesto o enterrado dentro de la estructura. Con este programa se construyeron modelos del extremo 5'. Las secuencias que se utilizaron de cada organismo incluyen los dos epítomos utilizados para el anticuerpo sintetizado *de novo* Ac1211/1212 específico a la ANK de *L. vannamei*. También se construyeron modelos del epítomo del anticuerpo Ac α 5, las cuales consisten solamente en los aminoácidos 615-750 de la ANK de *G. gallus* y las secuencias correspondientes a la ANK de cada organismo.

VIII.5 Optimización de Dot Blot

Para el dot blot se realizaron extracciones de proteínas a partir de branquias de *L. vannamei* aclimatados a 10, 26 y 40 psu. Se realizó una extracción de proteínas en RIPA-Urea (Ngoka L.C.M, 2008). Para ello se homogenizaron 150 mg de tejido branquial en 500 μ L amortiguador RIPA-Urea (Tris-HCl a 50 mM, pH 8.00, NaCl a 150 mM, Urea a 8 M, deoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 2%, Triton X-100 al 0.1%, glicina al 1%, PMSF a 2 mM, y DTT a 5 mM). Los homogenizados se centrifugaron 15 min a 12000 g, se removieron los sobrenadantes y se colocaron en tubos nuevos. Se evitó por completo calentar o hervir estas muestras porque la urea causa carbamilación de las proteínas. Directamente se determinó la concentración de proteína de cada muestra mediante el ensayo Bradford utilizando BSA como estándar. Se diluyeron todas las extracciones de proteínas a 2.5 μ g/ μ L y se colocaron 2 μ L de cada muestra sobre membranas de nylon (5 μ g en total) por triplicado. Las membranas se dejaron secar y se incubaron bajo luz UV 4 minutos para fijar las proteínas a la membrana. Se prepararon cuatro membranas idénticas (a, b, c y d). Una membrana (a) fue bloqueada 1 hora en PBS + 5% leche descremada solamente para servir como control negativo

de Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*. Otra (b) fue bloqueada 1 hora en PBS + 5% leche descremada y marcada con Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*. La tercera membrana (c) fue bloqueada 1 hora en PBS+ 0.5% BSA y 0.1% gelatina solamente para servir como control negativo de Ac 1211/1212. La última membrana (d) fue bloqueada 1 hora en PBS+ 0.5% BSA y 0.1% gelatina y fue marcada con el Anti-ANK de *L. vannamei* 1211/1212, las soluciones bloqueadoras también se utilizaron para diluir el anticuerpo primario y el secundario. El anticuerpo primario Anti-ANK $\alpha 5$ se diluyó a 10 $\mu\text{g/ml}$, el anticuerpo primario Anti ANK *L. vannamei* 1211/1212 (stock: 1 mg/mL) se diluyó a 5 $\mu\text{g/mL}$ en solución bloqueadora. Ambas membranas se incubaron en anticuerpo primario 2 horas. Los respectivos anticuerpos secundarios están vinculados al HRP (anti-ratón) para membranas a y b (Santa Cruz Biotechnology, Inc[®]) y anti-conejo (Genway[®], USA) para membranas c y d y se diluyeron 1:100 en sus respectivas soluciones bloqueadoras. El HRP es una peroxidasa aislada de un rábano, la cual cataliza la transformación de su sustrato (TMB) a un compuesto insoluble y de color morado. Las membranas se incubaron en sus respectivos anticuerpos secundarios una hora. Todas las membranas se revelaron con sustrato TMB (Larson, 1992).

VIII.6 Inmunolocalización celular de la $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$

Se realizaron cortes histológicos de 4 μM de tejido branquial aclimatado a 10, 26 y 40 psu (Sigala-Andrade, 2010) en un microtomo (American Optical[®] 815) y se montaron sobre laminillas tratadas con solución de poli-L-lisina al 0.1%. Se desparafinaron con xileno, seguido por deshidratación/rehidratación en mezclas de alcohol progresivamente diluidas siguiendo los protocolos estándar de Giffard-Mena et. al., (2006) (Anexo 3). Los cortes se procesaron de manera diferente dependiendo del anticuerpo primario utilizado optimizando los protocolos de Giffard-Mena et. al., (2006). La solución bloqueadora fue diferente para los anticuerpos primarios, leche descremada al 5% en PBS para ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* y BSA 0.5% y gelatina 0.1 % en PBS para Anti-ANK de *Litopenaeus vannamei* (ver detalles en Anexo 3). Para la ANK $\alpha 5$ se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en chivo (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Para la Anti-ANK de *Litopenaeus vannamei* se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en pollo (Genway[®], USA). Ambos anticuerpos secundarios tienen vinculado el fluorocromo FITC para revelar la hibridación del anticuerpo bajo luz fluorescente a una longitud de onda de 488 nm, para ello se utilizó un microscopio Zeiss y se tomaron fotografías con una cámara digital acoplada Axiovision[®] utilizando objetivos para fluorescencia 10x. El programa asociado con la cámara digital, Axiovision[®] (version 4.7) se utilizó para analizar el tamaño de las estructuras

celulares de las imágenes que se obtuvieron. Para esto se remarcó el contorno de cada estructura donde se encontró expresión. Tejido branquial de *Pachygrapsus* spp. se utilizó como control positivo para Ac $\alpha 5$ comúnmente, por lo que se utilizó el tejido de *Pachygrapsus crassipes* como control positivo de Ac $\alpha 5$ y también para averiguar si se puede utilizar como control positivo del Ac1211/1212.

VIII.7 Niveles de expresión de la ANK en camarones aclimatados a salinidades y temperaturas diferentes.

Los niveles de transcritos de la ANK fueron cuantificados por PCR en tiempo real en un termociclador de Life Technologies, (ABI) Inc. Step One Plus[®] (USA) en volumen final de 20 μ L (10 μ L de mezcla de buffer Fast SYBR Green 2x, 1 μ L de los cebadores específicos sentido y anti sentido para cada gen a una concentración de 10 μ M, 7 μ L de agua ppi y 1 μ L de cDNA molde (10 ng/ μ L, medido por Nanodrop[®]) (Tabla 6).

Tabla 6. Cebadores y condiciones utilizados para PCR en tiempo real de muestras de branquias de camarones aclimatados a 10, 26 y 40 psu.

Gen blanco	No de secuencia en el Gene Bank	Secuencias de cebadores Forward/ Reverse	Producto (pb)	Referencia diseño de cebadores
ATPasa Na⁺/K⁺	JF288783	5'-CCAGTATGACAAGACCTC-3' 5'-CCTTAACATCACCAACAGCC-3'	235 pb	Martinez-Corona, 2011
Perfil Térmico	1 ciclo de 95°C por 20 seg, 40 ciclos de 95 °C por 3 seg, y 30 seg a 60 °C. El perfil térmico de la curva de disociación fue de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min y 95 °C por 15 seg.			

Las muestras de cDNA que se utilizaron en este trabajo se amplificaron y cuantificaron usando como control positivo y para la curva de calibración el fragmento de la ATPasa Na⁺/K⁺ clonado en el vector TOPO TA (Invitrogen) (Martinez-Corona, 2011). Éste se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop[®], y el valor que se obtuvo se usó para calcular el número de moléculas (o copias) de plásmido con el fragmento ANK en la solución madre (Tabla 7).

Tabla 7. Fórmula para calcular el número de moléculas (copias) del plásmido + el fragmento *ANK* utilizado para la curva de calibración (Lee et. al., 2006).

Gen	Gen (pb)	Plásmido (pb)	Plásmido + inserto (pb)	pDNA (g/μL)	No. Moléculas (No. copias)/μL
ATPasa Na ⁺ /K ⁺	235	3956	4191	4.66 E -8	1.014 E 10
Fórmula	moléculas/μL = [(g/μL DNA)/(plásmido + inserto en bp x 660)] 6.022 x 10 ²³				

A partir de la solución madre del plásmido con concentración 1.014E10 copias/μL de *ANK* de *L. vannamei*, se realizaron diluciones seriadas en agua de 1:10 hasta 1.014E1. Éstas se utilizaron para crear la curva de calibración y cuantificar las muestras bajo las mismas condiciones de amplificación (Tabla 6). El número de copias del gen de interés en las muestras se calculó con el programa “Step One Software” versión 2.2.2 (Applied Biosystems Inc.®). Como control negativo se utilizó agua en vez de muestra de cADN en cada una de las amplificaciones.

VIII.8 Estadística

Se realizó una prueba *z* con cada dato que se obtuvo del experimento del PCR cuantitativo, con los datos completos para detectar la existencia de valores extremos. Todo valor arriba de 2.5 o debajo de -2.5 se consideró un valor extremo. También se realizó un análisis de mediana y de rango de cuartiles, con su respectivo “boxplot” con el programa estadístico Minitab® (versión 15.1.0.0.) para averiguar la presencia de valores extremos. Se realizaron pruebas para determinar la normalidad de los datos obtenidos, las pruebas Anderson-Darling y Ryan-Joiner se aplicaron a las medianas y promedios de cada condición experimental, con N=15 y un valor α de 5%. Dependiendo de los resultados de éstas pruebas de normalidad se realizaron pruebas paramétricas de tipo *t* (*t*-student) para determinar diferencias significativas a las medianas globales (en el caso de ser Gaussianos, o normales) con N=3 y valor α de 5%. En caso de no ser normales los datos se utilizaron pruebas no-paramétricas, como la prueba Wilcoxon o Kruskal-Wallis para datos no-normales. Para realizar contrastes múltiples, se agruparon los datos de acuerdo a la temperatura, y luego de acuerdo a su valor de salinidad. Se calcularon promedios y medianas, las medianas se

utilizaron en las gráficas por ser medidas estadísticamente más robustas que el promedio. Para datos normales, se realizaron pruebas de homocelastividad (prueba F que determina si las varianzas son iguales o distintas) para comparar cada tratamiento, y dependiendo de estos resultados se realizaron contrastes múltiples con pruebas t para muestras con varianzas distintas o pruebas t para muestras con varianzas iguales. Para datos no normales se utilizaron pruebas Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Para calcular el valor t-student se utilizaron los promedios, para determinar si cada condición experimental tiene significancia estadística definido por diferencias significativas en comparación al promedio de todos los datos juntos, indicadas en las gráficas con un asterisco.

IX. Resultados:

IX.1 Análisis de anticuerpos disponibles en el mercado

Se realizó una búsqueda exhaustiva en varios sitios biotecnológicos sobre los anticuerpos utilizados hoy en día para estudiar la ANK, que pudieran servir para marcar la de *L. vannamei* (Tabla 9). Como se constata, comercialmente existen varios anticuerpos disponibles en el mercado dirigidos hacia la ANK de diversos organismos. Sin embargo, no hay disponible un anticuerpo diseñado para reaccionar de forma específica con la ANK de *L. vannamei*. El diseño del anticuerpo sintetizado *de novo* Ac 1211/1212 se realizó tomando en cuenta el hecho que se requirió utilizar una concentración muy alta de Ac $\alpha 5$ para obtener resultados con el Western blot y tomando en cuenta la falta de marcaje que se vio en la extracción con Tris-SDS. Otro anticuerpo que se ha empezado a utilizar recientemente en crustáceos es el H-300 (Tabla 9) que es específico a una región que incluye la región del Ac $\alpha 5$, lo cual introduce el mismo problema que el Ac $\alpha 5$ de no conocerse su epítipo.

IX.2 Evaluación de nivel de similitud de la ANK entre varias especies

Existe una elevada similitud entre las secuencias de la ANK de diversos grupos taxonómicos, tanto a nivel de la secuencia que incluye el dominio P de la subunidad α , como en la secuencia que reconoce el anticuerpo Ac $\alpha 5$ (aminoácidos 615-750, Figura 3). Utilizando el programa de análisis de secuencias de ADN y proteínas; Genedoc[®], versión 2.7.000 (Nicholas y Nicholas, 1997) y NCBI-BLAST se encontró que el 77% de la secuencia nucleotídica de la posición 1894 a 2301 es idéntica entre estos organismos (Figura 5) y todas las secuencias hasta ahorita conocidas en NCBI.

Tabla 8: Lista parcial de anticuerpos disponibles comercialmente para la ATPasa Na⁺/K⁺ subunidad α . Los primeros dos anticuerpo (en negritas) son los mas utilizados actualmente para estudiar crustáceos.

Organismo en el que fue desarrollado el anticuerpo para ANK	Zona seleccionada para el epítipo	Compañía (# de catálogo) o Autor
Ratón anti-ANK $\alpha 5$ <i>G. gallus</i>, monoclonal. Pez, mamíferos, ave, rana (<i>Xenopus</i>), insecto (Ac $\alpha 5$), Reconoce todas las isoformas.	Aminoácidos 615-750	DSHB (a5); Takeyasu et. al., 1988)
Anti-ANK α 1, 2, 3 de rata, humano, bovino, equino, canino, porcino y de aves, policlonal (H-300).	Aminoácidos 551-850	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-28800)
Chivo anti-ANK humano, policlonal.	Terminal N del extremo 5', N-15	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-16041)
Anti- ANK $\alpha 3$ de ratón, conejo y humano policlonal.	1-65 (humano)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-134969)
Ratón anti- ANK α (H-3) Humano, monoclonal.	Aminoácidos 551-850	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-48345)
Conejo IgG anti-ANK α 1 de ratón, rata, humano y borrego, policlonal.	Serina 16 fosforilada	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-109465)
Chivo IgG anti-ANK α de rata, policlonal.	Serina 23 fosforilada	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-16711)
Anti-ANK $\alpha 1$ de borrego, reacciona con humano y rata, monoclonal.	Subunidad α entero	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-71639)
Anti-ANK $\alpha 1$ Clona M7-PB-E9 de canino, borrego, pollo, puerco, y humano. No reacciona con $\alpha 1$ de rata o rana. Monoclonal.	Aminoácidos 646-652 (LNIPVSQ)	Sigma Aldrich, (A276)
Anti-ANK $\alpha 1$ <i>G. gallus</i> . Reconoce ANK de ave, humano, perro, ratón, puerco y pez (<i>D.rerio</i>). No reacciona con rana o borrego.	Aminoácidos 27-55	DSHB (a6f)
Conejo Anti ANK bovina, de rata, policlonal. No reacciona con ANK de conejo.	Aminoácidos 338-518	Upstate (# 06-520)

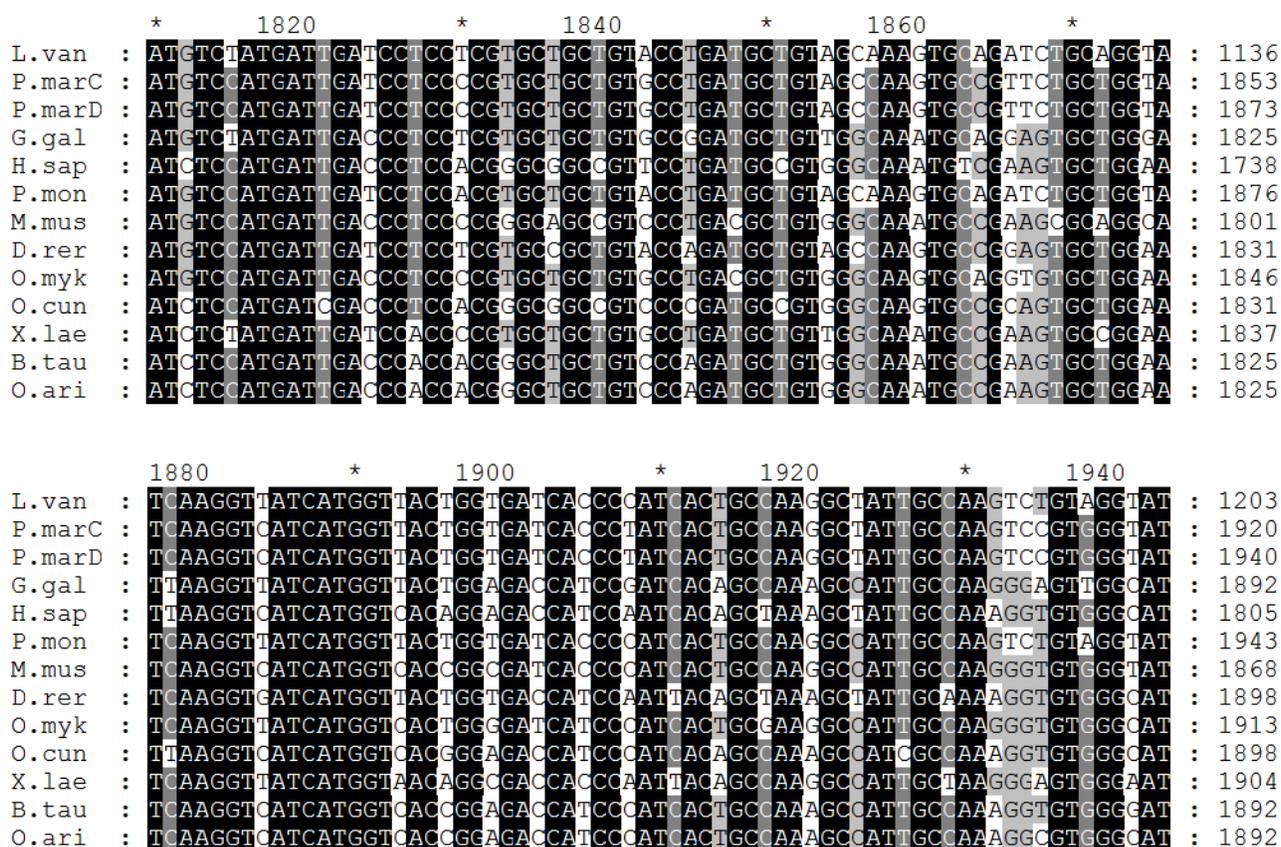


Figura 5. Alineación nucleotídica de la ATPasa Na⁺/K⁺ (ANK) subunidad α, de varios vertebrados e invertebrados. Los nucleótidos resaltados en negro indican nucleótidos conservados al 100%. Los nucleótidos en blanco son los que difieren de la secuencia de consenso (Alineado con Genedoc[®], Nicholas y Nicholas, 1997). Números de acceso NCBI (en orden) HM626274.1, DQ173925, DQ173924.2, NM205521.1, NM001160234.1, EF672699.1, BC037206.1, BC095306.1, NM001124461, NM001163074, NM001090595, NM001076798, NM001009360.1.

IX.3 PCR de Punto Final y Secuenciación de la ANK de *L. vannamei*

La optimización de PCR de punto final para obtener la terminal N, resultó en un sólo fragmento de aproximadamente 1250 pb. Se optimizó la reacción hasta obtener solo un fragmento del tamaño esperado para los cebadores utilizados (Figura 6) la cual se mandó secuenciar después de purificar.

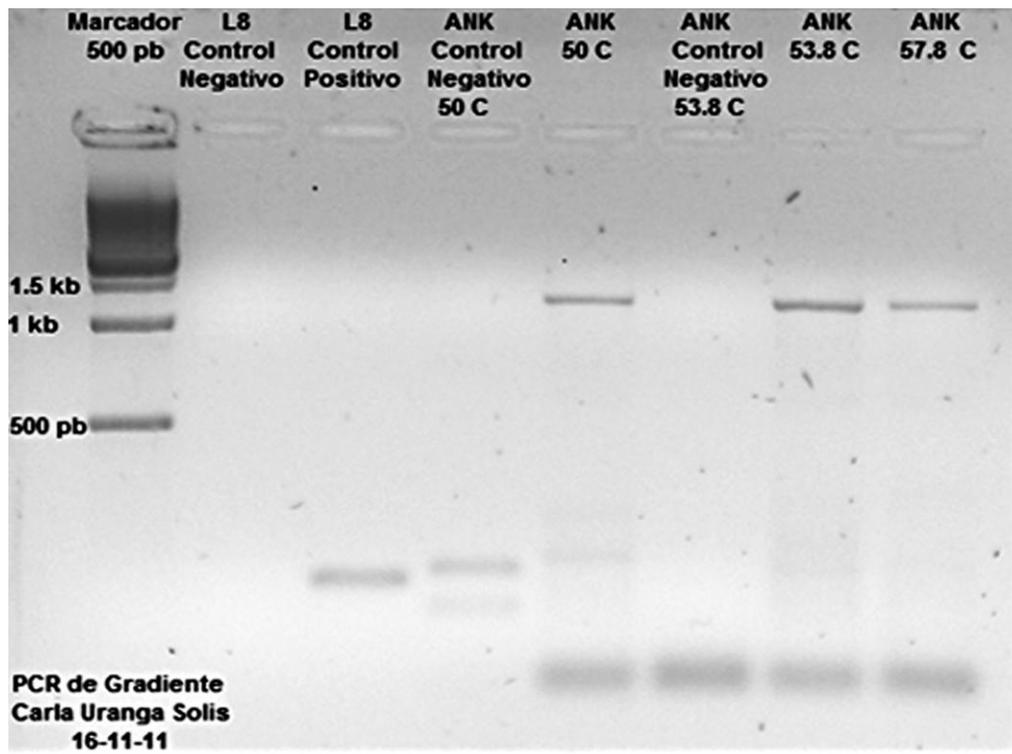


Figura 6. Optimización de PCR con gradiente de temperaturas para completar secuencia de nucleótidos en la N terminal de la ATPasa Na^+/K^+ de *L. vannamei*. Agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio. L8, gen ribosomal constitutivo como control positivo de PCR para probar el funcionamiento de los reactivos utilizados; ANK, ATPasa Na^+/K^+ de *L. vannamei*. A partir de estos resultados se determinó el T_m (temperatura de deshibridización de ADN de doble cadena) óptimo para estos cebadores (54 °C).

El fragmento secuenciado de la población de *L. vannamei* mexicana tuvo pocas diferencias en la zona común de alineamiento con las secuencias ya conocidas, que provienen de una población de *L. vannamei* (NCBI números de acceso CK572083.1 y HM626274.1) americana y china, respectivamente. Sin embargo, esa diferencia, sí resultó en un cambio a nivel de aminoácidos, particularmente en K18 que cambió de metionina a lisina (Figura 7 y 8). Existen secuencias completas de la ANK de *Pachygrapsus marmoratus*, y también de *Peneaus monodon*, que son taxonómicamente más similares a *Litopenaeus vannamei*, y que sirvieron para comparar la secuencia nueva que se obtuvo mediante PCR de punto final, ya que esta secuencia no se conocía en *L. vannamei*. La secuencia que se obtuvo de la ANK (NCBI No. de registro JQ996559.2) de *L. vannamei* resultó muy similar a secuencias de la ANK de otros camarones; 99% de similitud con los camarones peneidos *Peneaus monodon* y *Fenneropenaeus indicus* mientras que hubo 83% de similitud con *Pachygrapsus marmoratus* y *Callinectes sapidus*.

```

Nueva secu : -----*-----20-----*-----40-----*-----60----- : 16
L.van      : AIGGCCGATTCTAAGAAAAGCCCCAGAGGGCTAAGGGGAAGAGGGAGATA GGATTTGAAT : 63

Nueva secu : -----*-----80-----*-----100-----*-----120----- : 79
L.van      : GATCTGAGCAGGAGTTGGACTTIGATGAGCACAAGGICCCCAATIGAGGAPCICITTCARCGT : 126

Nueva secu : -----*-----140-----*-----160-----*-----180----- : 142
L.van      : CTACTGTTAATCCCGACAC GGICTATCACAAAGTGGGGCTAAGCGCCGTAATTCACGAGAT : 189

Nueva secu : -----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*----- : 205
L.van      : GGGCCGATGCTCTTACCCACCCAGCAGACTCCGATGGGTCAAGTCTGCAAAACCTC : 252

Nueva secu : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*----- : 268
L.van      : TTCGGTGGTTTTCACICTCTGCTGTGGATTGGCCGCTATCCCTCIGCTTCATIGCCIACTCAAT : 315

Nueva secu : -----*-----320-----*-----340-----*-----360-----*-----3 : 331
L.van      : GAGACAGCTGCAGAAAGAGGAGCCCAACAGGACAAITTTGTCCTGGGCAATIGTGCTCACAGCA : 355

Nueva secu : -----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440----- : 394
L.van      : GTCGTGATCAATCAGGGCGTCTCTCATATATACAGGAAGCAAGAGCTCCCGTATCTGGAA : -----

Nueva secu : -----*-----460-----*-----480-----*-----500----- : 457
L.van      : TCTTCAAGAACATGGTCCCTCAGTATGCTATTGTTCTTCGAGATGGCGAGAGCAGAAITGTT : -----

Nueva secu : -----*-----520-----*-----540-----*-----560----- : 520
L.van      : CAGGCTGAGGAACCTGTCATAGGAGCAATTGTAAGGTCAGTITGGTGATCCTATCCAGCA : -----

Nueva secu : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*----- : 583
L.van      : GATATCCGTTGTCATCGAAGCAGGGGCTTCAGGTTGCAACCTTCCTGACTGGAGAAATCC : -----

Nueva secu : -----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*----- : 646
L.van      : GAAACCCAGACCCCTTACCCGAAATACCTTCCGAAACCCCTTGGAGCCAGGAACTGGCA : -----

Nueva secu : -----*-----700-----*-----720-----*-----740-----*----- : 709
L.van      : TTCCTCTCCACCAATGCTGTCCAGGGTACTTGCAGGGTATCCGTAACATGATTTGGTGACAA : -----

Nueva secu : -----*-----760-----*-----780-----*-----800-----*-----82 : 772
L.van      : ACTGTGATGGGTCGTAATGCTGGTTTGGCATCTGGATTGGAACTGGTGAAACCCCAATGGCC : -----

Nueva secu : -----*-----840-----*-----860-----*-----880----- : 835
L.van      : AAGGAAATTAACCAATTCATTCACATCAATTAATGCTGGGCTGCTGCTGGGTTGACCTTC : -----

Nueva secu : -----*-----900-----*-----920-----*-----940----- : 898
L.van      : TTCGTTATTTGCCITGATCCTTGGGTACCAATGGTGGATGCTGTTGTTCCCTCATTTGGTATC : -----

Nueva secu : -----*-----960-----*-----980-----*-----1000----- : 961
L.van      : ATTCTAGCCAAATGTCCTGAGGGTCTGCTAGCCACTGTCACCTGCTGCTGACTTCACTGCCC : -----

Nueva secu : -----*-----1020-----*-----1040-----*-----1060-----*----- : 1024
L.van      : AAGCCCATGGCTGCCAAGPACIGCCITGTRAGPACTTGGAGGCCIGTGGAAACCCITGGGTTCC : 412
          : -----ATGGCTGCCAAGPACIGCCITGTRAGPACTTGGAGGCCIGTGGAAACCCITGGGTTCC

```

Figura 7. Secuencia nucleotídica de la ANK obtenida (marcado en negro) a partir de branquias de *Litopenaeus vannamei* (NCBI No. de registro JQ996559) alineado con fragmento existente en la base de datos (NCBI CK572083.1 y HM626274). Las diferencias entre ambas secuencias se marcan en rojo y con flecha negra.

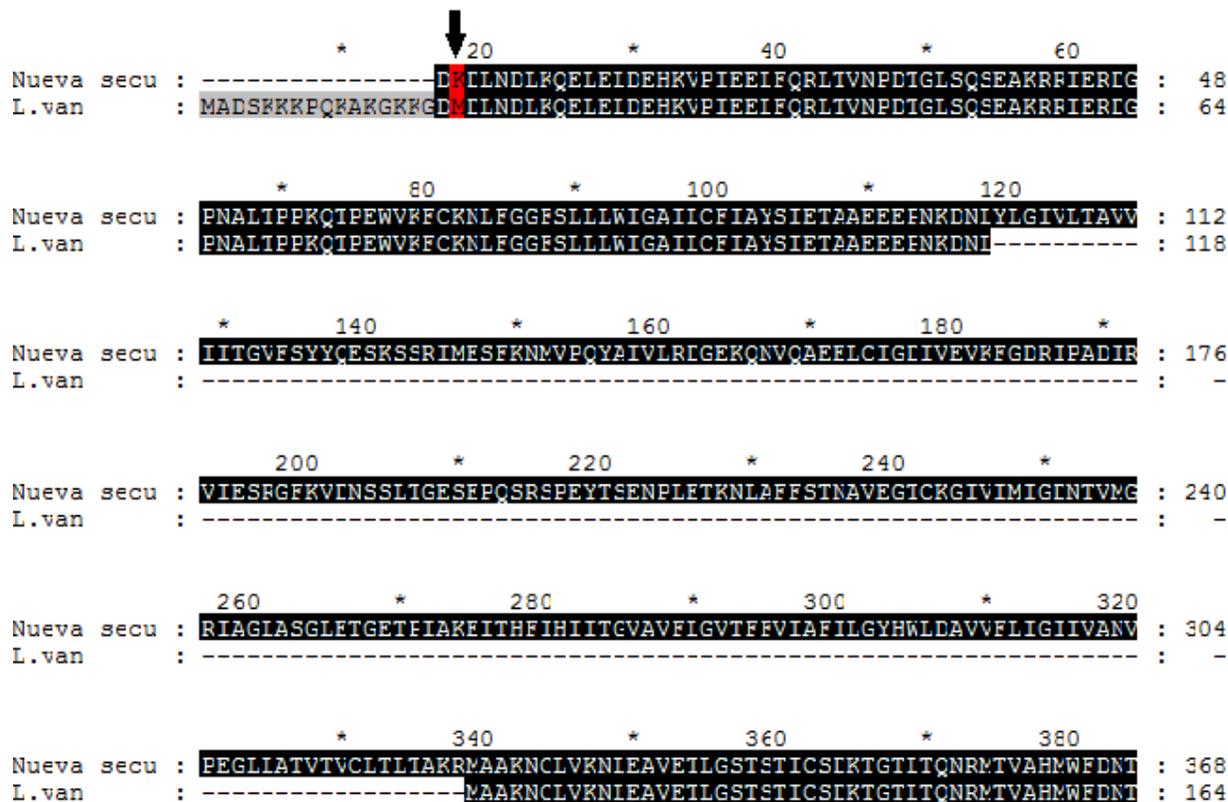


Figura 8. Secuencias de aminoácidos traducidos de las secuencias del fragmento PCR amplificado (marcado en negro) alineado con el fragmento existente en la base de datos (NCBI CK572083.1 y HM626274) para *L. vannamei*. Las diferencias entre ambas secuencias se marcan en rojo y con flecha negra.

IX.4 Modelaje estructural de epítomos de Ac1211/1212 y el epítomo de Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*

Los modelos de estructuras que se obtuvieron con el programa Phyre[®] (Kelley y Sternberg, 2009) resultaron ser muy diferentes al comparar los extremos N terminal de la ANK de varias especies que incluyen los dos epítomos del Ac1211/1212 (Tabla 9, renglón A). Se observan estructuras secundarias y terciarias con desorden químico, y pocas estructuras de hélices alfa o pliegues de tipo beta en el extremo terminal N. Para las estructuras donde se compara la región P donde se ubica el epítomo que corresponde a Ac $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (Tabla 9, renglón B) se manifiesta mayor orden y similitud entre las estructuras, lo cual se espera de una región tan conservada a través de especies y de transportadores de tipo P, subfamilia IIC y de una región que contiene el sitio de vinculación e hidrolización de ATP. Todos los modelos del epítomo del Ac $\alpha 5$ presentan pliegues y hélices casi idénticos en diferentes especies (camarón, cangrejo y aves) e incluso con los transportadores de tipo P como la AHK y la ATPasa de Ca^{2+} (Tabla 9).

Tabla 9: Modelos predictivos de la estructura terciaria del extremo 5' (A) y el dominio P (B) de diferentes ATPasas de cationes de tipo P incluyendo los epítomos del Anticuerpo Anti-ANK de *Litopenaeus vannamei* 1211/1212. El color azul en cada modelo indica la terminal N, y el color rojo indica la terminal carboxílica. Las secuencias que se utilizaron para determinar la estructura de los dominios P se alinean a los aminoácidos 615-750 de la ATPasa de Na⁺/K⁺ (ANK) de *Gallus gallus*. Esta secuencia se utilizó porque incluye el epítomo del anticuerpo Anti-ANK α5 de *Gallus gallus*. Estos modelos se obtuvieron con el programa de modelación de proteínas Phyre[®] versión 2.0 (Kelley y Sternberg, 2009).

	ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Litopenaeus vannamei</i> CK572083.1	ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Pachygrapsus marmoratus</i> , isoforma C DQ173925	ATPasa Na ⁺ /K ⁺ de <i>Gallus gallus</i> NM_205521.1	ATPasa de Ca ⁺ de <i>Gallus gallus</i> NM_204891	ATPasa de H ⁺ /K ⁺ del pez <i>Siniperca chuatsi</i> (pez) HM165261.1
A. Extremo 5', poco conservado, aminoácidos 1-100, (hasta el fin del 2° epítomo).					
B. Dominio P, relativo al epítomo del Ac α5, altamente conservado					

IX.5 Western blot con Anti-ANK de *Gallus gallus*

En el Western blot con Ac α5 se obtuvo una banda nítida solo para la extracción fenólica. Sin embargo, también se obtuvo marcaje inespecífico de alto peso molecular en todos los tipos de extracción proteica realizados (extracción fenólica y con Tris-SDS de branquias de *Pachygrapsus crassipes* y del camarón *Litopenaeus vannamei* y músculo de este último) (Figura 9A, B y D). Cabe resaltar que en las extracciones con detergentes no se reveló la presencia de la banda de interés aun después de realizar múltiples combinaciones con concentraciones de anticuerpo primario, de

1:40-1:200 (Figura 9B). El control negativo (Figura 9C) demuestra que los agregados formados son a raíz del anticuerpo primario, y no el secundario, porque no demuestra marcaje de alto peso molecular como en las membranas experimentales. No se obtuvieron resultados de un Western blot con Ac1211/1212 bajo estas mismas condiciones experimentales y materiales experimentales (datos no mostrados). La única dilución de Ac $\alpha 5$ que dio resultado fue la más concentrada (1:40).

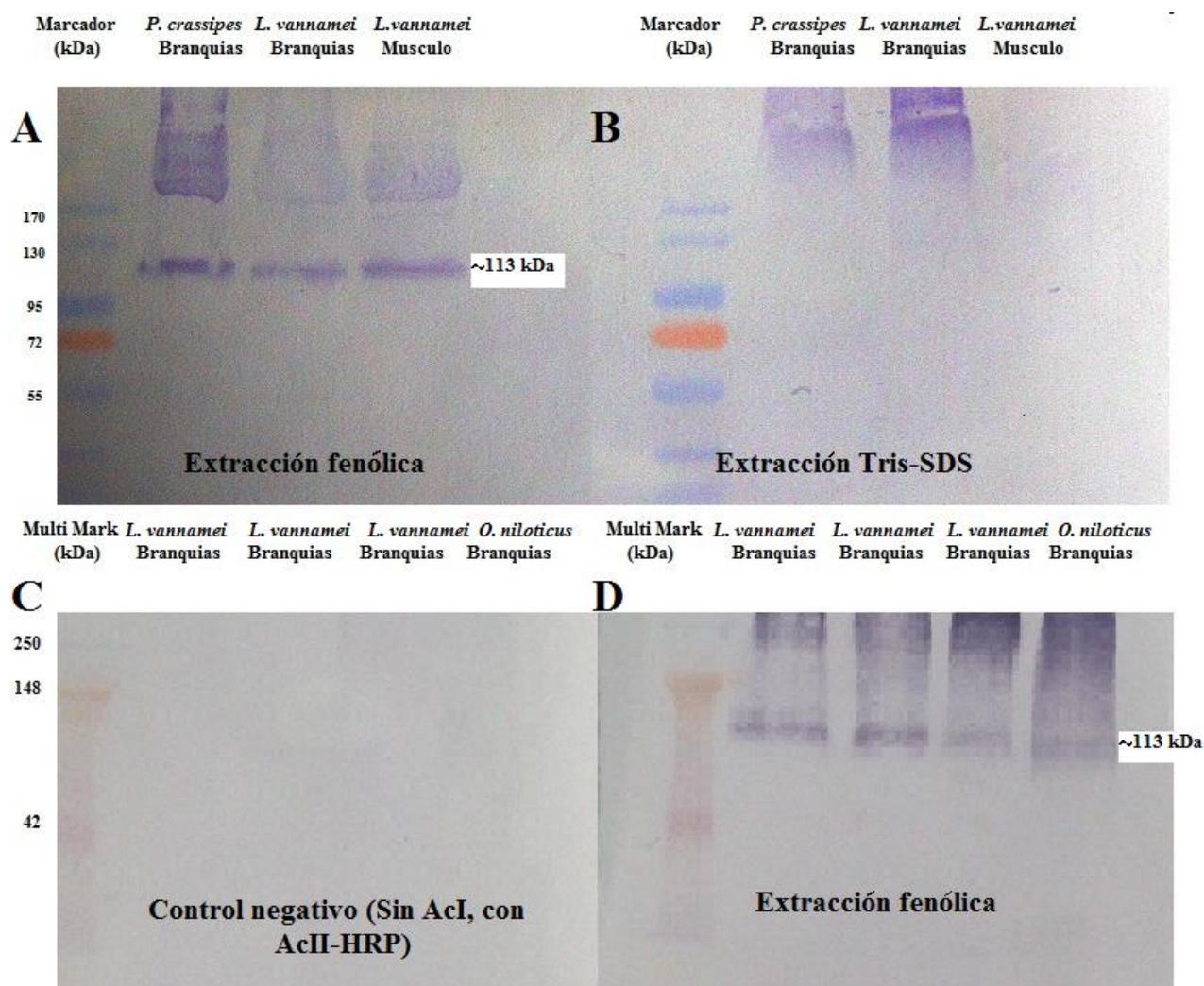


Figura 9. Expresión proteica de la ATPasa de Na^+/K^+ mediante Western blot de tejido branquial y muscular de *Litopenaeus vannamei* utilizando dos métodos de extracción distintos y el anticuerpo monoclonal Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* diluido a 1:40 en solución bloqueadora. Se observan interacciones inespecíficas con proteínas o agregados de proteínas no identificadas de alto peso molecular en los dos métodos de extracción. El marcador de peso molecular es de Fermentas® (A y B) o de Invitrogen® (C y D). A, Extracción fenólica de branquias y músculo de *Pachygrapsus crassipes* y *Litopenaeus vannamei*; B, Extracción Tris-SDS de branquias y músculo de *Pachygrapsus crassipes* y *Litopenaeus vannamei*; C, Control negativo sin Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*, pero con AcII-HRP; D, Extracción fenólica de branquias de *Litopenaeus vannamei* y *Oreochromis niloticus*.

IX.6 Evaluación de reactividad de Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* y el Anti-ANK 1211/1212 de *Litopenaeus vannamei* mediante Dot blot.

Los dot blot arrojan un marcaje positivo para los dos anticuerpos primarios anti-ANK probados. El marcaje con el anticuerpo monoclonal Ac $\alpha 5$ es más intenso que el del anticuerpo policlonal Ac 1211/1212 (Figura 10 B y D). Las membranas con el sistema de anticuerpos para Ac 1211/1212 presentan cierto marcaje inespecífico y más ruido de fondo debido al anticuerpo secundario (Figura 10C y D).

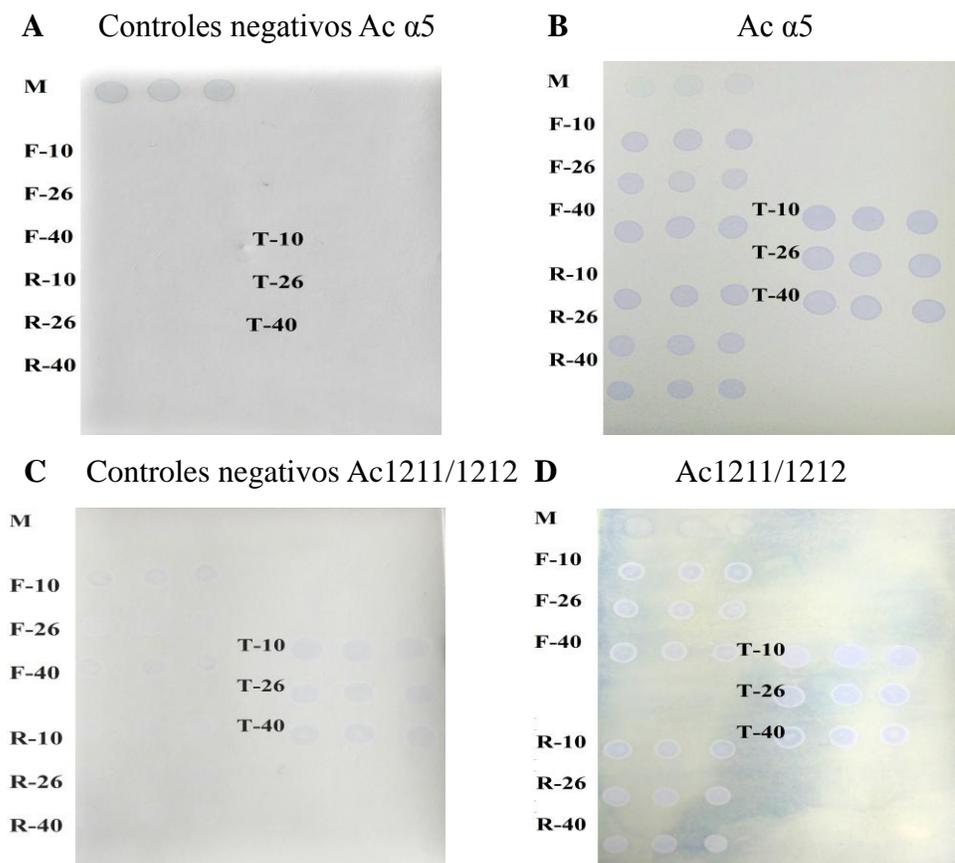


Figura 10. Expresión proteica de la ATPasa de Na^+/K^+ mediante Dot blot sobre membranas de nylon de extracciones de proteína total de branquias de camarón aclimatados a 10 psu, 26 psu, o 40 psu, extraídas por tres métodos diferentes. Extracción fenólica de proteínas branquiales aclimatadas a 10 psu (F-10), 26 psu (F-26) y 40 psu (F-40), extracción directa en RIPA-Urea de proteínas branquiales de organismos aclimatados a 10 psu, (R-10), 26 psu (R-26) y 40 psu (R-40), y extracción directa en Tris-SDS de proteínas branquiales aclimatados a 10 psu (T-10), 26 psu (T-26) y 40 psu (T-40). (M) Marcador de Western blot de Genscript® como control positivo. A, Control negativo sin anticuerpo primario Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* con anticuerpo secundario AcII-FITC; B, Experimento con anticuerpo específico para la ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus*; C, Control negativo sin anticuerpo primario Anti-ANK 1211/1212 de *Litopenaeus vannamei* con anticuerpo secundario; D, Experimento con anticuerpo específico para la ANK de *Litopenaeus vannamei*.

IX.7 Inmunolocalización celular de la ANK con Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* y Anti-ANK de *L. vannamei* 1211/1212

Los resultados de inmunofluorescencia en branquias de *Pachygrapsus crassipes*, que se usa como control positivo para el Ac $\alpha 5$, dieron marcaje esperado para el Ac $\alpha 5$ (Figura 11B). El marcaje se localiza adentro de las lamelas, en el epitelio basolateral, como se esperaba para esta especie. Con el Ac 1211/1212 no se observó marcaje (Figura 11D), por lo que este organismo no puede funcionar como control positivo para el Ac 1211/1212. No hubo señal de la ANK con Ac $\alpha 5$ en controles negativos (Figura 11A y C). Los resultados en tejido branquial de *L. vannamei* con Ac $\alpha 5$ revelaron un patrón de expresión ubicuo en el epitelio basolateral de las lamelas y los filamentos de las branquias (Figura 12B, D, E).

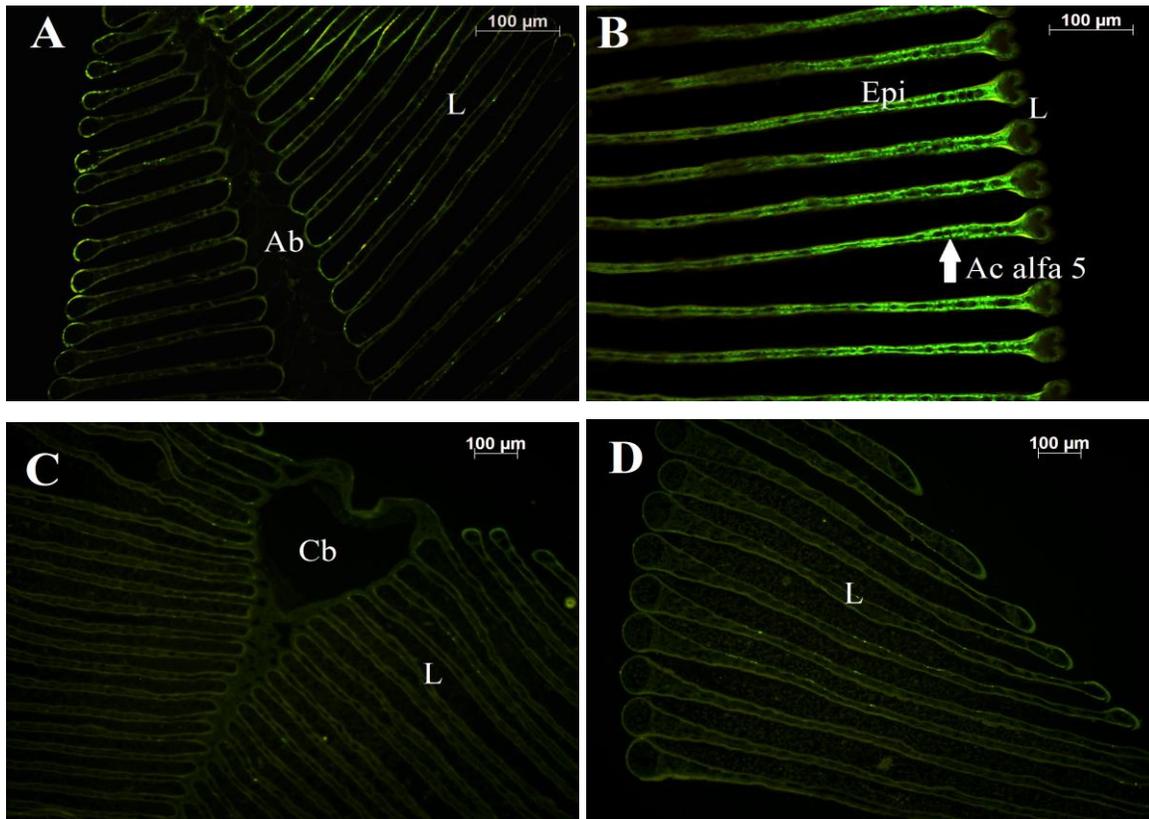


Figura 11: Inmunolocalización celular de la ATPasa de Na^+/K^+ en branquias de *Pachygrapsus crassipes* marcadas con Anti-ANK de *Litopenaeus vannamei* (Ac 1211/1212) y Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* con sus anticuerpos secundarios, anti-IgG vinculado con FITC. A, Control negativo sin Ac $\alpha 5$, con AcII-FITC; B, Tejido de branquias de *P. crassipes* marcado con Ac $\alpha 5$ y anticuerpo secundario vinculado con FITC. C, Control negativo sin anticuerpo primario Ac 1211/1212, con anticuerpo secundario con FITC. (D) Tejido de branquias de *P. crassipes* marcado con Ac 1211/1212 y anticuerpo secundario vinculado con FITC. Notar marcaje intenso con Ac $\alpha 5$ y falta de fluorescencia con Ac 1211/1212. Branquias de *P. crassipes* demostrando marcaje con Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* en epitelio. F, filamento; L, lamela; Cb, conducto branquial; Epi, epitelio; Ab, arco branquial.

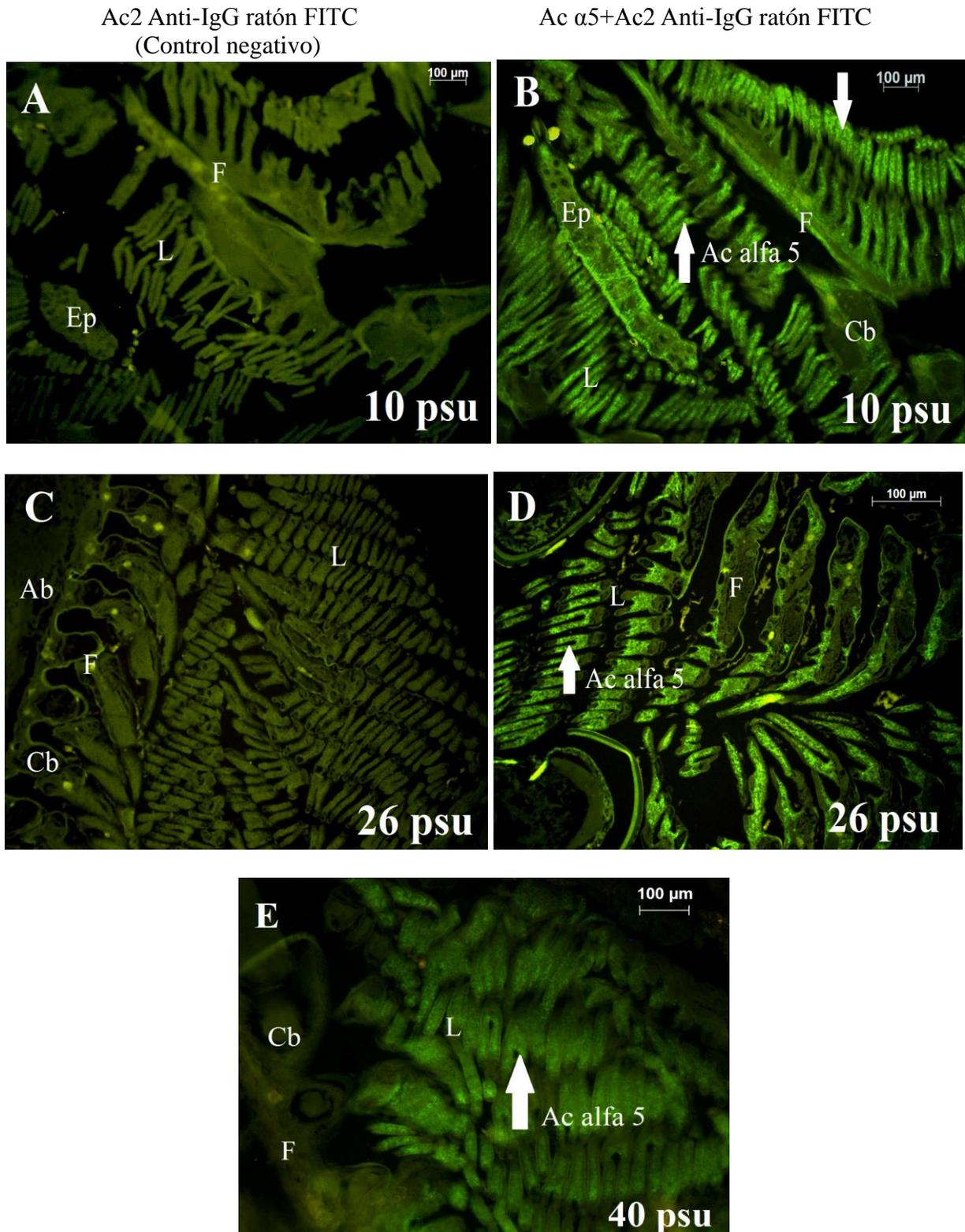


Figura 12. Inmunolocalización en branquias de *Litopenaeus vannamei* utilizando el Ac $\alpha 5$ de *Gallus gallus*. A, C controles negativos sin Ac $\alpha 5$, solo AcII-FITC. B, D y E muestras con Ac $\alpha 5$ y AcII-FITC. Camarones aclimatados a diferentes salinidades: A y B, a 10 psu; C y D a 10 psu; E y F a 26 psu; G a 40 psu. F, Filamento; L, lamela; Cb, Conducto branquial; Ep, epipodito; Cu, Cutícula. La flecha indica la fluorecencia distribuida de manera ubicua en todo el epitelio.

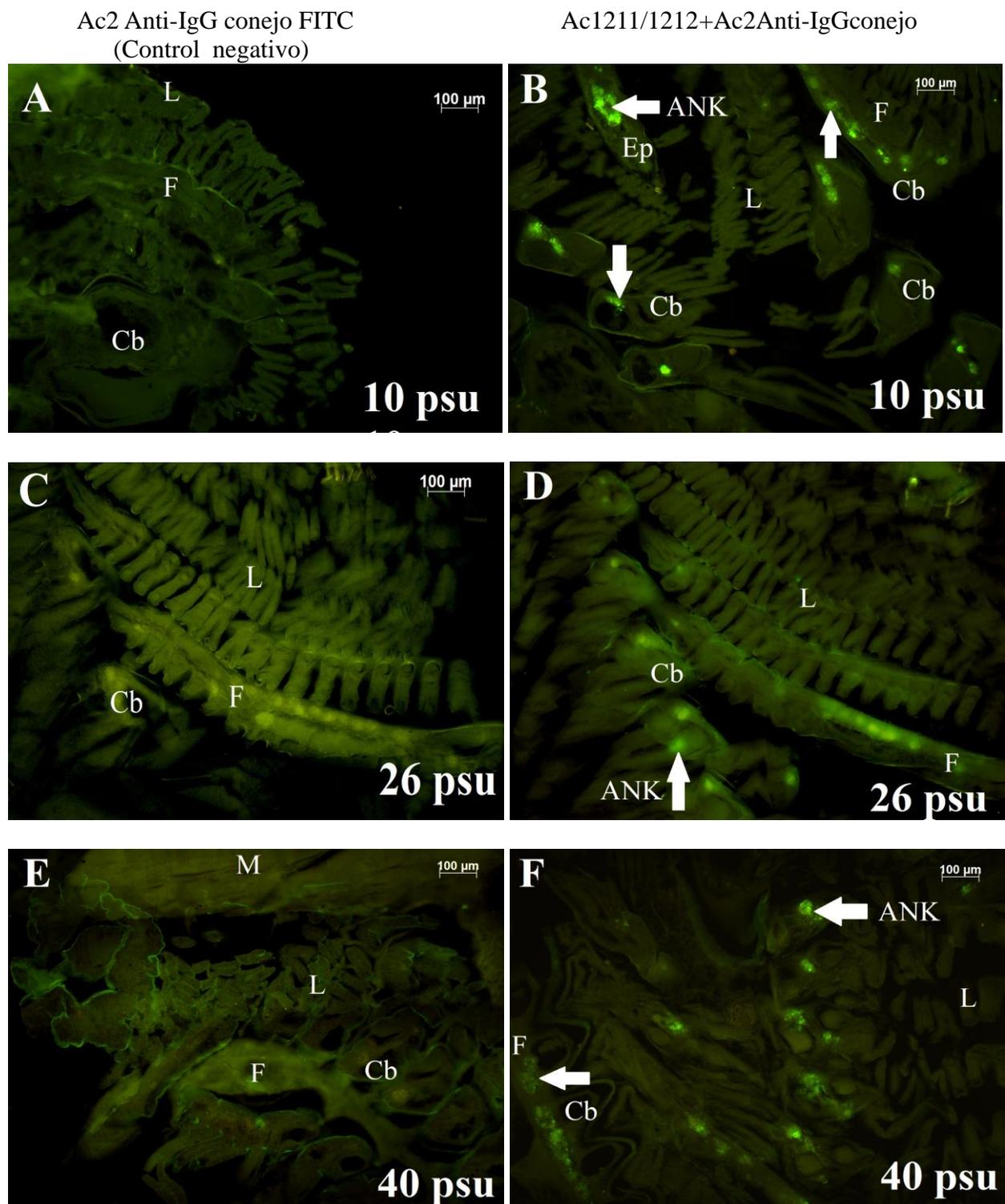
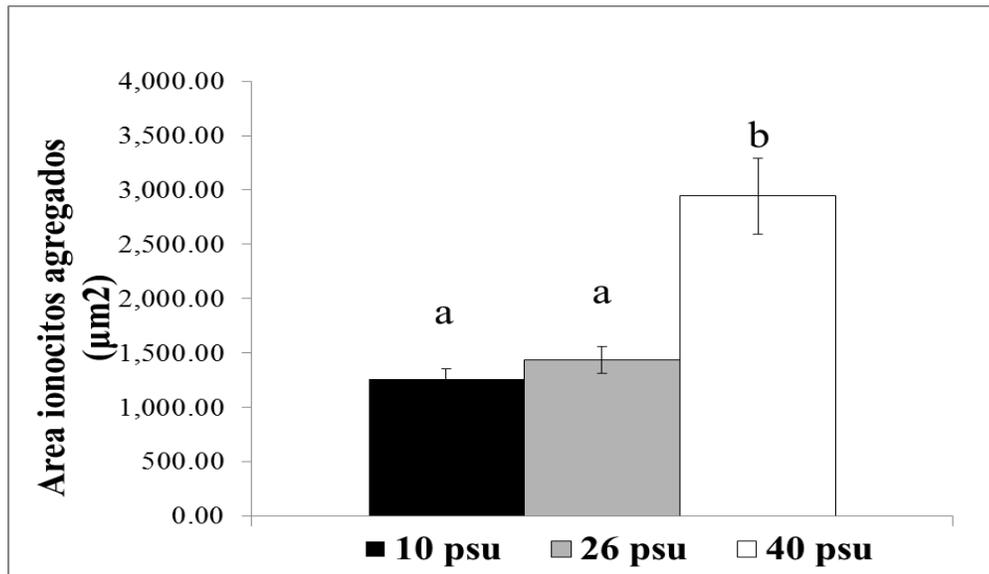


Figura 13. Inmunolocalización celular de la ATPasa de Na^+/K^+ en branquias de *Litopenaeus vannamei* utilizando el anticuerpo primario Anti-ANK 1211/1212. A, C, y E Controles negativos, sin anticuerpo primario. B, D y E con anticuerpo primario y secundario. Camarones aclimatados a diferentes salinidades: A y B a 10 psu; C y D a 26 psu; E y F a 40 psu. Ep, epipodito; L, lamela; Cb, Conducto branquial; CbA, conducto branquial aferente; CbE, conducto branquial eferente; F, filamento. La flecha indica la fluorescencia distribuida en estructuras globulares ovaloides in filamentos y epipoditos.

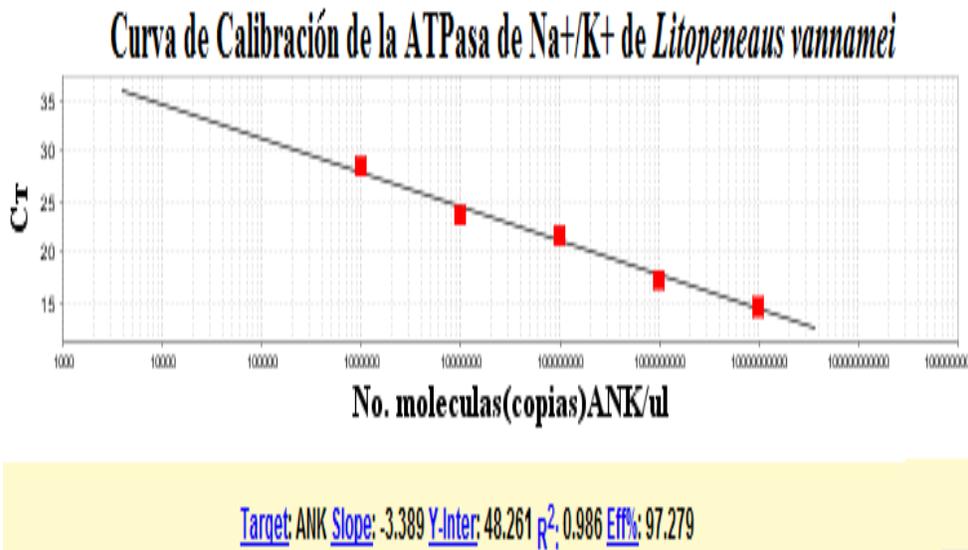
Los resultados con el anticuerpo sintetizado *de novo* Ac 1211/1212 revelan falta de marcaje en controles negativos (Figura 13^a, C y E) y expresión positiva localizada de la ANK en estructuras globulares y ovaloides con un rango de áreas de 719 a 3226 μm^2 entre las tres salinidades. Los ionocitos de *L. vannamei* se detectaron exclusivamente en los filamentos y los epipoditos de las branquias (Figura 13 B, D, F) con marcaje más intenso a 10 psu y 40 psu, y muy ligero a 26 psu. A 40 psu se presentó un marcaje mas disperso, ocupando áreas significativamente más amplias en comparación a 10 y 26 psu. Hubo diferencias significativas en tamaño entre las salinidades con 95% de confianza demostradas por la prueba Mann-Whitney. A 10 y a 26 psu el tamaño es igual, con medianas de 1265.2 y 1437.01 μm^2 , respectivamente. A 40 psu cambió el patrón de expresión y el tamaño del área que ocupa (mediana de 2942.3 μm^2) (Tabla 10).

Tabla 10. Tamaño de las estructuras (posiblemente ionocitos) identificadas con el Ac 1211/1212 en cada salinidad. Medidas se hicieron con el programa Axiovision[®] (versión 4.7). Diferencias en tamaño entre las salinidades detectadas por prueba Mann-Whitney, con $\alpha=5\%$ designadas con letras en la gráfica (n=10). Barras en la gráfica indican error estándar.



	10 psu	26 psu	40 psu
n	10	10	10
Mediana (μm^2)	1265	1437	2942
Promedio (μm^2)	1231	1378	2954
desviacion estándar (μm^2)	273	391	1103
error estándar (μm^2)	86	124	349

A)



B)

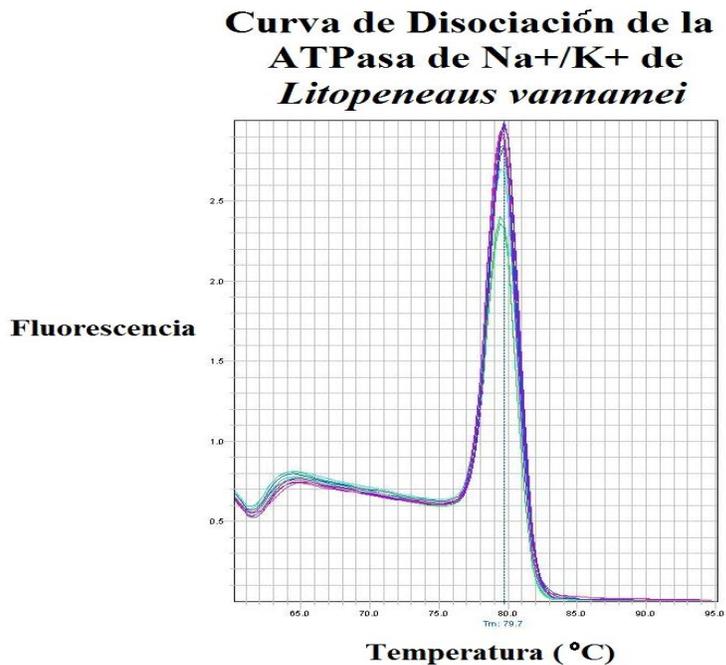


Figura 14. Estandarización del PCR en tiempo real para la ATPasa de Na⁺/K⁺. Curva de calibración (A) y curva de fusión (B). Se obtuvieron valores de eficiencia de amplificación %Ef=97.3 y pendiente de la recta $m=-3.389$ y un $R^2 = 0.986$ calculados por el programa StepOne Software, versión 2.2.2®, Notar la especificidad de PCR por solo un producto PCR con un Tm (temperatura de deshibridización de las cadenas de ADN) de 79.85 °C.

IX.8 Niveles de expresión de transcritos de la ANK en camarones aclimatados a diferentes salinidades y temperaturas.

Los niveles de transcripción de la ANK, se calcularon de manera absoluta de acuerdo a la curva estándar preparada diluyendo el plásmido con el inserto del gen. Se obtuvieron valores de eficiencia de amplificación (%Ef=97.3) y pendiente de la recta ($m=-3.389$) dentro del rango establecido por el fabricante para hacer válido el ensayo de cuantificación (% Ef recomendado: 92 a 100% y m entre -3.3 a -3.6) respectivamente. También se obtuvo un solo producto amplificado, único y específico para la ANK de acuerdo con las curva de fusión ($T_m=79.85$) (Figura 14).

Los niveles de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ presentaron diferencias de acuerdo a la salinidad y la temperatura estudiadas. En la Figura 15 se observa que la ANK se expresó mas fuertemente a 10 psu en todas las temperaturas (Figura 15 A, C, D, E y F) excepto a 23 °C (Figura 15B) donde presentó sus niveles de expresión mas bajos. Notamos que en general el número de copias es mayor a 40 psu que a 26 psu. Cabe destacar que a 23 °C el número de copias de la ANK se incrementó hasta un maximo a 40 psu (Figura 15B) mientras que a 29 °C el patrón fue inverso con el valor mínimo a 40 psu (Figura 15D).

Tomando en cuenta la mediana de todas las temperaturas por cada salinidad estudiada (Figura 15F), se evidencia un incremento estadísticamente significativo de 108% en el nivel de transcritos de la ANK a 10 psu comparado con el nivel a la salinidad cercana al nivel del punto iso-osmótico (26 psu) y del 76.4% comparando con el nivel a 40 psu.

Tanto la prueba Z para valores extremos como análisis de rangos de cuartiles detectaron un valor extremo, el mismo en las dos pruebas. Este valor extremo consiste en una de las tres réplicas de la condición 40 psu y 20 °C. Para el análisis de los datos, se realizaron pruebas de normalidad, estas confirman la normalidad tanto de los datos crudos como de los datos con un valor extremo removido considerando $n=15$ para estas pruebas. Los datos son Gaussianos (normales) con 95% de probabilidad para las medianas y promedios de cada condición ($n=15$), por lo que se utilizaron pruebas paramétricas, las cuales son en general más precisas que las no paramétricas (Kitchen, 2009). La correlación Pearson entre los promedios de las réplicas y las medianas de las réplicas es de 0.958, lo cual indica que estos dos valores son prácticamente iguales para estos datos, por lo que

se utilizaron las medianas para elaborar los datos en las gráficas.

La prueba de Anderson-Darling dio un valor de A cuadrado de 0.589, para los promedios, con un p-valor de 0.104 para los promedios de cada tratamiento experimental. La prueba de Ryan-Joiner dio un valor de 0.961, con un p-valor > 0.1. La hipótesis nula para estas dos pruebas es que los datos son normales. El hecho de que los datos p-valor son mayores a 0.05 indica aceptación de la hipótesis nula.

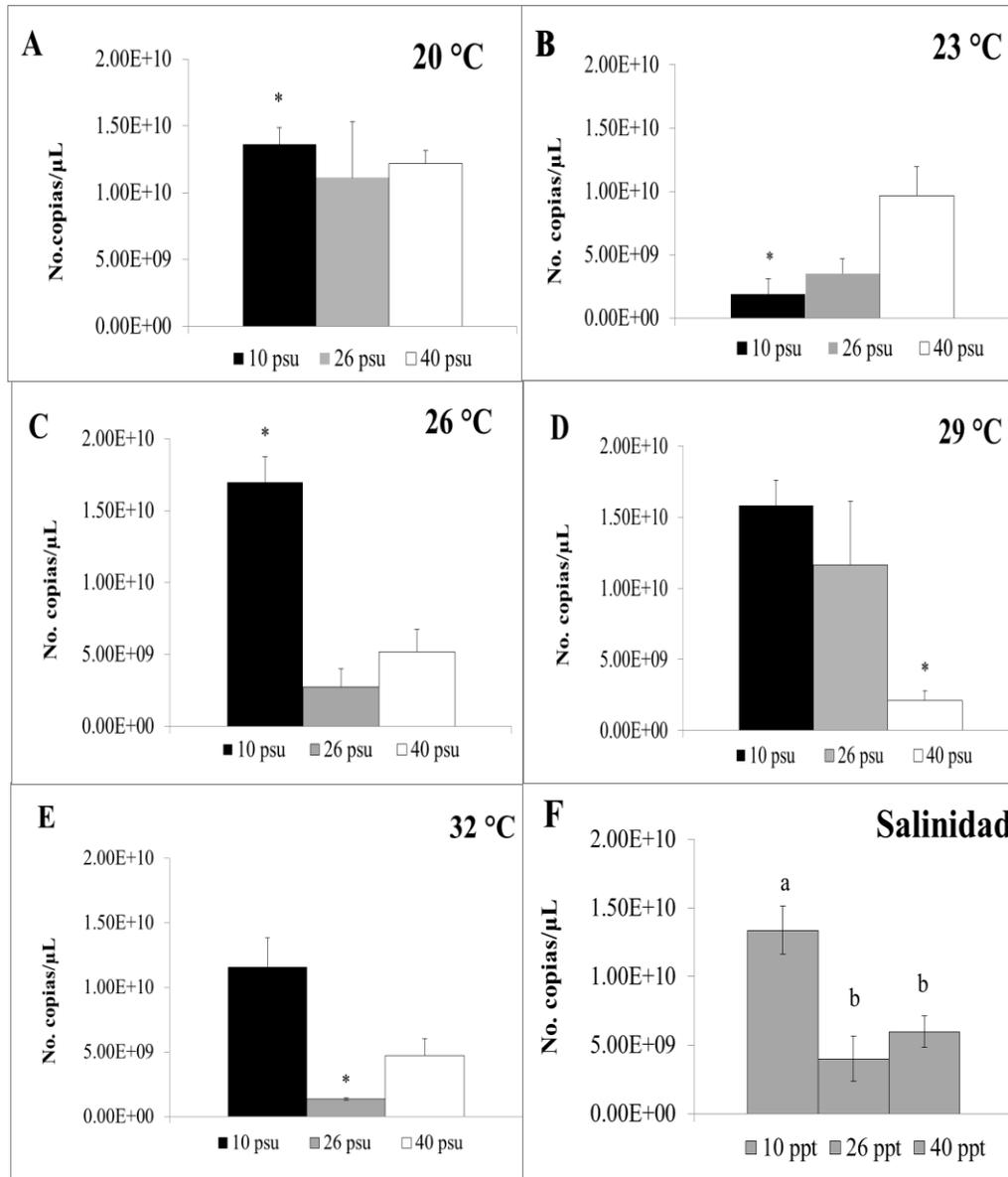


Figura 15. Expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en branquias de *Litopenaeus vannamei* aclimatado a diferentes niveles de salinidad (10, 26 y 40 psu) y temperatura (A) 20°C, (B) 23°C, (C) 26°C, (D) 29°C y (E) 32°C. Se grafican las medianas de temperaturas por cada salinidad. Valores significativos (prueba t-student) se indican con un asterisco (n=3, alfa =5%). Las pruebas t para contrastes multiples se utilizaron para la grafica (F), con $\alpha=5\%$, y diferencias significativas se indican con letras. Las barras indican error estándar.

Al graficar los datos agrupandolos por salinidad (Figura 16), corroboramos que los mayores niveles de expresion de la ANK ocurrieron a 10 psu en todas las temperaturas excepto a 23 °C (Figura 16A). En la salinidad cercana al punto iso-osmótico (26 psu) resaltan incrementos en el numero de transcritos a 20 y 29 °C presentandose los valores mas bajos a 32 °C (figura 16B). La salinidad a 40 psu refleja un claro patrón en forma de “U” con valores mayores en las temperaturas extremas (20 y 32 °C) y el minimo a 29 °C (Figura 16 C). El promedio de todas las salinidades por cada temperatura revela un aumento significativo del 113.6% de expresi3n de la ANK a 20 °C con respecto a la de 23 y 32 °C y del 55.3% en relaci3n a la de 26 y 29 °C (Figura 16D).

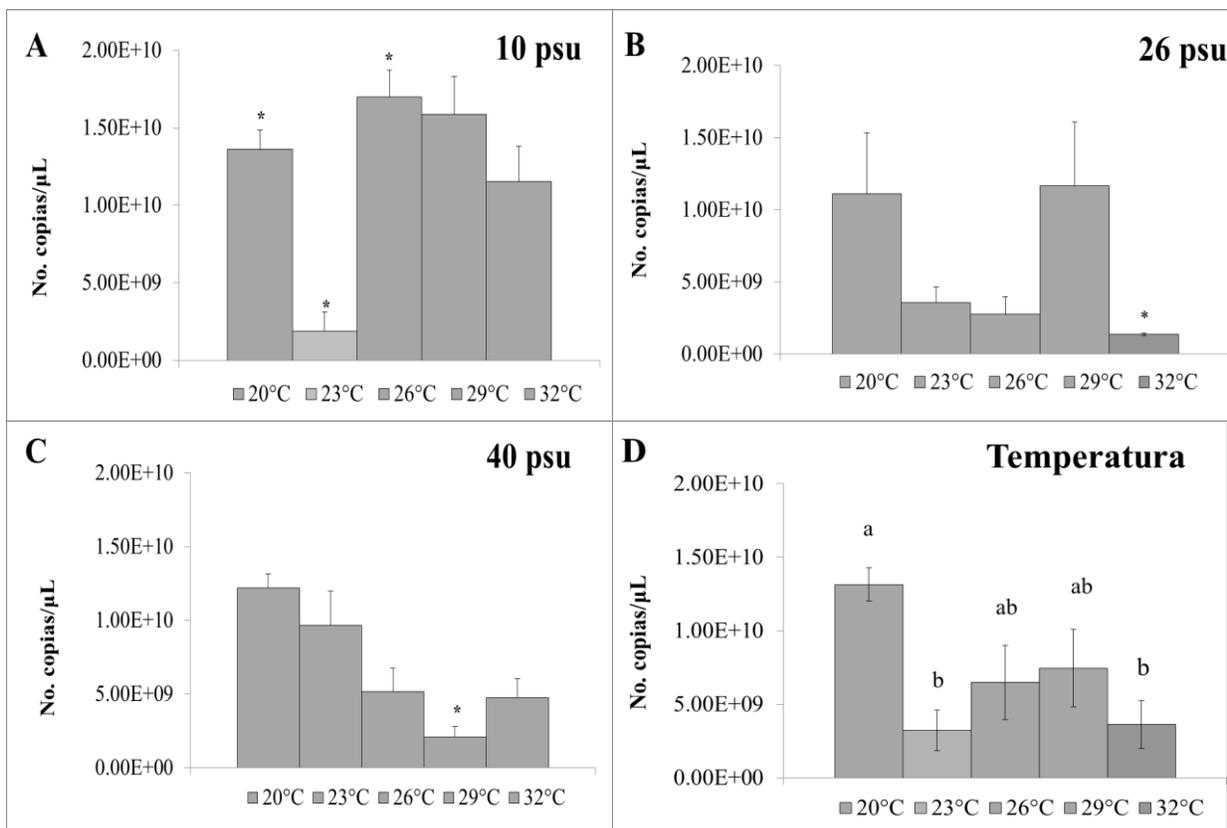


Figura 16: Niveles de expresi3n de la ATPasa de Na⁺/K⁺ por PCR en tiempo real en branquias de camar3n aclimatado a: (A) 10 psu, (B) 26 psu y (C) 40 psu y a temperatura variable de 20, 23, 26, 29 y 32 °C. Se grafican las medianas de todas las salinidades probadas. Los valores significativos tienen un p-valor <0.05 ($\alpha=5\%$). Las barras indican error est3ndar. Valores significativos (prueba t-student) se indican con un asterisco (n=3, alfa =5%). Las pruebas t para contrastes multiples se utilizaron para la gr3fica (D), con $\alpha=5\%$, y diferencias significativas se marcaron con letras. Las barras indican error est3ndar.

X. Discusión:

Con la secuencia de la ANK de *L. vannamei* secuenciada con este trabajo (No. de acceso NCBI Genbank JQ996559.2) se seleccionaron los epítomos para sintetizar el anticuerpo Anti-ANK 1211/1212. La secuencia nucleotídica (1110 pb) se conserva entre diferentes especies, tiene una similitud de 73% con todas las secuencias (102) disponibles en Genbank de NCBI-BLAST. Entre camarones, se conservó al 98-99%. Entre crustáceos en general, se conservó al 82-99%. Se conservó altamente entre las isoformas de *D. rerio* disponibles en Genbank, al 87% con la isoforma de la ANK de *D. rerio* atp1a1 (NM131686), y atp1a2 (NM 131683.1). Dos isoformas similares fueron detectadas por Liao et. al., (2009) en ionocitos en la piel de *D. rerio*, lo cual aumenta la posibilidad que el anticuerpo nuevo Ac 1211/1212 está detectando la ANK de una manera altamente específica en ionocitos de branquias de *L. vannamei*. En cuanto la secuencia peptídica que se obtuvo con este trabajo (AFN 40437.2), tuvo un nivel de conservación de 72% a través de todas las especies secuenciadas hasta ahora. Entre crustáceos el nivel de conservación es de 93-99%, un nivel más alto en comparación con el nivel de conservación de la secuencia nucleotídica, lo cual indica que la mayoría de mutaciones entre estas especies son silenciosas.

Los resultados del Western blot usando el anticuerpo Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* dieron resultados positivos para una proteína dentro de un rango de tamaño de 95-130 kDa, lo que corresponde al tamaño esperado de la ANK de 113 kDa. Sin embargo, dentro de este rango también caen otras proteínas transmembranales como la ATPasa de H^+/K^+ y la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) La extracción fenólica fue el método de extracción más eficiente para exponer el epítomo al anticuerpo ya que con Tris-SDS no se detecta la enzima por Western blot. Siendo una proteína transmembranal y altamente hidrofóbica, se requieren detergentes más eficientes como el deoxicolato sódico para solubilizarla. La adición de deoxicolato sódico junto con urea ayuda a solubilizar proteínas de una manera más fervorosa, lo cual se probó en el método del dot blot con extracción RIPA-Urea (Ngoka L.C.M , 2008). Se detectaron interacciones inespecíficas de alto peso molecular o agregados de proteínas en todas las membranas marcadas con el Ac $\alpha 5$ en el Western blot que no se pueden identificar porque no se conoce el epítomo exacto de este anticuerpo, pudiendo ser agregados de la ANK o bien otras proteínas con epítomo similar. El transportador de H^+/K^+ (AHK) y de Ca^{2+} (SERCA) tiene casi exactamente el mismo peso molecular que la ANK, midiendo 114 kDa y 110 kDa respectivamente, por lo tanto pudiera ser uno de estos transportadores el que se está detectando. El transportador de Ca^{2+} (PMCA) mide de 129-135 kDa, y el hecho de que se encontró marcaje en

músculo de *L. vannamei* aumenta las posibilidades de que sea PMCA o SERCA. Los agregados puede que ocurran por interacciones de la ANK o la AHK con otras proteínas citoesqueléticas. Está documentado que la tubulina acetilada se vincula químicamente con la ANK, formando un agregado de 250-400 kDa que se puede purificar con cromatografía de exclusión molecular. La tubulina acetilada es importante porque funciona como el “motor” de tráfico de moléculas en las células (Zampar et.al., 2009). Dado el alto nivel de conservación entre la ANK y la AHK (65%) (Jaisser y Beggah, 1999) es muy factible que la AHK también se vincule de la misma manera. Está reportado que tanto la AHK, como la ANK y la ATPasa de Ca^{2+} se vinculan con la tubulina. Siendo transmembranales, los transportadores de tipo P son altamente hidrofóbicos, por lo que, en solución polar, tienden a formar agregados resistentes al SDS en SDS-PAGE (Sagné et.al., 1996) por lo que cabe mencionar que esto puede ser lo que está causando los agregados en el Western blot.

El Western blot con Ac1211/1212 no reveló resultado con las condiciones que se utilizaron para el Western con Ac $\alpha 5$. Se probó el experimento con el protocolo exactamente igual al de Ac $\alpha 5$ con Ac 1211/1212 y no se observaron bandas de ni una forma en la membrana. El protocolo del Western blot se pudiera cambiar y optimizar con membranas de nitrocelulosa, sin embargo, viendo los niveles de expresión por inmunofluorescencia, puede ser que la expresión basal es muy baja para ser detectada por Western blot. El hecho de que con Ac $\alpha 5$ se haya detectado la banda que se detectó sugiere menos especificidad para una sola proteína en crustáceos. Se debe señalar que el anticuerpo Ac $\alpha 5$ se utilizó en Western blot de proteínas aisladas de branquias del crustáceo *Callinectes sapidus* con resultados indicando el marcaje de dos proteínas de peso molecular 113 kDa y 131 kDa (Lovett et. al., 2006). Esto indica que Ac $\alpha 5$ no detecta sólo una proteína, sino distintas proteínas y el peso de la proteína midiendo 131 kDa se acerca al peso esperado de PMCA (~130 kDa).

Los resultados del dot blot demostraron reactividad en todas las extracciones usando Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* ya que el control negativo no presentó marcaje o interacciones inespecíficas con el anticuerpo secundario. Ésto se espera de un anticuerpo monoclonal, por el método de producirlos, que no incluye contaminación con proteínas de suero, como suele suceder con los anticuerpos policlonales, que sí se aíslan del suero. El hecho de que el Western blot no reveló la banda esperada de 113 kDa con la extracción de Tris-SDS, y que en el dot blot sí hubo marcaje con el Ac $\alpha 5$ mediante extracción con Tris-SDS sugiere que este anticuerpo está detectando varias proteínas del camarón. Resta verificar si efectivamente se trata de la ANK o bien de otras proteínas de igual o mayor peso molecular y con alta similitud peptídica, como la AHK, que tiene un peso

molecular esperado de 114 kDa; la PMCA, que tiene peso esperado de ~130 kDa o la SERCA, que tiene peso esperado de ~110 kDa.

Para el anticuerpo Anti-ANK 1211/1212 también hubo reactividad por dot blot, pero más tenue. Hubo interacciones inespecíficas en el control negativo para las extracciones fenólicas y la extracción con Tris-SDS relacionadas con el anticuerpo secundario, así como “ruido de fondo” (tinción inespecífica) en la membrana nylon. Se pueden optimizar tanto el dot blot como el Western blot con membranas de nitrocelulosa para el anticuerpo Ac1211/1212, o bien utilizar un anticuerpo secundario hecho en chivo u otro animal para evitar este problema. La única extracción que resultó con menores interacciones inespecíficas fue la extracción directa en RIPA-Urea, la cual incluye deoxicolato sódico y urea. Se recomienda ésta extracción por su sencillez y eficiencia en futuros experimentos de Western y dot blot con el nuevo anticuerpo Anti-ANK de *L.vannamei* 1211/1212. El hecho de que no se detectó marcaje fuerte en el dot blot para el Ac1211/1212 indica que hay un nivel bajo de expresión de la proteína, lo cual puede explicar el porqué no se pudo detectar mediante Western blot (resultados no presentados).

Los anticuerpos (Ac) son proteínas producidas por el sistema inmune para reconocer algún microorganismo o algún agente extraño invadiendo un organismo y funcionan mediante una interacción análoga a un candado y una llave. Como los Ac están hechos con alta especificidad por un epítipo, teóricamente cualquier diferencia en su secuencia puede resultar en falta de reconocimiento hacia la proteína de interés (en este caso la ANK). Como aún no se conoce el epítipo del Ac $\alpha 5$ no se tiene la certeza que se está detectando exclusivamente la ANK. El anticuerpo Ac $\alpha 5$ está marcando una proteína que se encuentra en el epitelio de las branquias. Es posible que Ac $\alpha 5$ reconozca varias isoformas de la ANK, o inclusive el transportador H^+/K^+ , (AHK) o una ATPasa de Ca^+ , de la cual su subunidad α también se ha reportado que es muy similar a la subunidad alfa de la ATPasas de Na^+/K^+ (Morth et. al., 2007). De éstos transportadores proteicos se espera un patrón de expresión similar, que consiste en expresión en las branquias porque algunos de ellos se han encontrado en ionocitos en peces o elasmobranquios (Hwang, 2009; Kazerouni y Khodabandeh, 2011; Choe et. al., 2004) y las estructuras en general son altamente conservadas.

La única forma de determinar con precisión el epítipo de anticuerpos monoclonales como Ac $\alpha 5$ o H300 o el de cualquier anticuerpo monoclonal donde no se use péptidos pequeños para producir los anticuerpos es haciendo un estudio detallado como el que hizo Geysen (1984), donde se

sintetizaron 208 posibles hexapéptidos (traslapados en un aminoácido) de una secuencia viral (VP1 de FMDV) de 213 aminoácidos, y cada péptido se analizó por ELISA para determinar el epítipo de anticuerpos policlonales hechos hacia el virus entero. En el estudio de Geysen se determinó que dentro de las 213 secuencias solo una secuencia (un hexapéptido) reaccionó con los anticuerpos policlonales, y dentro del hexapéptido, solo 2 aminoácidos resultaron absolutamente necesarios para la interacción con los anticuerpos, que en este caso eran anticuerpos policlonales hechos con el virus inactivado entero.

Los modelos proteicos ayudan a comprender si la secuencia como la estructura se conserva en las zonas que se escogieron para sintetizar el péptido y producir el Ac 1211/1212 (del extremo 5' de la ANK) encuentran homologías entre estructura y secuencia con estructuras de proteínas ya resueltas por medio de cristalografía con rayos X. Aparte, con solo un cambio de secuencia de aminoácidos puede cambiar completamente la estructura terciaria. Los modelos que se realizaron para las estructuras de los epítopos de transportadores que corresponden a los aminoácidos 615-750 de la ANK de *Gallus gallus*, corroboran la idea que tanto la secuencia como la estructura del epítipo conocido de Ac $\alpha 5$ están altamente conservadas a través de especies y a través de transportadores de iones de tipo P. Estos modelos también revelan la falta de conservación en estructura de los primeros 100 aminoácidos del extremo terminal N.

El consenso en la literatura hasta ahora es que la expresión proteica de la ANK no ocurre en estructuras globulares u ovaloides que se consideren ionocitos en crustáceos porque han estado utilizando el anticuerpo Ac $\alpha 5$. Sin embargo, esto es contradictorio a los experimentos de inmunofluorescencia con Ac $\alpha 5$ en peces como el salmón *Salmo trutta caspius* (Kazerouni y Khodabandeh, 2011) o en tilapia *Oreochromis mossambicus*, (Tang et. al., 2008) y en el pez *Sparus aurata* (Bodinier et. al., 2010), los cuales indican que la expresión detectada por Ac $\alpha 5$ ocurrió en células de las branquias que podrían interpretarse como ionocitos. Interesantemente, los ionocitos en peces reportados por estos autores con el Ac $\alpha 5$ se encuentran mayormente en los filamentos, tal como se encontró con el Ac1211/1212 en branquias de *L. vannamei*. Sin embargo en peces también se vio marcaje en el epitelio de las lamelas, lo cual no se encontró con Ac1211/1212 en epitelio de lamelas de *L.vannamei*. Los datos de la literatura demuestran patrones de expresión completamente diferentes en peces y crustáceos, lo cual sugiere que el anticuerpo Ac $\alpha 5$ de *G. gallus* puede estar reconociendo proteínas distintas entre ellos. El sitio donde se encuentra el epítipo (aminoácidos 615-750) incluye regiones muy conservadas tanto entre las ANK de vertebrados e invertebrados

como entre otros transportadores como la ATPasa de H^+/K^+ y la ATPasa de Ca^{2+} (PMCA o SERCA).

El Ac 1211/1212 no reaccionó con tejido de *Pachygrapsus crassipes*, un crustáceo decápodo cuyas branquias se utilizaron para verificar funcionamiento del Ac $\alpha 5$, porque es filogenéticamente muy similar a *Pachygrapsus marmoratus*, el cual ha sido usado como control positivo en otros estudios (Khodabandeh et. al., 2005a). El marcaje con Ac $\alpha 5$ en *P. crassipes* se presentó en las lamelas, a nivel del epitelio basolateral tal como ha sido reportado. Sin embargo, no hubo marcaje en el filamento ni en las lamelas con Ac 1211/1212, lo cual indica alta especificidad del anticuerpo para la ANK de *L. vannamei*. Se esperaba ver marcaje en *P. crassipes* porque el segundo epítipo se escogió e inyectó en conjunto con el primero en parte para que reaccionara con otros crustáceos. La secuencia del segundo epítipo en *Pachygrapsus marmoratus*, (que es del mismo género que *Pachygrapsus crassipes*) que sí se conoce (# de Genbank DQ173925.2), es similar a la ANK de *L. vannamei*. Sólo existe un aminoácido diferente entre estas dos secuencias. La estructura terciaria de los dos epítipos de Ac 1211/1212 es distinta entre *P. marmoratus* y *L. vannamei*, que, junto con la diferencia en la secuencia de aminoácidos, puede estar impidiendo que el Ac 1211/1212 reaccione con la ANK de *P. crassipes*.

El Ac $\alpha 5$ requiere de calentamiento del tejido en portaobjetos para mejor marcaje en *L. vannamei*. Esto indica que se requiere desnaturalizar la proteína que está detectando el anticuerpo Ac $\alpha 5$, lo cual tiene la desventaja de exponer los tejidos a que se despeguen y se destruyan durante el procesamiento. De hecho esto ocurrió con varias de las muestras que se utilizaron en este trabajo. El extremo terminal N como epítipo tiene la ventaja de ser normalmente una región expuesta, y los anticuerpos se vinculan más fácilmente a regiones expuestas. Para el protocolo del nuevo anticuerpo Ac1211/1212, no fue necesario calentar los cortes montados en los portaobjetos, eliminando un paso que puede resultar en pérdidas de muestras escasas.

En organismos poco caracterizados como *Litopenaeus vannamei*, no se han descrito ionocitos con marcadores proteómicos hasta ahora. Estos resultados sugieren que la proteína marcada con el nuevo anticuerpo dirigido hacia el extremo N de la ANK de *L. vannamei* (Ac1211/1212) se localiza en ionocitos, especialmente alrededor de los conductos branquiales. La ANK, localizada con el anticuerpo diseñado y sintetizado *de novo* en este trabajo (Ac 1211/1212) se presentó únicamente en estructuras ovaloides que pudieran ser ionocitos, alrededor de los conductos branquiales. A 10 psu los ionocitos se ven compactos, con marcaje intenso. A 26 psu apenas se logró detectar marcaje, y a

esta salinidad en general hubo muy baja densidad de marcaje. A 40 psu se observó marcaje intenso pero, menos en comparación a 10 psu y a esta salinidad los ionocitos no forman agregados compactos como a 10 psu. Lo que se detectó con el nuevo anticuerpo Ac 1211/1212 corresponde con el patrón de expresión detectado para la expresión de las isoformas de la ANK en *D. rerio*, tipo “sal y pimienta” para la distribución estructural de los ionocitos en branquias (Liao et. al., 2009). Interesantemente, este patrón de sal y pimienta se observó en los experimentos usando el Ac 1211/1212 para marcar branquias de *Litopenaeus vannamei* con un cambio en dispersión a 40 psu que posiblemente está relacionado al papel que toman las zónulas ocluyentes en la osmoregulación en alta salinidad. Bodinier et. al. (2009) reportó un modelo de ionocitos de peces que indica que en alta salinidad, las zónulas ocluyentes entre las células se abren para permitir que salga el exceso de sodio de los tejidos. Esto tiene implicaciones en nuestro entendimiento de la función y localización anatómica de la osmoregulación. Se ha pensado que el intercambio ionico debido a la ANK ocurre en el epitelio de las lamelas branquiales, las cuales tienen contacto directo con el agua, ya sea agua de baja salinidad o de alta salinidad. Sin embargo, estas ideas se formaron debido al marcaje observado con Ac $\alpha 5$. En este trabajo no se detectaron diferencias en nivel de marcaje con Ac $\alpha 5$ en el rango de salinidades a las que fueron expuestos los camarones como se detectaron con el Ac 1211/1212 y cuyas diferencias van de acuerdo con los resultados de PCR cuantitativo. El hecho de que con el nuevo anticuerpo Ac 1211/1212 se hayan localizado ionocitos mayormente alrededor del conducto branquial eferente y en el septum entre los conductos eferentes y aferentes, indica que, en baja salinidad, los tejidos de las lamelas branquiales exportan sodio a la hemolinfa directamente a través de ionocitos en lugar de a través del epitelio basolateral para transportar sodio al resto del organismo y mantener homeostásis ionico en el organismo. En alta salinidad ocurrió una remodelación de los ionocitos indicando potencialmente un cambio en dirección de exportación de sodio celular hacia una zona más disponible a que se extruya por las zónulas ocluyentes y eventualmente hacia el agua de cultivo.

Las fluctuaciones de la expresión observadas en PCR cuantitativo de la ANK en las tres salinidades y en las 5 temperaturas, presentaron patrones diferentes debido a temperatura en la transcripción. Las temperaturas probadas representan un rango amplio de 20 a 32 °C. A 23 °C, se vio un patrón invertido, en el sentido de que hubo menos expresión a 10 psu que a 26 psu y 40 psu. Ésta temperatura parece ser una temperatura crítica y de transición para la regulación de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ para adaptación a agua fría. Puede ser que en el extremo de baja temperatura se activen varios sistemas de regulación que consisten en activación y represión

mientras se aclimata y adapta el organismo. Es evidente que la baja temperatura y salinidad cambian la dinámica de intercambios iónicos, debido al hecho que el organismo tiene que ingerir e importar iones, teniendo un efecto en el flujo de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ a través de la membrana probablemente activada por mayor expresión del NKCC o el intercambiador de Na^+ y H^+ . Está documentado que en crustáceos el intercambiador de Na^+ y H^+ , a diferencia de otros organismos que intercambian un Na^+ por cada H^+ , intercambia dos Na^+ por cada H^+ aprovechándose de los gradientes electroquímicos (Towle y Weihrauch, 2001). Sin embargo, no están estudiados estos transportadores en *L. vannamei* en extremos de salinidad o temperatura. A baja salinidad probablemente haya movimiento de Na^+ hacia el citosol de las células del organismo debido al transportador NKCC o el intercambiador de Na^+ y H^+ . Inclusive, la hormona peptídica, CHH, la cual causa un aumento en glucosa y sodio en la hemolinfa (Serrano et al., 2003; Lucu y Towle, 2003), podría estar actuando en este proceso de importar sodio al citosol. Este flujo de sodio hacia el citosol generado por los procesos mencionados y el transporte activo de sodio de las branquias hacia la hemolinfa generada por la ANK trabajan en sinérgia para mantener el volumen celular y la presión osmótica estable en un ambiente acuático de baja salinidad; A baja salinidad y temperatura la ANK se activa y expresa mayormente en los ionocitos del camarón para activamente transportar sodio del agua a la hemolinfa y surtir al resto del organismo de sodio.

Los patrones invertidos en las temperaturas antes de las extremas (23 y a 29 °C) indica que se está reprimiendo (23 °C) o activando (10 psu y 20 °C) la expresión de la ANK a nivel transcripcional por medio de factores distintos a los que las activan o degradan en las temperaturas y salinidades altas. Puede ser que exista una hormona similar a la prolactina de peces en el camarón, la cual está comprobado que inhibe la actividad de la ANK en peces (Metz et. al., 2003 y Bodinier et. al., 2010). O puede ser que a temperaturas altas simplemente se degradan los transcritos por falta de protección térmica. La regulación de la transcripción ocurre por activadores, represores, factores de transcripción, etc. por lo que es necesario caracterizar éstas de la ANK de *L. vannamei*.

Spanings-Pierrot et.al., (2000a) y Lucu y Towle (2003) encontraron que en el cangrejo *Pachygrapsus marmoratus* (o en crustáceos) la actividad de la ANK se estimuló con la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), la cual es una hormona peptídica que aislaron mediante HPLC, pero a nivel de actividad de proteína, medido por la concentración de Na^+ en el epitelio de branquias de este cangrejo. También, Sigala-Andrade (2010) encontró que hubo mayor expresión de transcritos de la CHH en branquias de *Litopenaeus vannamei* a 10 psu, a 20, 23, y 29 °C. No hubo

mayor expresión a 26 psu o a 40 psu. Sin embargo, sí se vio un aumento significativo y mayor de *CHH* a 23 °C, que pudiera estar relacionado con la represión significativa de la *ANK* a 23 °C observado. Siendo una hormona peptídica ya conocida en *L. vannamei*, sería importante, en futuros trabajos, analizar la expresión de transcritos de la *ANK* en organismos bajo tratamiento con *CHH* para establecer si la *CHH* activa la expresión de la *ANK* a nivel transcripcional. No se puede descartar la búsqueda de la prolactina de crustáceos, para averiguar si esta inhibe la *ANK* a nivel enzimática o transcripcional.

Existen otros factores estudiados en mamíferos y en peces que inducen expresión de transcritos de la *ANK* o aumentan su actividad. Por ejemplo, las hormonas de tipo catecolaminas, peptídicas y esteroide (Therien y Blostein, 2000). Estos autores aseveran que los corticoesteroides como la aldosterona (mineralocorticoide) y la dexametasona (glucocorticoide), tienen el efecto de aumentar la expresión de transcritos de la *ANK*, lo cual se observó en vejiga de rana y en varios tejidos de mamíferos, tal como de riñón, músculo, colon, cerebro, corazón, etc. Estos autores explican que los corticoesteroides actúan por medio de sus receptores para manejar la síntesis de ARNm, interactuando con elementos regulatorios de los genes de las subunidades α y β de la *ANK*, los cuales dependen de concentraciones de Na^+ citoplásmicos. El cortisol es otro tipo de corticoesteroide que se ha estudiado en salmón (McCormick et. al., 2008). En salmón midieron la expresión de la *ANK* después de tratarlos con cortisol, aldosterona y desoxicorticoesterona. En dicho estudio encontraron que solo el cortisol pudo aumentar la transcripción de ARNm de la *ANK*, y, además, aumentar la resistencia del salmón a salinidades mayores (McCormick et. al., 2008). Se encontró el mismo resultado (activación de la *ANK* con cortisol) en el pez *Acipenser persicus* (Khodabandeh et. al., 2009).

De las catecolaminas, la dopamina y la norepinefrina estimulan la actividad enzimática de la *ANK*. Las hormonas peptídicas, como la insulina, también activan la enzima, pero todas estas no activan la *ANK* a nivel transcripcional como los corticoesteroides, (Therien y Blostein, 2000), por lo que se pueden y deben realizar estudios midiendo la actividad de la *ANK* (Huong et. al., 2010) como respuesta a éstas hormonas en camarón para averiguar si existen algunas versiones de estas hormonas en el camarón, y sus respectivos receptores nucleares. Aún no se caracterizan los corticoesteroides de *L. vannamei*, pero este tema es importante para comprender la regulación de la *ANK* de *L. vannamei* expuesto a cambios de temperatura y salinidad, y se espera que sea el enfoque de futuros estudios de la expresión de la *ANK* en *L. vannamei*. Relacionado a los corticoesteroides,

(que actúan a través de receptores) están poco caracterizados los receptores nucleares en crustáceos. Recientemente se han caracterizado hasta cierto punto en el crustáceo *Daphnia pulex* (Thomson et al., 2009), pero no se puede hacer una comparación sin un esfuerzo para caracterizar estos receptores en el camarón.

XI. Conclusiones

1. Se obtuvo una secuencia de 1110 nucleótidos que traduce a 369 aminoácidos de la ANK de *L. vannamei*. Esta secuencia fue depositada en el GenBank con el número de acceso de JQ996559.2 y corresponde en longitud al 36% de la secuencia total. El fragmento peptídico codificado por la secuencia obtenida corresponde al extremo terminal N de la ANK hasta el comienzo del dominio P, y representa una secuencia que no se conocía para la ANK de *L. vannamei*. Es muy similar a secuencias de la ANK de otros decápodos. Este fragmento tuvo el 100% de similitud con *Litopenaeus stylirostris*, y 99% de similitud con la de *Peneaus monodon* y *Fenneropenaeus indicus*. Solo hubo 83% de similitud con la de *Pachygrapsus marmoratus* y *Callinectes sapidus*, por lo que es muy conservada entre peneidos, pero tiene más diferencias al comparar con otros crustáceos, como los cangrejos *Pachygrapsus marmoratus* y *Callinectes sapidus*. La secuencia peptídica se conserva de 99-100% en todos los crustáceos hasta ahora secuenciados, lo cual indica que la mayoría de las diferencias de aminoácidos entre especies de crustáceos son debidas a mutaciones silenciosas. En el extremo terminal N, los aminoácidos 1-100 de *L. vannamei*, que incluye los dos epítomos del anticuerpo Ac1211/1212, la secuencia se conserva de 98-99% entre camarones peneidos, y de 84-99% en crustáceos en general

2. El Western blot con el Ac $\alpha 5$ usado para marcar la ANK de *G. gallus* y probado para *L. vannamei*, detecta una proteína de 95-130 kDa, la cual corresponde al tamaño esperado de la ANK de esta especie (113 kDa) y también al tamaño teórico de la AHK (114 kD). La detección de esta proteína fue posible únicamente mediante una extracción fenólica, la cual expuso el epítomo al anticuerpo, a diferencia de la extracción con Tris-SDS donde no hubo marcaje. La especificidad de Ac $\alpha 5$ es cuestionable porque en otros crustáceos (*Callinectes sapidus*) se han detectado dos proteínas distintas identificadas como ANK mediante Western blot (de 113 kDa) y otra de 131 kDa que bien pudiera ser la ATPasa de Ca^{2+} (PMCA o SERCA). SDS-PAGE y Western blot no lograron diferenciar entre ANK y AHK de *L. vannamei* por ser proteínas de pesos moleculares muy similares, además el epítomo de Ac $\alpha 5$ es similar entre estas dos proteínas. Se requiere purificar la ANK de

tejidos para desarrollar ensayos (como ELISA) más precisos para averiguar y comparar la especificidad de los anticuerpos Ac $\alpha 5$ y Ac1211/1212.

El anticuerpo Ac $\alpha 5$ de *G. gallus* demostró marcaje fuerte en todas las formas de extracción de proteínas en el Dot blot. Como se espera de un anticuerpo monoclonal, no se observaron interacciones inespecíficas en las membranas, sin embargo, teniendo un probable epítipo en una región muy conservada tanto en secuencia de aminoácidos como en estructura, se sugiere que el marcaje es inespecífico y probablemente se estén detectando simultáneamente otras tal como el AHK.

3. Se diseñaron y sintetizaron dos péptidos para producir anticuerpos específicos (Ac 1211/1212) dirigidos hacia el extremo terminal N de la ANK de *L. vannamei*. Las pruebas de marcaje mediante extracción fenólica, Tris-SDS y RIPA-Urea por dot blot indican baja abundancia de la ANK e interacciones inespecíficas. debido al anticuerpo secundario el cual se reduce significativamente con la extracción RIPA-Urea. El Ac II-HRP de Ac1211/1212 fue hecho en pollo, por lo que dichas interacciones están asociadas al tipo de membrana (nylon y/o PVDF), lo cual se puede optimizar con membranas de nitrocelulosa. La baja intensidad de marcaje de la ANK con el Ac 1211/1212 en el dot blot indican un bajo nivel de expresión de esta proteína en todas las salinidades probadas, y si hubo diferencias entre las salinidades, el Dot blot no fue lo suficientemente sensible para detectarlas.

4. El anticuerpo Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (Ac $\alpha 5$) detecta proteínas distribuidas en el epitelio branquial de *L. vannamei*, cuyo patrón de expresión celular es diferente con respecto al patrón celular que se observa con el anticuerpo sintetizado *de novo* (Ac 1211/1212). Este se localiza en estructuras globulares aisladas características de ionocitos de tamaño relativamente grande ($719\text{-}3226\ \mu\text{m}^2$) en comparación con salmón ($54\ \mu\text{m}^2$). Sin embargo, su gran tamaño podría atribuirse a conglomeraciones de ionocitos, destacables a 10 psu. A 40 psu estos agregados se ven más dispersos. A 10 y 40 psu se localizaron alrededor de los conductos branquiales y en el septum dividiendo el conducto branquial aferente y eferente. La localización de la ANK en camarón con el Ac $\alpha 5$ difiere del patrón de expresión reportado en peces, pero es similar al patrón reportado para crustáceos. Es probable que en crustáceos el Ac $\alpha 5$ no solo esté detectando la ATPasa de Na^+/K^+ , sino posiblemente algún transportador relacionado, tal como el de H^+/K^+ .

Para anticuerpos monoclonales comerciales (como Ac $\alpha 5$ que reconocen epítipos de proteínas

muy conservadas, se requiere realizar análisis más detallados para identificar el epítipo exacto y poder determinar cuál proteína se está detectando. El nuevo anticuerpo Ac1211/1212 detectó estructuras que probablemente sean ionocitos. Lo novedoso del marcaje de este anticuerpo es que se encontraron estos posibles ionocitos alrededor del conducto branquial eferente y en el septum entre el conducto branquial aferente y eferente a 10 y 40 psu. Esto tiene implicaciones en nuestro entendimiento de la función y localización anatómica de la osmoregulación. Se ha pensado que el intercambio iónico debido a la ANK ocurre en el epitelio de las lamelas branquiales, las cuales tienen contacto directo con el agua, ya sea agua de baja salinidad o de alta salinidad. Sin embargo, estas ideas se formaron debido al marcaje observado con Ac $\alpha 5$. El hecho de que con el nuevo anticuerpo Ac 1211/1212 se hayan localizado ionocitos alrededor del conducto branquial eferente y en el septum entre los conductos eferentes y aferentes, indica que los tejidos de las lamelas branquiales exportan sodio directamente a la hemolinfa en los conductos eferentes en baja salinidad, para transportar sodio al resto del organismo y mantener homeostásis iónico en el organismo. El marcaje menos intenso pero más disperso detectado a 40 psu puede ser debido a una reorganización celular vinculada a la apertura de zónulas ocluyentes entre las células, que está reportado que ocurre en alta salinidad para permitir la salida de exceso de sodio, y las cuales se cierran a baja salinidad para conservar iones dentro del organismo. En alta salinidad, se tendría que sacar el exceso de sodio de la hemolinfa. En general, el cambio de patrón de expresión en baja y alta salinidad y la localización alrededor de los conductos branquiales indica contacto directo entre ionocitos (y la ANK) y la hemolinfa.

5. Con este trabajo identificamos que a baja temperatura (20 °C) y a baja salinidad (10 psu), se activa la expresión de la ANK a nivel transcripcional, para compensar la reducción de su actividad enzimática (posiblemente debido a las propiedades termodinámicas de la enzima), y para absorber iones, por lo cual el organismo compensa aumentando la expresión. En general, en alta temperatura se detectó una reducción de transcritos de la ANK, que pudiera asociarse con el aumento de la actividad de la enzima. Respecto a la salinidad, el nivel de transcritos de la ANK aumentó en alta salinidad para compensar la invasión iónica y el aumento del volumen celular. Lo cual concuerda con los modelos iónicos propuestos para los ionocitos de peces y otros crustáceos.

XII. Perspectivas

En este trabajo se probó el Ac $\alpha 5$ en *L. vannamei* y parece que no es específico a la ANK como reportado para otras especies. Es de suma importancia averiguar la proteína que se ha estado detectando con el Ac $\alpha 5$ para ver si detecta la ANK en peces y en otros organismos, por el hecho de que su epítipo se encuentra en una región muy conservada entre ATPasas de Ca^{2+} , H^+/K^+ , y Na^+/K^+ . Si se logra averiguar el epítipo, se podrán evaluar los numerosos estudios y publicaciones que reportan resultados utilizando el Ac $\alpha 5$ desde un punto de vista más exacto. El nuevo anticuerpo sintetizado *de novo* Ac1211/1212 fue diseñado basándose en dos epítipos para asegurar el reconocimiento de esta enzima y usando la secuencia específica de la ANK de *L.vannamei*. Los resultados de Western blot y Dot con Ac1211/1212 blot sugieren baja expresión de la ANK. La localización celular demuestra que se distribuye en lo que parecen ser ionocitos en la periferia del sistema circulatorio branquial. Su expresión tanto en inmunofluorescencia como a nivel transcripcional es alta en baja salinidad. Esto concuerda con el modelo de osmoregulación establecido para esta especie. Sería de gran interés que se secuencien las ATPasas de Ca^{2+} (SERCA y PMCA) y H^+/K^+ de *L. vannamei* para resolver el dilema de la identidad de la proteína detectada en *L. vannamei* por Ac $\alpha 5$. El anticuerpo producido en esta investigación (Ac1211/1212) será de gran utilidad para estudios de ontogenia de la ANK, para determinar con certeza donde y cuando se expresa la ANK en tejidos de *L. vannamei* durante su desarrollo y posiblemente en otros camarones peneidos o crustáceos. Tiene alta especificidad hacia la ANK de *L.vannamei*, y con pruebas en tejidos de otros crustáceos se podrá seguir confirmando su especificidad y utilidad, que nos ayudará a comprender mejor la osmoregulación en *L.vannamei*.

XIII. LITERATURA CITADA:

Aves Labs Inc.[®] (s.f.) Antibody Production 101. Accedido el 1^{ero} de abril, 2011
<http://www.aveslab.com/resources/antibody-production-101/>

Ávila, R.C.(2012). Capturas y Comercio Exterior. Accedido el 14 de septiembre, 2012
<http://www.infopesca.org/oficiales-mexico>

Balbi F., Rosas J., Velásquez A., Cabrera T. y Maneiro C. (2005). "Aclimatación a baja salinidad de postlarvas del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) provenientes de dos criaderos comerciales." *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(2): 109-115.

Baumann O. (2001). "Posterior midgut epithelial cells differ in their organization of the membrane skeleton from other *Drosophila* epithelia." *Experimental Cell Research* 270: 176-187.

Blanco G. (2005). "Na⁺, K⁺ ATPase Subunit Heterogeneity as a Mechanism for Tissue-Specific Ion Regulation." *Seminars in Nephrology* 25(5): 292-203.

Bodinier C., Sucré E., Lecurieux-Belfond L., Blondeau-Bidet E. y Charmantier G. (2010). "Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*." *Comparative Biochemistry Physiology Part A Molecular Integrative Physiology* 157(3): 220-228.

Boyd C.E. y Clay J.W. (2002) "Evaluation of Belize Aquaculture Ltd: A superintensive shrimp aquaculture system." Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Published by the Consortium and obtainable through NACA, Bangkok, Thailand. 17 pp.

Buckle F., Baron B. y Hernandez M. (2006). "Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment." *Revista de Biología Tropical* 54(3): 745-753.

Choe K., Verlander J.W., Wingo C.S. y Evans D.H. (2004). "A putative H⁺/K⁺ ATPase in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*: primary sequence and expression in gills." *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287(4): 981-991.

Chomczynski P. y Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159.

Christensen A.K., Hiroi J., Schultz E.T. y McCormick S.D. (2011). "Branchial ionocyte organization and ion transport protein expression in juvenile alewives acclimated to freshwater or seawater." *Journal of Experimental Biology* 215: 642-652.

Chung K. y Hui-Chen L. (2006). "Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*." *Comparative Biochemistry Physiology Part A* 144: 48-57.

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: 325-336.

DHSB, Developmental Hybridoma Studies Bank, acedido enero, 2011 sitio internet: <http://www.dhsb.biology.uiowa.edu>

Dunbar L. A. y Caplan M. J. (2001) "Ion Pumps in Polarized Cells: Sorting and Regulation of the Na⁺/K⁺ and H⁺/K⁺ ATPases." *The Journal of Biological Chemistry* 276(32): 29617–29620.

FAO. © 2006-2012. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*.

Texto por Briggs, M. En: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Roma. Updated 7 April 2006. [Cited 14 September 2012].

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en

Ferrando S., Bottaro M., Gallus L., Girosi L., Vacchi M. y Tagliafierro G. (2006). "Na⁺ /K⁺ ATPase immunoreactivity in olfactory epithelium of small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* (L.): possible presence of ion exchanging cells." *Journal of Fish Biology* 69(B): pp.278-282.

Gao Y. y Wheatly M.G. (2004). "Characterization and expression of plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA3) in the crayfish *Procambarus clarkia* antennal gland during molting." *The Journal of Experimental Biology* 207: 2991-3002.

Geering K. (2008). "Functional Roles of Na,K-ATPase subunits". *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17 (5): 526-532.

Geysen M. (1984). "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid." *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 81(13): 3998-4002.

Giffard-Mena I., Charmantier G., Grousset E., Aujoulat F. y Castille R. (2006). "Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in osmoregulation." *Development. Growth and Differentiation* 48: 139-151.

Henry R.P., Gehnrich S., Weihrauch D. y Towle D.W. (2003). "Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 136: 243–258

Huong D.T., Jasmani S., Jayasankar V. y Wilder M. (2010). "Na⁺/K⁺ ATPase activity and osmotic regulation in adult white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to low salinities." *Aquaculture* 304: 88-94.

Huotari V., Sormunen R., Lehto V.-P. y Eskelinen S. (1995). "The polarity of the membrane skeleton in retinal pigment epithelial cells of developing chicken embryos and in primary culture." *Differentiation* 58: 201-215.

Hurkman W. y Tanaka C. (1986). "Solubilization of Plant Membrane Proteins for analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis." *Plant Physiology* 81: 802-806

Hwang P-P. (2009). "Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*)." *The Journal of Experimental Biology* 212: 1745-1752.

Jaisser F. y Beggah A. (1999). "The non-gastric H⁺-K⁺-ATPases: molecular and functional properties." *American Journal of Renal Physiology* 276: F812-F824.

Jayasundara N., Towle D., Weihrauch D. y Spanings-Pierrot C. (2007). "Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure." *The Journal of Experimental Biology* 210: 2070-2081

Jorgensen P.L., Hakansson K.O. y Karlsh S.J.D. (2003). "Structure and Mechanism of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions." *Annual Review of Physiology* 65: 817-49.

Kelley L.A. y Sternberg M.J.E. (2009). "Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server." *Nature Protocols* 4: 363-371.

Kazerouni E. y Khodabandeh S., (2011) "Ionocyte Immunolocalization and the Effects of Ultraviolet Radiation on Their Abundance and Distribution in the Alenins of Caspian Sea Salmon, *Salmo trutta caspius*". *Cell Journal (Yakhteh)* 13(1): 45-54.

Khodabandeh S., Charmantier G. y Charmantier-Daures M. (2005a). "Ultrastructural studies and Na⁺, K⁺-ATPase immunolocalization in the antennal urinary glands of the lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda)." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 53(10): 1203-1214.

Khodabandeh S., Kutnik M., Aujoulat F., Charmantier G. y Charmantier-Daures M. (2005b). "Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase." *Cell Tissue Research* 319: pp.167-174.).

Khodabandeh S., Mosafer S. y Khoshnood Z. (2009). "Effects of cortisol and salinity acclimation on Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter gene expression and Na⁺, K⁺-ATPase activity in the gill of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry." *Scientia Marina* 111-116.

Kitchen, C. (2009). "Nonparametric vs Parametric Tests of Location in Biomedical Research." *American Journal of Ophthalmology*: 147(4) 571-572.

Kriete M. y Higgins-Luthman M. (2011). Accedido el 1^{ero} de abril, 2011. <http://biology.kenyon.edu/BMB/Jmol2009/MCandMonica/mcandmonica.html>.

Larson G. (1992). "Stabilized TMB Substrate for Horseradish Peroxidase vs. 4-chloro-1-naphthol: A comparison on Western blots." *Promega Notes Magazine* 39: pp.17.

Lee C., Kim J., Shin S.G y Hwang S (2006). "Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*." *Journal of Biotechnology* 123: 273–280

Lovett D., Verzi M., Burgents J., Tanner C., Glomski K., Lee J. y Towle D. (2006). "Expression Profiles of Na⁺,K⁺-ATPase during Acute and Chronic Hypo-osmotic Stress in the Blue Crab *Callinectes sapidus*" *Biological Bulletin* 211: 58–65.

Lemaire P., Bernard E., Martinez-Paz J.A. y Chim L. (2002). "Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*." *Aquaculture* 209(1-4) 307-317.

Liao B., Chen R. y Hwang P.P. (2009). "Expression regulation of Na-K-ATPase 1-subunit subtypes in zebrafish gill ionocytes." *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296: R1897–R1906.

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: 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 Tissue Research* 319: 331-339.

Lucu C y Towle DW. (2003). "Na(+)+K(+)-ATPase in gills of aquatic crustacea." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 135(2): 195-214.

Martin D.W. (2005). "Structure-Function Relationships in the Na⁺,K⁺ Pump." *Seminars in Nephrology* 25(5): pp. 282-291.

Martinez A.S., Charmantier G., Compere 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 Cell* 37: pp. 153-165.

Martinez-Corona D.O. (2011). Expresión Genética en familias de *Penaeus vannamei* expuestas experimentalmente al virus de la mancha blanca (WSSV). *Ciencias de la Vida*. Ensenada, B.C., CICESE. Tesis de Maestría: 64 pp.

McCormick S.D., Regish A., O'Dea M.F., Shrimpton J.M. (2008). "Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺, K⁺-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic Salmon." *General and Comparative Endocrinology* 157: pp. 35-40.

Metz J., van den burg E., Wendelaar Bonga S. y Flik G. (2003). "Regulation of branchial Na⁺/K⁺ ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures." *The Journal of Experimental Biology* 206: 2273-2280.

Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sørensen T.L., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., y Nissen P. (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." *Nature* 450(7172): 1043-1049.

Morth J.P., Poulsen H., Toustrup-Jensen, M.S., Schack V.R., Egebjerg J., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nissen, P. (2009). "The structure of the Na⁺, K⁺ ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations." *Philosophical Transactions of The Royal Society, Biological Sciences* 364: 217-227.

NCBI-BLAST, National Center for Biotechnology Information, accedido junio-octubre, 2012.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Ngoka L.C.M (2008). "Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers." *Proteome Science* 6(1): 1-24.

Nebel C., Negre-Sadargues G., Blasco C. y Charmantier G., (2005). "Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*." *Anatomy and Embryology* 209: 193-206.

Nicholas K. B. y Nicholas H. B., Jr (1997). "Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments." <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>.

Pascual C, Zenteno E, Cuzonc G, Sanchez A., Gaxiola G, Taboada G, Suarez J., Maldonado T., y Rosas, C. (2004). "*Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein." *Aquaculture* 236: 431–450.

Patrick M.L., Aimanova K., Sanders H.R. y Gill S.S. (2006). "P-type Na⁺/K⁺-ATPase and V-type H⁺-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*." *Journal of Experimental Biology* 209: 4638-4651.

Péqueux A., Dandrifosse G, Loret S., Charmantier G, Charmantier-Daures M., Spanings-Pierrot C., y Schoffeniels E. (2006). "Osmoregulation: morphological, physiological, biochemical, hormonal and developmental aspects." pp. 205-308. Editado por J.Forest y J.C. von Vaupelklein. The Crustacea, revisado y actualizado del Traité de Zoologie.

Pham D. (2011). La capacidad osmoregulatoria del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* durante la ontogenia. *Oceanologia Biologica y Medioambiente Marino*. Nueva Caledonia, La Universidad Polinesa Francesa. Tesis de Doctorado: 166 pp.

Re- Araujo D., Diaz F., Ponce E., Giffard I., Munoz-Marquez M.E. y Sigala-Andrade H.M. (2012). "Combined effect of temperature and salinity on the thermotolerance and osmotic pressure of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone)." *Journal of Thermal Biology* 6: 413-418,

Rosas J., Velásquez A., Balbi F., Maneiro C. y Cabrera T. (2005). "Aclimatación a baja salinidad de postlarvas del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) provenientes de dos criaderos comerciales." *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(2): 109-115.

Sacchetto R., Bertipaglia I., Giannetti S., Cendron L., Mascarello F., Damiani E., Carafoli E. y Zanotti G. (2012). "Crystal structure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) from bovine muscle." *Journal of Structural Biology* 178(1):38-44.

Sagné C., Isambert M.F., Henry J.P. y Gasnier B. (1996) "SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter." *Biochemical Journal* 316: 825-831

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 18.51-18.71.

Serrano L., Blanvillain G., Soyez D., Chairmantier G., Grousset E., Aujoulat F. y Spanings- Pierrot C. (2003). "Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*." *Journal of Experimental Biology*. 206: 79-988.

Shakibaei M., y Mobasheri, A. (2003). "β1-integrins co-localize with Na,K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes." *Histology and Histopathology* 16: 343-351.

Sigala-Andrade, H.M. (2010). "Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*." Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California. Tesis de Maestría. 100 pp.

Spanings-Pierrot C., Soyez D., Van Herp F., Gompel M., Skaret G., Grousset E. y Charmantier G. (2000a). "Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*." *General and Comparative Endocrinology* 119(3): 340-350.

Spanings-Pierrot C., Weihrauch D., Lignot J.H., Charmantier G. y Towle D. (2000b). "Immunolocalization and gene expression of the Na⁺, K⁺ ATPase in gills of the grapsid crab *Pachygrapsus marmoratus*." *American Zoology* 40: 1217.

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 alpha subunit of an avian sodium pump." *Journal of Biological Chemistry* 263: 4347-4354.

Tang C-H., Chang I-C., Chen C-H., Lee T-H. y Hwang, P-P. (2008). "Phenotypic Changes in Mitochondrion-rich Cells and Responses of Na⁺/K⁺ ATPase in Gills of Tilapia Exposed to Deionized Water." *Zoological Science* 25: 205-211.

Therien A. y Blostein R. (2000). "Mechanisms of sodium pump regulation." *American Journal of Physiology Cell Physiology* 279: C541-C566.

Thomson S.A., Baldwin W.S., Wang Y.H., Kwon G, y LeBlanc G.A. (2009). "Annotation, phylogenetics, and expression of the nuclear receptors in *Daphnia pulex*." *BMC Genomics* 10(500): 1-14.

Tine M., Bohomme F., McKenzie D. y Durand J.D. (2010). "Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural population of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimated to a range of environmental salinities." *BMC Ecology* 10(11): 1-8.

Tipsmark C.K., Madsen S.S., Seidelin M., Christensen A.S., Cutler C.P. y Cramb G. (2002). "Dynamics of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransporter and Na⁺, K⁺ -ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Journal of Experimental Zoology* 293: 106-118.

Tipsmark C.K., Madsen S.S. y Borski R.J. (2004). "Effect of salinity on expression of branchial ion transporters in striped bass (*Morone saxatilis*)." *Journal of Experimental Zoology* 301A: 979-991.

Towle D.W. y Weihrauch D. (2001). "Osmoregulation by Gills of Euryhaline Crabs: Molecular Analysis of Transporters." *American Zoology* 41: 770-780

Towle D.W., Paulsen R., Weirauch D., Kordylewski M., Salvador C., Lignot J-H. y Spanings-Pierrot C. (2001). "Na⁺/K⁺ATP-ase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein." *The Journal of Experimental Biology* 204: 4005-4012.

Valenzuela-Quiñonez W., Rodríguez-Quiroz G. y Esparza-Leal H.M. (2010). "Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación." *Ximhai Ra. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable* 6(1): pp. 1-8.

Zampar G.G., Chesta M.E., Carbajal A., Chanaday N.L., Diaz N.M., Casale C. y Arce C.A. (2009) "Acetylated tubulin associates with the fifth cytoplasmic domain of Na⁺/K⁺-ATPase: possible anchorage site of microtubules to the plasma membrane." *Biochemical Journal* 422: 129–137.

XIV. Anexos

Anexo 1 Método para Extracción de ARN por Trizol[®], Método basado en Chomczynski y Sacchi (1987).

1. Homogenizar el tejido congelado (50-100 mg) en 1 ml de solución Trizol.
2. Centrifugar la muestra a 12 000 g a 4°C durante 10 minutos.
3. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar 0.1 ml de Cloroformo.
4. Agitar vigorosamente
5. Centrifugar la muestra a 12,000 g
6. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 0.5 ml de isopropanol.
7. Centrifugar y descartar el sobrenadante.
8. Adicionar 1 ml de etanol 75%.
9. Centrifugar
10. Descartar el sobrenadante cuidadosamente y dejar secar el ARN hasta que se evapore completamente el etanol.
11. Disolver en agua y guardarlo a -70°C.

Anexo 2: Extracción Fenólica de Proteína Total

Para la extracción fenólica (adaptada de Hurkman y Tanaka, 1986) se homogenizaron 150 mg de tejido branquial de *L. vannamei* en 500 μ L amortiguador sucrosa (0.1M Tris-HCl pH 8.8, 10 mM EDTA, 0.9M sucrosa, 2 mM PMSF, 0.4% β -mercaptoetanol o 10 mM DTT). Se agregaron 500 μ L fenol (amortiguado con Tris), se pasó por vortex y se incubó a 4°C 30 min. Se centrifugaron a 5000 g 10 min. Las capas de arriba (las fenólicas) se transfirieron a tubo nuevo. A la capa que quedó se le agregaron otros 500 μ L fenol/Tris, se pasaron por vortex, se incubaron a 4°C 30 min, y se centrifugaron 10 min a 5000 g. La capa de arriba se juntó con la anterior, y se aseguró de extraer la capa blanca entre las dos fases. A las capas fenólicas se les agregaron 500 μ L amortiguador sucrosa de nuevo y se repitió la incubación a 4°C. Se centrifugaron a 5000 g 10 min. La capa fenólica (de arriba) se agregó a tubo de 15 ml nuevo. A esto se le agregaron 10 volúmenes de solución de precipitación (metanol con 0.1M acetato de amonio y 0.4% β -mercaptoetanol o 10mM DTT). Se formó un precipitado floculento de color blanco de proteínas. Se mezclaron bien con vortex y se incubaron a -80 °C 2 horas mínimo. Se centrifugaron las muestras a 5000 g 10 min. Se lavaron una vez re-suspendiendo los botones en solución de precipitación frescos, seguidos por centrifugación a 5000 g 10 min. Se lavaron tres veces las proteínas precipitados de la siguiente manera: A) Se removió el sobrenadante y se resuspendieron los botones de proteínas precipitadas en solución fresca de lavar (80% acetona + 0.4% β -mercaptoetanol o 10 mM DTT). B) Se volvieron a centrifugar a 5000 g 10 min. Los pasos A y B se repitieron tres veces. Los botones se dejaron secar a tiempo ambiente (aire libre) 10-15 min. Los botones se suspendieron en amortiguador de resuspensión (Urea o RIPA-Urea), y la proteína se midió mediante ensayo Bradford.

Anexo 3: Protocolos de inmunofluorescencia para Anti-ANK $\alpha 5$ de *Gallus gallus* (A) y Anti-ANK 1211/1212 de *Litopenaeus vannamei* (B) (Adaptado de Giffard-Mena et. al.,2006).

(A) Protocolo Inmunofluorescencia Anti-ANK $\alpha 5$ <i>Gallus gallus</i> / Anti-IgG de ratón hecho en chivo	(B) Protocolo Inmunofluorescencia Anti-ANK 1211/1212 <i>Litopenaeus vannamei</i> / Anti-IgG de conejo hecho en pollo
10 min. xileno	5 min. xileno
10 min. xileno	5 min. xileno
5 min. alcohol butílico	5 min. alcohol butílico
5 min. alcohol 100%	5 min. alcohol 100%
5 min. alcohol 95%	5 min. alcohol 95%
5 min. alcohol 90%	5 min. alcohol 90%
5 min. alcohol 70%	5 min. alcohol 70%
5 min. alcohol 50%	5 min. alcohol 50%
Lavado en PBS 5 min. Microondas a potencia de 80% 2 veces 2 min Dejar enfriar.	Solución A 10 min. (0.01% Tween,150 mM NaCl en PBS 10 o 20 mM, pH 7.3)
Solución A 10 min. (0.01% Tween,150 mM NaCl en PBS 10 o 20 mM, pH 7.3)	Solución B 5 min. (50 mM NH ₄ Cl en PBS)
PBS+5% Leche descremada 20 min.	Solución C 10 min. (0.5% BSA + 0.1% gelatina o grenetina)
Anticuerpo primario Anti-ANK $\alpha 5$ de <i>G. gallus</i> diluido a 15 μ g/ml en PBS-5% Leche descremada, (control negativo sólo 0.5% PBS- 5% leche descremada). Se incubaron 100 μ L por lámina de cada dilución 2 horas.	Anticuerpo primario 1211/1212 diluido a 5 μ g/ml en 0.5% BSA (en PBS), control negativo sólo 0.5% BSA. Se incubaron 100 μ L por lámina de cada dilución 2 horas.
Se lavaron 3 veces en PBS 5 min.	Se lavaron 3 veces en PBS 5 min.
Anticuerpo secundario (FITC) diluido 1:100 en PBS-5% Leche descremada. Se incubaron 100 μ L por lámina de la dilución 1 hora.	Anticuerpo secundario (FITC) diluido 1:100 en 0.5% BSA en PBS. Se incubaron 100 μ L por lámina de la dilución 1 hora.
Lavados 3 veces en PBS 5 minutos y se escurrieron bien.	Lavados 3 veces en PBS 5 minutos y se escurrieron bien.
Montaje con medio acuoso	

Anexo 4: Protocolo para la síntesis de ADNc de camarones aclimatados a diferentes salinidades y temperaturas utilizados para PCR de tiempo real (Sigala-Andrade, 2010)

Se determinó la integridad de ARN por análisis visual en gel de agarosa desnaturizante siguiendo el protocolo de corrimiento electroforético establecido por Sambrook et. al., (1989) con ligeras modificaciones. El gel de agarosa al 1.4% se preparó con 0.7 g de agarosa disuelta en 36 ml de agua tratada con DEPC al 0.1% mas 5 ml de solución MOPS 10X (0.2 M ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico, 20 mM de acetato de sodio y 10 mM de EDTA) y 9 ml de formaldehído. Se cargaron 2 μ L de cada muestra y 15 μ L de solución desnaturizante (150 μ L de formaldehído, 100 μ L de MOPS 10x, 500 μ L de formamida y 50 μ L de bromuro de etídio 1 mg/ml), previo calentamiento a 65°C por 15 min. El corrimiento electroforético se realizó a 70 V durante 2 horas. Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador (UV transiluminator 2000, Biorad) y fotografiados utilizando una cámara digital Kodak DC290 ZOOM.

4.1 Tratamiento con ADNasa.

Las muestras de ARN total se trataron con agua libre de ARNasas para un volumen de 87.5 μ L. A cada muestra se le agregó 10 μ L de solución buffer RDD, 2.5 μ L de solución de ADNasa I y se incubaron a temperatura ambiente (20 a 25°C) por 10 minutos. Cuando se requirió se limpió el ARN total usando columna de sílice.

4.2 Síntesis de ADN complementario.

La obtención de ADNc se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit Superscript III RT. En un tubo estéril se agregaron: 1 μ L de oligo (dT) 18, 1 μ g de ARN total (tratado con ADNasa I), 1 μ L de 10 mM dNTP Mix y 10 μ L de agua destilada estéril. Se calentó la muestra a 65°C durante 5 min incubó en hielo 1 minuto. Posteriormente se adicionó: 2 μ L 10X first strand buffer, 4 μ L MgCl₂ 25 mM, 2 μ L de 0.1 M DTT, 1 μ L de inhibidor de nucleasas, 1 μ L de Superscript III RT (200 U/ μ L). Luego se incubó a 55°C de 30 a 60 minutos. Se inactivó la reacción por calentamiento durante 15 minutos y se guardó a -20°C hasta su uso.

Anexo 5: Reporte Final de la Síntesis del Anticuerpo 1211/1212 de la compañía Enogene®.

FINAL REPORT

Rabbit Polyclonal Antibody Production (RPAP)

Service Number : UABC20111019

Service Receipt: Oct 19th, 2011

Technical Support Staff:

Jack Meng, Ph.D.

service@enogene.com

Study Director: Lai Shen, Ph.D.

Products and documents

1) Pre-serum:

Rabbit 1211 (R1211) Pre-serum of UABC20111019 (0.1ml/vial, 1 vial)

Rabbit 1212 (R1212) Pre-serum of UABC20111019 (0.1ml/vial, 1 vial)

2) Anti-serum:

Rabbit 1211 (R1211) Anti-serum of UABC20111019 (1.0ml/vial, 2 vials)

Rabbit 1212 (R1212) Anti-serum of UABC20111019 (1.0ml/vial, 2 vials)

3) Affinity Purified Antibody:

Rabbit 1211 (R1211) Affinity Purified Antibody of UABC20111019 (1mg/ml, 1.0ml/vial, 3 vial;
0.5ml/vial, 1 vial)

Rabbit 1212 (R1212) Affinity Purified Antibody of UABC20111019 (1mg/ml, 1.0ml/vial, 4 vial)

4) Peptide:

CK-15 Peptide (≥85%) CRIERDGPNALTPPK (2mg, 200ul, 10mg/ml, 1 vial)

MC-16 Peptide (≥85%) MADSKKKPQKAKGKKC (2mg, 200ul, 10mg/ml, 1 vial)

5) Final report with QC documents

STORAGE CONDITIONS

Store at -20°C from date of shipment. Aliquot to avoid repeated freezing and thawing.

EnoGene Biotech Co., Ltd.



No. 301 Hanzhongmen Dajie, NISOP suite A 3F, Nanjing 210036, China

Tel: 86-25-8661-6616 Fax: 86-25-8699-0398

service@enogene.com

www.enogene.com

PROCEDURES

Animals

Two 1.8-2.0 Kg SPF New Zealand White Male Rabbits

Methods Adjuvant Complete Freund's Adjuvant (CFA) initially, followed by Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) for all subsequent injections.

Immunogen Typically 50 to 200 µg conjugated peptides immunogen is used for each immunization (however amounts may vary do to antigen availability).

Procedure The immunogen is diluted to 0.25 ml with sterile saline and combined with 0.25 ml of the appropriate adjuvant. The antigen and adjuvant are mixed thoroughly to form a stable emulsion that is injected beneath the skin of the rabbit (subcutaneously) in the area around the shoulders and/or intradermally into the hind haunches near the rear legs for a maximum of two times intradermally. This provides enhanced immune response from the sustained presentation of the immunogen. EnoGene has established immunization SOPs and Guidelines to be followed.

Bleeds Blood is collected from the central ear artery with a 21-gauge needle and allowed to clot and retract at 37°C overnight. The serum is decanted and clarified by centrifugation at 2,500 RPM for 15 minutes. EnoGene has established blood collection and laboratory SOPs and Guidelines to be followed. The SOPs used in this service include:

EGSOP-SC-1001 BSA (Sulfo-SMCC) Activation SOP

EGSOP-SC-1002 KLH (Sulfo-SMCC) Activation SOP

EGSOP-SC-1003 Peptide conjugation to BSA SOP

EGSOP-SC-1004 Peptide conjugation to KLH SOP

EGSOP-SC-1005 Antigen preparation and immunization SOP

EGSOP-SC-1006 Bleeding SOP

EGSOP-SC-1007 Terminal bleeding SOP

EGSOP-SC-2001 Peptide affinity column preparation SOP
 EGSOP-SC-2002 Affinity purification SOP
 EGSOP-SC-2003 LOWRY assay of Protein concentration SOP
 EGSOP-QC-1001 ELISA SOP

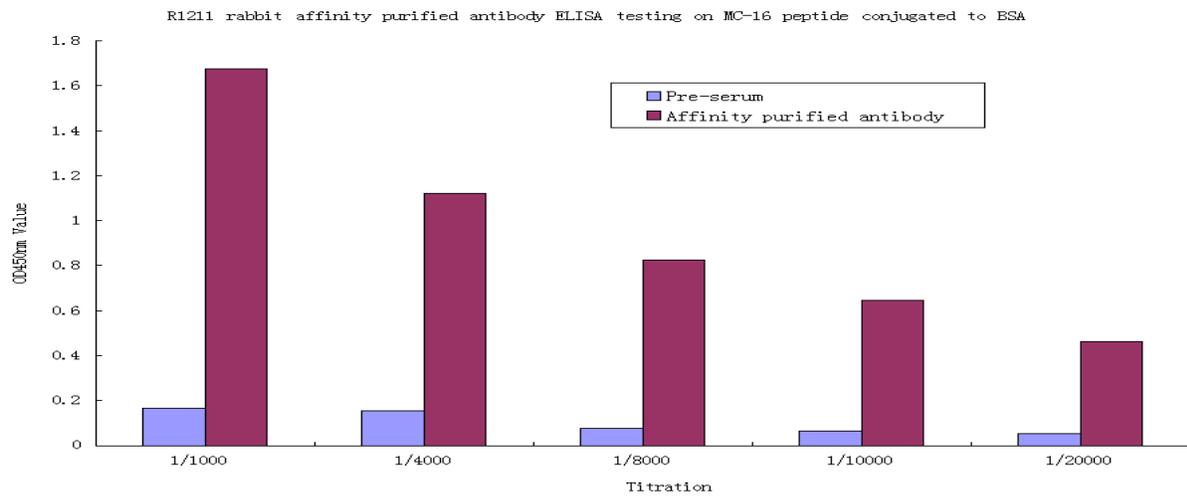
References

1. Pathak, SS, van Oudenaren, A, Savelkoul, HFJ. Ed. Lefkovits, I. Immunology Methods Manual, Volume 2 Academic Press, 1997 (General Information)
2. Diamandis EP, and Christopoulos, TK, Eds., Immunoassay. Academic Press, Inc. 1996.

Detailed Service Recording

Order#	Antigen	Rabbits	Peptide Received	
UABC20111019	CK-15 Peptide: CRIERDGNALTPPK ; MC-16 Peptide: MADSKKKPQKAKGKKC	R1211,R1212	2011.12.5	
Peptide Conjugation	Pre-bleeding	Immunization	1st Booster	2nd Booster
2011.12.10	2011.12.13	2011.12.17	2012.1.7	2012.1.31
Bleed	Terminal Bleed	Purification	Shipment	
2011.2.7	2012.2.13	2012.2.15	2012.2.17	

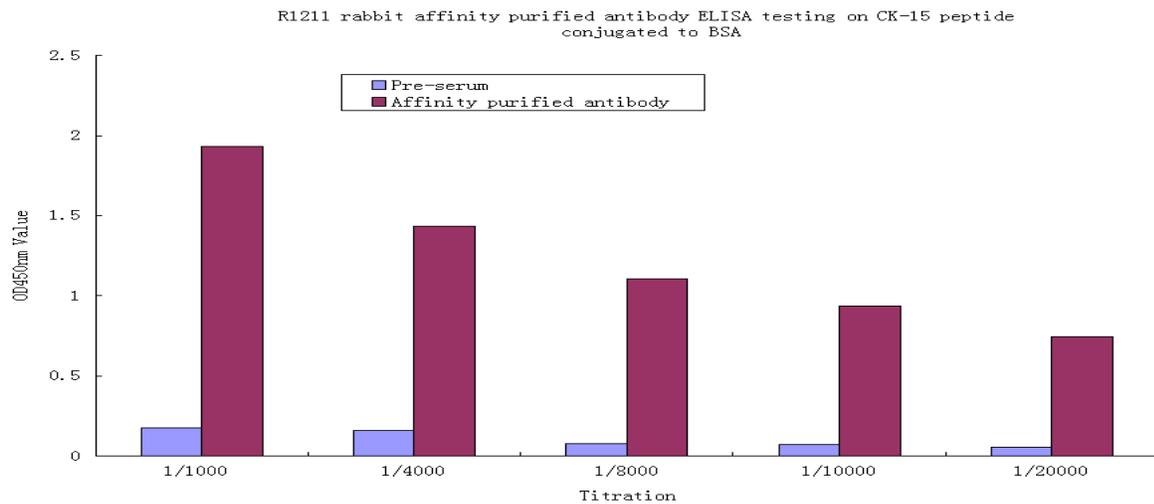
ELISA Testing Results



Antigen: MC-16 peptide conjugated to BSA (MC-16: MADSKKKPQKAKGKKC peptide conjugated to BSA) 0.25ug/well

First antibody: Affinity purified antibody from R1211 rabbit anti-serum diluted at 1:1000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000 respectively; 37 °C incubation for 2 hrs

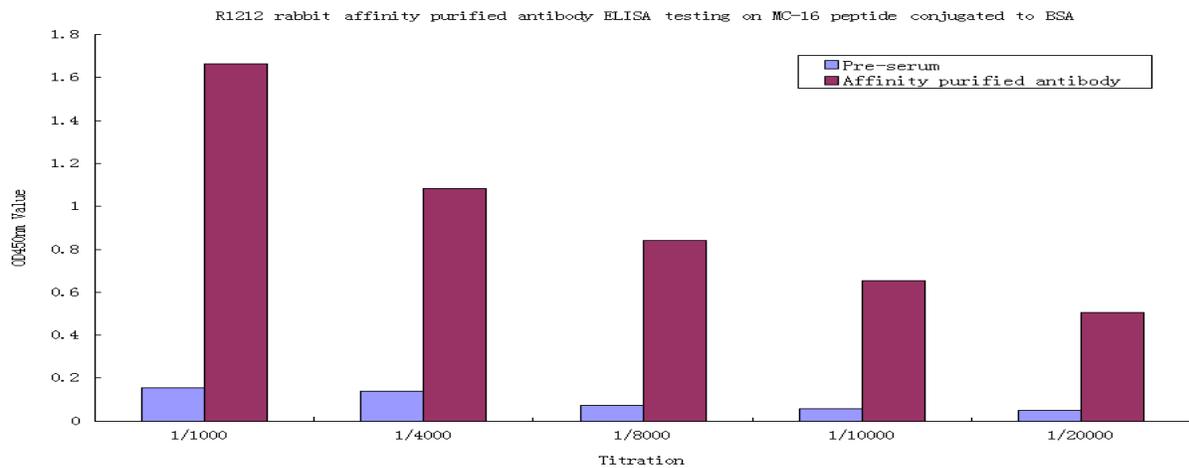
Second antibody:HRP conjugated goat anti-rabbit IgG diluted at 1:20000; 37°C incubation for 1.5 hrs.



Antigen: CK-15 peptide conjugated to BSA (CK-15: CRIERDGPNALTPPK peptide conjugated to BSA) 0.25ug/well

First antibody: Affinity purified antibody from R1211 rabbit anti-serum diluted at 1:1000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000 respectively; 37 °C incubation for 2 hrs

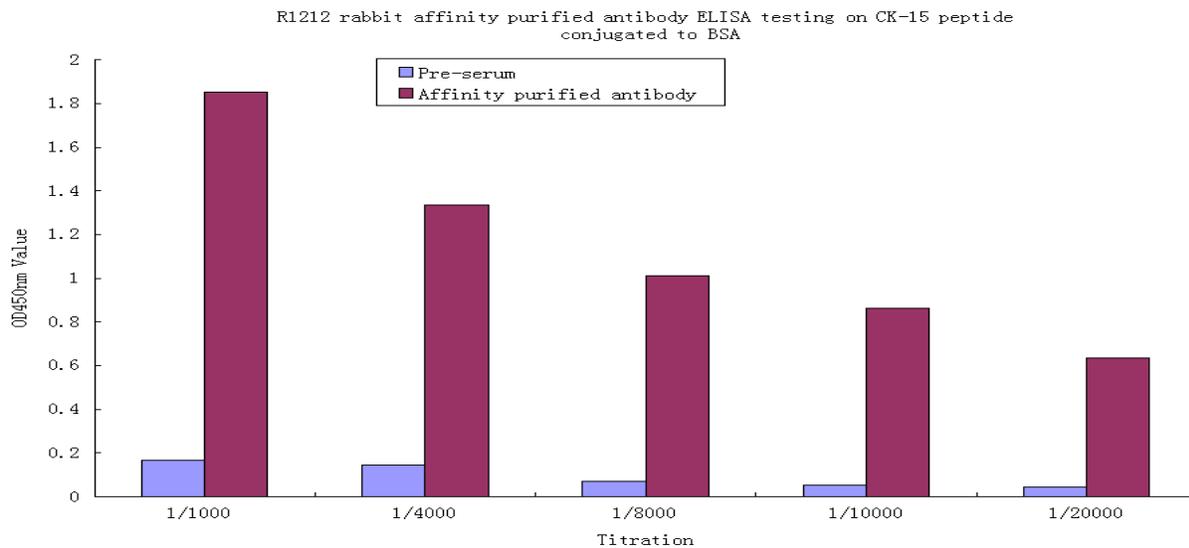
Second antibody:HRP conjugated goat anti-rabbit IgG diluted at 1:20000; 37 °C incubation for 1.5 hrs



Antigen: MC-16 peptide conjugated to BSA (MC-16: MADSKKKPQKAKGKKC peptide conjugated to BSA) 0.25ug/well

First antibody: Affinity purified antibody from R1212 rabbit anti-serum diluted at 1:1000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000 respectively; 37 °C incubation for 2 hrs

Second antibody: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG diluted at 1:20000; 37 °C incubation for 1.5 hrs



Antigen: CK-15 peptide conjugated to BSA (CK-15: CRIERDGPNALTPPK peptide conjugated to BSA) 0.25ug/well

First antibody: Affinity purified antibody from R1212 rabbit anti-serum diluted at 1:1000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000 respectively; 37 °C incubation for 2 hrs

Second antibody: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG diluted at 1:20000; 37 °C incubation for 1.5 hrs

Conclusion

Rabbit	MC-16	CK-15
R1211 Antibody 1:20,000	+	+
R1212 Antibody 1:20,000	+	+

+, positive

Approval

I accept responsibility of the conduct of this study which was performed in compliance with the U.S. Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations (21 CFR 58), The UK GLP Regulations, the Japanese GLP Standard and the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) Principles of Good Laboratory Practice.

STUDY DIRECTOR

DATE

Lai Shen

2012-2-1

Quality Assurance Statement

Service Title: Rabbit Polyclonal Antibody Production (RPAP)

Service Number:UABC20111019

Study Director: Lai Shen, Ph.D.

Quality Assurance performed the inspections listed below for this service. Verification the service protocol was also performed and documented by QA. Procedures, documentation, equipment records, etc., are examined in order to assure that the service performed in accordance with the U.S. Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations (21 CFR 58), THE UK GLP Regulations, the Japanese GLP Standard and the Organization of Economic Cooperation and

Development (OECD) Principles of Good Laboratory Practice and to assure that the service is conducted according to the protocol and relevant Standard Operating Procedures.

The following are the inspection dates, phase inspected, and report dates of QA inspections of this service.

**Inspect on Feb 17th, 2012
Phase Final Report and data audit

*Inspect on Feb 15th, 2012
Phase Systems Inspection—Administration of test substance/data collection and/or Analysis

**Inspect on Feb 7th, 2012
Phase Systems Inspection—Observation of bleeding

*Inspect on Jan 7th, 2012
Phase Systems Inspection—manipulation of Test system

*Inspect on Dec 10th, 2011
Phase Systems Inspection—Test system preparation

** Inspection specific for this service
* Systems Inspection

This report describes the methods and procedures used in the service and the reported results accurately reflect the raw data of the service.

QUALITY ASSURANCE

DATE

William Wang

2012-2-17

EnoGene Biotech Co., Ltd. 

No. 301 Hanzhongmen Dajie, NISOP suite A 3F, Nanjing 210036, China

Tel: 86-25-8661-6616 Fax: 86-25-8699-0398

service@enogene.com

www.enogene.com

Peptide Lot No: CK-15

Sequence : CRIERDGPNALTPPK

Number : 010250011

Lot# : P111121-CL272323

Column : 4.6×250mm, Venusil XBP-C18

Solvent A : 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile

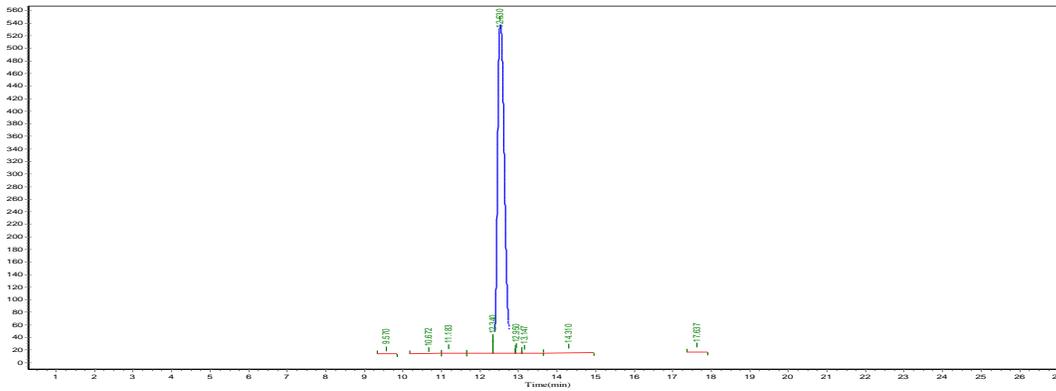
Solvent B : 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Gradient : A B
0.01min 20% 80%
25min 45% 55%
25.1min 100% 0%
30min STOP

Flow rate : 1.0 mL/min

Wavelength : 220nm

Volume : 5ul

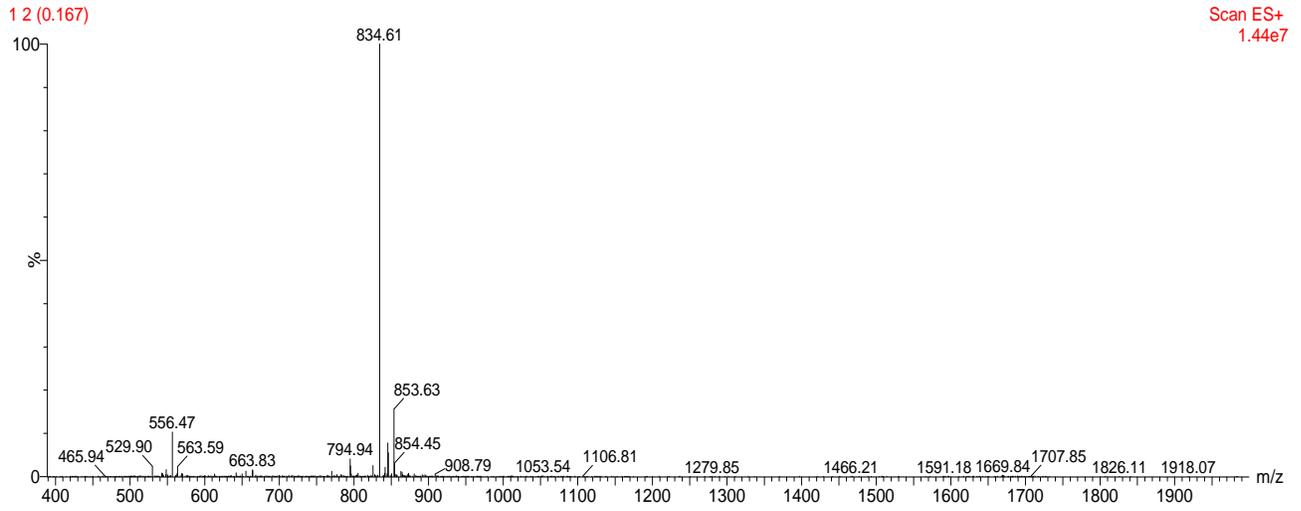


Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	9.570	0.4241	3074.742	33221.934
2	10.672	0.4241	1863.951	30516.750
3	11.183	1.3138	6611.376	94541.125
4	12.340	1.5910	22341.057	114486.453
5	12.530	92.2260	528145.375	
6	12.950	0.9102	7919.710	65495.840
7	13.147	0.9150	4832.508	65840.164
8	14.310	1.1436	6755.234	82291.477
9	17.637	1.0148	7589.595	73023.391

Total 100.000

CK-15

Sequence : CRIERDGPNALTPPK

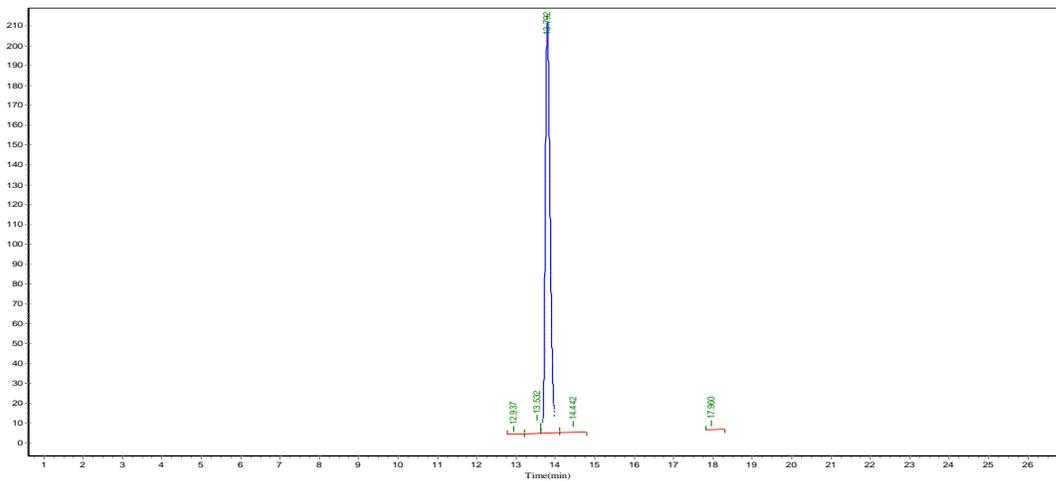


Sample Information

Injection Volume :1.00µl
 Date Acquired :2011-11-29 16:36:45
 Sample Name :CK-15
 MW :1666.93
 Lot No. :P111121-CL272323

Probe :ESI
 Gas Flow :1.5L/min
 DL Temp :250°C
 Block Temp :200°C
 T.Flow :0.2ml/min
 B.conc :50%H2O/50%ACN

Peptide Lot No: MC-16,
 Sequence : MADSKKKPQKAKGKKC
 Number : 010250011
 Lot# : P111121-CL272321
 Column : 4.6×250mm, Venusil XBP-C18
 Solvent A : 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile
 Solvent B : 0.1% trifluoroacetic in 100% water
 Gradient : A B
 0.01min 23% 77%
 25min 48% 52%
 25.1min 100% 0%
 30min STOP
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Wavelength : 220nm
 Volume : 5ul



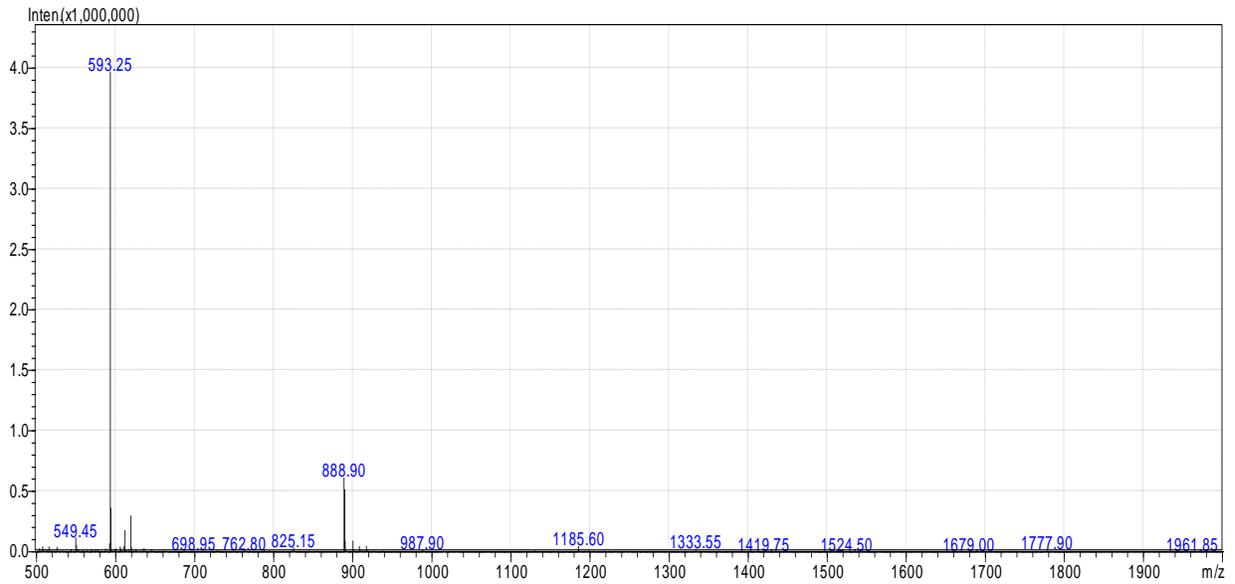
Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	12.937	0.6020	943.513	
2	13.532	3.7439	6228.263	70886.266
3	13.792	93.2196	207794.594	
4	14.442	1.7037	2890.848	32258.346
5	17.960	0.7309	1544.810	13837.944
Total		100.0000		

REPORT

Sequence : MADSKKKPQKAKGKKC

:

:



Probe: ESI Probe bias: +4.5kv
Nebulizer Gas Flow: 1.5L/min Detector: 1.5kv
CDL: -20.0v T. Flow: 0.2ml/min
CDL Temp: 250 °C B. conc: 50%H2O/50%ACN
Block Temp: 200 °C