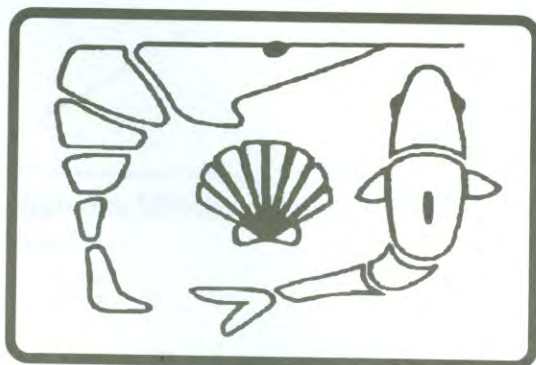




EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN ACUACULTURA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN
PARA PROTEÍNAS DEL SISTEMA INMUNE EN LOS
ESTADIOS LARVARIOS DEL CAMARÓN BLANCO DEL
PACÍFICO *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
presenta:

MIGUEL ARTURO CABANILLAS GÁMEZ

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	13
II.1. Cultivo larvario	13
II.1.1. Vibriosis	13
II.1.2. Enfermedades virales	14
II.1.3. Virus de la necrosis hipodermal y hematopoyética infecciosa (IHHNV)	14
II.1.4. Virus del Síndrome del Taura	15
II.1.5. Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)	15
II.1.6. Enfermedad de la Cabeza Amarilla	16
II.1.7. Mionecrosis Infecciosa	17
II.2. Generalidades del sistema inmune del camarón	17
II.2.1. Fagocitosis	19
II.2.2. Formación de nódulos	19
II.2.3. Encapsulación	20
II.2.4. Sistema de activación de la profenoloxidasa	20
II.3. Proteínas que participan en el sistema inmune	20
II.3.1. Proteínas de Reconocimiento	20
II.3.1.1. Lectinas de membrana	21
II.3.1.2. Proteína unidora de B-1,3-glucanos de bajo peso molecular	21
II.3.1.3. Lipoproteína de alta densidad (HDL-BGBP)	22
II.3.2. Proteínas efectoras	24
II.3.2.1. Chelonioanina	24
II.3.2.2. Peroxinectina	25
II.3.2.3. Proteína de coagulación	26
II.3.2.4. Serin proteasa	27

II.3.2.5. Tansglutaminasa -----	28
II.3.3. Proteínas antibacteriales -----	30
II.3.3.1. Crustina -----	30
II.3.3.2. Lisozima -----	31
II.3.3.3. Peneidina-----	32
II.3.4. Proteínas de choque térmico -----	33
II.3.4.1. HSP 70 -----	33
II.3.4.2. HSP 10 -----	33
II.4. Sistema inmune en estadios larvarios -----	34
II.5. Expresión génica -----	36
II.6. Técnica de expresión diferencial-----	37
III. JUSTIFICACIÓN -----	38
IV. HIPÓTESIS -----	39
V. OBJETIVOS -----	39
V.1. General -----	39
V.2. Objetivos particulares -----	39
VI. MATERIAL Y MÉTODOS -----	40
VI.1. Diseño de primers-----	40
VI.2. Estandarización de Primers-----	40
VI.3. Toma de muestras. -----	41
VI.4. Aislamiento de RNA total -----	41
VI.5. Determinación de la concentración del RNA total por espectrofotometría -	42
VI.6. Estandarización con L13-----	42
VI.7. Síntesis de DNA complementario (cDNA) -----	43
VI.8. Amplificación por PCR -----	43
VI.9. Análisis de los productos de PCR -----	44
VI.10. Cuantificación de la concentración de los productos de PCR por análisis de fluorescencia. -----	44

VII. RESULTADOS	46
VII.1. Toma de muestras de estadios larvales de camarón.	48
VII.2. Aislamiento de RNA total	49
VII.3. Amplificación por PCR	49
VIII. DISCUSIÓN	58
VIII.1. Proteínas de Reconocimiento	58
VIII.2. Proteínas Efectoras	59
VIII.3. Proteínas antibacteriales	60
VIII.4. Proteínas de Choque Térmico	63
IX. CONCLUSIONES	66
X. RECOMENDACIONES	68
XI. LITERATURA CITADA	69

RESUMEN

Los camarones experimentan fuertes cambios morfológicos y diferente susceptibilidad a las enfermedades infecciosas durante su desarrollo larvario. Se determinó por RT-PCR semicuantitativo la expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmune, tales como BGBP, Peroxinectina, Proteína de Coagulación, Lisozima, Peneidina 3 y HSP10 en estadios larvarios del camarón blanco, *P. vannamei*. Se tomó una muestra diaria durante el desarrollo de huevo a PL 20, distribuyéndose las muestras de la siguiente manera: huevo, nauplio (NI-NV), zoea (Z1, Z1+...Z3+), mysis (M1-M3), postlarva (PL 1-PL 20). Todos los genes fueron amplificados mediante PCR en todos los estadios, mostrando importantes variaciones en sus niveles de expresión. La tendencia de los genes durante el desarrollo larvario fue de incrementar su nivel de expresión a partir del segundo subestadio de mysis, alcanzando su nivel máximo en los primeros 10 días de postlarva y enseguida 4 de ellos volvieron a su estado basal (BGBP, Perox, Liso, Penei 3). Este trabajo es uno de los primeros que se hacen sobre ontogenia del sistema inmune del camarón donde se hace un análisis de expresión de genes en todos los estadios, dando elementos para entender porque la incidencia de mortalidades de algunos estadios como mysis a zoea.

ABSTRACT

Shrimp undergo several morphologically different stages during development and therefore the expression of some immunerelated genes such as BGBP, Peroxinectin, Coagulation Protein, Lysozyme, Penaeidine 3 y HSP10 were determined during larval development of the shrimp (*Penaeus vannamei*), from. nauplius 1 until post-larvae 20 and also in haemocytes of juveniles. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that all transcripts were already present in the early larval stage but at different levels. In this study, the transcriptes of immune genes were low during the larval stages and hardly present at all at the first stages of mysis. This might indicate that the development of immune-competent system during the larval stages is not completed and as a consequence they are likely to be more susceptible to infectious diseases during these stages.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Productos de PCR amplificados con primers específicos, utilizando cDNA de hemocitos de camarón <i>P. vannamei</i> .	48
2	Productos de PCR amplificados con primers específicos, utilizando cDNA de hepatopáncreas de camarón <i>P. vannamei</i> .	48
3	Electroforesis en geles de agarosa al 2 % de genes amplificados por PCR en los estadios larvarios del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	51
4	Expresión del gen que codifica para la proteína BGBP en estadios larvarios y la edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	52
5	Variación en la expresión del gen que codifica para la peroxinectina en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	53
6	Variación en la expresión del gen que codifica para la proteína de coagulación en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	54
7	Expresión de genes de las proteínas efectoras del sistema inmune del camarón, proteína de coagulación y peroxinectina, en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	54
8	Variación en la expresión del gen que codifica para la lisozima en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	55
9	Expresión del gen de la proteína antibacterial peneidina3 en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	56
10	Análisis de expresión de genes de las proteínas antibacteriales, lisozima y peneidina 3, en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	56
11	Expresión del gen de la proteína de choque térmico HSP10 en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	57

INDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
I	Número de acceso a la secuencia de proteínas del sistema inmune del camarón depositadas en el GenBank	40
II	Secuencias de primers específicos diseñados para proteínas del sistema inmune del camarón estandarizados con cDNA de hemocitos y hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> .	47

I. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola ha progresado impresionantemente durante las últimas dos décadas (Hannesson, 2003), con una tasa de crecimiento en los ochentas del 5.3% y de 7.1% en los noventas (FAO 2002). Demostrando que la acuicultura tiene gran potencial y en especial la de los crustáceos como el camarón, donde las especies comerciales más importantes son *Penaeus monodon*, *P. vannamei*, *P. chinensis*, *P. orientalis*, *P. stylirostris* y *P. japonicus* (FAO, 2002).

La producción acuícola del camarón se ha reportado alrededor de un millón de toneladas cúbicas, lo cual es equivalente a un tercio de toda la producción incluyendo las pesquerías (Neiland, *et al.*, 2001). En México dicha actividad se ha visto incrementada enormemente, en especial en el noroeste del país en donde se encuentran el 97% de las granjas de camarón, convirtiéndose en una las zonas productoras de camarón más importantes en Latinoamérica (Páez-Osuna, *et al.*, 2003).

En este contexto, el dominio de las técnicas para la producción de postlarvas de camarones peneidos constituye una de las principales bases que permiten la expansión geográfica y la intensificación de la acuicultura; además, la producción de postlarvas en laboratorio es una herramienta muy útil que significa la única posibilidad de abasto de “semilla certificada”.

Sin embargo la acuicultura del camarón está siendo afectada seriamente por problemas asociados con la degradación del ambiente y con enfermedades infecciosas y no infecciosas (Guzmán y Ascencio-Valle 2000; Bachere, *et al.*, 2004). Tal situación se ha vuelto grave con la intensificación del cultivo y por la falta de conocimiento en el manejo, la fisiología e inmunidad de los camarones peneidos (Bachère 2000).

Esto ha llevado a que los estudios relacionados con la inmunidad de los crustáceos y en especial de los camarones peneidos; se haya vuelto una prioridad reciente de los especialistas debido al incremento dramático de las varias enfermedades infecciosas en organismos cultivados; afectando tanto la sustentabilidad, como la economía de la acuicultura de dichos organismos (Bachere 2003; Muñoz, *et al.*, 2000).

Gracias a los estudios realizados en inmunidad del camarón se han alcanzado algunos logros, como la producción de medios y anticoagulantes para el aislamiento de hemocitos sin que estos pierdan su estado natural (Bachére, 2000), los métodos de identificación de genes por análisis EST (Expresión de Secuencias Etiquetadas); (Supungul, *et al.*, 2002); (Rojtinnakorn, *et al.*, 2002), la clonación y caracterización de genes que codifican para proteínas del sistema inmune (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2002; Aoki, *et al.*, 2003; Gollas-Galván, *et al.*, 2003; Hikima, *et al.*, 2003; Huang, *et al.*, 2004; Lo, *et al.*, 2004; Song, *et al.*, 2004; De Lorgeril, *et al.*, 2005; Tonganunt, *et al.*, 2005), así como la técnica de expresión diferencial (Mulenga, *et al.*, 2003; Zhu, *et al.*, 2003; De Lorgeril, *et al.*, 2005; Pan, *et al.*, 2005). Todas estas herramientas han hecho posible un conocimiento más amplio del conocimiento del sistema inmune de los crustáceos.

No obstante, los primeros estadios del ciclo de vida del camarón se caracterizan por presentar altas mortalidades (Bachére, 2003) las cuáles se han atribuido a que el sistema inmune no se encuentra bien desarrollado en este periodo (Bachére, 2000), sin embargo, no se conoce nada acerca del funcionamiento de este sistema en estadios larvarios.

Se han realizado algunos estudios para tratar de encontrar diferencias en el sistema inmune de invertebrados durante los estadios de su ciclo de vida. Los resultados indican que efectivamente, si puede existir alguna diferencia, debido al retraso observado en la respuesta de los organismos ante el reto con un patógeno determinado en estadios larvarios. Algunas proteínas han mostrado que pueden expresarse de manera disímil en los diferentes estadios, incluso podrían no expresarse en alguno de ellos (Chuang, *et al.*, 2000; Muñoz, *et al.*, 2002; Bachére, *et al.*, 2003; Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007). Sin embargo, existen en la actualidad muchas otras proteínas que se conoce que tienen funciones específicas muy importantes dentro del sistema inmune de manera que estas debieran de ser investigadas para conocer si existe algún cambio en su expresión de genes durante los estadios larvarios del camarón, lo cual nos ayudaría a comprender, si en realidad el mecanismo del sistema inmune es diferente en estos estadios.

II. ANTECEDENTES

II.1. Cultivo larvario

Los camarones peneidos son especies económicamente importantes para la industria de la acuicultura. Sin embargo, la producción de las larvas de camarón es a veces amenazada por las altas tasas de mortalidad debido a los brotes de enfermedades infecciosas. Las enfermedades por bacterias, hongos y virus son las principales causas de mortalidades masivas durante los estadios larvarios del camarón, cuando estas son cultivadas en los criaderos (Vaseeharan y Ramasamy, 2003; Aguirre-Guzmán, *et al.*, 2004; Bachére *et al.*, 2003).

II.1.1. Vibriosis

Diferentes especies de *Vibrio* han sido reportadas como patógenos oportunistas que causan serias pérdidas de producción en las granjas de camarón, con mortalidades de hasta el 100 %, particularmente en poblaciones de postlarvas y juveniles (Prayitno y Latchford 1995; Vanderbergh, *et al.*, 1998; Sudheesh y Xu 2001).

Las enfermedades por *Vibrio* se describen como vibriosis o enfermedades bacteriales, septicemia bacterial, luminescencia o la enfermedad de la pata roja y se distribuye ampliamente. Los signos de las enfermedades por *Vibrio* incluyen letargia, necrosis de apéndices y tejidos, lento crecimiento, retraso de la metamorfosis y malformaciones del cuerpo en larvas, bolitas negras, bioluminiscencia, opacidad del músculo, melanización, intestino medio vacío y anorexia (Lightner 1996; Robertson, *et al.*, 1998; Smith 2000). Ante la presencia de septicemia bacteriana se ha observado un gran número de bacterias en montajes de hemolinfa al microscopio, así como también Necrosis e inflamación de órganos (órgano linfoide, branquias, corazón y hepatopáncreas) (Smith, 2000).

Las investigaciones de la patogenicidad de los *Vibrios* en camarón han usado diferentes métodos de infección, tales como inmersión, inyección intramuscular y entubación oral. Los estudios han mostrado claramente que la patogenicidad varía ampliamente y es un proceso complejo afectado por muchas variables que incluyen, el hospedero, la especie y cepa del *Vibrio*, el estadio de desarrollo, la condición fisiológica, el estrés ambiental, la dosis y el

tiempo y método de infección (Karunasagar, *et al.*, 1994; Le Groumellec, *et al.*, 1996; Goarant, *et al.*, 1998 ; Saulnier, *et al.*, 2000; Sudheesh y Xu 2001 ; Alday-Sanz, *et al.*, 2002).

II.1.2. Enfermedades virales

Aunque se han encontrado cerca de 10 virus en el cultivo de camarones peneidos en el Hemisferio Occidental, solo cuatro de estos han causado enfermedades panzooticas con serias consecuencias económicas en las Américas durante la década pasada (Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; 2003). Estos virus, o mejor dicho, grupos de diferentes cepas de las mismas especies de virus, son IHHNV, TSV, WSSV y IMNV. IMN (Mionecrosis Infecciosa) emergió recientemente en granjas de los estados del noreste de Brasil, donde ha causado serias mortalidades y pérdidas de producción a las granjas afectadas (Lightner, *et al.*, 2004).

II.1.3. Virus de la necrosis hipodermal y hematopoyética infecciosa (IHHNV)

IHHNV es el mas pequeño de los virus conocidos en los camarones peneidos. El virion es icosaédrico, desnudo con 22 nm de diámetro y ha sido clasificado como miembro de la familia *Parvoviridae* y probable miembro del género *Brevidensovirus* (Nunan, *et al.*, 2000; Shike, *et al.*, 2000).

Inicialmente la enfermedad de IHHN, y posteriormente el agente causal IHHNV, fueron descritos como la causa de epizootias agudas y mortalidades masivas (90 %) en Hawaii (Brock y Lightner, 1990). Se ha detectado que algunos miembros de las poblaciones de *P. stylirostris* y *P. vannamei* que sobreviven a las infecciones por IHHNV pueden ser portadores asintomáticos del virus toda su vida y pasarlo a su progenie por transmisión vertical y horizontal (Motte, *et al.*, 2003). Aunque después se demostró que IHHNV no ocasiona mortalidades masivas en *P. vannamei*, tiene un fuerte impacto económico y en la producción debido a la irregularidad y reducción del crecimiento (Lightner, 1996a). La estrategia para mitigar el efecto de esta enfermedad ha sido la selección de líneas de *P. stylirostris* resistentes a IHHNV y el desarrollo de líneas de *P. vannamei* libres de IHHNV o SPF (Specific Pathogen-Free) (Tang, *et al.*, 2002).

Unos pocos años después de su descubrimiento en 1981, IHHNV se encontró ampliamente distribuido en las zonas de cultivo de camarón en América y en poblaciones

silvestres a lo largo de la costa del Pacífico. Recientemente se ha encontrado ampliamente distribuido en camarones silvestres y cultivados en el Este y Sureste de Asia, donde no ha causado pérdidas de producción (Tang, *et al.*, 2003; Primavera y Quintio, 2000). Los estudios moleculares han mostrado considerables variaciones entre los virus aislados en Asia (Tang, *et al.*, 2003), mientras que en América esta ha sido muy poca (Tang y Lightner, 2002).

II.1.4. Virus del Síndrome del Taura

TSV es un pequeño virus de RNA simple. El virion es icosaédrico, desnudo, con un diámetro de 32 nm. (Robles-Sikisaka, *et al.*, 2001; Mari, *et al.*, 2002). TSV ha sido asignado por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV) al género *Cripavirus* y a la familia *Dicistroviridae*, ambos recién creados (Mayo, 2002a). Su principal hospedero es el camarón blanco del pacífico *P. vannamei*, aunque puede infectar y presentarse en otras especies (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle F., 2000; Robles-Sikisaka, *et al.*, 2001). Las mortalidades acumulativas en las epizootias de TSV varían del 40-90 % en las poblaciones de postlarvas cultivadas y los sobrevivientes pueden ser portadores del virus por toda su vida (Lotz, 1997).

TSV emergió de una fuente emérgida en Ecuador en 1991. La enfermedad se reconoció en 1992 como la principal enfermedad de *P. vannamei* cultivado (Lightner, *et al.*, 1995) y la etiología viral fue confirmada en 1994 (Hasson, *et al.*, 1995).

Estudios moleculares de TSV sugieren que en un principio estuvo presente una sola cepa del virus en las pandemias iniciales, pero que posteriormente han emergido nuevas cepas con diferente rango de hospederos y virulencia (Zarain-Herzberg y Ascencio-Valle, 2001; Erickson, *et al.*, 2002).

II.1.5. Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)

WSSV tiene un amplio rango de hospederos entre los crustáceos decápodos y es potencialmente letal para la mayoría de las especies de camarones peneidos cultivados comercialmente (OIE., 2003). El agente causal de WSSV es un virus de doble cadena de DNA muy larga, recientemente asignado por el ICTV al nuevo género, *Whispovirus* y a la familia *Nimaviridae* (Mayo, 2002a; b). Los viriones son largos (80-120 x 250-380 nm), en forma de bastón a elíptica y con una envoltura trilaminar (van Hulten, *et al.*, 2001).

La enfermedad de la mancha blanca emergió en el Este de Asia en 1992-93 y se extendió rápidamente con las semillas y pies de cría a todo el continente Asiático y a la India, donde causó una gran pandemia y sigue causando pérdidas en algunas regiones. Posteriormente, los signos de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) fueron reportados en Korea (Kim, *et al.*, 1998), la India (Karunasagar, *et al.*, 1998), las Filipinas y los Estados Unidos (Durand, *et al.*, 2000) y Sureste y Oriente Medio de Europa. Posteriormente WSD alcanzó el Sureste, Oriente Medio, Australia y España en Europa (OIE., 2003), teniendo un fuerte impacto en Centro y Sudamérica durante 1999 (Vidal, *et al.*, 2001; Lightner, 2003).

II.1.6. Enfermedad de la Cabeza Amarilla

La enfermedad de la cabeza amarilla (YHD) fue primero descrita en 1991 como una epizootia en las granjas tailandesas (Limuswan, 1991), posteriormente se reportaron brotes en otros países de Asia. Pruebas de laboratorio han mostrado que YHV puede causar altas mortalidades en especies de cultivo representativas y especies silvestres en América (Pantoja y Lightner, 2003).

YHV es un virus de RNA de una sola cadena en sentido positivo (Tang y Lightner, 1999), relacionado con los *nidovirus* en el *Coronaviridae* y *Arteriviridae* (Stidilokratna, *et al.*, 2002), la cepa Australiana fue reconocida como especie del nuevo género *Okavirus* en la nueva familia *Roniviridae* (Mayo, 2002a; b; OIE., 2003). Aunque YHV fue primero reportado como una epizootia de las granjas de camarón Tailandesas, subsecuentes brotes han sido reportados en camarones cultivados en muchos lugares de Asia (OIE., 2003).

YHV ha sido reportado en camarones que se importan congelados a los Estados Unidos (Durand, *et al.*, 2000) y ha sido incorrectamente reportado en algunas granjas de cultivo de camarón en las Américas en base a la presentación de necrosis severas del órgano linfoide (Lightner y Redman, 1998). Sin embargo, estudios recientes demostraron que la diagnosis histológica reportada en las Américas fue debida a infecciones severas con el virus de la mancha blanca, la cual puede causar histopatología en el órgano linfoide, tal como ocurre en la fase severa aguda de YHD (Pantoja y Lightner, 2003).

II.1.7. Mionecrosis Infecciosa

La Mionecrosis Infecciosa (IMN) es una enfermedad recientemente identificada en *P. vannamei* cultivados en el Noreste de Brasil. Los brotes de esta enfermedad se han visto asociados con ciertos tipos de estrés físico y ambiental (salinidad y temperaturas extremas, colección por redes de molde, etc.) y posiblemente con el uso de alimentos de baja calidad.

IMN se presenta en *P. vannamei* como una enfermedad con un inicio agudo de signos gruesos y mortalidades elevadas, pero progresa con un curso más crónico, caracterizado por mortalidades persistentes a bajo nivel. A la fecha, IMN parece estar limitada al Noreste de Brasil pero también han sido reportados camarones con signos gruesos en otros países donde se cultiva *vannamei*. Los camarones infectados presentan extensivas áreas necróticas en el músculo estriado, principalmente en el segmento abdominal distal y en el abanico de la cola. Los camarones en la fase aguda presentan lesiones con necrosis coagulativa del músculo, a veces con edemas. En los camarones que se recuperan de la fase aguda de la enfermedad o los que están en la fase más crónica, la mionecrosis parece progresar de coagulativa a licuefactiva. El virus ha sido parcialmente caracterizado y las porciones de su ácido nucleico (RNA) han sido clonadas y secuenciadas, así mismo se han desarrollado pruebas moleculares y métodos de RT-PCR para su detección y diagnóstico (Lightner, *et al.*, 2004).

II.2. Generalidades del sistema inmune del camarón

Los invertebrados no poseen inmunoglobulinas, ni siguen una memoria del primer encuentro con un patógeno. No obstante, las especies de invertebrados preceden a los vertebrados. Por ejemplo, algunas especies de camarón han existido desde hace 30 millones de años, mientras que el promedio de duración de la vida de algunas especies (invertebrados o vertebrados) es de solo 4 millones de años y los humanos aparecieron hace solo 3 millones de años. Consecuentemente, en vista de la gran antigüedad de su existencia, es obvio que ellos poseen un sistema de defensa eficiente (Roch, 1999).

Aunque la cutícula dura forma una barrera estructural y química para los parásitos, es necesaria una red eficiente de defensa inmune interna para matar a los microorganismos oportunistas o patógenos que puedan entrar a las cavidades del cuerpo a través de heridas o

durante la muda. Al igual que en otros animales, el sistema de defensa de los crustáceos se basa principalmente en la actividad de las células sanguíneas o hemocitos. Estas células pueden eliminar partículas extrañas del hemocele de los crustáceos por medio de actividades de fagocitosis o encapsulación.

Otro proceso importante en los crustáceos acuáticos es la rápida curación de heridas para prevenir la pérdida substancial de la hemolinfa y la penetración de microorganismos, por ello, la reacción de coagulación es un mecanismo de defensa extremadamente rápido y eficiente en los crustáceos (Söderhäll y Cerenius 1992).

Para identificar y clasificar a los hemocitos se han utilizado diferentes criterios: morfológicos, antigénicos y funcionales (Rodríguez, 1996). Básicamente se han descrito tres tipos de hemocitos, encontramos a los hemocitos hialinos (H), que no poseen gránulos; los hemocitos semigranulosos (SG), con abundantes gránulos; y los hemocitos granulosos (G) cargados de gránulos (Johansson, *et al.*, 2000).

Las células hialinas de la mayoría de los crustáceos se caracterizan por la ausencia de gránulos. Atacan rápidamente y se extienden de manera extensiva sobre la superficie del material extraño, siendo incluso capaces de fagocitarlo (Söderhäll, *et al.*, 1996; Söderhäll, *et al.*, 1986; Raa, 1996).

Las células semigranulares contienen un número variable de gránulos pequeños. Son muy inestables *in vitro* y requieren manejo cuidadoso y delicado, de otra manera serán rápidamente lisadas y liberarán su contenido. Se ha propuesto que son las células semigranulares las responsables de reconocer las moléculas y partículas extrañas (tales como polisacáridos y β -1,3-glucanos de los microbios) y de responder con la degranulación, dándose enseguida el ataque y el recubrimiento de la superficie del invasor; (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2000) además, son las principales células involucradas en la encapsulación (Rendon y Balcázar, 2003).

Por otra parte, los hemocitos granulares no responden a los polisacáridos ni participan en las reacciones de encapsulación, estas células están llenas de grandes gránulos y su función principal es como reservorio del sistema de activación de la profenoloxidasas (el sistema

proPO) (Smith y Söderhäll, 1983). A diferencia de lo que ocurre con los hemocitos semigranulares, los polisacáridos microbianos por sí solos son incapaces de provocar una liberación exocitótica del sistema de las células granulares. Existen dos proteínas endógenas que están asociadas con el sistema de la proPO, llamadas el factor 76 KD (Destoumieux, et al., 2000) y la proteína unidora de β -1,3-glucanos, las cuales una vez que reaccionan con β -1,3-glucanos son capaces de inducir la exocitosis y, subsecuentemente, la liberación del sistema de la proPO de los gránulos de las células granulares (Barracco, *et al.*, 1991).

II.2.1. Fagocitosis

La fagocitosis es una reacción de defensa celular. La eliminación de material particulado en los crustáceos la realizan dos tipos de células: los hemocitos libres y los fagocitos fijos (en los senos hemáticos del hepatopáncreas en la mayoría de los decápodos). Johnson (1987), menciona que la fagocitosis es la eliminación de materiales extraños del hemocele de crustáceos decápodos, donde se ven involucradas varias clases de células. Proteínas y pequeños virus son eliminados por los podocitos, células especializadas en pinocitosis, ubicadas en las branquias y en la glándula antenal (Rodríguez, 1996). La fagocitosis junto con otros mecanismos humorales constituye la primera línea de defensa inmunitaria cuando una partícula atraviesa la primera barrera de defensa que constituye la cutícula (Söderhäll y Cerenius, 1992).

II.2.2. Formación de nódulos

Cuando la cavidad del cuerpo está invadida por un gran número de microorganismos, que exceden los que pueden ser removidos por fagocitosis, en algunos invertebrados incluyendo los crustáceos, ocurren los nódulos o agrupamientos de células. El resultado final de la formación de nódulos es que los microorganismos quedan atrapados en varias capas de hemocitos y posteriormente los nódulos son fuertemente melanizados por la actividad de la fenoloxidasa del huésped.

Las bacterias son rápidamente removidas de la circulación y localizadas en los agrupamientos de hemocitos, usualmente en las branquias, pero también ocurren en los senos

entre los túbulos hepatopancreáticos. Se piensa que las branquias y el hepatopáncreas son los principales sitios del cuerpo donde se alojan los patógenos (Söderhäll y Cerenius, 1992).

II.2.3. Encapsulación

Cuando un parásito es muy grande para ser fagocitado, varios hemocitos colaboran para sacar la partícula extraña de la circulación. Las células semigranulares son las primeras en reaccionar a las partículas extrañas y encapsular algunos intrusos (Persson, *et al.*, 1987), además, la proteína 76 KD puede funcionar como opsonina para este tipo de células durante la encapsulación de partículas extrañas (Kobayashi, *et al.*, 1990).

II.2.4. Sistema de activación de la profenoloxidasa

El sistema de activación de la profenoloxidasa es considerado como un sistema de reconocimiento de lo no propio y de defensa en los invertebrados (Söderhäll y Cerenius 1998). La enzima activa, fenoloxidasa (PO), es la responsable de la bien conocida reacción de melanización, la cual generalmente se observa en áreas donde hay heridas o durante una respuesta inmune en los invertebrados. La bifuncional PO, una oxidasa que a su vez contiene cobre, cataliza la oxidación de sustancias fenólicas a quinonas, las que luego son convertidas a melanina. Así mismo, durante la formación de melanina se forman metabolitos tóxicos con actividad fungicida (Nellaiappan y Sugumaran, 1996).

II.3. Proteínas que participan en el sistema inmune

Gracias a los avances alcanzados en herramientas moleculares y técnicas para el estudio del funcionamiento del sistema inmune, de los genes que participan y las proteínas que se sobreexpresan ante los desafíos con patógenos determinados, así como de aquellas que de manera constitutiva se expresan, se ha logrado caracterizar algunas de las proteínas que juegan un importante papel en el sistema de defensa de invertebrados y en especial del camarón (proteínas de reconocimiento, efectoras, antibacteriales, de choque y constitutivas).

II.3.1. Proteínas de Reconocimiento

Las moléculas de reconocimiento juegan un papel importante en la inmunidad innata debido a que ellas reconocen epítopes comunes en la superficie de los patógenos, los cuales usualmente son carbohidratos característicos. En los invertebrados, han sido aisladas y

caracterizadas un gran número de proteínas que reconocen la estructura de los carbohidratos en la superficie celular de los microbios y estas han mostrado ser parte del sistema de inmunidad innata.

II.3.1.1. Lectinas de membrana

(Gross, *et al.*, 2001) reportaron el hallazgo de distintos tipos de moléculas de reconocimiento encontradas en librerías de cDNA de hepatopáncreas de *L. vannamei*, como BGBP y algunas lectinas, mientras que en *L. setiferus* solo se encontraron lectinas. Se identificaron varias secuencias homólogas a varias lectinas tipo-C en las librerías de cDNA de hepatopáncreas de las dos especies. Una de las características más notables de estas ESTs relacionadas a las lectinas es la gran variedad encontrada. De estas dos librerías fueron identificadas una lectina tipo-C con características específicas de un macrófago, una forma unidora de asialoglicoproteínas de macrófagos, una forma asociada a la membrana, una homóloga a la forma específica de las células NK, una forma específica de las células Langerhans y una forma específica de las células Kupffer. Las formas de mayor interés son las de los tipos de células Kupffer, Langerhans, NK y-macrófagos, debido a que todas ellas participan en funciones carroñeras en el sistema inmune de los vertebrados, lo cual eleva la posibilidad de que exista una población de células carroñeras en el hepatopáncreas.

II.3.1.2. Proteína unidora de B-1,3-glucanos de bajo peso molecular

Algunas de las moléculas de reconocimiento tienen características en su estructura primaria que son muy similares a las glucasaas bacteriales, inmunoglobulinas, o a bacteriófagos del tipo de la lisozima, sin embargo, ninguna de ellas ha mostrado tener actividad enzimática, ellas pueden unirse a lipopolisacáridos o β -1,3-glucanos y activar el sistema de defensa en los animales, tal es el caso de la proteína unidora de β -1,3-glucanos aislada de los hemocitos de *Penaeus monodon* (Söderhäll, *et al.*, 2002). Esta es una proteína de 31 kDa que puede unirse a polímeros de β -1,3-glucanos, zymosan, en hemolinfa del camarón. La proteína unidora de β -1,3-glucanos del camarón (GBP), se ha llamado así porque no muestra ninguna actividad de unión hacia los LPS. El cDNA clonado de esta proteína consiste en un total de 1314 nucleótidos con una secuencia poliadenilada y una secuencia poli A en la región C terminal, su masa molecular calculada es de 39.5 kDa y el Pi estimado es de

5.5. Los cuatro aminoácidos residuales (Trp160, Glu165, Asp167, y Glu170) que se supone que participan en la separación de los enlaces glucosídicos β -1,3 o β -1,4 han sido encontrados en la secuencia de la BGBP del camarón. Por otro lado, también se encontró un posible sitio de N-glicosilación, lo que sugiere que se trata de una glicoproteína (Söderhäll, *et al.*, 2002).

Toda la secuencia de esta proteína fue muy similar a la de LGBP del langostino (Lee, *et al.*, 2000), GGBP de *Anopheles gambiae* (Dimopoulos, *et al.*, 1997), CCF-1 de la lombriz de tierra (Beschlin, *et al.*, 1998) y a una proteína unidora de β -1,3-glucanos de *Bombyx mori* (Ochiai y Ashida 2000). Por otro lado, lo altamente homóloga de la región amino terminal de GBP del camarón con la de otras PRP's sugiere que esta región podría jugar un papel importante en el proceso de reconocimiento de los microorganismos.

(Söderhäll, *et al.*, 2002) reportan que no hubo ningún cambio en el mRNA de la BGBP cuando los organismos fueron inyectados con β -1,3-glucanos, curdlan o *V. harveyi*, lo cual sugiere que el gen es expresado de manera constitutiva.

II.3.1.3. Lipoproteína de alta densidad (HDL-BGBP)

(Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2004) determinaron la secuencia completa del cDNA de la HDL-BGBP (6379 pb), el cual codifica para una proteína de 1454 aminoácidos. El aminoácido N-terminal de la BGBP-HDL madura se encuentra en el residuo 197 después de la primera metionina. La secuencia de cDNA contiene una poliadenilación de señal ATA doce nucleótidos arriba de la cola poliA⁺. Entre el codón de terminación y la cola poliA⁺ se encontró una larga secuencia de 1966 nucleótidos 3'-no traducida. Esta región contiene dos ATA (posiciones 6142 y 6153) que desestabilizan el mRNA y participan en su descomposición.

La secuencia de cDNA de la BGBP-HDL contiene un fragmento de lectura abierta de 1454 aminoácidos que contiene la secuencia amino terminal previamente determinada (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998) y tres secuencias internas de aminoácidos terminales obtenidas por digestión trípica. La primera metionina se encuentra en la posición 197 antes del extremo N-terminal de la proteína madura y al parecer no hay secreción del péptido señal. Aunque es un fragmento grande el que se remueve para generar el extremo N-terminal de la proteína madura

también en la BGBP del langostino se remueve un segmento de 109 residuos (Cerenius, *et al.*, 1994), y estas regiones son también homólogas entre ambas proteínas. La inusual región N-terminal del precursor de la proteína juega su papel en el correcto plegamiento de esta, en el mecanismo de carga de los lípidos y, además, compensa la falta de la típica secreción del péptido de señal.

Al igual que en la BGBP de *P. leniusculus*, en la lipoproteína de alta densidad del camarón existen ensanchamientos tipo glucanasa, correspondientes a los residuos 456-476 y 911-931. También comparte con esta proteína la característica Arg-Gli-Asp (RGD) observada en las proteínas que tienen funciones de adhesión celular.

La proteína presentó la mayor abundancia en el hepatopáncreas, seguido por las branquias y luego los pleopodos, pero no se detectaron productos de PCR en hemocitos. Esto contrasta con lo reportado en el langostino usando Northern blotting, donde solo se detectó una señal en el RNA del hepatopáncreas (Cerenius, *et al.*, 1994). Esto podría representar una diferencia de expresión de la BGBP-HDL entre los crustáceos decápodos de agua dulce y marinos o podría deberse a la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, el hepatopáncreas parece ser el principal tejido de expresión del gen de la BGBP-HDL. El contenido de la estructura secundaria de esta proteína (hélices- α y hojas- β) es similar a las lipoproteínas de alta densidad de los insectos, mientras que los sitios tipo glucanasa y características integrin se encuentran en las PRP involucradas en la inmunidad innata, explicando al menos de manera parcial el papel bifuncional de la estructura de la BGBP-HDL del camarón.

La mayor abundancia de transcripción de esta proteína en hepatopáncreas probablemente está relacionada a su papel como la principal glándula almacenadora de lípidos y sintetizadora de proteínas de la hemolinfa, similar a la grasa corporal de los insectos. Así mismo, debido al alto número de ESTs similares a las proteínas involucradas en la defensa inmune que recientemente se han encontrado en hepatopáncreas de varios peneidos, ha surgido la propuesta de que la principal glándula podría jugar un papel importante en la defensa (Gross, *et al.*, 2001).

II.3.2. Proteínas efectoras

II.3.2.1. Chelonioanina

Al igual que en los insectos, las proteínas antibacteriales, proteinasas y sus inhibidores son abundantes en las librerías de cDNA lo cual revela la importancia de estas proteínas para la inmunidad del camarón. Las proteínas que contienen el sitio de la proteína ácida del suero de la leche (WAP) inicialmente se asociaron con los inhibidores de serin proteasas, sin embargo, este campo también está presente en otras proteínas con una variedad de funciones. Las proteínas que contienen el sitio WAP han sido agrupadas en familias en base a función y al sitio específico donde se localizan e incluyen las antileukoproteinasas (ALKI) (Heinzel, *et al.*, 1986), las proteínas inhibidoras de elastasas (Wiedow, *et al.*, 1990), así como las proteínas específicas del epidídimo (Kirchhoff, *et al.*, 1991) y las ovulatorias (Garczynski y Goetz 1997). Aunque el sitio WAP es de tamaño de 45-50 residuos, puede encontrarse en proteínas más grandes que contienen otros sitios activos.

(Vargas-Albores, *et al.*, 2004) reportaron la secuencia de una proteína inhibidora de proteasas de los hemocitos de *Penaeus vannamei*, que contiene un sitio WAP pero no tiene algún otro campo funcional, este es el primer reporte de una proteína que tiene solo un sitio WAP (SWD). La longitud total del clon (433 pb) incluye un fragmento de lectura abierta (ORF) de 282 nucleótidos (93 aminoácidos) cortado por un 5'-UTR de 32-pb y un 3'-UTR de 122-pb que contiene una poliadenilación de señal típica ATAAA. La secuencia de nucleótidos mostró alta similitud con las secuencias descritas como chelonianina en los camarones peneidos: *P. Vannamei* (BE188608), *P. monodon* (AW600774) y *P japonicus* (AU176270) además de algunas otras proteínas de vertebrados que contienen un campo WAP.

La secuencia de la proteína corresponde a una proteína inmadura de 9.7 kDa con un pI de 8.34. El péptido señal predice una división entre Ala24 y Val25, resultando en una proteína madura de 7.3 kDa (69 residuos). Tanto la proteína clonada en *P. vannamei*, como la encontrada en *P. monodon* incluyen ocho residuos de cisteína que probablemente formen un núcleo 4 disulfuro (4-DSC), típico de los sitios WAP. Al inocular los organismos *L. vannamei* con *V. alginolyticus* hubo un aumento en el nivel de RNA en las siguientes 3 y 6 horas, regresando lentamente al estado normal cerca de las 12-24 horas (Vargas-Albores, *et al.*,

2004) lo cual indica que esta proteína puede jugar un papel importante en el sistema inmune de esta especie.

II.3.2.2. Peroxinectina

(Söderhäll, *et al.*, 2001) hicieron ensayos de adhesión celular utilizando hemocitos granulares del camarón tigre *Penaeus monodon*, ellos reportan la presencia de una actividad de adhesión celular en el sobrenadante del lisado de hemocitos (HLS) (alrededor del 60%) en un ensayo en el cual se activó previamente el sistema de la proPO, a diferencia de otro donde la proPO se mantuvo inactiva y la actividad de adhesión celular se vio disminuida. Por ello fue utilizado el HLS con el sistema de la PO activa para el estudio de la actividad de la adhesión celular del camarón con anticuerpos para la peroxinectina del langostino. En seguida, el HLS fue incubado con la peroxinectina con y sin anticuerpos para la peroxinectina del langostino, obteniéndose una significativa reducción de la actividad de adhesión celular en el ensayo con anticuerpos. Tales resultados sugieren que la actividad de adhesión celular en el HLS del camarón podría deberse a una peroxinectina en el camarón.

Usando el cDNA de la peroxinectina del langostino se obtuvo y se secuenció un clon que contenía completo el fragmento de lectura abierta (ORF) de una molécula tipo peroxinectina en el camarón. Contiene 2337 nucleótidos con una secuencia de poliadenilación y una cola poli-A. Codifica para una proteína de 778 aminoácidos con un péptido señal de 20 aminoácidos. La masa molecular calculada de la proteína madura (758 aminoácidos) es de 84.8 kDa y el P_i estimado es de 9.0. En cada una de las partes N y C-terminal de la proteína madura se encontró un sitio de unión integrin, RGD (residuos 60-62) y KGD (residuos 679-681) respectivamente.

La secuencia de esta proteína presentó una similitud del 69% con la peroxinectina del langostino *P. leniusculus* (Johansson, *et al.*, 1995), además de un 50% de con la peroxidasa de *Aedes aegypti* (AF098717), la ovoperoxidasa de *Hemicentrotus pulcherrimus* (AB003145), la peroxidasa de *Drosophila* (Wiedemann, *et al.*, 1992), la peroxidasa de la tiroides de *Sus scrofa* (Magnusson, *et al.*, 1986), y la mieloperoxidasa de *Mus musculus* (Venturelli, *et al.*, 1989), además, la peroxinectina del camarón contiene todos los residuos conservados necesarios para

la actividad peroxidasa, sugiriendo que tiene también esta actividad además de la adhesión celular (Zeng, 1992).

La peroxinectina de los crustáceos y la de *Drosophila* son moléculas que se relacionan porque ambas poseen sitios de unión a integrinas, lo cuál sugirió que ellas funcionan como moléculas de adhesión celular, demostrándose en la peroxinectina del langostino (Johansson, *et al.*, 1995) y la del camarón.

Söderhäll, *et al.*, (2001) también encontraron que esta molécula se transcribe en hemocitos y no en hepatopáncreas. Además, el tamaño del transcripto es de aproximadamente 2.6 kb. La peroxinectina es expresada de manera constitutiva en hemocitos y mostró una relativa reducción de su transcripción después de un periodo de dos horas de que los organismos fueron desafiados (inyectados) con laminarina y LPS.

II.3.2.3. Proteína de coagulación

Al igual que el papel bifuncional de la HDL-BGBP que fue primero reportado en el langostino de agua dulce *Pacifastacus leniusculus* (Hall, *et al.*, 1995), proteína (HDL) que fue primero reportada como BGBP por su papel en el reconocimiento de la materia extraña (Cerenius, *et al.*, 1994), un papel bifuncional también ocurre en la proteína de coagulación de los crustáceos, la cual es también lipoproteína de muy alta densidad (VHDL).

Debido al contenido de lípidos, las lipoproteínas tienen menor densidad que las proteínas que no contienen lípidos, característica que ha sido ampliamente utilizada para su aislamiento por ultra centrifugación. Yepiz-Plascencia, *et al.*, (2002) detectaron un polipéptido de aproximadamente 200 kDa en las fracciones 4-7 en reducción SDS-PAGE. Estas fracciones (4-7) tienen una densidad de 1.155 a 1.212 g/ml, que corresponde a las lipoproteínas clasificadas como VHDL, y ellas contienen un polipéptido de 200 kDa. La migración de la banda de 200 kDa fue muy parecida a la de una proteína previamente identificada como proteína de coagulación (Montaño-Pérez, *et al.*, 1999; Reyes-Izquierdo y Vargas-Albores 2001) y su identidad fue confirmada por la secuencia N-terminal. Se determinaron un total de 15 aminoácidos y los primeros 10 fueron idénticos a la secuencia N-terminal de 10 aminoácidos de la CP de *P. vannamei* previamente reportada (Montaño-Pérez, *et al.*, 1999).

Además, esta secuencia fue 100% idéntica al extremo N-terminal de la CP de *P. monodon* (Yeh, *et al.*, 1998; Yeh, *et al.*, 1999) y altamente parecida a la de una variedad de crustáceos, confirmando la idea de que la VHDL es también la proteína responsable de la formación de coágulos (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2002).

En *P. leniusculus*, la VHDL del plasma es la misma proteína de coagulación (CP) previamente reportada (Hall, *et al.*, 1995). La CP de los camarones peneidos marinos *P. japonicus* (Chen, *et al.*, 1993), *P. monodon* (Yeh, *et al.*, 1998) y *P. vannamei* (Montaño-Pérez, *et al.*, 1999), así como la de *P. leniusculus* (Kopáček, *et al.*, 1993) es una proteína formada por dos subunidades idénticas de 180-200 kDa forma un largo polímero, constituyendo un coágulo que previene la pérdida de hemolinfa en los tejidos dañados, reacción catalizada por la transglutaminasa hemocítica, y por esta razón, es considerada un constituyente del sistema inmune (Kopáček, *et al.*, 1993).

II.3.2.4. Serin proteasa

Las serin proteasas (SPs) realizan una amplia gama de funciones fisiológicas importantes, incluyendo digestión, coagulación de la sangre, fibrinólisis, fertilización, desarrollo embrionario e inmunidad (Rawlings y Barret 1993; Krem y Di Cera 2002).

Para ejercer sus funciones extracelulares estas enzimas generalmente son sintetizadas como zimógenos y almacenados en vesículas o gránulos, de los cuales ellos son liberados y convertidos a la enzima activa por división proteolítica de un enlace peptídico en particular. A través de específicas interacciones proteína-proteína, varios zimógenos de SP pueden formar una cascada en la cual una proteasa activa al zimógeno de otra para realizar una reacción local rápida. Ejemplos clásicos de este sistema de las SP son la cascada de coagulación de la sangre en el plasma humano, el sistema de activación de la profenoloxidasa (sistema proPO) en los artrópodos y la cascada de coagulación en la hemolinfa de *Limulus* (Muta y Iwanaga 1996; Bennett y Ratnoff 1972; Söderhäll y Cerenius 1998).

Las serin proteasas del camarón probablemente participen en varios mecanismos de defensa, incluyendo la coagulación de la hemolinfa, encapsulación melanótica, inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos y activación de las citoquinonas, similar a insectos

(Kanost, *et al.*, 2001; Jiang y Kanost 2000; Gorman y Paskewits 2001). Por lo tanto, se asume que su presencia es necesaria para la activación proteolítica del sistema de la proPO (Gollas-Galván, *et al.*, 1997). Por otro lado, varias ESTs que codifican para SP han sido descritas de varias librerías de cDNA de hemocitos de camarón (Gross, *et al.*, 2001; Rojtinnakorn, *et al.*, 2002) y estas ESTs son muy similares en secuencia a otras SP descritas del sistema inmune de otros artrópodos.

Con el fin de estimar la abundancia, el papel y diferencias de las SP de los hemocitos del camarón, Vargas-Albores, *et al.*, (2005) analizaron varios clones aislados de una librería de cDNA de hemocitos del camarón *P. vannamei*, ellos lograron aislar un clon que codifica para una serin proteasa. Apartir de una genoteca de hemocitos (Vargas-Albores, *et al.*, 2005) aislaron un clon de 1123 nucleótidos, incluyendo el codón de iniciación ATG en las posiciones 83-85, y el codón de terminación TGA en las posiciones 1052-1054, y una señal de poliadenilación, ATTAAA, en las posiciones 1055-1060. El fragmento de lectura abierto continuo (969 nucleótidos) codifica para un polipéptido de 323 residuos con una masa molecular estimada de 35 kDa. El péptido de señal predicho es de 16 residuos, produciendo un péptido precursor de SP maduro de 33.5 kDa (307 aminoácidos) conteniendo el típico sitio catalítico de las SP formado por His127, Asp175 y Ser268.

La presencia del mRNA fue probada por RT-PCR en el músculo, hipodermis, corazón, cola, branquias, hepatopáncreas y hemocitos, observándose una banda de 800 pb solo en hemocitos, y no en otros tejidos. Para determinar un papel tentativo de esta proteína en la respuesta inmune, Vargas-Albores, *et al.*, (2005) inocularon camarones juveniles con *V. alginolyticus*; sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de la SP durante los tiempos muestreados (3, 6, 12 y 24 h), esto concuerda con algunos trabajos en los que se ha observado que este tipo de proteasas a veces están involucradas en sistemas complejos, tal como el sistema de activación de la profenoloxidasa y, usualmente su expresión no cambia por la inyección de bacterias (Gorman y Paskewits 2001; Kraut 1977; Kim, *et al.*, 2002).

II.3.2.5. Transglutaminasa

Las transglutaminasas (TG) (EC 2.3.2.13) son conocidas principalmente por su papel en la coagulación de la sangre y el remodelamiento postraducciona de las proteínas. Las

enzimas de esta familia usan un mecanismo modificado de la doble sustitución para ejercer una reacción de aciltransferencia dependiente de calcio entre el grupo γ -carboxamino de un enlace peptídico de una glutamina y el grupo ϵ -amino del enlace peptídico de una lisina o el grupo amino principal de un poliamino. Cuando una lisina unida a una proteína actúa como un acil receptor, se forman enlaces ϵ -(γ -glutamil) inter o intramoleculares, resultando en la polimerización de la proteína (Folk y Finlayson 1977; Folk 1980; Lonrad y Conrad 1984; Greenberg, *et al.*, 1991).

En invertebrados se han caracterizado ocho productos de genes de diferentes transglutaminasas basados en su estructura primaria (Grenard, *et al.*, 2001). Además de este nivel de diversidad en los genes, la TG experimenta un sin número de modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, acilación de grasas, y división proteolítica que regulan su actividad enzimática y localización subcelular (Aeschlimann y Paulsson 1994); (Kim, *et al.*, 1995; Eposio, *et al.*, 1996; Steinert, *et al.*, 1996; Aeschlimann, *et al.*, 1998). Las TG están ampliamente distribuidas en tejidos y fluidos corporales, y se especializan en el eslabonamiento cruzado de proteínas particulares o estructuras de tejidos para una variedad de procesos biológicos.

(Song, *et al.*, 2004) identificaron el cDNA de una transglutaminasa en el camarón, el cual comprende 2988 pb, con un fragmento de lectura abierta de 2271 pb. La proteína contiene 757 aminoácidos, su masa molecular calculada es de 84.713 Da y su punto isoeléctrico es de 5.56. No contiene la secuencia de señal típica de un sitio transmembranal. Presenta cuatro sitios potenciales de N-glicosilación y también fue identificada una propiedad unión a integrinas (RGD).

La transglutaminasa tiene mayor similitud con la de langostino, sin embargo presentó homología con otras TG de invertebrados y vertebrados. La principal similitud se encontró entre los núcleos catalíticos, especialmente en las del camarón y langostino. Todos los aminoácidos involucrados en las triadas catalíticas son perfectamente conservados.

La transglutaminasa del camarón contiene un sitio RGD (Arg-Gli-Asp), el cual está presente en la mayoría de las ligasas, lo que la une a la familia de receptores de membrana llamada integrín (Ruoslahti, 1996). El sitio RGD se encuentra también en la misma posición

en la TG del langostino (Wang, *et al.*, 2001), la TG de la mosca de la fruta (Adamas, *et al.*, 2000) y la TG de queratinocitos de humanos (Phillips, *et al.*, 1990; Kim, *et al.*, 1991).

La actividad de esta TG del camarón fue detectada en pedúnculo ocular, intestino, hepatopáncreas, branquias, corazón, órgano linfoide, tejido subcuticular y hemocitos, pero no en el plasma, siendo más fuerte en hepatopáncreas. En los análisis por RT-PCR se detectó baja expresión en el intestino, hepatopáncreas, branquias, corazón órgano linfoide, epitelio subcuticular y hemocitos, pero no en el pedúnculo ocular. Por hibridización *in situ* no se pudieron detectar señales en la mayoría de los órganos probados, sin embargo, las señales mas fuertes se detectaron en hemocitos jóvenes y en el tejido hematopoyético. Con respecto a los ensayos de coagulación, solo el sobrenadante de lisado de hemocitos mostró esta actividad, a diferencia del pedúnculo ocular, intestino, hepatopáncreas, branquias, corazón, órgano linfoide y células del epitelio subcuticular, donde no se detectó la actividad. El hecho de que la proteína se encuentre en varios órganos pero la actividad de coagulación solo se haya llevado a cabo en el sobrenadante de lisado de hemocitos implica que el camarón puede contener mas de un tipo de transglutaminasa.

II.3.3. Proteínas antibacteriales

II.3.3.1. Crustina

La crustina, primero purificada del cangrejo arenero *Carcinus maenas*, se conoce como un péptido antibacterial de 11.5 kDa (Relf, *et al.*, 1999). Esta proteína es activa solo contra bacterias marinas Gram positivas y parece requerir de altas salinidades para expresar su actividad. La crustina es estable y retiene su actividad aún después del hervor, es un péptido rico en cisteína y tiene el 30% de similitud con proteínas 4-disulfuro del corazón o del suero ácido. Las proteínas con esta propiedad generalmente poseen propiedades inhibitorias de serin proteasas y pueden inhibir el crecimiento celular (Larsen, *et al.*, 1998). Recientemente ha sido clonado un cDNA homólogo a la crustina de dos especies hermanas de camarones peneidos *P. vannamei* y *P. setiferus* (Bartlett, *et al.*, 2002). El cDNA de la crustina codifica para una proteína con una secuencia líder, una repetición hidrofóbica rica en glicina en la región amino-terminal y una región única carboxilo terminal. La región amino-terminal se ha encontrado que tiene similitud a la secuencia de la crustina del cangrejo herradura (Relf, *et al.*, 1999). Así

mismo, en *Marsupenaeus japonicus* se encontraron 5 variantes de la crustina. La variante 1 tuvo un cDNA de 694 nucleótidos y un fragmento de lectura abierta de 573 pares de bases. La secuencia incluyó una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, un péptido señal de 18 aminoácidos y un número de repeticiones ricas en glicina entre las posiciones 28 y 103 de su secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la segunda variable fue idéntica a la del tipo 1, excepto que tuvo una región repetida adicional de 28 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de las variantes 3, 4 y 5 también fue idéntica a la del tipo 1, excepto por el número de repeticiones ricas en glicina. Estas regiones repetidas en el grupo 3, 4 y 5 fueron 20 y 16 residuos más largas y 8 residuos más cortas que la región repetida del péptido tipo 1 respectivamente. Su expresión se detectó mediante la técnica de PCR exclusivamente en hemocitos. Así mismo, se mostró que la expresión de este péptido es inducida por la administración de peptidoglucanos (Takashi, *et al.*, 2004).

II.3.3.2. Lisozima

La lisozima (E.EC. 3.2.1.17) ha sido descrita en los invertebrados como un componente del sistema inmune innato, funcionando como una proteína antibacteriana. La proteína ejerce su función hidrolizando el enlace β -1,4 glicosídico de los peptidoglucanos de las paredes celulares bacterianas (Jolles y Jolles 1984). Han sido descritas dos familias de lisozimas: C (pollo) y G (ganso). En general, las lisozimas de tipo C son más grandes de tamaño y no requieren Asp 52 para la catálisis (Matsumura y Kirsch 1996).

Sotelo-Mundo, *et al.*, (2003) clonaron y secuenciaron totalmente el cDNA de la lisozima de *P. vannamei* y obtuvieron la secuencia de aminoácidos de la proteína madura. El ORF continuo obtenido comprendió un total de 150 aminoácidos.

La secuencia de la lisozima del camarón fue comparada con la de humanos, la del huevo de gallina y otras lisozimas de insectos previamente reportadas, observándose alta similitud con las del tipo C, incluyendo el invariable residuo catalítico Glu 35 y Asp 52, por ello, la lisozima del camarón es un nuevo miembro de la familia de lisozimas tipo C. Su presencia fue confirmada directamente de los hemocitos del camarón blanco, detectándose una banda de 446 pares de bases en geles de poliacrilamida al 10% con tinciones de plata de alta resolución. La actividad enzimática de la proteína fue detectada en lisado de hemocitos, pero

no en el plasma, indicando que la lisozima es expresada, traducida y almacenada dentro de las células (Sotelo-Mundo, *et al.*, 2003).

II.3.3.3. Peneidina

Las peneidinas fueron primero caracterizadas en *P. vannamei*, usando aproximaciones bioquímicas y técnicas de clonación molecular. Tres péptidos, inicialmente llamados peneidinas 1, 2 y 3 fueron aislados en su forma activa y madura (5.68-6.62 kDa) de los hemocitos del camarón (Destoumieux, *et al.*, 1997). Sin embargo, el análisis filogenético indicó que las peneidinas 1 y 2 podrían ser clasificadas en la misma clase (Cuthbertson, *et al.*, 2002). Las peneidinas están compuestas de un sitio N-terminal rico en prolina, seguido de un sitio C-terminal que contiene seis residuos de cisteína organizados en pares. La estructura completa es única entre las familias AMP (Destoumieux, *et al.*, 1997). El espectro de actividad antibacteriana de las peneidinas 2 y 3 de *P. vannamei* ha sido establecido a través de la producción y el análisis de péptidos recombinantes (Destoumieux, *et al.*, 1999). Más recientemente, ha sido identificado un nuevo subgrupo de peneidinas en *P. vannamei*, usando una aproximación genómica, llamado peneidina 4 por sus autores (Cuthbertson, *et al.*, 2002), y se produjo un péptido sintético para investigar y caracterizar las propiedades funcionales y el espectro de actividad (Cuthbertson, *et al.*, 2004). Las peneidinas poseen actividad antibacteriana predominantemente dirigida contra bacterias Gram positivas y actividad antifúngica contra hongos filamentosos. Muy recientemente, ha sido determinada la conformación de la estructura de la peneidina recombinante 3 de *P. vannamei* y la peneidina sintética 4 de *P. setiferus*, revelando la completa organización de los dos sitios y el arreglo de enlaces disulfuro (Yang, *et al.*, 2003; Cuthbertson, *et al.*, 2005). Estudios recientes han demostrado la presencia de mRNAs de peneidinas en diferentes especies de camarones peneidos (Gross, *et al.*, 2001; Supungul, *et al.*, 2002; Rojtinnakorn, *et al.*, 2002; Kang, *et al.*, 2004). Además, se mostró que en *vannamei* y *setiferus*, los subgrupos de peneidinas (Wang y Wang, 2004; Brahmachary, *et al.*, 2004; Destoumieux, *et al.*, 1997) se expresan en un solo individuo (Gross, *et al.*, 2001). El análisis de la expresión de secuencias etiquetadas (EST) de librerías de cDNA de hemocitos demostró que la transcripción de las peneidinas es muy abundante. De hecho, las peneidinas parecen representar 10.7 y 20% de todas las secuencias aisladas de hemocitos de *vannamei* y

setiferus respectivamente (Gross, *et al.*, 2001). Se han publicado alrededor de 200 secuencias diferentes de peneidinas, las cuales recientemente han sido clasificadas en tres subgrupos: peneidinas 2, 3 y 4 (PEN2, PEN3 y PEN4) (Gueguen, *et al.*, 2006).

II.3.4. Proteínas de choque térmico

II.3.4.1. HSP 70

Una de las tendencias más interesantes entre las librerías de cDNA de hemocitos y de hepatopáncreas reportadas por Gross, *et al.*, (2001) fue la distribución de proteínas de choque térmico. En las librerías de cDNA de hemocitos fue identificada una homóloga para la proteína de estrés 70 relacionado al choque térmico (HSP 70) entre las ESTs de *P. vannamei* y una homóloga para las HSP 82 fue encontrada entre las ESTs de *P. setiferus*. Las HSPs tienen una función de protección celular. Las proteínas de estrés conocidas como HSP 70 Y HSP 60 son “chaperones moleculares”. Su función es facilitar la conformación de la estructura madura de las proteínas, previniendo su desnaturalización bajo condiciones de estrés y restaurando las proteínas desnaturalizadas (Gross, *et al.*, 2001). Los niveles tanto de la HSP 70 como de la HSP 60 pueden cambiar (usualmente incrementan de 3-15 veces) en respuesta al estrés celular (Ohashi, *et al.*, 2000). La HSP 82 (también conocida como HSP 90) interactúa con los receptores de la hormona productora de esteroides y regula su actividad (Fliss, *et al.*, 2000). Además, en las librerías de *L. setiferus* se encontraron otras dos HSPs de tamaño moderado (HSP 28 y HSP 29), de las cuales la HSP 28 aumenta la supervivencia previniendo la muerte celular en vertebrados (Paul y Arrigo 2000), mientras que de la HSP 29 se desconoce su función.

II.3.4.2. HSP 10

La HSP10 es capaz de expresarse ante condiciones de estrés y de manera constitutiva debido a su función en el mantenimiento de la homeostasis celular (Chen, *et al.*, 1994 Lo, *et al.*, 2004). Gross, (2001), reportó la presencia de una variedad de proteínas de choque térmico en librerías de cDNA de hemocitos y hepatopáncreas de *P. vannamei* (Gross, *et al.*, 2001). Recientemente se ha caracterizado el cDNA de la proteína de choque térmico HSP10 en *Penaeus vannamei* (Romero, 2006). La secuencia codificante de HSP10 de *P. vannamei*

obtenida por Romero (2006), tiene identidad de hasta 92% con las secuencias nucleotídicas parciales de HSP10 de ADNc de *L. setiferus* y *P. monodon*. La secuencia completa del ADNc presentó un tamaño de 689 pb, de las cuales, al marco de lectura codificante para la proteína madura corresponden 102 aminoácidos. El RNAm de esta chaperonina fue detectado en una variedad de tejidos, branquias, corazón, ojos, cutícula, pleópodos, sistema nervioso, intestino, músculo, hemocitos y hepatopáncreas en *Penaeus vannamei*, detectándose una abundante cantidad de RNAm en cada uno de ellos. Así mismo, se mostró que el gen de la HSP10 es capaz de sobreexpresarse durante las primeras horas post-infección en organismos expuestos al virus de la mancha blanca (Romero, 2006).

II.4. Sistema inmune en estadios larvarios

El desarrollo larvario de los camarones penidos es uno de los más complejos de los crustáceos, generalmente tiene 3-6 estadios de nauplio, 3 de protozoa y 3 estadios de mysis larval, seguido por el desarrollo de post-larva a adulto (Ronquillo, *et al.*, 2006; Türkmm, 2005). Después de un día, los huevos eclosionan y entran en el primer estadio larval, conocido como nauplio, durante el cual, su cuerpo es insegmentado, parecido a una araña, posee tres pares de apéndices y se alimenta de las reservas de la propia yema del huevo. Después experimenta 5 procesos de muda para cambiar a protozoa, el segundo estadio larval, y empieza a alimentarse de algas. En el primer estadio de protozoa, el cuerpo tiene un par sobresaliente de ojos compuestos, en el siguiente aparece el rostrum y en el último se observan los urópodos. Durante protozoa, las larvas se alimentan de algas y una variedad de alimentos balanceados por tres a cinco días y luego cambian a mysis, el tercer y último estadio larval. En mysis, la morfología de la larva es similar a la del camarón juvenil, en el cual el cuerpo es segmentado y se desarrollan el pedúnculo ocular y los pleópodos. En mysis se alimentan de algas, alimento balanceado y zooplancton. mysis tarda otros tres o cuatro días y luego las larvas completan su metamorfosis a post-larva. Las postlarvas son parecidas a los adultos, con los pleópodos totalmente desarrollados y funcionales. El animal se alimenta de zooplancton, detritus y alimento comercial. Todos los pasos de esta metamorfosis ocurren en un periodo de ocho a nueve días (Motoh, Buri, 1981; Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007). Aparentemente, la información de los mecanismos de defensa en los estadios larvales es muy limitada.

En los teleosteos, el desarrollo de leucocitos en el sistema inmune temprano y el posterior sistema inmune adquirido ha sido bien estudiado (Rombout, *et al.*, 2005). Sin embargo, se conoce poco acerca de la ontogenia del sistema inmune del camarón y la relación entre la expresión de genes y el estadio de desarrollo (Muñoz, *et al.*, 2003).

Las altas mortalidades causadas por enfermedades bacterianas y fungales son un problema común durante los primeros estadios larvarios del camarón (Lightner, 1983), se ha visto que el periodo más crítico son los cuatro estadios metamórficos de nauplios, zoea, mysis y postlarva. La transición de zoea a mysis es especialmente difícil y su sobrevivencia es típicamente solo del 30 al 50% de las crías (Chuang, *et al.*, 2000). Generalmente, se piensa que los estadios tempranos del desarrollo son más susceptibles a los patógenos que los adultos (Lightner, *et al.*, 1983; Evans, Shapiro, 1997; Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007). Por lo anterior, la susceptibilidad de las larvas del camarón podría estar relacionada a su inmunoincompetencia durante estos tempranos estadios.

Los primeros estudios para determinar diferencias ontogénicas en la respuesta inmune a diferentes estadios de desarrollo en invertebrados fueron realizados con la cucaracha americana, *Periplaneta americana*, (Karp y Rheins, 1985), entre las diferencias de la respuesta humoral relativas al estado de desarrollo, ellos encontraron que los primeros estadios se caracterizan por un largo periodo antes de que se desarrolle una respuesta inmune.

Posteriormente, el estudio de los patrones de expresión de algunos péptidos han constituido una herramienta útil para el estudio de las reacciones inmunes (Muñoz, *et al.*, 2002). En el 2002, Chiang realizó un estudio con el camarón tropical, *Penaeus monodon*, encontrando que el mRNA de la proteína Ras asociada a la membrana celular, que participa en la transducción de señales, varía grandemente de una cantidad mínima en el estado de nauplio a un máximo en el de postlarva (Chuang, *et al.*, 2000).

Los trabajos más recientes han mostrado una amplia variación en la expresión de genes durante el desarrollo larvario. Usando hibridación *in situ* y RT-PCR, se ha detectado que la transcripción de la peneidina se lleva a cabo al menos desde nauplio 5 hasta postlarva 8 en *P. vannamei* (Muñoz, *et al.*, 2003). En *P. monodon*, el gen la peneidina parece expresarse en niveles dramáticamente menores comparada a otras proteínas antibacteriales como la crustina

y la peroxinectina, las cuales se expresan fuertemente en etapas larvarias en *P. monodon* en los estadios larvarios (Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007; Bachère, *et al.*, 2003). Así mismo, se mostró una muy baja transcripción, apenas detectable del RNAm de la proPO en N4, mientras que la proteína activa (PO) no se detectó en este estadio, pero sí en los siguientes, con un incremento constante durante el desarrollo. Sin embargo la ausencia de un completo sistema de la proPO en las larvas tempranas pudiera ser una causa de la mayor susceptibilidad a los patógenos en estos estadios (Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007). Ante la ausencia del sistema de la proPO activo y de las peneidinas, la crustina y la peroxinectina parecen ser algunos de los péptidos que actúen en respuesta a un ataque microbiano en etapas larvarias. No obstante, en *P. monodon*, se ha reportado la presencia de un grupo independiente de peneidinas, cuya expresión se ha detectado desde el estado embrionario de una célula hasta postlarva, (Jiann-Chu, *et al.*, 2007). Otros genes también mostraron amplia variación en las larvas de *P. monodon*, como la transglutaminasa, la cual se incrementó en el estadio de protozoa 3, relacionándose con la aparición de una mayor complejidad en el hepatopáncreas, similar a su estructura en el organismo adulto.

II.5. Expresión génica

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. En todos los organismos, inclusive los eucariotes el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo, ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células, los cuales son utilizados como referencia en los análisis de expresión de otros genes, estos son conocidos como "housekeeping genes". El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en

diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos.

La expresión de genes constitutivos se refiere a una transcripción continua que da lugar a un cierto nivel constante de los productos proteicos. Estos genes son los que se encargan de administrar y mantener el suministro continuo de sus productos para el metabolismo central y el mantenimiento general de la célula.

La expresión de genes que se inducen o se reprimen se refiere a aquellos genes que pueden ser activados (inducidos) para incrementar los niveles de mRNA y sus productos proteicos o aquellos que pueden ser desactivados (reprimidos) para disminuir los niveles de mRNA y de las proteínas. Estos genes están regulados por la RNA polimerasa y moléculas de señal del tipo de las proteínas reguladoras, hormonas y metabolitos (Boyer, 2000).

II.6. Técnica de expresión diferencial

La caracterización de la expresión regulada de genes es esencial para el estudio del crecimiento y diferenciación celular, así como para investigar el mecanismo molecular de las enfermedades. La expresión diferencial fue desarrollada para permitir una selección sistemática y no parcial de las diferencias moleculares a nivel de la expresión del mRNA entre las diferentes células o tejidos (Liang y Pardee, 1998). La técnica de la expresión diferencial es un método utilizado para identificar el estado de RNAs mensajeros individuales (mRNAs) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. En esta técnica se pueden utilizar un par de primers oligonucleótidos; uno se ancla a la cola poliadenilada de un subconjunto de mRNAs, el segundo deberá ser corto y arbitrario para que se alinee a regiones arbitrarias diferentes a la del primer primer. Las subpoblaciones de RNAm definidas por este par de primers son luego amplificadas por transcripción reversa y corridas en un gel para secuenciar el DNA (Liang y Pardee, 1992). También es posible la realización de análisis de expresión utilizando oligonucleótidos dirigidos a la amplificación de genes específicos.

III. JUSTIFICACIÓN

La industria del cultivo de camarón es una de las que ha mostrado mejor crecimiento durante los últimos años; sin embargo, esta actividad actualmente está siendo amenazada por diversas enfermedades que provocan pérdidas cuantiosas en los sistemas de cultivo, tanto en la engorda como en los sistemas de producción de larvas, dichas enfermedades son ocasionadas por una variedad de patógenos entre los que destacan los Virus y las bacterias del género *Vibrionacea*.

Las mortalidades ocurridas suelen ser masivas, en particular en los sistemas de producción de larvas, dejando al descubierto que estos organismos son especialmente susceptibles a las enfermedades durante esta etapa, lo que generalmente se asume que es debido a la inmadurez del sistema de defensa en los estadios tempranos de su desarrollo.

Algunos trabajos han evidenciado la diferencia en la susceptibilidad de invertebrados dependiendo de la fase de desarrollo, siendo generalmente más susceptibles en etapas tempranas y, considerándose que esto es debido a la inmadurez del sistema inmune, que les impide responder adecuadamente al ataque de patógenos, resulta primordial el estudio de los cambios en la expresión de genes que codifican para las proteínas que intervienen de manera importante en las reacciones de defensa. Esto nos llevará a comprender la razón por la cual la susceptibilidad a las enfermedades sea mayor en algunos estadios y posteriormente montar estrategias para mejorar la resistencia de las larvas al estrés producido por los patógenos y con ello mejorar las producciones.

IV. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la expresión de genes que codifican para proteínas del sistema inmune en los diferentes estadios del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

V. OBJETIVOS

V.1. General

Evaluar los cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas del sistema inmune en estadios larvarios del camarón blanco *Penaeus. vannamei*.

V.2. Objetivos particulares

- Diseñar iniciadores en base a secuencias de aminoácidos o nucleótidos de proteínas del sistema de defensa del camarón.
- Estandarizar condiciones de amplificación de genes que codifican para proteínas del sistema inmune.
- Demostrar diferencias en la expresión de genes que codifican para proteínas del sistema inmune, debido a los diferentes estadios del camarón desde nauplio 1 hasta PL 20.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Diseño de primers

Para la amplificación de genes en diferentes estadios de *L. vannamei*, se diseñaron primers específicos, sentido y antisentido, (Tabla 1). Estos se diseñaron en base a las secuencias de DNA que codifican para proteínas del sistema inmune y que han sido reportadas en el GenBank.

Tabla I.- Número de acceso a la secuencia de proteínas del sistema inmune del camarón depositadas en el GenBank.

Proteína	No. Acceso	Proteína	No. Acceso	Proteína	No. Acceso
Unidora de glucanos (BGP)	AF473579	Peroxinectina	AF188840	Crustina	AF430073
BGBP	P81182	Proteína de Coagulación	BF024392	HSP 70	AF474375
Lectinas de membrana	BF024206	Chelonianina	AY464465	HSP10	BF024512
ProPO	AF099741	Lisozima	AF425673	Anti Virus	AY302750
Transglutaminasa	AF469484	Peneidina 2	Y14925		
Serin Proteasa	AY372186	Peneidina 3	Y14925		

VI.2. Estandarización de Primers

Se probó un juego de 19 primers diseñados en base a secuencias reportadas de proteínas que juegan un papel importante en el sistema de defensa humoral de diferentes especies de camarones peneidos, probándose diferentes temperaturas de alineamiento del primer (45-65 °C), diferentes concentraciones de templado (0.5-3.0 µl) variando el número de ciclos para encontrar las condiciones mas adecuadas de amplificación de los segmentos del RNAm que codifica para cada una de las diferentes proteínas buscadas.

Los primers fueron primero probados con cDNA de tejido de hepatopáncreas y de hemocitos de organismos juveniles y adultos para evitar el efecto de posibles inhibidores de la polimerasa en muestras de larvas.

Una vez que se obtuvo amplificación con el cDNA de organismos adultos, se procedió a estandarizar las condiciones con muestras de larvas con algunos primers que amplifican la secuencia de proteínas del sistema de defensa humoral utilizando algunos para proteínas constitutivas como control.

VI.3. Toma de muestras.

La colecta de las muestras se llevó a cabo durante una estancia de 30 días realizada en los laboratorios de producción de larvas de camarón “Maricultura del Pacífico S.A de C.V.”

Los estadios muestreados comprenden huevo, 5 subestadios de nauplio (N1-N5), 6 subestadios de zoea (Z1, Z1+, Z2, Z2+, Z3, Z3+), 3 subestadios de mysis (M1, M2, M3) y una muestra diaria desde PL1 hasta PL20. Se tomaron 5 réplicas de la muestra de cada estadio.

La toma de muestras, se hizo pasando a través de un tamiz el volumen de agua que contenía a los organismos necesarios para obtener 500 mg de tejido. Con ayuda de una pizeta se dio un lavado a los organismos con agua marina artificial estéril, luego se dividieron en 5 muestras de 100 mg cada una. Cada muestra se colocó en un vial de 1.5 ml y se añadieron de 700-1000 µl de TRIZOL a cada una para posteriormente realizar el macerado con ayuda de un pistilo. Las muestras fueron congeladas para los análisis posteriores.

VI.4. Aislamiento de RNA total

La extracción del RNA se realizó utilizando el reactivo de TRIZOL (Gibco BRL Life Technologies) (1 ml de TRIZOL/50-100 mg de tejido). Se procedió a la homogenización del tejido en un microtubo, incubación de las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos, agregando 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIZOL utilizado, agitando vigorosamente por 15 segundos, enseguida se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugaron a 12000 x g por 30 minutos a 4 °C. Al realizar esta centrifugación las muestras se separaron en una fase acuosa e incolora superior, una interfase y una fase inferior rojiza. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo microtubo para proceder con la precipitación del

RNA, agregando a cada muestra 500 μ l de isopropanol por cada ml de TRIZOL usado, mezclando por inversión e incubando las muestras a 4 °C por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 x g a 4 °C por 30 minutos. Las muestras se lavaron dos veces adicionando 200 μ l de etanol al 75% y fueron centrifugadas a no mas de 7500 x g después de realizado el lavado. El precipitado se colocó en un secador sin dejarlo completamente seco. Posteriormente el RNA se disolvió en agua libre de RNasas pasándolo varias veces a través de la punta de una pipeta e incubándolo por 10 minutos a una temperatura de 55 °C.

VI.5. Determinación de la concentración del RNA total por espectrofotometría

Para determinar la concentración de RNA por absorbancia se usaron 5 μ l resuspendidos en 50 μ l de H₂O estéril (dilución 1:100). La determinación se hizo de la siguiente manera:

$$\text{Pureza} = A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$$

$$\text{Concentración} = (40)(\text{dilución})(A_{260 \text{ nm}}) / 1000$$

$$\text{Factor establecido para determinar la concentración de RNA} = 40$$

$$\text{Factor establecido para determinar la concentración de DNA} = 50$$

La medición de la absorbancia se hizo en un espectrofotómetro de placa Biotec Sinergy HT. El cálculo de la concentración, se realizó tomando como base que 40 μ g/ml de RNA tienen una A 260 nm igual a 1.

En la determinación de la pureza se tomaron como aceptables aquellos RNAs que tuvieron un valor de A 260/A 280 entre 1.7 y 2.1 (Sambrook, *et al.*, 1989).

Para evaluar la integridad y calidad del RNA extraído, se sometieron las muestras a electroforesis en geles de agarosa.

VI.6. Estandarización con L13

La concentración de la L13 fue utilizada para estandarizar la concentración de RNA total de todas las muestras. Para ello se realizó un RT-PCR de un juego de RNA total de todas las muestras utilizando primers específicos para L13. La concentración de los productos de

RT-PCR con L13 fue medida en solución mediante fluorescencia utilizando el reactivo picogreen (ver punto VI.10).

Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones para ajustar la concentración de la muestras de RNA total a la de la muestra que mostró una menor concentración del producto de L13 por RT-PCR.

VI.7. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para sintetizar el cDNA se utilizó el Kit 12371-019 Superscript First-Strand Síntesis System for RT-PCR (Invitrogen). La cual es una enzima capaz de sintetizar cadenas de cDNA en gran cantidad y longitud (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, el cual consistió en mezclar 5 µg de RNA total con 1 µl de dNTP mix 10 mM mas 1 µl de Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ 0.5 µg/µl y 1 µl de H₂O estéril. La mezcla se incubó a 65 °C para permitir el alineamiento del Oligo dT con el poly-A del mRNA. Posteriormente se incubó en hielo por lo menos durante 1 minuto y se preparó para cada reacción una mezcla de 2 µl de buffer 10X RT, 4 µl de MgCl 25 mM, 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µL de Rnasa OUT.

La mezcla se incubó por 2 minutos a 42 °C y se adicionó 1 µl de la transcriptasa reversa Superscript II RT 50 U/µl, y se incubaron por 50 minutos a 42 °C. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción incubando por 15 minutos a 70 °C y posteriormente se colocaron en hielo. En seguida se eliminó el mRNA agregando 1 µl de la RNasa H y se incubaron por 20 minutos a 37 °C. El CDNA sintetizado en este paso se empleó para las reacciones de PCR .

VI.8. Amplificación por PCR

Para amplificar los fragmentos de cDNA por la reacción de PCR se utilizaron cebadores o primers específicos para cada una de las proteínas que se muestran en la tabla 2. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 25 µl en el termociclador PX2 (un ciclo de 5 min a 94 °C, y 35 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a °C).

Las amplificaciones con los primers estandarizados durante el desarrollo larvario fueron realizadas por PCR , utilizando el kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG. Se usó el procedimiento indicado por el fabricante con una modificación. El volumen de

reacción fue ajustado a 15 μl (7.5 μl de la Platinum[®]SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG, 1 μl de primer sentido, 1 μl de primer antisentido, 1 μl de cDNA templado y 4.5 μl de agua tratada con DEPC.

Los tiempos del programa utilizado fueron: 50 °C por dos minutos, 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 95, 60 y 72 °C, finalizando con 10 minutos a 72 °C.

VI.9. Análisis de los productos de PCR

Los productos de las amplificaciones por PCR durante la estandarización de los primers se analizaron en geles de agarosa al 1.2 %. Para determinar el tamaño de los fragmentos se usó el marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen, Gaithersburg, ED. EUA). El volumen de carga de cada muestra en el gel fue de 10 μl y de 4 para el marcador utilizando 2 μl de buffer muestra 5X para las muestras y uno para el marcador. El gel se corrió de 30-50 minutos a 70 volts. Enseguida se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por un minuto, destiñéndolo con agua por 5 minutos.

En las pruebas con el cDNA de larvas, los productos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa prefabricados Invitrogen al 2 % utilizando el marcador de peso molecular Low Mass Ladder de Invitrogen. La intensidad de la banda de cada producto medida en base al número de pixeles con el software Digital science 1D de Kodak, versión 3.0.1.

VI.10. Cuantificación de la concentración de los productos de PCR por análisis de fluorescencia.

La estimación de la concentración del DNA por fluorescencia se realizó utilizando el Kit PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Reagent and Kits, el cual es un reactivo ultrasensitivo para determinar fluorescencia de ácidos nucleicos de doble cadena (dsDNA) en solución (Sambrook, *et al.*, 1989).

Se utilizó el protocolo establecido por el fabricante con una modificación. El procedimiento consistió en diluir las muestras experimentales en buffer TE a un volumen final de 100 μl , posteriormente se añadió a cada muestra un volumen de 100 μl de la solución acuosa de trabajo PicoGreen, seguido de una incubación de 2-5 minutos protegidas de la luz.

A continuación se midió la fluorescencia usando un espectrofotómetro de lectura en placa. Los parámetros utilizados fueron: excitación 480 nm y emisión 520 nm. La lectura se realizó en el fondo de la placa.

La determinación de la concentración se llevó a cabo con una curva estándar previamente elaborada.

VII. RESULTADOS

La morfología de los camarones peneidos durante el desarrollo es bastante diversa y en general, se describen formas muy distintas que ocurren durante la metamorfosis y muda, las cuales se distinguen principalmente por los apéndices utilizados para locomoción. En general, se consideran los estadios larvales y poslarvales; entre los primeros se incluyen las formas llamadas nauplios, protozoa, mysis y poslarva, a las cuales sigue la forma de juveniles o adultos, ésta última, es la forma de camarón comúnmente conocida (Dall, *et al.*, 1990). En los estadios larvales, la morfología cambia significativamente por medio de metamorfosis y muda, mientras que en los juveniles; el crecimiento ocurre por medio de la muda, en donde la forma se mantiene (Dall, *et al.*, 1990). El desarrollo ontogénico del camarón es un proceso único dentro de los crustáceos decápodos. Se caracteriza porque todos los estadios larvarios son libres-nadadores y la transformación morfológica que sufren antes de llegar a la etapa adulta, lleva consigo cambios importantes en sus hábitos alimenticios, tasas metabólicas, e incluso en la actividad de sus enzimas digestivas y posiblemente el desarrollo del sistema inmune (Dall, *et al.*, 1990; Lemos, *et al.*, 1999).

Actualmente existen una variedad de proteínas con funciones en el sistema inmune de los crustáceos que han sido caracterizadas de las especies de camarones peneidos más importantes (*monodon*, *vannamei*, *chinensis*, *orientalis*, *stilyrostris* y *japonicus*) y sus secuencias de nucleótidos han sido determinadas. En este trabajo se seleccionaron, algunas de estas proteínas, cuyas secuencias han sido depositadas en el GenBank, dos de ellas han sido tomadas del camarón tigre *P. monodon*: peroxinectina (Söderhäll, *et al.*, 2001) y HSP10 (Lo, *et al.*, 2004). El resto han sido ya reportadas en la especie de estudio de este trabajo, el camarón blanco *P. vannamei*: BGBP (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2004), lisozima (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2004), CP (Sotelo-Mundo, *et al.*, 2003) y peneidina3 (Gross, *et al.*, 2001).

Tabla 2. Secuencia de primer específicos diseñados para proteínas del sistema inmune del camarón, estandarizados con cDNA de hemocitos y hepatopáncreas de *P. vannamei*.

Nombre del primer	Secuencia	Especie
BGBPFw	GTGGCCAGCTATTTGGATGT	<i>P. vannamei</i>
BGBPRw	CGTTCCAGAAGTCGAGGAAG	
PeroxFw	CCTGTGTGGGGGAAGAGTAA	<i>P. monodon</i>
PeroxRv	CAGCTGTTCTGCGTATCCAA	
LizosFw	ATAAACCGCAACAGAAACCG	<i>P. vannamei</i>
LizosRv	AACCGTGAGACCAGCACTCT	
Penei3Fw	CTCCCTCTAGCCTCACCTGC	<i>P. vannamei</i>
Penei3Rv	GAGAGATCTGTCAACACCAACCT	
HSP10Fw	AAGGTCCTCACAGGGAAGGT	<i>P. vannamei</i>
HSP10Rv	GGACAAAACATTCATGCCCT	
CPFw	CTTCCAGTGAACGTCTGCCT	<i>P. vannamei</i>
CPRv	AGACTGAAGCCCATGTTCGTC	

Los primers diseñados fueron probados con cDNA de hemocitos y de hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco.

La temperatura media o temperatura de alineamiento (T_m) recomendada para los primers diseñados osciló entre 63 y 70 °C, Sin embargo, se obtuvo una mejor amplificación utilizando 60 °C., utilizando temperaturas de alineamiento menores se observó una pérdida importante de la especificidad de los primers. Mientras que a T_m mayores se tuvo una menor amplificación. En las figuras 1-2 se observan las bandas y el nombre de los fragmentos amplificados usando cDNA de hemocitos (1) y de hepatopáncreas (2).

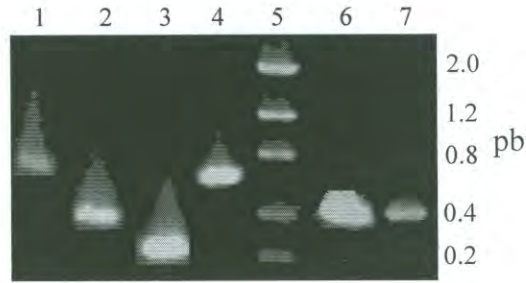


Figura 1. Productos de PCR amplificados con primers específicos, utilizando cDNA de hemocitos de camarón *P. vannamei*. A. 1. BGBP, 2. Peroxinetina, 3. Lisozima, 4. Peneidina, 5. Marcador de peso molecular (Low Mass), 6. Proteína de Coagulación, 7. HSP10.

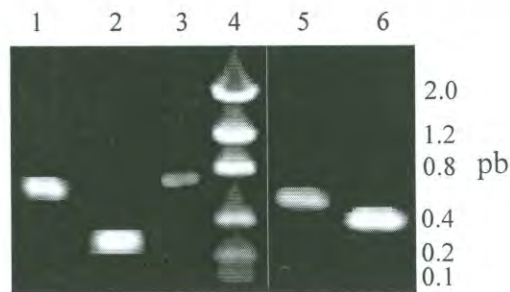


Figura 2. Productos de PCR amplificados con primers específicos, utilizando cDNA de hepatopáncreas de camarón *P. vannamei*. A. 1: BGBP, 2. Lisozima, 3. Peneidina, 4. Marcador de peso molecular (Low Mass), 5. HSP10, 6. Proteína de Coagulación.

Estas condiciones de amplificación se emplearon con las muestras de cDNA sintetizado a partir de RNA de los diferentes estadios de camarón

VII.1. Toma de muestras de estadios larvales de camarón.

La toma de muestras se llevó a cabo en los laboratorios de producción de larvas “Maricultura del Pacífico” S.A. de C.V. El muestreo se inició en el laboratorio número 1 de Maricultura del Pacífico, ubicado en Mazatlán, Sinaloa, donde se encuentra el área de maduración.

Para la realización de este trabajo las larvas fueron, proporcionadas de dos desoves que se realizaron de manera consecutiva, los organismos fueron mezclados y a partir de ese lote se llevaron a cabo los muestreos conforme al avance del desarrollo de los organismos. Las

primeras tomas de muestras se realizaron en el laboratorio 1 (huevo-nauplio 2) debido a que los nauplios son enviados al laboratorio número 2, ubicado en Bahía de Kino, Sonora, donde se completa el ciclo de cultivo larvario. En total se tomaron 175 muestras (5 réplicas de cada uno de los 35 subestadios considerados) de aproximadamente 100 mg cada una, las cuales fueron homogeneizadas en Trizol y congeladas hasta su análisis.

VII.2. Aislamiento de RNA total

Una vez obtenidas las muestras de larvas que fueron previamente homogenizadas en TRIZOL, se procedió a la extracción del RNA total por este mismo método. Se consideró un total de 35 muestras (huevo, 5 de nauplio, 6 de zoea, 3 de mysis y PL1 a PL20), 3 repeticiones de cada una (A, B y C).

La concentración del RNA total extraído de las muestras mediante el método del Trizol fue determinada mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm. Se tomó como base el valor de absorbancia (260 nm) de 1 para una concentración de 40 µg/ml. El valor promedio de la concentración del total de las muestras analizadas fue de 4 ± 1 µg/µl. También se determinó la pureza del RNA total, mediante la relación de la absorbancia medida a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm. Según Sambrook (1989), un valor de 1.7-2.1 en esta relación de absorbancias determina un grado de pureza aceptable del RNA. En este trabajo se analizó el RNA de tres repeticiones (A, B y C) de cada uno de los estadios considerados, dando la relación ABS260/ABS280 valores de 1.85 para la repetición A y 1.76 para las repeticiones B y C, con desviaciones estándar de 0.25, 0.14 y 0.17 respectivamente.

La integridad y calidad del RNA fue corroborada sometiendo 3 µl del RNA de cada muestra a electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

VII.3. Amplificación por PCR

La amplificación de los segmentos de genes que codifican para las proteínas estudiadas en este trabajo fue realizada mediante la Reacción de PCR. El gen ribosomal L13 se expresa de manera constitutiva en los camarones peneidos, por ello fue utilizado en este trabajo, como gen de referencia, para comparar las variaciones en los niveles de expresión de los genes que codifican para proteínas con funciones inmunológicas (figura 3).

Las proteínas para las cuales codifican los genes analizados pueden agruparse en: Proteínas de reconocimiento de lo no propio, efectoras, antibacteriales y una de choque térmico, por lo que los resultados se presentan en este mismo orden.

Se analizó la expresión del gene que codifican para la proteína de reconocimiento BGBP. El cDNA de BGBP amplificado tiene un peso molecular de 617 pares de bases, el cual se expresó de manera constante a partir del estadio de nauplio 3 (N3). El primer estadio en el que parece expresarse este gen es en N3, con un ligero incremento en N4, dos días antes de pasar a zoea. La expresión del gen de la BGBP parece no obedecer a un patrón definido, a pesar de que solo en dos estadios no se detectó su transcripción a partir de N3, su nivel de expresión es realmente bajo en todo el desarrollo con ligeros incrementos en mysis 2 y los primeros días de postlarva. Los únicos picos de expresión realmente significativos de este gen se observan en PL11 y en el organismo adulto (figura 4).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

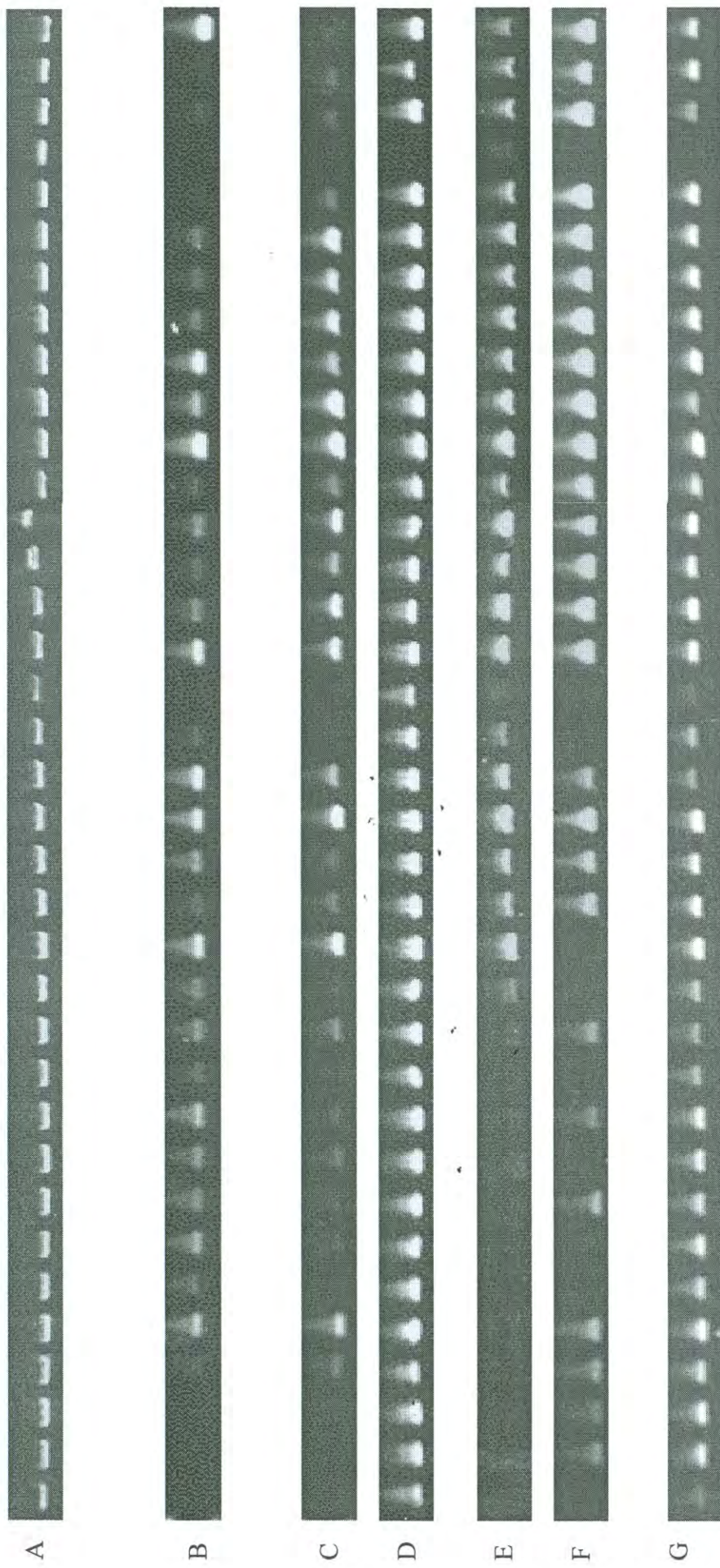


Figura 3. Electroforesis en gels de agarosa al 2 % de genes amplificados por PCR en los estadios larvarios del camarón blanco *P. vannamei*. A. Proteína ribosomal L13. B . Protene de reconocimiento de lo no propio, BGBP . C y D. Proteínas efectoras, peroxinectina y proteína de coagulación. E y F. Proteínas antibacterianas, lisozima y peneidina 3. G. Proteína de choque térmico HSP10. 1, huevo, 2-6, Subestadios de nauplio (1-5).7-12, Subestadios de zoea (1, 1+, 2, 2+, 3, 3+). 13-15, Subestadios de mysis (1-3). 16-35, Subestadios de postlarva (PL 1-20). 36, Adulto.

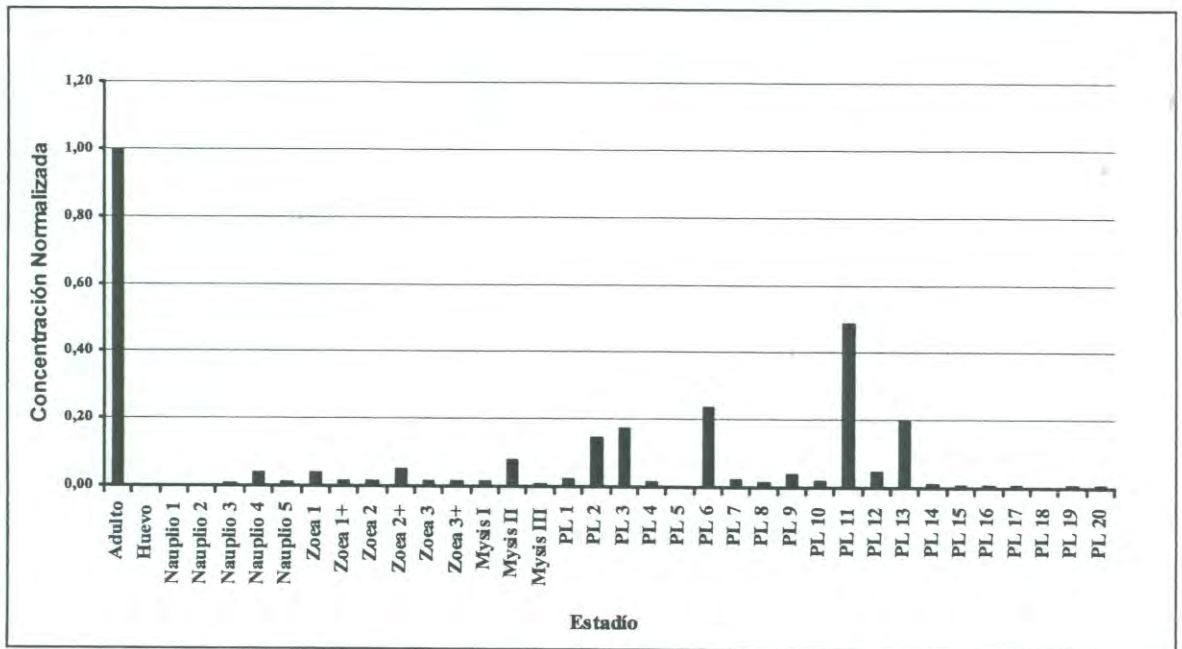


Figura 4. Expresión del gen que codifica para la proteína BGBP en estadios larvarios y la edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

Dos de los genes analizados codifican para proteínas que son efectoras importantes dentro del sistema inmune de los crustáceos, estas son la Peroxinectina, con funciones de adhesión celular y peroxidasa, y la Proteína de Coagulación, que previene la pérdida de hemolinfa en los tejidos dañados. Los Primers utilizados para la amplificación del gen que codifica para una de las proteínas efectoras, Peroxinectina, fueron diseñados en base a la secuencia de la Peroxinectina reportada por Söderhäll para *Penaeus monodon* (Lindmark, *et al.*, 2001).

Se amplificó el cDNA de la peroxinectina de *P. vannamei*. El segmento amplificado tiene una extensión de 511 pares de bases. La expresión del gen de esta proteína se detecta en cantidades bajas durante los primeros estadios (nauplio y zoea, no se detectó en huevo). Como se puede observar en la figura 5, se obtuvieron dos picos de expresión en los sub estadios de Nauplio 4 y mysis 2 durante el desarrollo larvario (3.55 y 11.70 veces respectivamente la cantidad expresada en el adulto), no obstante, los niveles más altos se observaron durante los primeros días de la etapa de postlarva (PL6-PL12). A partir de PL 17 se observan niveles menores a los encontrados en la etapa adulta del organismo.

De los genes que aquí se presentan, el que codifica para CP, otra de las proteínas efectoras, ha tenido un nivel de expresión mucho mayor a los demás, manteniéndose en

todos los estadios larvarios por encima del nivel de expresión mostrado por la proteína constitutiva L13, excepto en el subestadio de postlarva 20. En la figura 6 se observa una cantidad menor del producto en el huevo, sin embargo se tiene un fuerte incremento a partir de nauplio 1, el cual se mantiene de manera casi regular durante los estadios subsecuentes de nauplio, zoea, mysis y los primeros días de postlarva, siendo a partir de PL 10 cuando se observa una marcada disminución en su nivel de expresión.

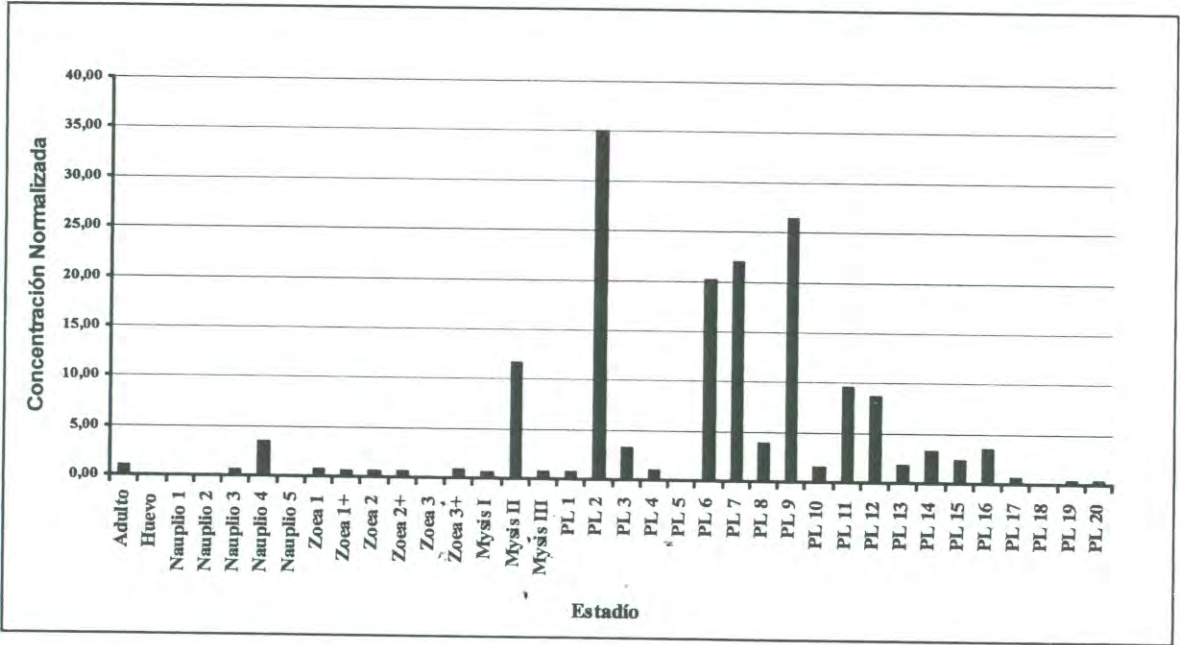


Figura 5. Variación en la expresión del gen que codifica para la peroxinectina en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

La lisozima y la peneidina 3 constituyen dos moléculas importantes para el sistema inmune de los camarones por su función antibacteriana. La expresión del gen que codifica para lisozima, se puede observar de manera casi ininterrumpida a partir del subestadio de zoea 2. Este gen tiene un fuerte incremento en su nivel de expresión a partir de que se detecta en zoea 2 hasta PL 9, cuando alcanza su nivel máximo, y a partir de este mismo estadio empieza a menguar su expresión casi con la misma constancia que se incrementó antes de llegar al máximo, lo cual se observa a manera de una campana en la figura 8.

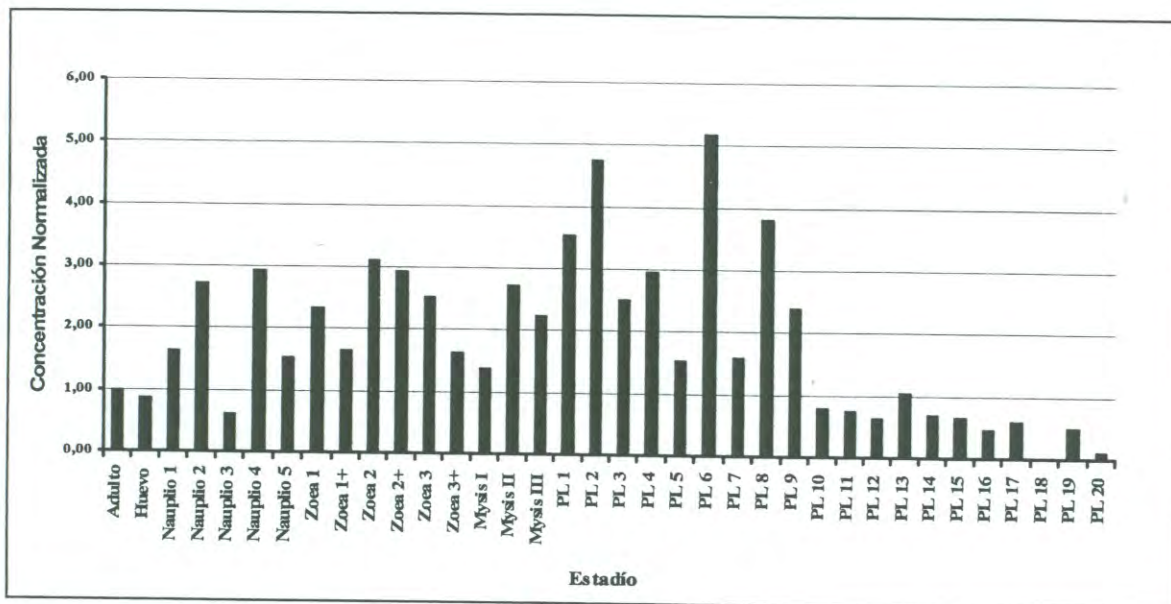


Figura 6. Variación en la expresión del gen que codifica para la proteína de coagulación en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

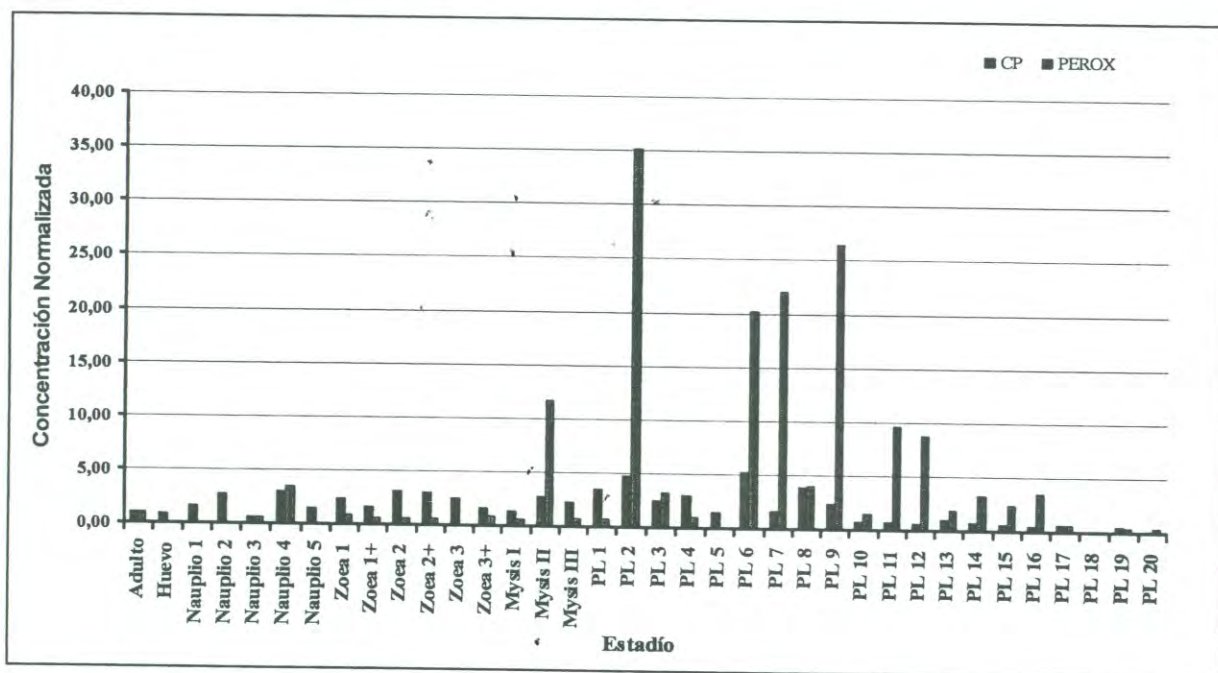


Figura 7. Expresión de genes de las proteínas efectoras del sistema inmune del camarón, proteína de coagulación y peroxinectina, en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

El comportamiento de la expresión del gen que codifica para la peneidina 3 difiere del de la mayoría de los genes que se han estudiado en este trabajo. Se observa un nivel permanentemente bajo durante las primeras etapas de desarrollo (nauplio, zoea y mysis, no se detectó su expresión en el huevo con la técnica aquí utilizada) para tener

una fuerte expresión durante casi toda la etapa de postlarva. El cDNA que aquí se reporta tiene una masa molecular de 445 pb. El comportamiento del gen de esta proteína antibacterial está referido en la figura 9.

La transcripción del RNAm de la HSP10 se mantiene en los organismos de manera muy regular durante su desarrollo si se compara a lo observado con otros genes. Como se puede apreciar en la figura 3, las bandas de los productos de PCR de este cDNA, observadas en los geles de agarosa son de intensidad muy similar en la mayoría de los estadios probados. No obstante, el análisis de los pixeles de la figura reveló que la cantidad expresada del gen de esta proteína se incrementa durante los días de mysis y los primeros 14 días de la etapa postlarval, disminuyendo después de este periodo a los niveles normales observados en el organismo adulto (Figura 11). Solo en algunos estadios se observó una cantidad de cDNA de HSP10 ligeramente menor al de la proteína constitutiva L13.

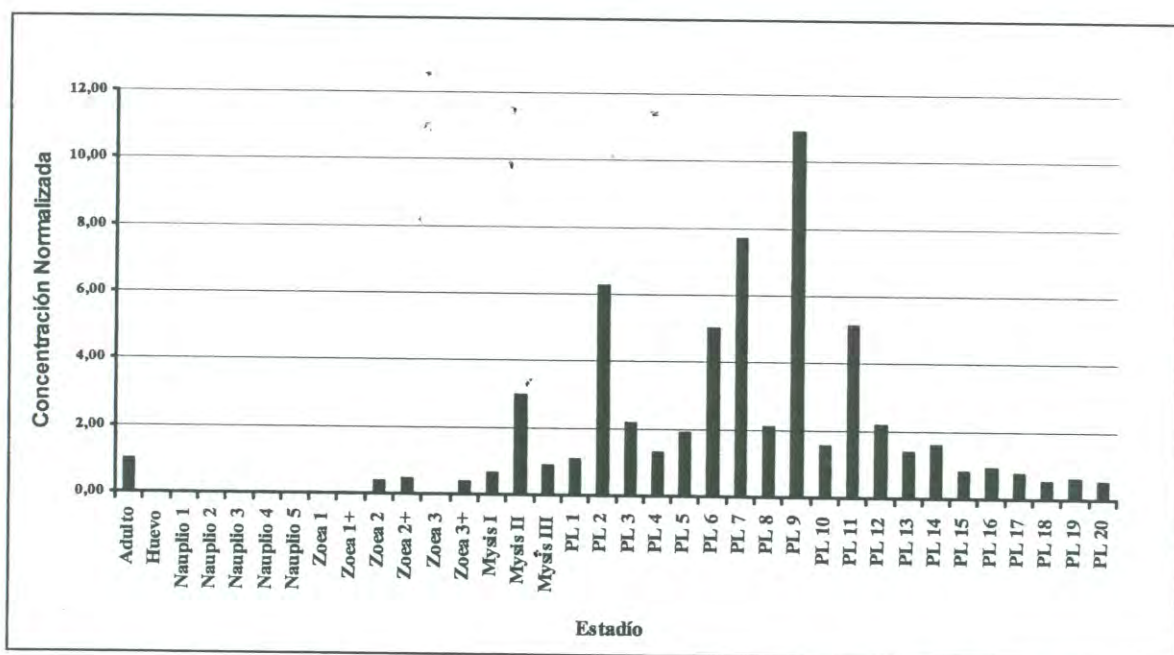


Figura 8. Variación en la expresión del gen que codifica para lisozima en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

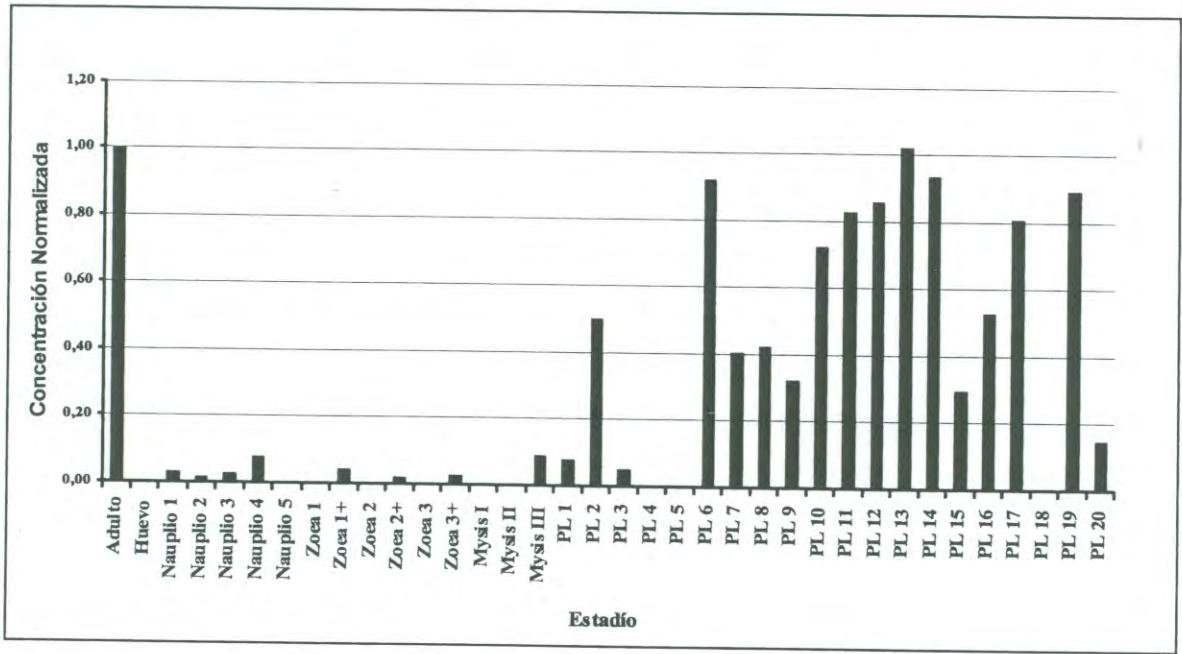


Figura 9. Expresión del gen de la proteína antibacteriana peneidina 3 en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

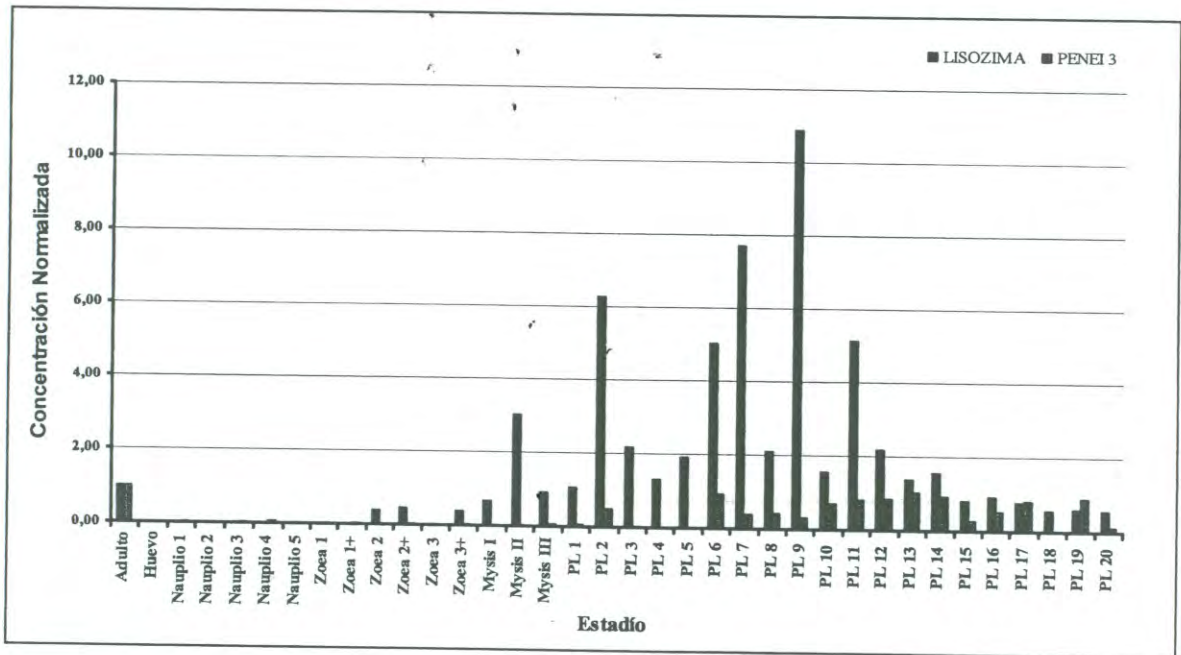


Figura 10. Análisis de expresión de genes de las proteínas antibacteriales, lisozima y peneidina 3, en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

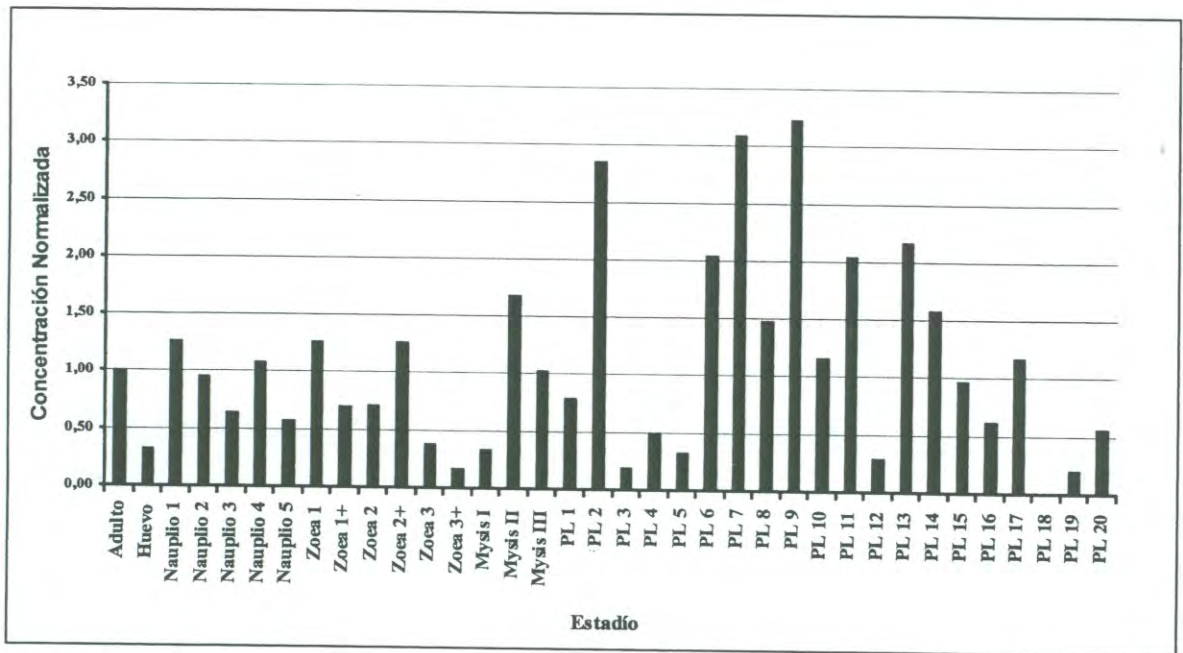


Figura 11. Expresión del gen de la proteína de choque térmico HSP10 en estadios larvarios y edad adulta del camarón blanco *P. vannamei*.

VIII. DISCUSIÓN

El desarrollo ontogénico del camarón es un proceso único dentro de los crustáceos decápodos. Se caracteriza porque todos los estadios larvarios son librenadadores y la transformación morfológica que sufren antes de llegar a la etapa adulta lleva consigo cambios importantes en sus hábitos alimenticios, tasas metabólicas, e incluso en la actividad de sus enzimas digestivas (Dall, *et al.*, 1990; Lemos, *et al.*, 1999). Por lo que, el estudio de la expresión diferencial de genes de la ontogenia como un proceso endógeno de gran importancia en la fisiología del camarón, permite arrojar resultados interesantes para el conocimiento más intenso de los mecanismos de defensa y eliminación de patógenos.

VIII.1. Proteínas de Reconocimiento

Una parte importante del sistema inmune de los invertebrados la constituyen las Proteínas Patrón de Reconocimiento (PRP por sus siglas en inglés), las cuales reconocen y se unen a moléculas con características estructurales llamadas patrones moleculares (Janeway y Medzhitov 2002). Estos patrones están presentes en la superficie de los microorganismos pero ausentes en los animales. Aunque los PRPs carecen de la especificidad de los anticuerpos, ellos reconocen y se unen a carbohidratos tales como los β -1,3-glucanos, lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglucanos presentes en la superficie de bacterias y hongos (Janeway y Medzhitov, 2002; Yu, *et al.*, 2002). La proteína unidora de β -glucanos del plasma del camarón dispara la activación del sistema profenoloxidasa (Kurata, 2004) en los hemocitos, un componente central del sistema de defensa (Vargas-Albores, *et al.*, 1997; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Además, la BGBP del camarón es también una lipoproteína de alta densidad involucrada en el transporte de lípidos (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998).

La BGBP se expresa en hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias, pero no en los hemocitos (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2004). En el trabajo de Yepiz-Plascencia, reporta una mayor abundancia del RNAm de la HDL-BGBP en hepatopáncreas, seguido de branquias y pleópodos. No existen reportes anteriores de la expresión de estas proteínas durante la ontogenia de los crustáceos.

Los resultados aquí obtenidos muestran picos de expresión de la BGBP que se incrementan desde nauplio a PL 11, aunque aparecen muy aislados, con periodos de bajos niveles de expresión, para luego mantenerse en niveles sumamente bajos a partir de PL 14. Posiblemente lo aislado de los picos de expresión se deban a eventos

espontáneos de proliferación de microorganismos que puedan inducir la expresión de este gen, la cual cada vez que se presenta la ocasión llega a ser más alta debido al desarrollo del organismo o a la mayor acumulación de microbios con el avance del cultivo.

En la figura 4 se hace la comparación de la expresión de estos genes en estadios larvarios con la edad adulta, donde se observa que a pesar de los aumentos en los niveles del gen de la BGBP en el desarrollo larvario, esta se mantiene muy baja relativa a la edad adulta.

VIII.2. Proteínas Efectoras

Se analizó la expresión del RNAm de dos proteínas con importantes funciones como efectoras del sistema inmune de los camarones peneidos, estas proteínas son la peroxinectina y la proteína de coagulación.

La peroxinectina de los crustáceos fue primero aislada del langostino *Pacifastacus leniusculus*. La peroxinectina aislada del langostino, además de tener actividades de peroxidasa y de adhesión celular, es también una opsonina (Söderhäll, et al., 1994) y un factor que promueve la degranulación (Johansson y Söderhäll 1989) y la encapsulación (Sritunyalucksana, et al., 2001). El cDNA que codifica para la peroxinectina en *P. monodon* se transcribe en los hemocitos y no en el hepatopáncreas, así mismo se expresa de manera constitutiva (Söderhäll, et al., 2001). Al igual que en el langostino, en *P. monodon* la actividad de adhesión celular de la peroxinectina es desarrollada junto con la activación de la profenoloxidasa, por lo cual se sugiere que pudiera ser una molécula asociada al sistema profenoloxidasa.

Los resultados de los niveles de transcripción de la peroxinectina difieren en de lo reportado por Jiravanichpaisal, (2007), donde en *P. monodon*, la peroxinectina se transcribe en cantidades altas de manera constante desde los estadios tempranos (N5, Z1 Y Z3, M3 y PL3) (Jiravanichpaisal, et al., 2007).

El RNAm del gen que codifica para la peroxinectina pudo amplificarse a partir del tercer subestadio de nauplio (N3), se observó un nivel de expresión muy bajo en estos estadios hasta mysis 1, sin embargo, en mysis 2 tuvo un incremento fuerte, siendo por mucho, el mayor nivel observado durante el desarrollo larvario. En la etapa de postlarva, se observa un pico en PL 2, el cual fue el mayor durante todos los estadios

probados en este trabajo, abarcando hasta PL 12 el periodo en que se observa un alto nivel de expresión, con algunas bajas como en PL 3-5.

La proteína de coagulación de los crustáceos (CP), conocida por su función en el sistema inmune de estos organismos por prevenir la pérdida de hemolinfa en los tejidos dañados mediante la formación de coágulos (Kopáček, *et al.*, 1993), tiene una doble función, participando también en el transporte de lípidos, por lo que es también conocida como VHDL (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2002).

La proteína de coagulación constituye la proteína más abundante durante el desarrollo larvario de las que son codificadas a partir de los genes probados en este trabajo. En otras especies se ha reportado a la proteína de coagulación como la lipoproteína mas abundante del hemolinfa, tal es el caso del langostino, *Ibacus ciliatus* (Komatsu y Anso, 1998). En *vannamei*, la transcripción de la proteína de coagulación se detectó desde el huevo y se observa un nivel de expresión sumamente alto desde el subestadio de N1 hasta PL9. Durante la etapa de postlarva, aunque la cantidad de RNAm de la CP que se transcribe es menor, que el observado en los estadios larvarios, es por mucho superior a la cantidad de RNAm de la proteína constitutiva L13.

No existen reportes de la expresión de esta proteína en estadios tempranos del desarrollo de los decápodos. No obstante, en el presente trabajo, se observa que esta proteína se expresa fuertemente, desde huevo y que el nivel de expresión se incrementa durante la etapa larvaria, manteniéndose por encima del nivel observado en el adulto (Figuras 6 y 7) por lo cual puede estimarse que juega un papel muy importante por la doble función que tiene en la hemolinfa de los crustáceos y que es un elemento clave en la respuesta inmune durante etapas tempranas del desarrollo.

VIII.3. Proteínas antibacteriales

Se estudió la expresión de los genes que codifican para dos proteínas con reconocida función antibacterial en los peneidos, tales proteínas son la lisozima y la peneidina 3.

La transcripción de RNAm de la lisozima no se detectó en el huevo ni en ninguno de los estadios de nauplio. Es a partir del subestadio de zoea 2 cuando empieza a detectarse su expresión, manteniendo un nivel bajo hasta mysis 1. El pico de expresión de la lisozima se encuentra entre mysis 2, subestadio en el que tiene un drástico incremento y se siguen observando cantidades muy altas de manera casi regular

durante los siguientes subestadios, siendo hasta PL12 cuando esta empieza a declinar para alcanzar en PL20 un nivel similar al observado en el organismo adulto.

El comportamiento de las proteínas antibacteriales estudiadas en este trabajo parece obedecer a la biología del organismo mismo, dado que inician su expresión en niveles bajos en la etapa que el organismo inicia su alimentación externa con alimento preferentemente de origen fitoplanctónico. El pico de expresión de la peneidina se da a partir del subestadio de mysis 2, para este momento se ha iniciado ya la alimentación con alimento de origen zooplanctónico en el medio natural y en el caso de este estudio, con una dieta balanceada. Es comprensible que al iniciar su alimentación externa, el organismo entre en contacto con las bacterias que se encuentran en el medio e incluso en el mismo alimento, lo cual podría representar una señal para dar inicio a la producción de efectores antibacteriales como la lisozima y la peneidina para defenderse de lo no propio. Así mismo, durante el huevo y los subestadios de nauplio, las larvas dependen solo de sus reservas vitelinas y no hay entrada de alimento externo, por lo que el medio interno se mantiene estéril (Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007), ello podría explicar el porqué en estos estadios la cantidad de peneidina es muy baja y la lisozima no se encuentra presente.

Por otro lado, el gen que codifica para la peneidina 3 se mantuvo en un nivel permanentemente bajo durante el desarrollo larvario. La cantidad de RNAm de la Peneidina 3 se mantuvo muy por debajo de lo observado en el organismo adulto, incluso se vió muy interrumpida su detección entre estos estadios, como se observa en la figura 9. Un comportamiento similar de esta proteína ha sido reportado en *P. monodon*, (Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007). Los niveles de RNAm de la peneidina se incrementan a partir del subestadio de mysis 3, estos resultados concuerdan con lo reportado por Bachère, *et al.*, (2002), quien estudió la expresión de la peneidina de algunos estadios larvarios de *P. vannamei*. Bachère analizó la expresión de la peneidina en los subestadios de N5, Z1, 2 Y 3, M2 Y PL1 y 8; además estudió la localización de la expresión del RNA de esta proteína, llegando a la conclusión de que su expresión está restringida a las células hemocíticas, las cuales solo pudieron detectarlas a partir de mysis 2 (Bachère, *et al.*, 2003). De acuerdo a los resultados de Bachère, la presencia de los hemocitos con capacidad de expresar los RNAm de la peneidina a partir de los subestadios de mysis podría explicar el incremento en los niveles de RNAm que se reporta en este trabajo.

Los resultados de Bachère, *et al.*, (2003) y los que se presentan en este trabajo contrastan con los publicados recientemente con la especie *P monodon* (Jian-Chu, *et al.*, 2007). Jian-Chu encontró altas cantidades del transcripto de la peneidina en *P. monodon* desde el estado embrionario (1-4 células) hasta el estadio de postlarva, con un incremento marcado en nauplio 1. En el análisis realizado no se logró amplificar el transcripto de este gen, en el huevo. Aunque sí pudo realizarse la amplificación de la peneidina en casi todos los estadios de nauplio (N1-N4), esta fue en cantidades bajas, con un incremento ligero en N4 y no en N1 como se observó en *P. monodon*. Tomando en cuenta los hallazgos de Jian-Chu, podemos especular que las interrupciones en la transcripción de la peneidina durante los estadios de zoea y mysis que se observan en este trabajo se deban a la coincidencia de la colecta de los organismos con el estado de muda. Por otro lado, el transcripto de la peneidina fue detectado en varios tejidos (hemocitos, pedúnculo ocular, corazón, cerebro, órgano mandibular, branquias, hepatopáncreas, ovario, intestino, músculo y epitelio subcuticular) por Jiann-Chu y no solo en hemocitos como es reportado por Bachère; no obstante, la peneidina encontrada en *monodon* parece ser diferente de la de *vannamei* (Jiann-Chu, *et al.*, 2007).

Estudios previos muestran que las peneidinas son los péptidos antimicrobianos que se expresan de manera predominante en los hemocitos tanto de *P. vannamei* como de *P. setiferus*, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo en cuanto a la cantidad del RNAm encontrado en el organismo; sin embargo, cuando la cantidad del RNAm en estadios larvarios en comparada con la cantidad del mismo RNA en la edad adulta resulta mucho mayor la de lisozima (figura 8). Como puede observarse en la figura 10, la cantidad de RNAm de la lisozima tiende a bajar a partir de PL 12, a partir de esta etapa la transcripción de la peneidina 3 alcanza su nivel máximo. Las peneidinas comprenden una familia de péptidos recientemente identificada con ambas propiedades, antibacteriales (bacterias Gram-positivas) y antifungales (Destoumieux, *et al.*, 1997; Destoumieux, *et al.*, 1999), las cuales son únicas en los camarones peneidos (Gross, *et al.*, 2001). Aunque esta familia comprende varias proteínas, generalmente la peneidina 3a es la más efectiva para eliminar microbios (Destoumieux, *et al.*, 2000). Las peneidinas son almacenadas en los granulocitos del camarón y son liberadas en respuesta a un estímulo apropiado, tal como una infección. Sin embargo, la transcripción de las peneidinas no parece ser inducida por infecciones microbianas (Destoumieux, *et al.*, 2000). En estudios previos el péptido de la peneidina se ha

encontrado unido a quitina a través de una propiedad unidora de quitina conservada, lo cual permite su inmunolocalización en el tejido cuticular del camarón (Destoumieux, *et al.*, 2000; Bachére, *et al.*, 2000).

En general, aunque el RNAm de la peneidina 3 estuvo presente desde nauplio 1, se mantuvo muy por debajo del nivel que se encuentra en el organismo adulto, en cambio, el RNAm de la lisozima es detectado a partir de zoea 2, pero se expresa en mayor cantidad relativa a la edad adulta.

VIII.4. Proteínas de Choque Térmico

Las proteínas de choque que han sido también llamadas chaperonas moleculares, por su función de apoyo en la conformación de la estructura de algunas proteínas recién sintetizadas o desnaturalizadas, es por ello que constituyen parte importante en el desarrollo de muchos organismos. En el presente trabajo hemos analizado el nivel de transcripción de la HSP10 previamente reportada en *P. vannamei* (Gross, *et al.*, 2001).

El RNAm de la proteína se encontró en altas cantidades en casi todos los estadios probados, salvo PL18, donde además otras proteínas mostraron no expresarse en este mismo trabajo, por lo que la falta de amplificación en este estadio puede deberse a problemas relacionados con el manejo de la muestra, más que a la transcripción misma. El transcripto fue detectado desde el huevo, elevándose en cantidad en los estadios de nauplio y primeros días de zoea. No obstante los picos más altos de la expresión de este gen se observaron entre mysis 2 y PL14.

Las chaperonas moleculares son proteínas que unen y estabilizan conformaciones inestables de otras proteínas. Mediante uniones y liberaciones controladas, facilitan la conformación nativa de las proteínas o el ensamblaje entre estas para conformar oligómeros. De la familia de las chaperonas forman parte numerosas proteínas de distinta secuencia y diverso peso molecular. Las chaperoninas, en particular desempeñan un papel muy activo en el plegamiento de las proteínas. Las funciones principales de estas proteínas pueden ser reducidas a tres: impedir la agregación de polipéptidos parcialmente plegados y liberados de los ribosomas, unirse a péptidos parcialmente plegados aunque atrapados en una conformación tal que no pueden plegarse de manera espontánea y, proteger a las proteínas de la desnaturalización debida a estrés o facilitar el plegamiento si se ha producido la desnaturalización. Compete pues a las chaperoninas crear las condiciones adecuadas

para un plegamiento correcto de las proteínas desnaturalizadas. Así pues la HSP10 funciona como asistente de la HSP60 en su actividad plegadora en la mitocondria.

Las chaperoninas protegen la función y la estructura de las células a través de la protección de sus componentes. Pero su función no acaba ahí. En mamíferos, las chaperoninas podrían defender de las infecciones mediante el envío de señales al sistema inmunitario, del que son uno de los más potentes estimuladores. La estimulación procede en dos vías; en un primer nivel las chaperoninas activan los mecanismos innatos de defensa, puestos en operación por los fagocitos. En un segundo frente, las chaperoninas actúan sobre los mecanismos de defensa adquiridos mediante la estimulación de la producción de anticuerpos y linfocitos T.

En este mismo marco, las chaperoninas se relacionan con los factores de crecimiento en los mamíferos. El factor de embarazo temprano (“Early-pregnancy factor”), que aparece en el suero materno a las pocas horas de la fecundación, interviene en la proliferación celular, posee propiedades inmunosupresoras y regula el crecimiento de todo tipo de células, normales o neoplásicas. Además, su acumulación en las plaquetas manifiesta su participación en los procesos de cierre de heridas, se ha sugerido también su implicación en los procesos de inflamación. Este factor temprano de la gestación, con tan numerosas implicaciones biológicas ha resultado ser la cochaperonina mitocondrial mt-cpn 10, ayudante de la chaperonina mitocondrial en el plegamiento de las proteínas (Valpuesta, *et al.*, 2000).

En los camarones peneidos han sido reportadas varias proteínas de shock térmico, tal como la HSP70 y 10 en *P. vannamei* y la HSP 82, 29 y 28 en *P. setiferu* (Gross, *et al.*, 2001). Dado el papel tan importante que juegan las chaperoninas en el sistema inmune de los vertebrados durante el desarrollo, no es de extrañar que la HSP10 se encuentre presente durante todos los estadios de desarrollo larvario de los camarones peneidos iniciando desde el huevo, lo cual sugiere que también en los invertebrados son parte importante del sistema de inmunidad innata en esta etapa.

En este trabajo pudo notarse que el nivel de expresión de algunos de los genes analizados se vió un ligero incrementado durante el subestadio de nauplio 4 (BGBP, peroxinectina, CP, peneidina 3 y HSP10), en el cual hay una expresión que es mayor al menos a la observada en los estadios más próximos, sugiriendo que en esta etapa pudiera haber una preparación fisiológica mediante la producción de estos componentes del sistema inmune, lo cual permita que el organismo esté preparado para enfrentar un

ataque microbiano en el subestadio inmediato de zoea, donde se inicia la alimentación externa. La alta producción de proteínas del sistema inmune durante el subestadio de N4 fue también observado con la crustina en un trabajo reciente (Jiravanichpaisal, *et al.*, 2007), quien relacionó el incremento de esta proteína antibacterial con la aparición de un órgano parecido al intestino en este estadio, sugiriendo que ahí se transcribe esta proteína.

IX. CONCLUSIONES

Se amplificó el cDNA de 6 proteínas que participan en el sistema inmune del camarón adulto (BGBP, peroxinectina, proteína de coagulación, lisozima, peneidina 3 y HSP10) a partir del RNA total de cada uno de los estadios larvarios del camarón blanco del Pacífico, *P. vannamei*, mostrando importantes cambios en su nivel de expresión.

El gen que codifica para la BGBP se expresa en cantidades muy bajas durante todo el desarrollo larvario y en gran parte de la vida de postlarva; no obstante, algunos picos de expresión aislados durante los primeros días de postlarva indican que su expresión sí puede incrementarse en estos estadios.

El cDNA de las proteínas de coagulación se amplificó en todos los estadios probados, siendo también el que se encontró en mayor cantidad durante el desarrollo larvario. La CP se sobreexpresó durante todo el desarrollo larvario y los primeros nueve días de postlarva, después de este periodo su expresión decreció al nivel basal, lo cual demuestra que esta proteína juega un papel muy importante en etapas tempranas del desarrollo del camarón.

La transcripción de la peroxinectina estuvo presente en la gran mayoría de los estadios probados. Este gen presentó el mayor grado de variación en los niveles de expresión. La peroxinectina alcanzó sus más altos niveles de expresión entre mysis 2 y PL 12, llegando a superar 35 veces, en PL 2, la cantidad expresada en el adulto.

Estudios previos muestran que las peneidinas son los péptidos antibacterianos que se expresan de manera más abundante en la hemolinfa de los camarones, aunque en este trabajo esto no se observa en estadios tempranos si se cumple a partir de estadios posteriores a PL12, esto es comprensible ya que la mayoría de los trabajos se han realizado en base a organismos adultos. La amplificación de lisozima y peneidina fue muy baja en estadios larvarios tempranos, no obstante, tuvo un fuerte incremento a partir de la etapa final de mysis en el caso de lisozima, la cual alcanzó un nivel 10 veces superior a la del camarón adulto, aunque descendió rápidamente a su estado basal en PL 15. Peneidina 3 mostró una deficiencia en su expresión en el desarrollo larvario, alcanzando el nivel mostrado en el adulto hasta varios días después de pasar a postlarva. Este retraso en la expresión de genes de péptidos antibacterianos podría determinar una mayor susceptibilidad ante enfermedades infecciosas durante los estadios de zoea y primeros días de mysis.

El gen de HSP10 se expresó de manera constante durante los estadios larvarios. Al igual que las proteínas antibacteriales incrementó su nivel de expresión a finales de mysis y los primeros días de postlarva, lo cual muestra que esta proteína podría participar activamente en las reacciones inmunológicas en el camarón blanco.

La presente investigación apoya fuertemente la hipótesis planteada dado que existen marcadas diferencias en la expresión de genes del sistema inmune durante los estadios larvarios del camarón blanco *P. vannamei*. Así mismo, se apoya la idea de que el sistema inmune es inmaduro en etapas tempranas del desarrollo del camarón.

X. RECOMENDACIONES

Dado a la variación observada en la expresión de los genes que codifican para proteínas del sistema inmune del camarón, resultaría de amplia utilidad investigar si puede estimularse la expresión de estos genes que están siendo reprimidos en etapas tempranas, tal es el caso de los péptidos antibacteriales, lisozima y peneidina3, así como del gen de la proteína de reconocimiento BGBP y si una estimulación de estos genes ayuda a disminuir la susceptibilidad observada en etapas larvarias.

Debido a la dificultad de obtener RNA de buena calidad en las larvas, se podrían probar diferentes técnicas de purificación.

Para analizar a detalle las diferencias encontradas en la expresión de genes durante diferentes estadios, convendría realizar dicho análisis, utilizando PCR en tiempo real.

XI. LITERATURA CITADA

- Adamas, M. y S. Celniker, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 185–195.
- Aeschlimann, D., M. Koeller, B., Allen-Hoffman, D. y Mosher, 1998. Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. J Biol Chem 273: 3452–3460.
- Aeschlimann, D. y M. Paulsson 1994. Transglutaminase: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluid. Thromb Haemo-stasis 71(4): 402–415.
- Aguirre-Guzmán, G. y Ascencio-Valle F., 2000. Infections disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent Res. Delv. Microbiology 4, 333-348.
- Aguirre-Guzmán, G., M. Humberto y A. Felipe, 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquaculture Research 35: 1395-1404.
- Alday-Sanz, A., A. Roque y J.F. Turnbull, 2002. Claring mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 48: 91-99.
- Aoki, H., M.N. Ahsan y S. Watabe, 2003. Molecular cloning and characterization of cathepsin B from the hepatopancreas of northern shrimp *Pandalus borealis*. Comparative Biochemistry and Physiology 134B, 681-694.
- Bachère, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191(1-3): 3-11.
- Bachere, E., 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. Aquaculture 227, 427-438.
- Bachère, E., M. Muñoz, F. Vandenbulcke y Y Gueguen, 2003. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. Developmental and Comparative Immunology. 27, 283-289.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M., Gonzalez, J., De Lorgeril, J., Garnier y B. Romestand, 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunological reviews 198: 149-168.
- Barracco, M., B. Duvic y K. Söderhäll, 1991. The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish, *Pacifastacus leniusculus* when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. Cell Tissue Res. 266: 491-497.
- Bartlett, T.C., B.J Cuthbertson, E.F. Shepard, R.W. Chapman, P.S. Gross y G.W. Warr, 2002. Crustins, Homologues of an 11.5-kDa Antibacterial peptide, from Two Species of Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. Marine Biotechnology 4, 278-293.

- Bennett, B. y O. Ratnoff 1972. The normal coagulation mechanism. *Med Clin North Am* 56: 95-104.
- Beschin, A., M. Bilej, F. Hanssens, J. Raymakers, E. van Dyck, H. Revets, , L., Brys, J. Gomez, P. De Baetselier y M. Timmermans, 1998. Identification and cloning of a glucan and lipopolysaccharide binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem* 273: 24948-24954.
- Boyer, R., 2000. *Conceptos de Bioquímica*, México D.F., 693 pp.
- Brahmachary, M., S. Krishnan, J. Koh, A. Khan, S. Seah y T. Tan, 2004. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res* 32, 586-589.
- Brock, J.A. y Lightner, D.V., 1990. Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms en: *Diseases of Marine Animals*, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany. III, 245-239.
- Cerenius, L., Z. Liang, B. Duvic, P. Keyser, U. Hellman, E. Tapio-Palva, S. Iwanaga y K. Söderhäll, 1994. Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J Biol Chem* 269: 29462-29467.
- Chen, J. J., D. J. McNealy, S. Dalal y E.J. Androphy, 1994. Isolation, sequence analysis and characterization of a cDNA encoding human chaperonin 10. *Biochem Biophys Acta* 1219(1): 189-190.
- Chen, Y., C. Huang, J. Cheng y I. Tsai, 1993. Relationship between hemolymph-coagulation and disease in shrimps: II. Purification and characterization of the hemolymph coagulogen of Penaeids. *Rep.Fish Dis.Res* 40: 1-9.
- Chuang, N., C. Huang y N.-N Chuang, 2000. Differential expression of *ras* in organs and embryos of shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 125: 307-315.
- Cuthbertson, B.J., E.E. Bullesbach, J. Fievet, E. Bachère y P.S Gross, 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibit target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem J* 381, 79-86.
- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman y P.S. Gross, 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* 54, 442-445.
- Cuthbertson, B.J., Y. Ynag, E. Bachère, P.S. Gross y A. Aumelas, 2005. Synthesis and solution structure of syntetic penaeidin 4 with structural and functional comparisons to penaeidin 3. *J Biol Chem* 280, 16009-160018.
- De Lorgeril, J., D. Saulnier, M.G.Janech, Y. Gueguen y E. Bachère, 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp

(*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. Physiology Genomics 21, 174-183.

- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Vandorsselaer, J. Rodriguez y E. Bacheré, 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). Journal of Biological Chemistry 272, 28398-28406.
- Destoumieux, D., P. Bulet, J.M. Strub, A. Van Dorsselaer y E. Bachère, 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. Eur J. Biochem 266, 335-346.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, J. Cosseau, P. Rodríguez, P. Bulet, M. Comps y E. Bachère, 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. J. Cell Science 113, 461-469.
- Dimopoulos, G., A. Richman, H. Müller y F Kafatos, 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. Proc Natl Acad Sci USA 94: 11508-11513.
- Durand, S., K.J.F. Tang y D.V. Lightner, 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of White Spot Syndrome virus and Yellow Head virus. J. Aquat. Anim. Health. 12, 128-135.
- Eposio, C., P. Pucci, A. Amoresano, G. Marino, A. Cozzolino y P. Porto, 1996. Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. J Biol Chem 271: 27416-27423.
- Erickson, H.S., M. Zarin-Herzberg y D.V. Lightner, 2002. Detection of Taura Syndrome Virus TSV strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in Penaeid shrimp. Disease of Aquatic Organisms. 52, 1-10.
- Evans, H. y M. Shapiro, 1997. Viruses. In. Ed. By L.A. Lacey. Manual of techniques in insects pathology. 17-35.
- FAO, 2002. The State of World Fisheries and Aquaculture. 144 ppt.
- Fliss, A., S. Benzeno, J. Rao y A. Caplan, 2000. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. J Steroid Biochem Mol Biol 72: 223-230.
- Folk, J. 1980. Transglutaminase. Annu Rev Biochem 49: 517-31.
- Folk, J. y J. Finlayson 1977. The 1-(ϵ -glutamyl) lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminase. Adv Protein Chem 31: 1-133.
- Garczynski, M. y F. Goetz 1997. Molecular characterization of a ribonucleic acid transcript that is highly up-regulated at the time of ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary. Biol.Reprod. 57: 856-864.

- Goarant, C., F. Regnier, R. Brizard y A.-L. Marteau, 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* 169(3-4): 291-296.
- Gollas-Galván, T., J. Hernández-López y F Vargas-Albores, 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comp Biochem Physiol* 117: 419-425.
- Gollas-Galván, T., R.R. Sotelo-Mundo, G. Yepiz-Plascencia, C. Vargas-Requena y F. Vargas-Albores, 2003. Purification and characterization of [alpha]2-macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 134C, 431-438.
- Gorman, M. y S. Paskewits 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 257-262.
- Greenberg, C., P. Brickbichler y R. Rice, 1991. Transglutaminases: multifunction cross-linking enzymes that stabilize tissue. *FASEB J* 5: 3071-3077.
- Grenard, P., M. Bates y D. Aeschlimann, 2001. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. *J Biol Chem* 276: 33066-33078.
- Gross, P., T. Bartlett, C. Browdy, R. Chapman y G. Warr, 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 565-577.
- Gueguen, Y., J. Garnier, L. Robert y M. Leufranc, 2006. Pen Base, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 283-288.
- Guzmán, A. y F. Ascencio-Valle 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Res. Devl Microbiology* 4: 333-348.
- Hall, M., M. Vanheusden y K. Söderhäll, 1995. Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 216: 939-946.
- Hannesson, R. 2003. Aquaculture and fisheries." *Marine Policy* 27: 169-178.
- Hasson, K., D.V. Lightner, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock y J.R. Bonami, 1995. Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Dis Aquat Org.* 23, 115-126.
- Heinzel, R., H. Appelhans, H. Fritz, K. Wiedenmann, W. Machleidt, R. Heinzel, H. Appelhans, H.-G. Gassen y F. Lottspeich, 1986. Molecular cloning and

- expression of cDNA for human antileukoprotease from cervix uterus. *Eur.J.Biochem* 160: 61–67.
- Hikima, S., J. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono y T. Aoki, 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 316, 187-195.
- Huang, C.C., K. Sritunyalucksana, K. Soderhall y Y.L. Song, 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. *Developmental and comparative immunology* 28, 279-294.
- Janeway, C. A. y R. Medzhitov 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.
- Jiann-Chu, C., C. Tzu-Ting, L. Jenn-Kan, W. Jen-Leih, C. Thomas y K. Chi-Fong, 2007. Expression and characterisation of tiger shrimp *Penaeus monodon* penaeidin (mo-penaeidin) in various tissues, during early embrionic development and moulting steges. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 132-142.
- Jiang, H. y M. Kanost 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 95-105.
- Jiravanichpaisal, P., N. Puanglarp, S. Petkon, S. Donnuea, I. Söderhäll y K. Söderhäll, 2007. Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 20.
- Johansson, M. y K. Söderhäll 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol* 156: 175-181.
- Johansson, M. y K. Söderhäll 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proP0 system. *Parasit.* 5: 171-176.
- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana y K. Söderhäll, 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Johansson, M., M. Lind, T. Holmblad, P.O Thornqvist y K. Söderhäll, 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochem Biophys Res Com* 216: 1079-1087.
- Johnson, P., 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 679-704.
- Jolles, P. y J. Jolles 1984. What's new in lysozyme research? *Mol Cell Biochem* 63: 165-189.
- Kang, C.J., J.X. Wang, J.F. Zhao, X.M. Yang, X.L. Shao y J.H. Xiang, 2004. Molecular cloning and expression analysis of the Ch-penaeidin, and antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 513-525.

- Kanost, M., H. Jiang, Y. Wang, X. Yu, C. Ma y Y Zhu, 2001. Hemolymph proteinases in immune responses of *Manduca sexta*. *Adv Exp Med Biol* 484: 319-328.
- Karp, R. y L. Rheins 1985. Ontogeny of the invertebrate humoral immune response: studies on various developmental stages of the american cockroach (*Periplaneta americana*). *Developmental and Comparative Immunology*. 9: 395-406.
- Karunasagar, I., S.K. Otta y I. Karunasagar, 1998. Disease problems affecting cultured penaeid shrimp in India. *Fish Pathology*. 33, 413-149.
- Karunasagar, I., R. Pai y G.R. Malathi, 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.
- Kim, C.K., P.K. Kim, S.G. Sohn, D.S. Sim, M.A. Park, M.S. Heo, T.H. Lee, J.D. Lee, H.K. Jun y K.L. Jang, 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with White Spot Syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. *J. Fish. Dis.* 21, 11-17.
- Kim, H., W. Idler, J. Han, S. Chung y P. Steinert, 1991. The complete amino acid sequence of the human transglutaminase K enzyme deduced from the nucleic acid sequences of cDNA clones. *J Biol Chem* 266: 536-539.
- Kim, M., M. Baek, M.H. Lee, J.W. Park, S.Y. Lee, K. Söderhäll y B.L. Lee, 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Hyalotrichia diomphalia* larvae. *J Biol Chem* 277: 39999-40004.
- Kim, S., S. Chung y P. Steinert, 1995. Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 270: 18026-18035.
- Kirchhoff, C., I. Habben, R. Ivell y N. Krüll, 1991. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol.Reprod* 45: 350-357.
- Kobayashi, M., M. Johansson y K. Söderhäll, 1990. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation *in vitro*. *Cell Tissue Res* 260: 13-18.
- Kopáček, P., M. Hall y K. Söderhäll, 1993. Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur.J.Biochem* 213: 591-597.
- Kraut, J. 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem* 46: 331-358.
- Krem, M. y E. Di Cera 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci* 27: 67-74.

- Kurata, S. 2004. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in *Drosophila*. *Developmental & Comparative Immunology* 28: 89-95.
- Larsen, M., S.J. Ressler, B. Lu, M.J. Gerdes, L. McBride, T.D. Dang y D.R. Rowley, 1998. Molecular cloning and expression of ps20 growth inhibitor-A novel WAP_type for-disulphide core domain protein expressed in smooth muscle. *J Biol Chem* 273, 4574-4584.
- Le Groumellec, M., C. Goarant, P. Haffner, I. Mermoud y R. Costa, 1996. Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia: IV Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. En: Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Bangkok, Thailand, 29 January-2 February, 1996. 144.
- Lee, S., R. Wang, J.-H. Ryu, K.-H. Choi, Y.-S. Hong, Y.-H. Chung, S. Perrot, A. Raibaud, P.T. Brey y W.-J. Lee, 2000. A lipopolysaccharide and α -1,3-glucan binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning. *J. Biol. Chem* 275: 1337-1343.
- Liang, P. y A.B. Pardee, 1998. Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* Dec;10(3), 267-267.
- Liang, P. y A.B. Pardee, 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lightner, D. V. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. *Handbook of mariculture*. volume I: 289-377.
- Lightner, D.V., 1996a. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, 304.
- Lightner, D.V., 1996b. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev Sci Tech* 15, 579-601.
- Lightner, D. V. 1996. Disease of culture penaeid shrimp. In: *Handbook of Mariculture* (AD by J.P. McVey), pp. 1-78. *Crustacean Aquaculture*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.: 1-78.
- Lightner, D.V., 2003. Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. *The world Aquaculture Society*, 81-116.
- Lightner, D.V., C.R. Pantoja, B.T. Poulos, K.F.J. Tang, R.M. Redman, T. Andreas y J.R. Bonami, 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): a New Virus Disease of *Litopenaeus vannamei*. *Book of Abstracts. World Aquaculture 2004*, March 2-5, 2004, Honolulu, HI. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, USA.

- Lightner, D.V. y R.M. Redman, 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Lightner, D.V., R.M. Redman y T.A. Bell, 1983. Variation on the geograohic distribution, pathogenesis and morphology of the bacolovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 32, 209-233.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, K.W. Hasson y C. Pantoja, 1995. Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea :Decapoda): gross sings, histopathology and ultrastructure. *Dis Aquat Org.* 21, 53-59.
- Limuswan, C., 1991. Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawns. Tansetakit, Bangkok, Thailand (in Thai).
- Lindmark, H., K. C. Johansson, S. Stöven, D. Hultmark, Y. Engström y K. Söderhäll, 2001. Enteric Bacteria Counteract Lipopolysaccharide Induction of Antimicrobial Peptide Genes. *Journal of Immunology* 167: 6920-6923.
- Lo, W.Y., K.F. Liu, I.C. Liao y Y.L. Song, 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell Stress Chaperones* 9: 332-343.
- Lo, W.Y., K.F. Liu, I.C. Liao y Y.L. Song, 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell Stress Chaperones* 9, 332-343.
- Lonrad, L. y S. Conrad 1984. Transglutaminase. *Mol Cell Biochem* 58: 9-35.
- Lotz, J.M., 1997. Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis Aquat Org.* 30, 45-51.
- Magnusson, R., J. Gestautas, P. Seto, A. Taurog y B. Rapoport, 1986. Isolation and characterization of a cDNA clone for porcine thyroid peroxidase. *FEBS Lett* 208: 391-396.
- Mari, J., B.T. Poulos, D.V. Lightner y J.R. Bonami, 2002. Shrimp Taura Syndrome Virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket parlysis-like viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 915-926.
- Matsumura, I. y J. Kirsch (1996). Is aspartate 52 essential for catalysis by chicken egg white lysozyme? The role of natural substrate-assisted hydrolysis. *Biochemistry* 35: 1881-1889.
- Mayo, M.A., 2002a. Virus- Taxonomy-Houston 2002. *Archives of Virology.* 147/5, 1071-1076.
- Mayo, M.A., 2002b. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology.* 147/8, 1655-1656.

- McKay, D. y C. Jenkin 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci 48: 125-134.
- Merril, D., S. Mongeon y S. Fisher, 1979. Distribution of fluorescent latex particles following clearance from the hemolymph of the freshwater crayfish, *Orconectes virilis* (Hagen). J. Comp. Physiol 132: 363-368.
- Montaño-Pérez, K., G. Yepiz-Plascencia, I. Higuera-Ciapara y F. Vargas-Albores, 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). Comp. Biochem. Physiol 122B: 381-387.
- Motoh, H. y P. Buri, 1981. Identification of postlarvae of the genus *Penaeus* appearing in chore waters. Res Crustac 11, 3-11.
- Motte, E., E. Yugcha, J. Luzardo, F. Castro, G. Leclercq, J. Rodríguez, P. Miranda, O. Borja, J. Serrano, M. Terreros, K. Montalvo, K. Narváez, N. Tenorio, V. Cedeño, E. Mialhe y V. Boulo, 2003. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 219, 57-70.
- Mulenga, A., K.R. Macaluso, J.A. Simser y A.F. Azad, 2003. Dynamics of Rickettsia-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. Insect Molecular Biology 12, 185-193.
- Muñoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saülner y E. Bacheré, 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. European Journal of Biochemistry 269: 2678-2689.
- Muñoz, M., R. Cedeno, J. Rodriguez, W.P. van der Knaap, E. Mialhe y E. Bacheré, 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*, Aquaculture 191: 89-107.
- Muñoz, M., F. Vandenbulcke, Y. Gueguen y E. Bacheré, 2003. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. Developmental & Comparative Immunology 27, 283-289.
- Muta, T. y S. Iwanaga 1996. Clotting and immune defense in *Limulidae*. Prog Mol Subcell Biol 15: 154-189.
- Neiland, A., N. Soley, J. Varley y D. Whitmarsh, 2001. Shrimp aquaculture: economic perspectives for policy development. Marine Policy 25: 265-279.
- Nellaiappan, K. y M. Sugumaran, 1996. On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*. Comparative Biochemistry and Physiology 113B(1): 163-168.

- Nunan, L.M., B.T. Poulos y D.V. Lightner, 2000. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Penaeid Shrimp. *Mar. Biotechnol.* 2, 319-328.
- Ochiai, M. y M. Ashida 2000. A pattern recognition protein for β -1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of β -1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem* 275: 4995-5002.
- Ohashi, K., B. Burkart, S. Flohe y H. Kolb, 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164: 558-561.
- OIE., 2003. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, 4th Edition. Office International des Epizootics (OIE). Paris, France, 358.
- Páez-Osuna, F., A. Gracia, F. Flores-Verdugo, L. Lyle-Fritch, R. Alonso-Rodríguez, A. Roque y A Ruiz, 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin* 46: 806-815.
- Pantoja, C.R. y D.V. Lightner, 2003. Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* 218, 47-54.
- Pan, D., N. He, Z. Yang, H. Liu y X. Xu, 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental Comparative Immunology* 29, 103-112.
- Paul, C. y A. Arrigo 2000. Comparison of the protective activities generated by two survival proteins: Bcl-2 and Hsp27 in L929 murine fibroblasts exposed to menadione or staurosporine. *Exp Gerontol* 35: 757-766.
- Persson, M., A. Vey y K. Söderhäll, 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res.* 247: 409-415.
- Phillips, M., B. Stewart, Q. Qin, R. Chakraverty, E. Floyd, A. Jetten y R. Rice, 1990. Primary structure of keratinocyte transglutaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9333-9337.
- Prayitno, S. B. y J. W. Latchford 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectivity. *Aquaculture* 132: 105-112.
- Primavera, J.H. y E.T. Quintio, 2000. Runt-Deformity Syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biology.* 20, 796-802.
- Raa, J., 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Review in *Fisberies Science* 3, 229-288.

- Rawlings, R. y A. Barret 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290: 205-218.
- Relf, J.M., J.R. Chisholm, G.D. Kemp y V.J. Smith, 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry* 264, 350-357.
- Rendon, L. y J.L. Balcázar, 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *AquaTIC* 19, 27-33.
- Reyes-Izquierdo, T. y F. Vargas-Albores, 2001. Proteinase activity in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) clotting protein. *Biochem Biophys Res Com* 287: 332-336.
- Robertson, P. A. W., J. Calderon, L. Carrera, J.R. Stark, M Zherdmant y B. Austin, 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Disease Aquatic Organisms* 32: 151-155.
- Robles-Sikisaka, R., Garcia, D.K., Klimpel, K.R., Dhar y A.K., 2001. Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Archives of Virology* 146, 941-952.
- Roch, P. 1999. Defense mechanism and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172: 125-145.
- Rodríguez, J., 1996. Estado del arte de la investigación científica en inmunología de penaeidos. En: (Eds), R.S. (Ed.), *La Investigación científica en penaeidos de Iberoamérica*, San Pedro de Manglaralto-Ecuador, pp. 37-45.
- Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi y T. Aoki, 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol* 13: 69-83.
- Rombout, J.H.W.M., H.B.T. Huttenhuis, S. Picchiatti y G. Scapigliate, 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 441-455.
- Romero, S. A. 2006. Caracterización de ADNc de la proteína de choque térmico (HSP10) y evaluación de su expresión en *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV. Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México 79 p.
- Ronquillo, J.D., T. Saisho y R.S. McKinley, 2006. Early developmental stages of the green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* de Hann (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Hydrobiologia* 560, 175-196.
- Ruoslahti, E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
- Sambrook, J. y E. Fritsch, 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press.

- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy y D. Ansquer, 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191: 133-144.
- Shike, H., A.K. Dhar, J.C. Burns, C. Shimizu, F.X. Jousset, K.R. Klimpel y M. Bergoin, 2000. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus of Shrimp Is Related to Mosquito Brevidensovirus. *Virology* 277, 177-167.
- Shridhar, V., A. Sen, J. Chien, J. Staub, R. Avula, S. Kovats, J. Lee, J. Lillie y D.I. Smith, 2002. Identification of Underexpressed Genes in Early- and Late-Stage Primary Ovarian Tumors by Suppression Subtraction Hybridization. *Cancer Research* 62: 262-270.
- Smith, P. T. 2000. Diseases of the eye of farmed shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43(3): 159-173.
- Smith, V. y N. Ratcliffe 1980. Cellular defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): *in vivo* and histopathological responses to injected teria. *J. Invertebrate Pathol* 35: 65-74.
- Smith, V. y N. Ratcliffe 1978. Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), *in vitro*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 58: 367-379.
- Smith, V. y K. Söderhäll 1983. P-1,3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Bull* 164: 299-314.
- Söderhäll, K., A. Aspan y B. Duvic, 1990. The proPO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.* 141: 896-907.
- Söderhäll, K., L. Cerenius y M. Johansson, 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates, En: K. Söderhäll, S. Iwanaga, G.R. Vasta (Eds.). SOS Publications, Fair Haven, NJ, 29 -253.
- Söderhäll, K., K. Sritunyalucksana, K. Wongsuebsantati y M. Johansson, 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 353-363.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius, 1992. Crustacean immunity. *Annual Rev. of Fish Diseases*: 3-23.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol* 10: 23 -28.
- Söderhäll, K., S. Lee y K. Sritunyaluckšana, 2002. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 237-245.

- Söderhäll, K. y V. Smith, 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 229-239.
- Söderhäll, K., V. Smith y M. Johansson, 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: Evidence for cellular cooperation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.* 245: 43-49.
- Soderhall, K., W. Rogener, I. Soderhall, R.P. Newton y N.A Ratcliffe, 1988. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1,3-glucan. *Insect Biochem.* 18: 323-330.
- Song, Y., H uang, C., Sritunyalucksana y K., Söderhäll, 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 279-294.
- Sotelo-Mundo, R., M. Islas-Osuna, E. De-la-Re-Vega, J. Hernández-López y F. Vargas-Albores, G. Yepiz-Plascencia, 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 15: 325-331.
- Sritunyalucksana, K., K. Wongsuebsantati, K. Wongsuebsantati y M. Johansson, 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 353-363.
- Steinert, P., S. Kim, S. Chung y L. Marekov, 1996. The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratino-cytes. *J Biol Chem* : 271: 26242-26250.
- Sttidilokratna, S., Hodgson, R.A.J., Panjym, S., Cowley, J.A., Boonsaeng, V., Walker y P.J., 2002. Complete ORF-1b-gene sequence indicates Yellow Head virus in a invertebrate nidovirus. *Dis Aquat Org.* 50, 87-93.
- Sudheesh, P. S. y H.-S. Xu, 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196(1-2): 37-46.
- Supungul, P., S. Klinbunga, R. Pichyangkura, S. Jitrapakdee, I. Hirono, T. Aoki y A. Tassanakajon, 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine Biotechnology* 4, 487-494.
- Takashi, A., R. Achara, H. Ikuo, O. Tsuyoshi y T. Yukinori, 2004. Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. *Fisheries Science* 70, 765-771.
- Tang, J., Y. Cao, R.L. Rose y E. Hodgson, 2002. In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chemico-Biological Interactions* 141, 229-241.

- Tang, K.F.J. y D.V. Lightner, 1999. A Yellow-Head virus gen probe: application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis Aquat Org.* 35, 165-173.
- Tang, K.F.J., B.T. Poulos, J. Wang, R.M. Redman, H.H. Shih y D.V. Lightner, 2003. Geografic variations among Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis Aquat Org.* 53, 91-99.
- Tang, K. F.J. y D.V. Lightner, 2002. Low sequence variation among isolates of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis Aquat Org.* 49, 93-97.
- Tonganunt, M., A. Phongdara, W. Chotigeat y K. Fujise, 2005. Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Biotechnology* 4, 135-145.
- Türkmm, G., 2005. The larval development of *Penaeus semisulcatus* (de Hann, 1850)(Decapod:Penaeidae). *E. U. J. Fish Aquatic Sci* 22, 195-199.
- Valpuesta, J. M., O. Llorca y S. Marco, 2000. Biología de las chaperoninas. *Investigación y Ciencia* 282.
- Van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst y J.M. Vlak, 2001. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology* 286, 7-22.
- Vanderbergh, J., Y. Lib, L. Verdoncka, J. Lib, H.S. Xub y J. Swings, 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decápoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169: 121-132.
- Vargas-Albores, F., F. Jiménez-Vega, G. Yepiz-Plascencia y K. Söderhäll, 2004. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314: 681-687.
- Vargas-Albores, F., F. Jiménez-Vega y K. Söderhäll, 2005. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 18: 101-108.
- Vargas-Albores, F., F. Jiménez-Vega, G. Yepiz-Plascencia y K. Söderhäll, 2004. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 681-687.
- Vargas-Albores, F. y G. Yepiz-Plascencia, 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13 -21.
- Vaseeharan, B. y P. Ramasamy, 2003. Abundance of potentially pathogenic microorganisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol Research* 158 (4), 299-308.

- Venturelli, D., N. Shirsat, I. Gemperlein, S. Bittenbender y G Rovera, 1989. Nucleotide sequence of cDNA for murine myeloperoxidase. *Nucleic Acids Res* 17: 5852.
- Vidal, O.M., C.B. Granja, F. Aranguren, J.A. Brock y M. Salazar, 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopennaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *J. World Aquaculture Society*. 32, 364-372.
- Wang, Z. y G. Wang, 2004. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res* 32, 586-589.
- Wang, R., Z. Liang, M. Hall y K. Söderhäll, 2001. A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish. *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localization and cDNA cloning. *Fish Shellfish Immunol* 11: 623-637.
- White, K. y N. Ratcliffe 1982. The segregation and elimination of radio- and fluorescent-labelled marine bacteria from the haemolymph of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J. Mar. Ass. U.K* 62: 819-833.
- Wiedemann, M., R. Kontermann y G. Petersen, 1992. Molecular characterization of a putative peroxidase gene of *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* 1171: 224-228.
- Wiedow, O., J. Schroderjz, H. Gregoryq, J. Young y C. Enno, 1990. Elastin:an elastase-specific inhibitor of human skin. *J. Biol. Chem* 265: 14791-14795.
- Yang, Y., Poncet, J., J. Garnier, C. Zatylny, E. Bachère y A. Aumelas, 2003. Solution structure of the recombinant penaeidin 3, a shrimp antimicrobial peptide. *J Biol Chem* 278, 36859-36867.
- Yeh, M.-S., C.-J. Huang, J. Leu, Y. Lee y I.-H. Tsai, 1999. Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Eur.J.Biochem* 266: 624-633.
- Yeh, M.-S., Y.-L. Chen y I.-H. Tsai, 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon* and related species. *Comp.Biochem.Physiol* 121B: 169 -176.
- Yepiz-Plascencia, G., F. Jiménez-Vega, G. Romo-Figueroa, R. Sotelo-Mundo y F. Vargas-Albores, 2002. Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132B: 585-592.
- Yepiz-Plascencia, G., T. Gollas-Galván, F. Vargas-Albores y M. García-Banuelos, 2000. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Marine Biotechnology* 2, 485-492.
- Yepiz-Plascencia, G., G. Romo-Figueroa, C. Vargas-Requena, R.R. Sotelo-Mundo, F. Vargas-Albores y I. K. S. Higuera-Ciapara, 2004. Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus*

(*Litopenaeus*) *vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Developmental and Comparative Immunology* 28: 713-726.

- Yepiz-Plascencia, G., F. Vargas-Albores, F. Jimenez-Vega, L.M. Ruiz-Verdugo y G. Romo-Figueroa, 1998. Shrimp plasma HDL and b-glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comp Biochem Physiol* 121B: 309-314.
- Zarain-Herzberg, M. y F. Ascencio-Valle, 2001. Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture* 193, 1-9.
- Zeng, J. 1992. Fenna REX-r ray crystal structure of canine myelo-peroxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol* 226: 185-207.
- Zhu, Y., T.J. Johnson, A.A. Myers y M.R. Kanost, 2003. Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 541-559.