



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Actividad y expresión de aspártico proteasas en el
desarrollo larvario del camarón blanco *Litopenaeus
vannamei*.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Biol. Mar. Rogelio Francisco Romero Hernández

La Paz, Baja California Sur, Enero 2020

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 23 del Mes de Enero del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Actividad y expresión de aspártico proteasas en el desarrollo larvario del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*"


Presentada por el alumno:


Rogelio Francisco Romero Hernández


Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Fernando Luis García Carreño
Co-Director de Tesis


Dra. Lilliana Carolina Rojo Arreola
Co-Director de Tesis


Dr. Julio Humberto Cordova Murueta
Tutor


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dr. Fernando Luis García Carreño

Co-Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Co-Directora de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Comité revisor de la tesis

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Jurado del examen

Dr. Fernando Luis García Carreño

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Suplente

Dra. Martha Patricia Hernández Cortés

RESUMEN

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), es un crustáceo que durante su desarrollo larval pasa a través de cambios morfológicos, ecológicos y fisiológicos que se encuentran asociados con la maduración de la capacidad motora y metabólica. En otros artrópodos, se ha identificado que la actividad enzimática presenta variaciones relacionadas con los eventos de metamorfosis. Las enzimas sobre las cuales se centra esta investigación son las proteasas, que regulan procesos celulares importantes y mantienen la homeostasis celular. En particular, esta investigación se enfoca en la descripción del perfil de actividad y expresión genética de las aspártico proteasas, β -secretasa y catepsina D, en el desarrollo ontogénico de *L. vannamei*. Se obtuvieron muestras de 18 estadios larvales a partir de las cuales se extrajeron las proteínas solubles totales y el RNA total usando técnicas estándar. La actividad proteolítica se cuantificó usando sustratos fluorogénicos específicos para aspártico proteasas, la cual fue verificada con ensayos en presencia del inhibidor Pepstatin-A, específico para estas enzimas. Los estadios nauplio presentaron la mayor actividad de catepsina D, mientras que para β -secretasa un pico de actividad se detectó en el estadio nauplio 3. Los resultados de la cuantificación de los transcritos de catepsina D mostraron que el transcrito se encuentra en todos los estadios con una mayor expresión en los estadios nauplio 5, mysis 2 y 3, por otro lado, β -secretasa se expresa en mucho menor cantidad pero de manera constante, a lo largo del desarrollo larvario solo se detectó diferencia significativa en el estadio postlarva 11. Para tratar de determinar la relevancia de estas enzimas en el desarrollo larval, se utilizó RNAi para silenciar los transcritos de interés, 15 $\mu\text{g/mL}$ de dsRNA de cada transcrito fue suministrado directamente al agua donde fueron mantenidas las larvas, el efecto del RNAi se evaluó mediante observación directa de cambios en la morfología y comportamiento de las larvas y por qPCR. Los especímenes no mostraron diferencias en la sobrevivencia ni en el comportamiento, las cuantificaciones de los transcritos correspondientes a los tratamientos no mostraron diferencias significativas con los controles, indicando que el método de sumersión no entrega de manera efectiva el dsRNA. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de aspártico peptidasas está presente y fluctúa durante el desarrollo larvario de la especie, estas variaciones de actividad enzimática se asocian posiblemente a procesos inherentes a la metamorfosis, actuando probablemente como reguladoras de apoptosis, cómo ha sido descrito en otros artrópodos.

Palabras clave: Catepsina D, β -secretasa, desarrollo larval, camarón, RNAi


Vo. Bo. Dr. Fernando Luis García
Carreño
Co-Director


Vo.Bo. Dra. Lilia Carolina Rojo
Arreola
Co-Director

SUMMARY

The white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), is a crustacean that during its larval development passes through morphological, ecological and physiological changes, associated with the maturation of motor and metabolic capacity. In arthropods, the enzymatic activity shows variations related to metamorphosis events. The enzymes on which this research focuses are proteases, enzymes responsible for hydrolyzing peptide bonds within proteins, regulating important cellular processes and maintaining cell homeostasis. In particular, this research focuses on the description of the enzymatic activity and genetic expression of the aspartic proteases, β -secretase and cathepsin D along *L. vannamei* larval development. Samples of 18 larval stages were donated by a local farm from which total soluble proteins and total RNA were extracted using standard techniques. Proteolytic activity was quantified using fluorogenic substrates specific for aspartic proteases, which was verified with assays in the presence of Pepstatin-A inhibitor, specific for aspartic peptidases. The highest cathepsin D activity was detected at naupliar stages, while β -secretase activity peaked at nauplio substage 3. Cathepsin D transcripts were found in all stages with larger expression at nauplio 5, mysis 2 and 3 stages; on the other hand, β -secretase is expressed in much less quantity but constantly throughout the larval development, only postlarva stage 11 showed significantly higher expression. In order to determine the relevance of these enzymes in larval development, RNAi assays were conducted to silence the transcripts of interest. 15 μg / mL dsRNA was supplied directly to the water where the larvae were kept, the effect of RNAi was evaluated by direct observation of changes in the morphology and behavior of the larvae and by qPCR. The specimens showed no changes in survival or behavior, transcripts concentration in the treatments were not significantly different to controls, indicating that the genetic silencing was not achieved using the soaking delivery method. Our results evince that aspartic peptidase activity is present, and fluctuates during the larval development of the species, these variations are possibly associated with processes related to metamorphosis, probably acting as triggers of apoptosis, as described in other arthropods.

Keywords: Cathepsin D, β -secretase, larval development, shrimp, RNAi.


Vo. Bo. Dr. Fernando Luis García
Carreño
Co-Director


Vo.Bo. Dra. Liliana Carolina Rojo
Arreola
Co-Director

Dedicatoria

A mi abuelo (Enrique Hernández Brito 1921-2019):

Que se quedó esperándome y ahora está siempre junto a mí, perdón por anteponer el trabajo, pudimos haber compartido un último trago de yolixpa y un par de historias.

A Mónica:

Quién estuvo ahí en los buenos y malos ratos, y quien siempre me tuvo paciencia y me brindó un escape cuando más lo necesitaba.

A mi familia y amigos:

Quienes nunca dejaron de apoyarme y que siempre confiaron en mí.

A quien soy en este momento:

Nunca dejas de sorprenderme.

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada con el número 489103 para la realización de este posgrado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste S. C. por la oportunidad de realizar este posgrado.

Al proyecto “La función de las proteasas durante la ontogenia de *L. vannamei* elucidada a través de técnicas de RNAi” clave 198C por el financiamiento.

A mi familia por estar conmigo y apoyarme en este proyecto.

A Mónica Janeth Cañedo Condes de la Torre siempre estar conmigo y no dejarme caer, no hay palabras suficientes para agradecerte.

Al Dr. Ramiro J. González Duarte por todo el apoyo que me brindó y quién me demostró que aún hay personas que disfrutan de hacer ciencia.

Al IBQ Luis Francisco Díaz Domínguez por la ayuda en la realización de las técnicas necesarias para llevar a cabo los objetivos del proyecto.

Al M.C. Sergio Alan Ulaje Fernández por el apoyo y los consejos en el laboratorio.

Al Dr. Carlos Rangel Dávalos quien además de ser un buen asesor y consejero me ha brindado su amistad más allá de las instituciones y que además ha sido mi mecenas en la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos por sus comentarios y apoyo a lo largo de estos dos años.

Al Lic. Horacio Sandoval Gómez por toda su ayuda, es el relojero que cuida que todo funcione a la perfección.

A los miembros de mi comité tutorial, los doctores Liliana Rojo, Julio Córdova y Fernando García Carreño. A los integrantes del laboratorio de BQ por los consejos, recomendaciones y asesorías durante la realización de la tesis

Al técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro por darme las facilidades de laboratorio e instruirme en el manejo de diversas técnicas.

A todo el personal del CIBNOR quienes lo mantienen en funcionamiento.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Sujeto de estudio	4
2.2 Desarrollo larval de <i>L. vannamei</i>	4
2.3 Proteasas	7
2.4 Enzimas durante el desarrollo ontogénico en decápodos	8
2.4.1 Catepsina D.....	10
2.4.2 β -secretasa.....	14
2.5 Silenciamiento por RNAi.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1 Obtención de larvas de camarón	19
6.2 Obtención de las secuencias de los genes de catepsina D y β -secretasa	19
6.3 Determinación de actividad proteolítica	21
6.4 Ensayos de actividad proteolítica en presencia de Pepstatin A.....	21
6.5 Ensayo de silenciamiento mediante RNAi.....	22
6.5.1 Síntesis de dsRNA	22
6.5.2 Introducción de dsRNA en larvas de <i>L. vannamei</i> y el efecto del silenciamiento.	22

6.5.3 Extracción de RNA total	23
6.5.4 Tratamiento con DNasa.....	23
6.5.5 Síntesis de DNA complementario.....	24
6.5.6 Cuantificación de transcritos por qPCR	24
6.5.7 Análisis estadístico.....	25
7. RESULTADOS	25
7.1 Secuencias de genes de Catepsina D y β -secretasade <i>L. vannamei</i>	25
7.2 Análisis de la secuencia de amino ácidos de la catepsina D de <i>P. vannamei</i>	27
7.3 Actividad proteolítica de catepsina D y β -secretasa	32
7.4 Expresión de catepsina D y β -secretasa a lo largo del desarrollo larval de <i>L. vannamei</i>	34
7.5 Efecto del dsRNA en la expresión de los genes catepsina D y β -secretasa	36
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	46
10. LITERATURA CITADA	47

Lista de figuras

Figura 1. Estadios larvales durante la ontogenia de <i>Litopenaeus vannamei</i>	7
Figura 2. Efectos de BmCatD RNAi en el desarrollo de <i>B. mori</i>	16
Figura 3. Secuencia deducida nucleótidos y deducida de amino ácidos de β -secretasa de <i>L. vannamei</i>	29
Figura 4. Secuencia deducida nucleótidos y deducida de amino ácidos de β -secretasa de <i>L. vannamei</i>	30
Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencias de amino ácidos de catepsina D	33
Figura 6. Cladograma de diferentes secuencias de amino ácidos de catepsina D	33
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de amino ácidos de β -secretasa	35
Figura 8. Cladograma de diferentes secuencias de amino ácido de β -secretasa	35
Figura 9. Actividad específica de catepsina D en el desarrollo larval de <i>L. vannamei</i>	36
Figura 10. Actividad específica de β -secretasa en el desarrollo larval de <i>L. vannamei</i>	37
Figura 11. Cuantificación relativa de transcritos de catepsina D en el desarrollo larval de <i>L. vannamei</i>	38
Figura 12. Cuantificación relativa de transcritos de β -secretasa en el desarrollo larval de <i>L. vannamei</i>	39
Figura 13. Supervivencia relativa a los tratamientos con dsRNA.....	41
Figura 14. Expresión génica de FAMET y catepsina D del primer bioensayo.....	42
Figura 15. Expresión génica de FAMET y catepsina D del segundo bioensayo...	43

Lista de tablas

Tabla 1. Actividad proteolítica en diferentes tejidos de decápodos.....	14
--	----

1. INTRODUCCIÓN

Crustacea es un clado diverso tanto en fenotipo como en hábitat: la mayoría de las especies son marinas y habitan desde los fondos oceánicos hasta las zonas intermareales, a pesar de la gran variedad morfológica, presentan características propias del subphylum tales como; un cuerpo formado por un cefalón o una cabeza segmentada en cinco partes, y tronco postcefálico multi segmentado que se divide en tórax y abdomen (Webber *et al*, 2010).

Los crustáceos presentan estrategias de vida que raramente les hace permanecer en un solo hábitat, la mayoría de las especies presentan cambios morfológicos, fisiológicos, y ecológicos importantes dependiendo de la fase del desarrollo en la que se encuentran (Dall *et al*. 1990). Este tipo de desarrollo que se divide en etapas se denomina anamórfico y se define como un tipo indirecto de desarrollo gradual en el cual, las larvas se transforman en adultos a través de una serie de cambios en la morfología de su cuerpo durante la morfogénesis (Hoeg, 2015; Thiel y Wellborn, 2018). Debido a los diversos cambios que ocurren durante el desarrollo larval en crustáceos, el estudio de dichos procesos es relevante para enriquecer el conocimiento sobre la fisiología especialmente de especies de interés comercial que pueden llegar a ser manipuladas con fines biotecnológicos.

Litopenaeus vannamei conocido comúnmente como camarón blanco es un crustáceo de importancia comercial, debido a que es una de las principales especies utilizadas en la acuicultura en diferentes países alrededor del mundo (FAO, 2009), los cambios morfológicos y fisiológicos a lo largo de su desarrollo larval son acompañados de la producción de diversos tipos de moléculas que les ayudan a realizar procesos tales como la digestión de los alimentos (Brusca, 1998). Las enzimas son moléculas que intervienen en múltiples cambios asociados al desarrollo de los organismos, son proteínas que afectan la velocidad de una reacción química con una alta especificidad (Figueiredo y Anderson, 2003; Nelson *et al*, 2005).

En diferentes especies de artrópodos, las enzimas han sido estudiadas por el interés que genera su participación durante el ciclo de vida de éstos, así como en los cambios morfológicos y fisiológicos que se encuentran relacionados durante su desarrollo larvario. De la gran variedad de enzimas que se conocen, las proteinasas, conocidas también como enzimas proteolíticas o proteasas son unas de las de mayor interés, debido a su participación en procesos como la digestión y apoptosis. Estas proteinasas se agrupan en: serino-, cisteino-, aspártico-, metalo-, treonino- y glutámico- peptidasas, de acuerdo a su mecanismo de catálisis y a los aminoácidos que intervienen en la hidrólisis (Rawlings y Salvesen 2013). Específicamente la aspártico proteasa catepsina D se ha descrito que participa de manera activa en procesos de eliminación de tejido por medio de apoptosis para llevar a cabo la metamorfosis en insectos, por otro lado la enzima β -secretas ha sido ampliamente estudiada en humanos y se ha determinado que tiene un papel importante en el crecimiento de células asociadas al sistema nervioso (Bolkan *et al.*, 2012; Gui *et al.*, 2006).

La catepsina D es una aspártico endopeptidasa lisosomal, sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso como preprocatepsina D (pCD), bajo condiciones fisiológicas normales la pCD es transportada hacia el lisosoma, a diferencia de los demás miembros de las aspártico endopeptidasas que son en su mayoría secretadas (Benes *et al.*, 2008). Esta enzima hidroliza proteínas dentro de un rango de pH que va de 3.5 a 5.0 dependiendo del tipo de sustrato (Fusek *et al.*, 2013).

β -secretasa también conocida como ASP-2, aspártico proteasas ligada a la membrana, BACE 1, y Memapsin 2 (Membrane Aspartic Protease of the Pepsin family) trabaja en un pH óptimo de 4.0, y por debajo de pH 3.5 pierde irreversiblemente la actividad. Esta enzima es particularmente estudiada por su relación con la enfermedad neurodegenerativa conocida como Alzheimer, ya que se conoce que esta enzima es responsable de la hidrólisis en el sitio beta que se encuentra en la proteína β -amiloidea (APP), que en conjunto con la actividad de la enzima γ -secretasa forman un residuo de 40 a 42 péptidos conocido como péptido

β -amiloideo (A β), la acumulación de los péptidos A β es el mayor constituyente en la formación de las placas seniles en el cerebro, las cuales, son las responsables del padecimiento de esta enfermedad (Tang y Koelsch, 2013).

Existen diversas técnicas moleculares que son utilizadas para modificar la expresión génica, el uso de RNA de interferencia (RNAi), utilizando RNA pequeños (RNAs), que son secuencias menores a 30 pares de bases, y los cuales participan de la regulación génica en una gran diversidad de organismos ha sido una de las más utilizadas debido a su facilidad de aplicación en diversos organismos. El mecanismo de interferencia de RNA se observó por primera vez en plantas de petunias como parte del silenciamiento post-traducciona. Durante su descubrimiento se buscaba introducir genes exógenos (que son transferidos de manera natural o mediante técnicas genéticas de un organismo a otro) (García, 2012) con el fin de obtener flores que tuvieran una coloración violeta más intensa, sin embargo, las flores obtenidas presentaban zonas blancas en los pétalos lo que apuntaba a que tanto los genes exógenos y endógenos habían sido silenciados (Meister y Tuschl, 2004).

Actualmente se conocen diferentes clases de RNAs mediante las cuales se realiza regulación de genes por RNAi, éstos se agrupan en tres categorías: miRNA, siRNA y RNA asociado a Piwi (Saini *et al.*, 2007); el silenciamiento mediante RNAi toma como plantilla una de estas secuencias para señalar la secuencia objetivo, posteriormente se forma un complejo denominado RNA-induced silencing complex (RISC), el cual es un conjunto de diferentes enzimas y que actúa sobre el mRNA, silenciando el gen a nivel transcripcional o post transcripcional (Shabalina y Koonin, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1 Sujeto de estudio

L. vannamei conocido comúnmente como camarón blanco (Sin: *Penaeus vannamei*) es una especie que dependiendo de la etapa de vida, se distribuye en diversos ambientes que van desde sistemas costeros hasta sistemas oceánicos, tanto en la columna de agua como el bentos, y su distribución va desde la parte norte en el Golfo de California hasta Caleta de la Cruz en Perú. En la etapa adulta es una especie asociada al bentos con una preferencia a fondos arcillosos y arenosos en profundidades entre 5 y 72 metros y que habita en aguas tropicales y subtropicales. La reproducción se lleva a cabo durante la temporada de primavera y verano principalmente en aguas abiertas (FAO, 2009), y una vez fecundadas, las hembras realizan el desove en zonas costeras en profundidades de 10 a 80 m, cuando los huevos eclosionan las larvas son transportadas hasta bahías y estuarios donde se desarrollan para posteriormente regresar mar adentro como adultos en busca de áreas apropiadas para la reproducción (Holthuis *et al.*, 1998).

Durante el desarrollo larval los peneidos pasan a través de tres diferentes fases conocidas como: nauplio, zoea, mysis, antes de convertirse en postlarva (Fig. 1), durante este periodo los organismos pasan por diferentes cambios morfológicos y fisiológicos, que se encuentran relacionados con el desarrollo de las funciones motoras y metabólicas (Wei *et al.*, 2014)

2.2 Desarrollo larval de *L. vannamei*

Aproximadamente 14 horas después de la ovoposición, los embriones de los peneidos eclosionan en el estadio conocido como nauplio, durante esta primera etapa los organismos se desplazan usando tres pares de apéndices, sin embargo, no es suficiente para desplazarse en contra de las corrientes, por lo que se encuentran a merced de las mismas. En esta etapa, los nutrientes necesarios para la sobrevivencia son proporcionados mediante el vitelo, el cual se localiza en la cavidad

del intestino anterior y el tamaño del vitelo disminuye gradualmente hasta que desaparece durante el estadio de nauplio 5. Al pasar al siguiente estadio de zoea, el organismo comienza a alimentarse de microalgas y de partículas en suspensión (Muhammad *et al.* 2012). Una característica importante de estos primeros estadios es la respuesta de los organismos a la exposición de la luz, a lo que se le conoce como fototropismo. Se denomina fototropismo al cambio de la posición u orientación de un organismo, o de alguna de sus partes, en relación con la dirección de la luz, se habla de un fototropismo positivo como en el caso de las larvas del camarón cuando el organismo cambia su posición en dirección a la fuente de luz (Treece y Yates, 1993; Drewes, 2004) .

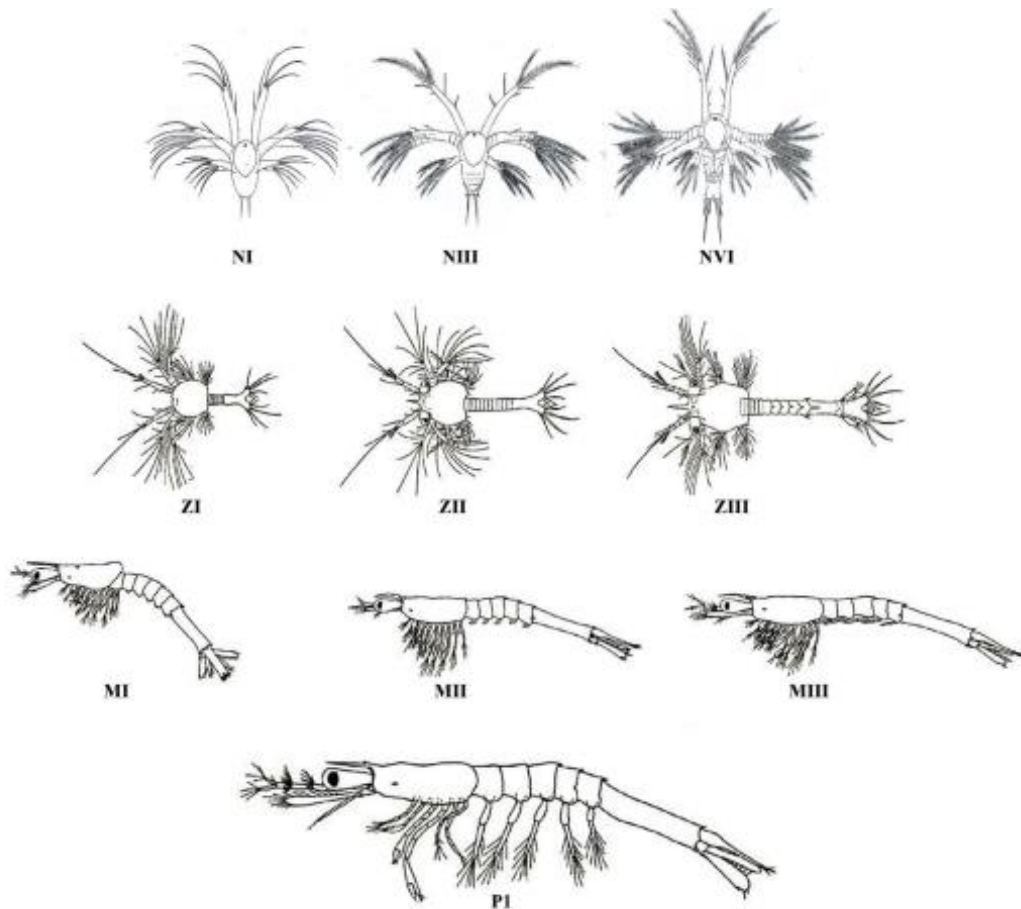


Figura 1. Estadios larvales durante la ontogenia de *L. vannamei*. N I (nauplio 1), N III (nauplio 3), N V (nauplio 5), Z I (zoea 1), Z II (zoea 2), Z III (zoea 3), M I (mysis 1), M II (mysis 2), M III (mysis 3) y P I (postlarva 1) tomado de Wei *et al* (2014).

Para el tercer estadio, mysis, se desarrollan los pereiópodos que realizan el movimiento de natación, durante dicho proceso el cuerpo se encuentra encorvado con la cabeza hacia abajo y el movimiento se lleva a cabo en dirección contraria a su orientación, en esta etapa los organismos comienzan a alimentarse de zooplacton (Muhammad *et al.*, 2012). En el estadio de postlarva, que es el último antes de convertirse en juveniles, tienden a encontrarse cerca del bentos y tienen la capacidad de enterrarse en el sedimento, la alimentación es facilitada por los pereiópodos quelados que son capaces de alcanzar y sujetar el alimento (Le Vay *et al.*, 2001).

Los cambios morfológicos y fisiológicos observados durante el desarrollo larval se propician por la participación de diferentes moléculas que intervienen en procesos como la digestión o en la degradación de tejidos, tales como la cutícula en preparación para la muda. La concentración de diferentes moléculas varía a lo largo del desarrollo larval dependiendo de los requerimientos fisiológicos, del total de moléculas involucradas, las enzimas proteolíticas han sido estudiadas ampliamente en diferentes especies, en el presente estudio se evaluarán dos enzimas proteolíticas y su concentración a lo largo del desarrollo larval del camarón.

2.2 Complejo Enzima sustrato

Las enzimas actúan como catalizadores, aumentando la velocidad con la que se realizan las reacciones químicas y que al combinarse con los sustratos, la reacción alcanza un estado de transición con una energía menor que el de una reacción carente de catalizador (Teh *et al.*, 2018). Durante una reacción la enzima interactúa con el sustrato, formando el complejo enzima-sustrato, uno de los mecanismos más sencillos que describen esta interacción es la teoría denominada “llave-cerradura”; en este modelo la enzima y el ligando poseen características conformacionales complementarias que facilitan su unión (Fischer, 1894).

Actualmente se conoce que las moléculas son dinámicas, por lo que su conformación estructural se encuentra en constante cambio. Existen dos modelos que explican la interacción de reconocimiento de la enzima por el sustrato, el primero se denomina “ajuste inducido”; el cual hace referencia a que el contacto de la proteína con el sustrato provoca un cambio conformacional que permite llevar a cabo la reacción y la formación de productos. El segundo modelo conocido como “teoría de selección de conformación” establece que debido a que las moléculas cambian su conformación constantemente, únicamente cuando ambos, enzima y sustrato cuentan con una conformación complementaria podrán interactuar y llevar a cabo la reacción (Gianni *et al.*, 2014; Vogt y Di Cera, 2012). Koshland postuló la teoría del ajuste inducido debido a que la teoría de llave-cerradura de Fisher no se ajustaba para todos los casos, esta teoría explica que debido a que existen cambios considerables en la conformación de la proteína, así como en el sustrato que se une al sitio activo, es necesario que cuente con una ubicación específica para que la transformación ocurra (Koshland, 1995). De las diversas familias de las enzimas nuestro estudio se centrará principalmente en el grupo de las enzimas proteolíticas también denominadas proteasas.

2.3 Proteasas

Las proteasas son un grupo de enzimas que se ubican en el grupo de las hidrolasas, cuya función catalítica es hidrolizar cadenas peptídicas (Nelson *et al.*, 2005). La función catalítica de cada una de las proteasas se asocia a una región denominada sitio activo, los amino ácidos que conforman este sitio entran en contacto con el sustrato para llevar a cabo la hidrólisis, cada clase de enzima posee dos o tres aminoácidos específicos que la diferencian de los demás grupos y determinan su mecanismo de catálisis (Barrett y McDonald 1986). Las aspártico proteasas, pertenecen a la familia de enzimas A1, que se encuentran clasificadas como EC 3.4.23.x y son endopeptidasas con actividad a pH ácido (Morcelle *et al.*, 2015).

Las tripsinas y quimotripsinas son las enzimas más estudiadas en crustáceos, debido a que tienen una importante participación en el proceso de digestión, sin

embargo, se carece de información acerca de diferentes peptidasas, como las catepsinas, y su participación en los procesos del desarrollo del camarón blanco. Romero-Hernández (2017) reportó un perfil proteolítico de 14 enzimas en 18 estadios larvales de *L. vannamei*, donde observó que algunas enzimas presentan una mayor actividad en estadios específicos durante el desarrollo larval.

Tomando como base el estudio anterior se eligieron a las aspártico proteasas β -secretasa y catepsina D para ser estudiadas a lo largo del desarrollo larval del camarón blanco. Debido a que la actividad de enzimas proteolíticas, como la de la catepsina D se ha descrito como responsable de los procesos apoptóticos durante la metamorfosis en otros invertebrados como *Bombyx mori* comprobando su importante participación en el desarrollo (Zhongzheng *et al.*, 2006).

2.4 Enzimas durante el desarrollo ontogénico en decápodos

La digestión en los decápodos es uno de los temas de mayor relevancia debido a la importancia que tiene durante el desarrollo temprano de los organismos. Johnston (2003) estudió el perfil de enzimas digestivas en diferentes etapas de la ontogenia de la langosta espinosa *Jasus edwardsii*, que habita en las costas de Nueva Zelanda. Se analizaron los estadios larvales de puerulus, pre puerulus, así como organismos adultos y juveniles. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de carboxipeptidasas, tripsina y quimotripsina se lograron cuantificar en las etapas de desarrollo de la langosta, junto con estos resultados se observó que la actividad de cada una de las enzimas aumentó de manera significativa conforme el organismo aumenta en talla. Durante los estadios larvales se detectó la actividad de amilasa, tripsina y lipasa, dado que son estadios en los que los organismos no se alimentan, la presencia de las enzimas digestivas podría deberse a que se encuentran involucradas en la hidrólisis de las reservas de energía endógenas que sustentan a los estadios de puerulus y pre puerulus, además de estar relacionados con procesos digestivos en otras etapas de su desarrollo, se concluye que los resultados obtenidos de los aumentos y disminuciones de la actividad proteolítica se encuentran directamente relacionados a la ecología alimenticia y a la fisiología de la

langosta, y que es esta última un reflejo de la nutrición y los requerimientos de energía entre los estadios.

Lovett y Felder (1990) realizaron un estudio en donde investigaron los cambios en la distribución de enzimas digestivas durante la ontogenia del camarón *Penaeus setiferus* y los compararon con las modificaciones en la ultraestructura del intestino medio mediante métodos histoquímicos. En su trabajo cuantificaron la actividad de cinco enzimas, esterasa no específica, amilasa, proteasas, y fosfatasa alcalina y ácida. La actividad de la fosfatasa ácida y esterasa se presentó en todos los tejidos intestinales analizados así como en los estadios larvales, por otro lado la actividad de proteasas se logró identificar en la parte anterior y en el intestino medio de larvas así como durante estadios tempranos de postlarva, en comparación, los estadios tardíos de postlarva mostraron actividad de proteasas y amilasas en el hepatopáncreas y en la parte anterior del intestino pero se encontraba ausente en el divertículo anterior del intestino medio. La fosfatasa alcalina en particular se encuentra presente en todo el intestino medio, esta presencia de actividad indica que la capacidad de absorción se mantiene a lo largo de todo este tejido. En organismos juveniles esta actividad se encuentra limitada al hepatopáncreas y a regiones del intestino medio en el cefalotórax, una vez que el hepatopáncreas ha alcanzado su tamaño máximo el intestino deja de tener funciones absorbentes y a pesar que se sus células epiteliales sintetizan proteínas su ultraestructura es diferente a las del hepatopáncreas que sintetiza y secreta enzimas digestivas.

La actividad de esterasa se encontró en todas las regiones del intestino medio en todos los estadios en los que se estudiaron, la actividad de la amilasa no se detectó en estadios anteriores a postlarva, en estadios tardíos de postlarva fue posible detectar actividad de amilasa en el hepatopáncreas y en la parte anterior a la porción del intestino medio. La fosfatasa ácida se cuantificó en todas las regiones del intestino y en todos los estadios larvales, mientras que la actividad de la fosfatasa alcalina solo pudo ser cuantificada en ciertas regiones, como en la parte anterior del intestino y el hepatopáncreas de todos los estadios larvales. Con lo anterior se

determinó que para *P. setiferus* la absorción y retención de alimento en el intestino es única entre los decápodos pues se mantiene durante todo el desarrollo larvario, al contrario que en otras especies, como los Homaridos en donde los que después de la absorción del vitelo en los primeros estadios larvales, la parte anterior del intestino disminuye de tamaño, lo que disminuye el volumen de la superficie de absorción.

En el trabajo de Hernandez-Cortes y colaboradores (2017) se evaluó la participación de las serino proteasas tripsina y quimotripsina a lo largo de la ontogenia del camarón blanco *L. vannamei* además de describir la presencia de una zinc metalloproteinasas. Los análisis obtenidos revelaron que las variaciones de actividad se relacionan con los cambios en la dieta y en las modificaciones morfológicas que presentan durante el desarrollo, de manera similar estos resultados han sido reportados por distintos autores en otras especies de decápodos, tales como *Penaeus monodon*, *P. japonicus* y *P. setiferus* (Fang y Lee, 1992; Laubier-Bonichon y Sellos 1977; Lovett y Felder 1990a; Rodriguez *et al.*, 1994). Durante los primeros estadios del desarrollo la actividad proteolítica cuantificada para las serino proteasas presenta valores bajos, esto se debe a que durante estas etapas tempranas la alimentación es administrada por el vitelo, por lo cual la actividad proteolítica asociada con la digestión no se presenta. Una vez que el organismo comienza a alimentarse en etapas posteriores la actividad de ambas proteínas aumenta, respondiendo al consumo de alimento. Junto con los análisis de actividad se realizaron cuantificaciones de los transcritos, estos resultados en conjunto demuestran que las enzimas tienen fluctuaciones importantes de actividad durante el desarrollo larval de los organismos y que además existe un mecanismo de regulación a nivel transcripcional.

2.4.1 Catepsina D

Entre las aspártico proteasas conocidas, la Catepsina D es la única que ha sido descrita en crustáceos decápodos, la catepsina D es una glicoproteína con residuos de manosa-6-fosfato que se basan en el reconocimiento de marcadores de lisina en la superficie de la proteína, estos marcadores permiten la localización lisosomal de la

Catepsina D, que se regula por los receptores de la misma manosa-6-fosfato (Fusek *et al.*,2013).

Numerosas funciones han sido atribuidas a esta enzima incluyendo la degradación de proteínas intracelulares, activación y degradación de polipéptidos hormonales y factores de crecimiento y procesamiento de muerte celular programada (Fusek *et al.*, 2013). Se conocen aspártico peptidasas tipo catepsina D en un gran número de invertebrados, principalmente parásitos hematófagos y ácaros, en donde forman parte de un complejo multienzimático que participa en el proceso de digestión, en algunos artrópodos tiene funciones especializadas en el reacomodo celular durante la metamorfosis (Sojka *et al.*, 2016). En humanos, esta enzima ha sido estudiada durante las últimas tres décadas por el papel que desempeña en el desarrollo de cáncer y ha sido sugerida como un marcador tumoral independiente. (Benes *et al.*, 2008).

Martínez-Alarcón (2018) y colaboradores realizaron un trabajo en el que analizaron las catepsinas D que se encuentran en diferentes especies de decápodos para compararlas con la de la langosta quelada *Homarus americanus* y determinar si es única en esta especie o es común en el grupo de los decápodos. La actividad proteolítica de esta enzima se midió en once especies de decápodos en diferentes tejidos tales como: hepatopáncreas, músculo, branquias y en algunos casos en jugo gástrico. Los análisis realizados demostraron que esta aspártico proteasa se encuentra presente en las once especies estudiadas, y de la misma manera presentan actividad en el jugo gástrico de siete de las cuales fue posible realizar una extracción. La actividad proteolítica obtenida a partir del hepatopáncreas muestra una mayor actividad comparada con la de los órganos no digestivos en los que también se midió actividad.

En la tabla 1 se muestra la actividad proteolítica para las muestras analizadas de hepatopáncreas y jugo gástrico, *H. americanus* cuenta con una mayor actividad en comparación a las demás especies, por otro lado las muestras de músculo y

branquias tienen una menor actividad en general, las especies que mostraron una mayor actividad fueron: para músculo *Astacus astacus* y para branquias *L.vannamei*.

A partir de muestras de hepatopáncreas se obtuvieron las secuencias parciales de la catepsina D de siete especies y basados en estas secuencias fueron identificadas regiones conservadas exclusivas para esta enzima. Con los datos obtenidos de la secuenciación se realizó un cladograma que muestra dos ramas principales, la rama que cuenta con un mayor porcentaje de similitud se agrupan Astacidae y Caridae, mientras que en la otra rama se encuentran las catepsinas de Anomura, Brachyura y Penacoidea.

Tabla 1. Actividad proteolítica en diferentes tejidos de decápodos. Tomada de Martínez-Alarcón *et al.* 2018.

Species	Gastric fluid	Midgut gland	Muscle	Gill
<i>Homarus americanus</i>	251.5 ± 24.6	73.9 ± 10.0	0.519 ± 0.276	0.947 ± 0.356
<i>Nephrops norvegicus</i>	n.d.	17.3 ± 2.2	0.348 ± 0.057	3.799 ± 0.626
<i>Astacus astacus</i>	51.0 ± 10.9	8.7 ± 1.7	0.984 ± 0.166	1.647 ± 0.329
<i>Pandalus montagui</i>	n.d.	10.6 ± 2.6	0.205 ± 0.024	3.205 ± 0.780
<i>Crangon crangon</i>	n.d.	17.5 ± 1.2	0.236 ± 0.107	5.648 ± 1.349
<i>Panulirus interruptus</i>	46.1 ± 7.1	30.1 ± 14.3	0.008 ± 0.002	0.142 ± 0.055
<i>Pagurus bernhardus</i>	40.1 ± 10.3	21.0 ± 3.6	0.924 ± 0.348	2.401 ± 0.417
<i>Liocarcinus depurator</i>	147.5 ± 36.4	22.3 ± 2.5	0.627 ± 0.092	3.465 ± 0.526
<i>Callinectes bellicosus</i>	28.2 ± 6.6	24.8 ± 5.5	0.038 ± 0.010	0.089 ± 0.015
<i>Cancer pagurus</i>	96.2 ± 15.4	9.6 ± 3.4	0.705 ± 0.339	1.326 ± 0.912
<i>Penaeus vannamei</i>	n.d.	27.5 ± 3.8	0.006 ± 0.001	0.030 ± 0.008

En el estudio se demostró la presencia de la peptidasa lisosomal catepsina D en órganos digestivos de once diferentes especies de decápodos, lo que sugiere su presencia como una enzima extracelular digestiva. Con lo establecido anteriormente fue posible concluir que la catepsina D es una enzima extracelular que se encuentra comúnmente presente en diferentes especies de decápodos, aunque se desconoce cuál es el proceso mediante el cual esta enzima es sintetizada, se cree que se encuentra presente en vacuolas que asemejan a los lisosomas de las células B hepatopancreáticas, las secreciones de estas células se acumulan en el fluido gástrico con lo cual las enzimas permanecen en el estómago y ayudan en la digestión extracelular de la comida recién digerida, estos resultados sugieren que

para el camarón blanco las catepsinas podrían estar involucradas en procesos similares.

En insectos se ha estudiado la participación de catepsina D en el desarrollo larval, tal es el caso del gusano de seda *B. mori*. Gui y colaboradores (2006) estudiaron la participación de esta aspártico proteasa durante la metamorfosis y reportaron la secuencia de una aspártico proteasa tipo catepsina D denominada BmCatD, que cuenta con las características que distinguen a este grupo de peptidasas; el centro catalítico con los residuos de ácido aspártico y seis residuos de cisteína. La expresión de los transcritos se cuantificó en el cuerpo graso y en el intestino de las larvas, observando que la expresión de cada tejido varía dependiendo del estadio. En el cuerpo graso tiene un aumento significativo de la expresión en el último estadio del desarrollo larval mientras que en el intestino tiene su máxima expresión durante los estadios de prepupa y pupa. Para analizar si la expresión de la enzima BmCatD es dependiente de la regulación hormonal realizaron ensayos en los que se añadió la hormona 20-hydroxiecdisona (20E) y la hormona análoga (JHA), así como un reto de infección con baculovirus. Los resultados demostraron que la hormona 20E es un regulador positivo de la expresión de la enzima mientras que JHA es negativo, el reto de infección realizado con baculovirus comprobó que sin importar cuál de las dos hormonas lo acompañe (20E o JHA) la infección aumenta la expresión de la enzima.

Los ensayos realizados mediante el uso de RNAi en los cuales la expresión del gen que codifica la enzima fue silenciada, se evidenció su participación durante la metamorfosis (Fig. 2). Los porcentajes de pupación entre los diferentes tratamientos disminuyen de acuerdo al subestadio en el que se silenció, obteniendo que el 58% de los organismos tratados en el tercer subestadio no desarrollaron pupa y el 16% tuvieron una pupación anormal. El porcentaje de los organismos que no desarrollaron pupa en el tratamiento que se administró durante el quinto subestadio fue el 9%, mientras que el 38% tuvo una pupación anormal. Los resultados obtenidos en el desarrollo de dicha investigación proporciona fuerte evidencia de la

participación de BmCatD en el desarrollo larval de *B. mori* (Gui *et al.* 2006), por la cercanía filogenética de esta especie, se plantea la hipótesis de que esta enzima participa de alguna manera en el desarrollo ontogénico en *L. vannamei*.

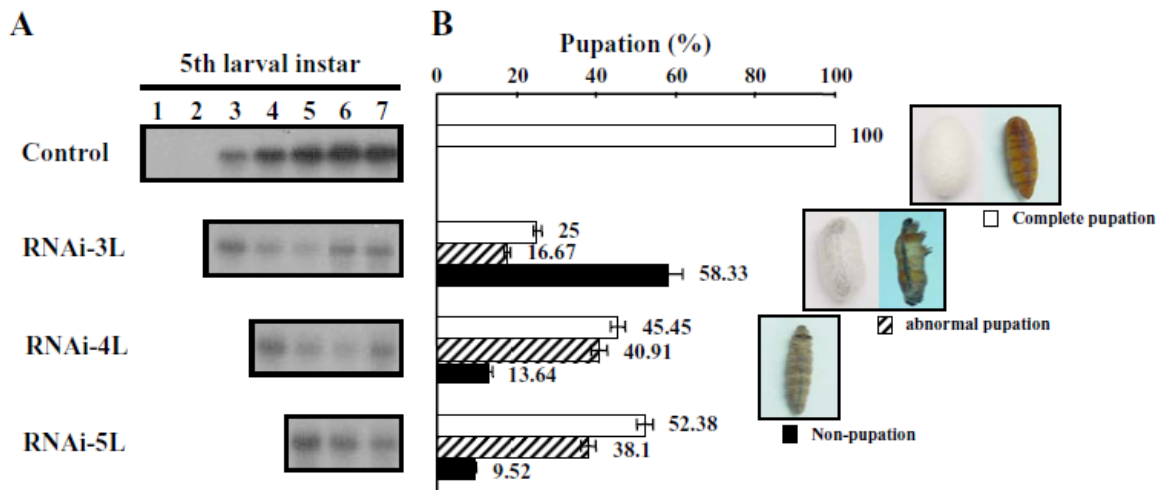


Figura 2. Efectos de BmCatD RNAi en el desarrollo de *B. mori*. (A) Perfil de expresión de BmCatD en larvas de *B. mori* medidas con los tratamientos de RNAi, el dsRNA se inyectó en larvas el día 3 (RNAi-3L), 4 (RNAi-4L) y 5 (RNAi-5L) respectivamente. El ARN total del cuerpo gordo se extrajo en intervalos de un día a partir del día posterior al tratamiento, el nivel de expresión del ARNm se analizó mediante Northern blot. (B) Porcentaje de pupación en larvas de *B. Mori*. Tomado de Gui *et al.*, (2006).

2.4.2 β -secretasa

β -secretasa es una enzima que ha sido estudiada ampliamente en humanos dada su participación en la enfermedad neurodegenerativa conocida como Alzheimer debido a que forma estructuras conocidas como placas seniles a partir de la acumulación de los péptidos β -amiloide. Por esta razón diversos estudios se han llevado a cabo para encontrar mecanismos para reducir dicho padecimiento (Arun *et al.*, 2000; Masuo *et al.*, 2007).

Para el caso de *Drosophila melanogaster* se encontró una proteína con actividad de β -secretasa que escinde la proteína APP, esta proteína se denominó como dBACE y muestra un 50% de similitud con una proteína BACE1 y BACE2 de humano, además la proteína tiene una región altamente conservada en donde se encuentran los

ácidos aspárticos del sitio activo. Bolkan y colaboradores (2012) observaron que la pérdida de la actividad de esta aspártico proteasa tiene efectos perjudiciales en la formación de mielina y actividad neuronal, y que su actividad determina la supervivencia de las células gliales. La eliminación de la actividad de esta enzima lleva a una degeneración de la zona de la glía en la lámina, el fenotipo en el que la proteína beta amiloidea de la mosca (APPL) tenía una forma deficiente la degeneración de las células gliales aumentaba. Estas observaciones determinan que la proteína APPL en su forma completa promueve la muerte de las células gliales, y para prevenir su muerte necesita ser procesada, por lo que su función es determinante para la supervivencia de las células gliales, siempre y cuando sea escindida (Carmine-Simmen *et al.*, 2009).

2.5 Silenciamiento por RNAi

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de la participación de las proteínas en diversos mecanismos, se conoce como “pérdida de función”, el cual, se refiere a la eliminación o supresión específica de la funcionalidad del transcrito de una proteína y posteriormente evaluar los cambios para poder definir su relevancia en diferentes procesos. Esta técnica puede realizarse de diversas maneras, uno de los métodos más recurridos es la inducción de mutaciones en el gen que genera la proteína de interés ocasionando la pérdida de su función, otra técnica utilizada es la que se conoce como “knock-down”, en la cual, el gen de interés no se expresa en la célula modificando la información a nivel del DNA. Actualmente una de las técnicas de silenciamiento más utilizadas, es el silenciamiento mediante el uso de RNAi, una de las bondades de la técnica es la eficiencia con la que puede reducir la expresión de un gen de manera temporal, además de que resulta relativamente sencilla (López *et al.*, 2007).

El mecanismo de silenciamiento mediante el uso de RNAi se catalogó principalmente como un mecanismo de protección que le brinda al organismo una defensa eliminando el RNA proveniente de un virus o de la integración aleatoria de elementos transponibles, sin embargo, la función general del silenciamiento en la

regulación génica solo se pudo observar cuando se describieron qué genes específicos en plantas y animales están involucrados en el procesamiento RNA de doble cadena (dsRNA: double strand RNA) que dan lugar al silenciamiento (Meister y Tuschl 2004).

Este silenciamiento comienza cuando un dsRNA es introducido a una célula, una vez dentro, los dsRNAs son cortados por una enzima del tipo RNAasa III conocida como DICER, generando fragmentos que van de 21-23 pares de bases se denominan siRNA, los fragmentos son reconocidos por un complejo enzimático conocido como RISC, que a su vez se ensambla activando una helicasa asignada al complejo formando una doble hélice, quedándose con la hebra guía. En humanos este complejo se encuentra formado por varias proteínas de la subcategoría Argonauta (Ago 1-4) y Piwi (hpiw1-4), esta enzima puede ser la responsable de hidrolizar el RNA mensajero y a la hebra no asociada al complejo RISC, lo que le permite a la hebra guía quedar unida a dicho complejo. El complejo RISC reconoce a los ARN mensajeros que contienen la secuencia complementaria para realizar el corte en una posición cercana al nucleótido 10 de la hebra guía. El proceso de silenciamiento mediante el sistema de RNAi es altamente eficiente, posiblemente gracias a que el ARN se encuentra dentro del complejo RISC y este puede degradar simultáneamente varios mRNA (López *et al.*, 2007; Shabalina y Koonin, 2008).

En el camarón blanco, diferentes estudios se han realizado utilizando esta técnica, Han-Ching y colaboradores (2010) utilizaron RNAi para medir la respuesta de 12 genes en el sistema inmune innato posterior a un reto infeccioso con *Vibrio harveyi* y observaron que los genes que participan en la cascada de profenoloxidasa (proPO) incrementaron su expresión, así como los genes de la coagulación de la hemolinfa transglutaminasa (TGase), los genes de la proteína de coagulación, así como cinco genes asociados al sistema de péptidos antimicrobianos (ALF, Crustin, Lyz, PEN2 y PEN4). Solo uno de los genes estudiados (PEN3) no mostró diferencias significativas. Posteriormente el gen LvToll fue silenciado mediante RNAi determinando que no existió un efecto en la tasa de supervivencia ni en el número

de bacterias en los camarones tratados expuesto al virus del síndrome de la mancha blanca, sin embargo, al desafiar a los organismos que fueron silenciados con LvToll la mortalidad y los recuentos de UFC bacterianos aumentó. Concluyendo que LvToll es un factor importante en la respuesta inmune innata del camarón a *V. harvery* pero no para el virus del síndrome de la mancha blanca.

Por otro lado Li y colaboradores (2018) analizaron la participación en la respuesta ante infecciones virales de las proteínas Toll, que constituyen una familia que forman parte del sistema inmune innato. Un total de nueve proteínas denominadas Toll del 1 al 9, fueron identificadas además de realizar el silenciamiento de su expresión por medio de RNAi. Los análisis obtenidos mediante el uso de RNAi demostraron que Toll4 es importante en la respuesta inmune contra el virus de la mancha blanca y dio como resultado que las cargas virales elevadas hacen susceptible al camarón a la infección. Además podría estar relacionada a los receptores de reconocimiento para el virus de la mancha blanca, el silenciamiento de Toll4 junto con la proteína Dorsal que contribuían a la modificación de expresión de un conjunto específico de péptidos antimicrobianos (AMP) que tienen una potente actividad ante la infección del virus de la mancha blanca, es por esto que se le adjudica a la combinación de Toll4-Dorsal una resistencia a la infección del virus de la mancha blanca al inducir algunos AMP específicos.

El presente estudio se centró en la caracterización de los transcritos de catepsina D y β -secretasa de *L. vannamei* y la cuantificación de la expresión y actividad proteolítica a lo largo del desarrollo larval. Para tratar de elucidar los procesos en los que participan, se evaluó el efecto del dsRNA de ambos genes en la expresión.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que se ha comprobado que en otras especies de artrópodos las aspártico proteasas participan en la metamorfosis larvaria, es relevante investigar si los transcritos y la actividad estas enzimas se encuentran presentes durante el desarrollo larval de *L. vannamei*, lo que indicaría una posible función en la metamorfosis de esta especie. El presente trabajo pretende contribuir con la adquisición de nuevo conocimiento sobre los procesos fisiológicos asociados al desarrollo larvario, los que servirá como base en estudios posteriores.

4. HIPÓTESIS

Si las aspártico proteasas participan en el desarrollo larval de diferentes especies de artrópodos; entonces estas enzimas tendrán una función similar en *L. vannamei*, la cual podrá ser inferida a través de la detección de transcritos y actividad específica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y cuantificar las aspártico proteasas en el desarrollo larval de *L. vannamei*.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar la secuencia de los transcritos de las proteasas aspárticas β -secretasa y catepsina D
2. Cuantificar la expresión y actividad de β -secretasa y catepsina D a lo largo del desarrollo larval de *L. vannamei*
3. Evaluar un método de transfección de RNAi de β -secretasa y catepsina D en larvas *L. vannamei*

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de larvas de camarón

Las larvas de camarón fueron obtenidas del Laboratorio de Granmar Larvas, S.A. de C.V. que se ubica en la región de San Juan de la Costa, Baja California Sur, México, las muestras fueron tomadas por cuadruplicado de 18 subestadios larvarios de *L. vannamei*; desde huevo hasta el estadio de postlarva 5 y posteriormente a postlarva 11. Las muestras se colocaron en nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio de Bioquímica del CIBNOR, en donde se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Los organismos designados para los ensayos en presencia de RNAi fueron obtenidos a partir de los desoves de hembras parchadas, las cuales fueron separadas y colocadas en espacios independientes y monitoreadas, una vez desovadas las hembras, se recolectaron los huevos filtrando el agua en la que se encontraban mediante el uso de filtros de 100 µm, los huevos fueron llevados a las instalaciones del CIBNOR en donde se mantuvieron en condiciones de oxigenación y temperatura adecuados hasta su eclosión, una vez que los organismos se encontraban en el estadio de nauplio 1 fueron separados para llevar a cabo los ensayos correspondientes.

6.2 Obtención de las secuencias de los genes de catepsina D y β -secretasa

La secuencia de ambos genes se obtuvo a partir de productos de PCR usando como templado cDNA de camarón, los oligonucleótidos iniciadores fueron diseñados en base a secuencias de transcriptomas de *L. vannamei*, depositados en GenBank. Para MEMAPSIN 2 se utilizó una secuencia de *Homo sapiens* de la proteína BACE 1 (GenBank no. de acceso BAA86463.2), que fue utilizada como molde para buscar por Blast TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) en transcriptomas de *L. vannamei* encontrando una secuencia con un porcentaje de identidad del 43% y una cobertura del 78% de camarón blanco. Posteriormente se diseñaron primers flanqueando la secuencia completa, se realizó la amplificación del fragmento mediante una PCR

usando como templado cDNA de postlarva 2 (PL 2) de *L. vannamei*. Posteriormente el producto de la PCR se insertó en un vector de secuenciación (Promega: pGEM®-T Easy Vector Systems) para realizar una secuenciación en Sanger. Por último esta secuencia se anotó en GenBank.

Para la obtención de la secuencia base de catepsina D se utilizó una secuencia de *P. monodon* de Catepsina D (GenBank no. de acceso ABQ10738.1) se realizó un blast TSA encontrando una secuencia de *L. vannamei* con un porcentaje de identidad de 89% y una cobertura de 95%, de la misma manera que en el caso de β -secretasa, usando como templado para este caso cDNA de hepatopáncreas y siguiendo el mismo protocolo hasta su anotación en GenBank.

La secuencia obtenida de catepsina D de *L. vannamei* fue comparada por medio de un alineamiento usando el algoritmo tblastn, el cual busca en la base de datos secuencias de nucleótidos tomando como base una secuencia de aminoácidos, este alineamiento se llevó a cabo en el software BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI), las secuencias encontradas con un alto grado de similitud se utilizaron para realizar un alineamiento comparativo entre las especies de decápodos encontradas y poder identificar motivos proteicos relevantes, basándose en estas secuencias se construyó un cladograma en el software Clustal OMEGA, que es un programa de alineamiento múltiple que utiliza el modelo oculto de Markov (HMM) para realizar alineaciones entre tres o más secuencias, este modelo se puede considerar una generalización de un modelo de mezcla en el cual las variables ocultas que controlan su conformación se selecciona individualmente para cada observación, y son seleccionadas por una serie de experimentos en el que cada variable tiene N posibles resultados y la probabilidad de que cada resultado depende exclusivamente de los que se hayan obtenido en los experimentos previos (Rabiner y Juang, 1986).

6.3 Determinación de actividad proteolítica

La proteína soluble se obtuvo a partir de 90 mg de cada uno de los estadios analizados, la cual fue homogeneizada en un microtubo de 1.6 mL usando un micropistilo y se centrifugó (10,000 g a 4°C) por 10 minutos para obtener la fracción soluble. La cuantificación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

Los ensayos de actividad proteolítica se realizaron en buffer de fosfato-citrato ajustado a pH 5.0, en presencia de 100 mM de NaCl, 1 mM de DTT y 0.001% de Tween 20. La actividad proteolítica se cuantificó mediante una cinética a 30 min con mediciones a intervalos de 30 segundos utilizando sustratos fluorogénicos específicos para la Catepsina D (Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-DArg-NH₂) y β -secretasa (Mca-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Lys(DNP)-Arg-Arg-NH₂), los cuales tienen como reportero a la molécula fluorogénica 7-Metoxicoumarin-4-acido acético (MCA), que se encuentra unida a una secuencia de péptidos conocidos y que sirven como sustrato específico para cada proteasa, ambos sustratos fueron utilizados en una concentración de 2.5 μ M.

Los ensayos se realizaron en microplacas negras de 96 pozos, agregando 10 μ L de la muestra, 70 μ L del buffer correspondiente y 20 μ L de sustrato, como control positivo se utilizó jugo gástrico de langosta, y se añadió un control negativo sin enzimas. Durante 30 minutos se midió la fluorescencia generada por la hidrólisis del sustrato utilizando un lector de microplacas Biotek Synergy 4 Multi mode a las longitudes de onda de 323 nm de excitación y 390 nm de emisión, la hidrólisis se calculó en unidades de fluorescencia relativa por minuto, la actividad proteolítica se expresó en unidades de fluorescencia por minuto por miligramo de proteína.

6.4 Ensayos de actividad proteolítica en presencia de Pepstatin A

Para determinar si la actividad proteolítica medida con los sustratos fluorogénicos proviene de una aspártico proteasa, los extractos proteicos fueron incubados durante 30 min con 1 μ M del inhibidor específico Pepstatin A en una proporción 1:1

(Pepstatin A; 26305-03-3; Sigma-Aldrich) y para el ensayo de actividad se añadieron 20 μL de la solución 1:1 del extracto proteico con el inhibidor, 60 μL de buffer y 20 μL de sustrato.

6.5 Ensayo de silenciamiento mediante RNAi

6.5.1 Síntesis de dsRNA

Se sintetizó dsRNA tanto de los genes de ácido farnesoico-O-metiltransferasa (LvFAMet), green fluorescent protein (GFP), catepsina D y β -secretasa usando el sistema T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega™), se comenzó con la síntesis de un fragmento de 350 pb para catepsina y 385 pb para β -secretasa utilizando como templado cDNA de postlarva de camarón mediante PCR. Estos oligonucleótidos están concatenados con una secuencia de la región promotora de la polimerasa T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3'). El producto obtenido de PCR fue utilizado como templado para la síntesis del dsRNA usando a la enzima RNA polimerasa T7 acorde a las especificaciones del proveedor.

Como control positivo se utilizó dsRNA de la FAMeT debido a que se ha demostrado que se encuentra predispuesto al silenciamiento en el camarón blanco, como control negativo se utilizó dsRNA de GFP, proteína no presente en crustáceos.

6.5.2 Introducción de dsRNA en larvas de *L. vannamei* y el efecto del silenciamiento.

En una placa de 24 pozos se colocaron 60 larvas en el estadio de nauplio 1 por pozo, que se mantuvieron en condiciones constantes de salinidad a 35 ppm y temperatura a 28 °C, con recambios de agua mar sintética y esterilizada por filtración cada 3 horas. El dsRNA se colocó en cada pozo a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ una vez que se encontraron en el estadio de nauplio V, las larvas fueron colectadas, fijadas el Trizol y almacenados a -20 para su análisis. Se utilizaron 5 tratamientos: GFP (Green fluorescence protein), ácido farnesoico O-metiltransferasa (FAMeT), catepsina D, β -secretasa y un control en el cual no se añadió dsRNA.

Se realizaron dos ensayos en los que se suministró el dsRNA correspondiente, en el primer ensayo los organismos se encontraban en el estadio de nauplio 3 y fueron colectados en el estadio de nauplio 5, para el segundo el dsRNA se suministró en organismos que se encontraban en nauplio 1 y fueron recolectados en el mismo estadio del primer ensayo.

6.5.3 Extracción de RNA total

En un tubo de 1.5 mL se homogenizaron las larvas añadiendo 500 μ L de Trizol y se procedió a incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación, se agregaron 100 μ L de cloroformo y se centrifugó (12,000 g a 4°C) por 15 minutos, cuando las fases fueron separadas se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 250 μ L de isopropanol incubándolos por 10 min y centrifugando (12,000 g a 4°C) por 10 minutos. Posteriormente el pellet obtenido fue lavado con 300 μ L de etanol al 70% y fue resuspendido en 20 μ L de agua libre de nucleasas. Se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos mediante el uso del equipo NanoDrop 200 (Thermo Scientific®) y el software NanoDrop 2000/2000c.

6.5.4 Tratamiento con DNasa

Se colocaron de entre 10 pg a 5 μ g del RNA previamente extraído y se agregaron 2 μ L de buffer de control 10X y 1 μ L de DNasa, esta mezcla se incubó a 37°C por 15 min, para la inactivación de la DNasa se agregó 1 μ L de solución Stop y se incubó a 70°C por 10 min, inmediatamente después de la incubación se colocó en hielo durante 1 min y se llevó a un volumen final de 50 μ L de agua libre de nucleasas.

La recuperación del RNA se llevó a cabo agregando 2 volúmenes de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) a la solución de RNA tratado con DNasa, posteriormente se mezcló por vortex a 14,000 rpm durante 15 segundos y se centrifugó (12,000 g a 4°C) por 10 minutos, la fase acuosa fue recuperada, el RNA fue precipitado agregando 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio a 3 mM pH 5.2 y se incubó a -80°C durante toda la noche, se centrifugó (10,000 g a 4°C) por 10 minutos y se descartó el sobrenadante,

posteriormente se llevaron a cabo dos lavados agregando 300 μL de etanol al 70% y se centrifugó (8,000 g a 4°C) por 5 minutos y descartando el sobrenadante, finalmente el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 15 μL de agua libre de nucleasas posteriormente se cuantificó la cantidad de ácidos nucleicos y se almacenaron a -20°C (Chomczynski 1993).

6.5.5 Síntesis de DNA complementario

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó con el kit GoScript™ Reverse Transcription System de Promega®, se utilizaron como templado 450 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para el primer ensayo y 400 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para el segundo, y se agregó 1 μL de Primer Oligo (dT)₁₅ y llevado a un volumen final de 10 μL con agua libre de nucleasas. Esta solución se incubó a 70°C por 5 minutos, terminada la incubación se procedió a colocar las muestras en hielo hasta que se añada el mix de reacción para la transcripción inversa, este mix se realizó añadiendo 4 μL de buffer GoScript™ 5X, 1.5 μL de MgCl_2 , 1 μL de PCR nucleotide mix, 0.5 μL de inhibidor de ribonucleasas RNasin® recombinante, 0.5 de GoScript™ reverse transcriptase y llevado a un volumen final de 10 μL con agua libre de nucleasas.

Una vez realizadas estas dos soluciones se combinaron y se incubaron a 25°C por 5 minutos para su alineación, posteriormente para la extensión se incubó a 42°C por una hora y media, finalmente para la inactivación de la transcriptasa se incubó a 70°C por 15 minutos. Una vez terminado el proceso el cDNA se almacenó a -20°C .

6.5.6 Cuantificación de transcritos por qPCR

Para realizar la cuantificación de los transcritos de los genes de interés, catepsina D y β -secretasa, se utilizó el equipo StepOne Real Time PCR system y el software StepOne v2.0 (Applied Biosystems). Se utilizó L8 como gen de referencia y el método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001) para la cuantificación relativa, este método resulta de utilidad para analizar los cambios relativos en la expresión de genes a partir de los datos obtenidos de cuantificaciones en PCR

tiempo real. La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión de los genes objetivo con referencia a un control, la cuantificación relativa.

El cDNA se diluyó 1:3 (7.5 ng/ μ L) para el primer ensayo y 1:4 (5 ng/ μ L) para el segundo, utilizando agua libre de nucleasas, de cada uno de los cuadruplicados biológicos de los tratamientos se realizaron cuantificaciones por duplicado, los primers para las reacciones de amplificación se utilizaron a una concentración de 5 μ M. Las reacciones consistieron en 5 μ L del reactivo iTaq Universal SYBR Green supermix (BIO-RAD), 1 μ L del primer forward, 1 μ L de primer reverse y 3 μ L de cDNA para tener un volumen final de 10 μ L.

6.5.7 Análisis estadístico

Los datos generados a partir de la cuantificación por qPCR se analizaron con el software STATISTICA® utilizando la prueba estadística de ANOVA para datos paramétricos con un intervalo de confianza de $P=0.05$.

Para determinar si las diferencias encontradas mediante ANOVA son significativas durante el primer ensayo se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey, la cual se encarga de agrupar las medias de cada uno de los tratamientos a analizar en diferentes familias para posteriormente poder compararlas entre si y determinar si alguna de estas es diferente con respecto a las demás y si tienen relación entre ellas, el uso de la prueba de Tukey reduce el error del tipo I, también denominado de tipo alfa, que es cuando se rechaza la hipótesis nula (H_0) siendo que es verdadera, así como también reduce el error de tipo II o beta, que por el contrario no rechaza la hipótesis nula siendo que es falsa.

7. RESULTADOS

7.1 Secuencias de genes de Catepsina D y β -secretasade *L. vannamei*.

En las figuras 3 y 4 se reportan las secuencias obtenidas a partir de productos de PCR obtenidos de tejidos de larvas y juveniles de camarón, los primers utilizados para amplificar el transcrito completo fueron diseñados con base en una secuencia

encontrada en un transcriptoma de la especie, usando para su búsqueda una catepsina D de *P. monodon* y una β -secretasa de humano. Posteriormente mediante un BLAST utilizando como molde una secuencia obtenida por secuenciación Sanger se corroboró la identidad. Las secuencias muestran las características propias de las aspártico proteasas, el péptido señal y los residuos de ácido aspártico.

```

aggaaaaatgaatccaacgcggttgggagctctcccatatggctcgacctgcaggcggccgca
G K - I Q R V G S S P I W S T C R R P R
attcactagtgattgcaaggaaactgcaaacctgttttaaatgagatgacgctcgggcaac
I H - - L Q G N C K P V L N E M T S G N
cagtgtttactcctaacttgagtttggtatcactggttactatgtctccaagctcgtttt
Q C L L L T L S L V S L L L C L Q A R F
gtgttcagtcaccccgccggtcacacccgcctcctgatgcagctcaaccctggaatttg
V F S H P P V T T R P P D A A Q P W N L
catgggactcctgggtgatggcatttactgaagtgcaaatgggactccaccagaag
H G T P G D G Y T E V Q I G T P P Q K
ttcaatcctttgggtggacactggtagcagcaatctagcaatagcaggtgcacctcacgaa
F N L L V D T G S S N L A I A G A P H E
gaactcgagagcttctatgtccatcagagctcctcctcatatgttgacctggcaaggat
E L E S F Y V H Q S S S S Y V D L G K D
gtcgaatgggttatactcagggtagctggcgagggcatttaggcccgtgatttggctcgg
V E M V Y T Q G S W R G H L G R D L V W
tttccaaaactcaaacacagagccactgggtcactgatttagcctcattacacccctgc
F P K L Q N T E P L V T D L A L I T S S
aacaactttatgttaataattcccattggcaggggtattataggcctcgcattgcccggc
N N F Y V N N S H W Q G I I G L A F A A
ttatcccagccaaaaggcagatgttctccggtggtttgacggccttaccgcaaaaaccac
L S Q P K G D V V P W F D G L T A K N H
actgtaaacactttcactatccagttgtgtggtcccttcaggcaaggaatgctcactcgc
T A N T F T I Q L C G P F R Q G N V T R
caccaaggaaagctttacattggatctgatgctggtgattgtcccgcaccatcagtcaca
H Q G K L Y I G S D A G D C F A P S V T
agtcccataaagaaggccatggttttacgaggtccttgcgttgctatggccataggcaag
S P I R R P W F Y E V L V V A M A I G K
acagtcccttgacataccgctgtgtaaagtaaacactgcccagcagcattgtttgactcggc
T V L D I P C V K Y N T A S S I V D S G
acgtccaaccttaggttaccatcaaagggttttcaaagctgtgctcgcggagttgcgcaaa
T S N L R L P S K V F K A V L A E L R K
cagacatcggcaacagagccccctgcccgaagatttttggctcgtgggagtgaggagatc
Q T S A T E P P L P E D F W S G S E E I
tgctggcagccagatcatgaggtatggactgcatttccgaacataacagtccatctagcc
C W Q P D H E V W T A F P N I T V H L A
cacagtaacaactcggccttcaccatcaccataccaccattgtcgtacctcaggccagcc
H S N N S A F T I T I P P L S Y L R P A
ctagatgtgtctgagactggcgatttgcgtgggtgctcgttattgaggaatcacacacaggc
L D V S E T G D C W V L G I E E S H T G
acggtgctaggtgctgtcattttggaaggactctgtgttaccctttgaccggtgctcagc
T V L G A V I L E G L C V T F D R A H A
acaattggatttgccgaatcatcctgtgggccaactgttaaactgagcagcattttacaat
T I G F A E S S C G P T V K L S S I Y N
ggatcggactggcattcattgtgttatatccctagcacagtggtgggctgacactcggcc
G S D W H S C V Y I P S T V D G L T L A
tcctacatgatgttgggattgttgggactcctcctcagtgccactgggtgctcgtgctcta
S Y I M L G L L G L L S V P L V L A A L
cgttgggctggaggtcatttgtagtgcgaaggctcaaccacagaagtgcattccttaca
R W A W R S F V V P R L N P E V P F L T
ctggacgagaccaacacctgaatcgaattcccgcggccgcatggcggcggagcatgc
L D E T N T N R I P A A A M A A G A C
gactcgttacttc
D S L L

```

Figura 3. Secuencia deducida nucleótidos y deducida de amino ácidos de β -secretasa de *L. vannamei*. En la secuencia se observan los codones de inicio y de paro (amarillo), el péptido señal (sombreado en color gris), los residuos de ácido aspártico (azul) y regiones a partir de las cuales se diseñaron los primers para obtener las amplificaciones por PCR (verde).

```

gggaggccaatcgcatgctccggcccgccatggcgccgcggaattcgattctcgccctc
G R P I A C S G R H G G R G N S I L A L
acactcgatagcttgtacagggcatcgctaccggaggacgaacacacttctgaaggcgcc
T L D S L Y R H R Y R R T N T L L K G A
gcgatgaaagtcttgccttctcctggccttggctctggcctgtgctgagctgcct
A M K V L L L L A L V A L A C A V E L P
aggattaaacttcataagttcaagtctgcacgacgctcttggcaagaggttgatcaggca
R I K A L H K F K S A R R S L Q E V D T A
gtgaaggttgttcatcgcaaatggggcaataaaggacccatgccagagccactttccaac
V K V V H R K W G N K G P M P E P L S N
tacatggatgcacagttactatggaccataaccattggtagacccccacagtcttccaga
Y M D A Q Y Y G P I T I G T P P Q S F R
gtgggtgtttgatactggatcctccaatctgtgggtgaccttctaagcagtgccactttacg
V V F D T G S S N L W V P S K Q C H F T
aatattgcttggttgatccacaacaagtagcagtgcaacgaagtcctccacatacaagaag
N I A C L I H N K Y D A T K S S T Y K K
aatggcacaagaattcgacatccagtaggggtcaggctcattgtcaggttatcttctaca
N G T K F D I Q Y G S G S L S G Y L S T
gactctgtatcggttggttcagtagcagtagaggaccagacttttgctgaagccatgagt
D S V S V G S V Q V E D Q T F A E A M S
gagccaggcttggcttttggctgccaagtttgatggaattctggcatggcctatgat
E P G L A F V A A K F D G I L G M A Y D
aggattgctgttgatggagtcacacctgttttctacaacatggggaagcagggtgtgtg
R I A V D G V T P V F Y N M V K Q G V
cctgctccaatttccagcttttctgaacagggatccatctgctgctgaaggtggagaa
P A P I F S F Y L N R D P S A A E G G E
ctgattctaggtggctcagatccttcttactatacaggcgatttccacatagtactgtt
L I L G G S D P S Y Y T G D F T Y V P V
gatcgacaagggtattggcagtttaagatggatggacttcagatgaatggacaacagta
D R Q G Y W Q F K M D G L Q M N G T T V
ccattctgtgatgggtggatgtgaggaattgctgatactgggtacttcccttattgtgct
P F C D G G C E A I A D T G T S L I A A
ccttcagaagaggctcgtctcatcaacaagaagattgggtgctaagccaattatgggtgga
P S E E A R L I N K K I G A K P I M G G
gatgggtcagtggaactgcaacttgattcctcacctgccaacatctcatttgttcttgct
E W S V D C N L I P H L P T I S F V L A
gggaagccatttactctggaaggaaaggattacattctcagggttagtcagtttgacaa
G K P F T L E G K D Y I L R V S Q F G Q
actacatgcctctctgcttccattggcctggatgttccaccacaatgggaccatttgg
T T C L S G F I G L D V P P P M G P I W
attctgggagacatttctcatcggtcgttctacacagagtttgacttgggcaacaatcgt
I L G D I F I G R F Y T E F D L G N N R
gtaggttttgcagagagcaagtagaagaaaaagggttgaagttgatgggtgaagttaga
V G F A E S K - K K K G L K L M G E V R
aaaaatgccatagtgccatataattgtggcataatcactagtggaattcgcgcccgctgca
K N A I V A Y I V A - S L V N S R P P A
ggtcgaccatagggagagctcccaacgcgtgatgtaaaagttg
G R P Y G R A P N A - C K S

```

Figura 4. Secuencia deducida nucleótidos y deducida de amino ácidos catepsina D de *L. vannamei*. En la secuencia se observan los codones de inicio y de paro (amarillo), el péptido señal (sombreado en color gris), los residuos de ácido aspártico (azul) y regiones a partir de las cuales se diseñaron los primers para obtener las amplificaciones por PCR (verde)

7.2 Análisis de la secuencia de amino ácidos de la catepsina D de *P. vannamei*

En base a la secuencias de catepsina D de otros decápodos fue posible identificar características en la secuencia de catepsina D de *L. vannamei*, como motifs conservados que son exclusivos de esta enzima. Entre los residuos conservados están los dos ácido aspárticos (D) que se localizan en los motif catalíticos DTGS (Fig. 5). Con base en la comparación de las secuencias publicadas fue posible realizar un cladograma (Fig. 6) en donde se observa que las secuencias de catepsinas D de decápodos forman dos clados, definidos principalmente por la

presencia o ausencia una región cercana al extremo C-terminal formada por tres prolina denominada “polyproline loop” y que en la estructura terciaria se encuentra cerca del sitio activo, esta secuencia ha sido descrita en reninas y en catepsinas D en mamíferos (Metcalf y Fusek 1993), y en algunos decápodos como la langosta americana (Rojo *et al.*, 2010), en esta especie en particular se ha descrito que las catepsinas presentan dos isoformas, y una de estas isoformas presenta dicha estructura de loop (Martínez-Alarcón *et al.* 2018b).

Al igual que en catepsina D, β -secretasa, presenta regiones específicas conservadas y que le brindan la identidad de aspártico proteasa, los dos residuos de ácido aspártico en los motifs DTG y DSG (Fig. 7). De acuerdo a la comparación de las secuencias en el cladograma se aprecian dos clados bien definidos, uno formado principalmente por las secuencias pertenecientes a mamíferos y otro en el que se encuentran las dos secuencias de *L. vannamei* (Fig. 8). El péptido señal en mamíferos se encuentra altamente conservado, mientras que en el camarón blanco la secuencia cambia, sin embargo, la metionina inicial se encuentra conservada en todas las secuencias. Una de las diferencias más marcadas entre las secuencias es la presencia del motif DDISLL, presente en mamíferos, conocido como cluster de ácido diluicina (ACDL) el cual interactúa con la proteína GGA y facilita el transporte intracelular (He *et al.*, 2005).


```

H_americanus_cathepsinD2_FJ943775.1 -----
P_clarkii_cathepsinD_MK244977.1 -----
E_sinensis_cathepsinD_MG547692.1 -----
M_japonicus_cathepsinD_KF900154.1 -----
P_vannamei_cathepsinD_MH171099 -----
P_vannamei_lysoosomalasparticprotease_XM_027364191.1 KKKGLKLMGEVRKNAIVAYIVAFKKKLLPS
P.monodon_cathepsinD_EF213114.1 -----
M_rosenbergii_cathepsinD_AKP262355.1 -----
E_carinicauda_cathepsinD_JX508644.1 -----
H_americanus_cathepsinD1_EU687261.1 -----
P_vannamei_lysoosomalasparticprotease_XM_027380068.1 -----

```

Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencias de amino ácidos de catepsina D de diferentes especies de decápodos utilizando el software Clustal OMEGA, las D subrayadas y remarcadas en negritas corresponden al residuo de ácido aspártico del sitio catalítico, las letras N en negritas indican los lugares con alta probabilidad de presentar glicosilaciones, sombreado de un color gris se encuentra resaltado el polyproline loop, subrayado y en itálica se encuentra señalado el péptido señal al inicio de las secuencias. Los asteriscos representan residuos idénticos o conservados, los dos puntos corresponden a substituciones conservativas mientras que los puntos son substituciones semi conservativas. GenBank números de acceso FJ943775.1, MK244977.1, MG547692.1, KF900154.1, MH171099, XM_027364191.1, EF213114.1, AKP262355.1, JX508644.1, EU687261.1 y XM_027380068.1.

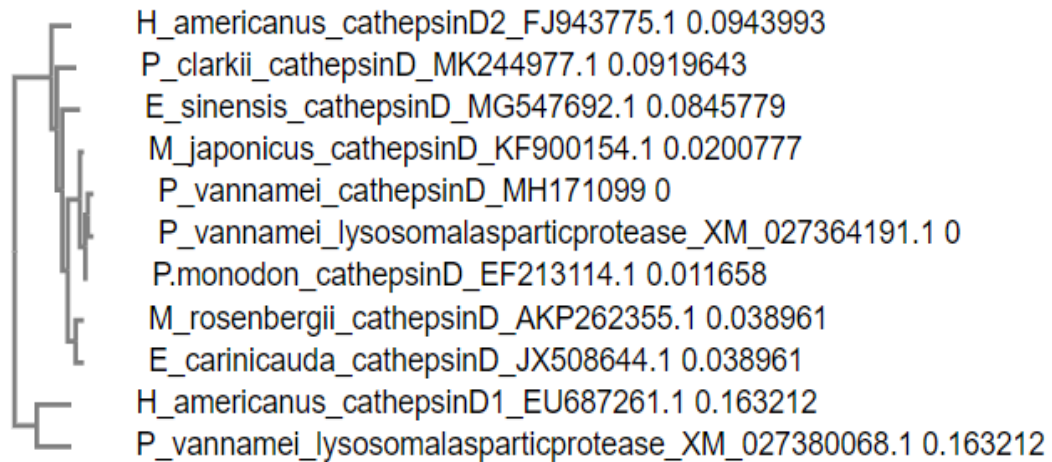


Figura 6. Cladograma formado a partir de diferentes secuencias de amino ácidos de catepsina D de diferentes especies de decápodos y la secuencia de *L. vannamei* obtenida en nuestro estudio. GenBank números de acceso FJ943775.1, MK244977.1, MG547692.1, KF900154.1, MH171099, XM_027364191.1, EF213114.1, AKP262355.1, JX508644.1, EU687261.1 y XM_027380068.1.

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ MAQALPWL... 60
C_ursinus_beta-secretasel_ MAQALPWL... 41
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 MAQVLPW... 56
H_sapiens_Asp MAQALPWL... 56
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 MAQTLPW... 56
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 MTSGNQCL... 37
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 MTSGNQCL... 37

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ RGSFVEMVDNLRGKSGGGYVEMTVGSP... 120
C_ursinus_beta-secretasel_ RGSFVEMVDNLRGKSGGGYVEMTVGSP... 101
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 RGSFVEMVDNLRGKSGGGYVEMTVGSP... 116
H_sapiens_Asp RGSFVEMVDNLRGKSGGGYVEMTVGSP... 116
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 RGSFVEMVDNLRGKSGGGYVEMTVGSP... 116
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 ---DAAQPWNLHGT... 94
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 ---DAAQPWNLHGT... 94

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ LSSTYRDRLRGGYVVPY... 179
C_ursinus_beta-secretasel_ LSSTYRDRLRGGYVVPY... 160
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 LSSTYRDRLRGGYVVPY... 175
H_sapiens_Asp LSSTYRDRLRGGYVVPY... 175
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 LSSTYRDRLRGGYVVPY... 175
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 SSSYVDLGD... 154
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 SSSYVDLGD... 154

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ WEGILGLAYAEIAR... 239
C_ursinus_beta-secretasel_ WEGILGLAYAEIAR... 220
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 WEGILGLAYAEIAR... 235
H_sapiens_Asp WEGILGLAYAEIAR... 235
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 WEGILGLAYAEIAR... 235
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 WQGIIGLAFAAL... 210
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 WQGIIGLAFAAL... 210

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ IIGGDHSLY... 299
C_ursinus_beta-secretasel_ IIGGDHSLY... 280
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 IIGGDHSLY... 295
H_sapiens_Asp IIGGDHSLY... 295
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 IIGGDHSLY... 295
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 YIG-SDAGDC... 269
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 YIG-SDAGDC... 269

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ RLPKVFEEAAVKS... 356
C_ursinus_beta-secretasel_ RLPKVFEEAAVKS... 337
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 RLPKVFEEAAVKS... 352
H_sapiens_Asp RLPKVFEEAAVKS... 352
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 RLPKVFEEAAVKS... 352
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 RLPKVFEEAAVKS... 328
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 RLPKVFEEAAVKS... 329

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ ---TNQSFRI... 394
C_ursinus_beta-secretasel_ ---TNQSFRI... 375
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 ---TNQSFRI... 390
H_sapiens_Asp ---TNQSFRI... 390
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 ---TNQSFRI... 390
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 ---NSAFTI... 364
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 CQRKRG... 387

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ GTVMGAVIMEGYV... 454
C_ursinus_beta-secretasel_ GTVMGAVIMEGYV... 435
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 GTVMGAVIMEGYV... 450
H_sapiens_Asp GTVMGAVIMEGYV... 450
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 GTVMGAVIMEGYV... 450
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 GTVLGAVILEGL... 419
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 QRRTVAIL... 442

M_putorius_furo_beta-site_APP-cleaving_ DESTLMTIAYVMA... 505
C_ursinus_beta-secretasel_ DESTLMTIAYVMA... 486
E_caballus_beta-secretasel-like_XM023644882.1 DESTLMTIAYVMA... 501
H_sapiens_Asp DESTLMTIAYVMA... 501
P_concolor_beta-secretasel_XM025927902.1 DESTLMTIAYVMA... 501
L_vannamei_beta-secretasa-like_MH171100 DG-LTLASY... 471
P_vannamei_beta-secretasel_XM027364158.1 DG-LTLASY... 494

Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de amino ácidos de β -secretasa pertenecientes a diferentes especies, realizado mediante el uso de software Clustal OMEGA, las D subrayadas y remarcadas en negritas corresponden al residuo de

ácido aspártico del sitio catalítico, las letras N en negritas indican los lugares con alta probabilidad de presentar glicosilaciones, sombreado de un color gris al principio de la secuencia se encuentra resaltado el motif ACDL que es importante en la endocitosis de BACE 1. Los asteriscos representan residuos idénticos o conservados, los dos puntos corresponden a substituciones conservativas mientras que los puntos son substituciones semi conservativas. GenBank números de acceso MH171100, AF204943.1, XM025893562.1, XM004749913.2, XM025927902.1, XM023644882.1 y XM027364158.1.

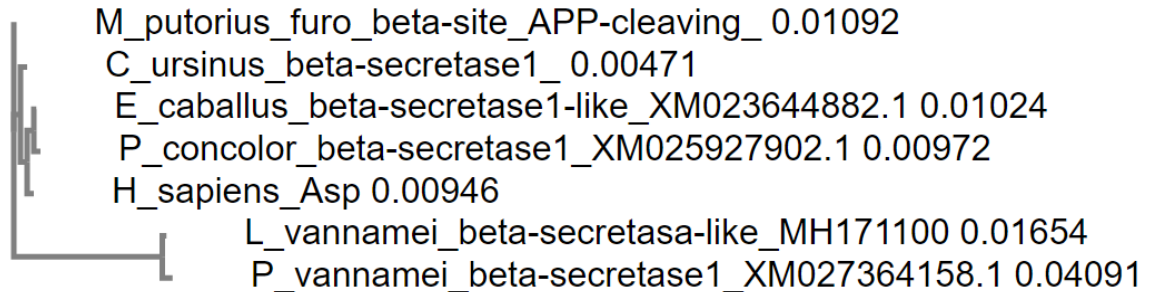


Figura 8. Cladograma formado a partir de diferentes secuencias de amino ácido de β -secretasa de diferentes especies, las secuencias se compararon principalmente con mamíferos y con una de la misma especie reportada por otros autores. GenBank números de acceso MH171100, AF204943.1, XM025893562.1, XM004749913.2, XM025927902.1, XM023644882.1 y XM027364158.1.

7.3 Actividad proteolítica de catepsina D y β -secretasa

La actividad proteolítica específica se muestra en las figuras 9 y 10, las barras representan la actividad que resultó sensible al inhibidor Pepstatin-A, se observa que la actividad de las enzimas cambia a lo largo del desarrollo larval, los cambios más relevantes se encontraron en los estadios en los que el camarón cambia sus hábitos alimenticios. Durante el desarrollo larval la actividad de catepsina D se observa en todos los subestadios nauplio (Fig. 9) alcanzando un máximo en el subestadio nauplio 2 y que posteriormente decrece. En zoea 2 y 3 se cuantificó un incremento de la actividad a diferencia de mysis en donde no se detectó, en el último estadio los cambios en la actividad no muestran diferencias significativas.

En comparación con catepsina D, la actividad de β -secretasa (Fig. 10) solo se detectó en los subestadios nauplio 3 y 5, posteriormente la actividad aumenta

durante los estadios de zoea y disminuye en mysis, después del cual se mantiene hasta el estadio de postlarva, solo fue detectada en los subestadios postlarva 1 y 5.

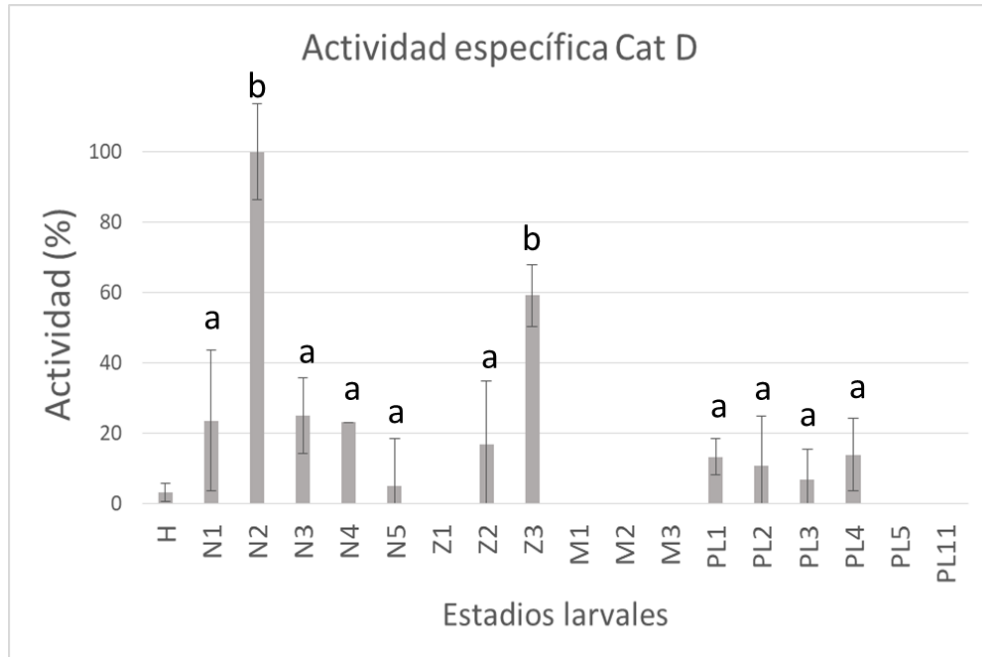


Figura 9. Actividad específica de catepsina D en el desarrollo larval de *L. vannamei*. Las barras representan el porcentaje de actividad de cada uno de los subestadios muestreados \pm el error estándar de cada una de las réplicas. H—representa el estadio de huevo, N1-N5 los estadios de nauplio, Z1-Z3 los estadios de zoea, M1-M3 los estadios de mysis y PL1-PL11 los estadios de postlarva.

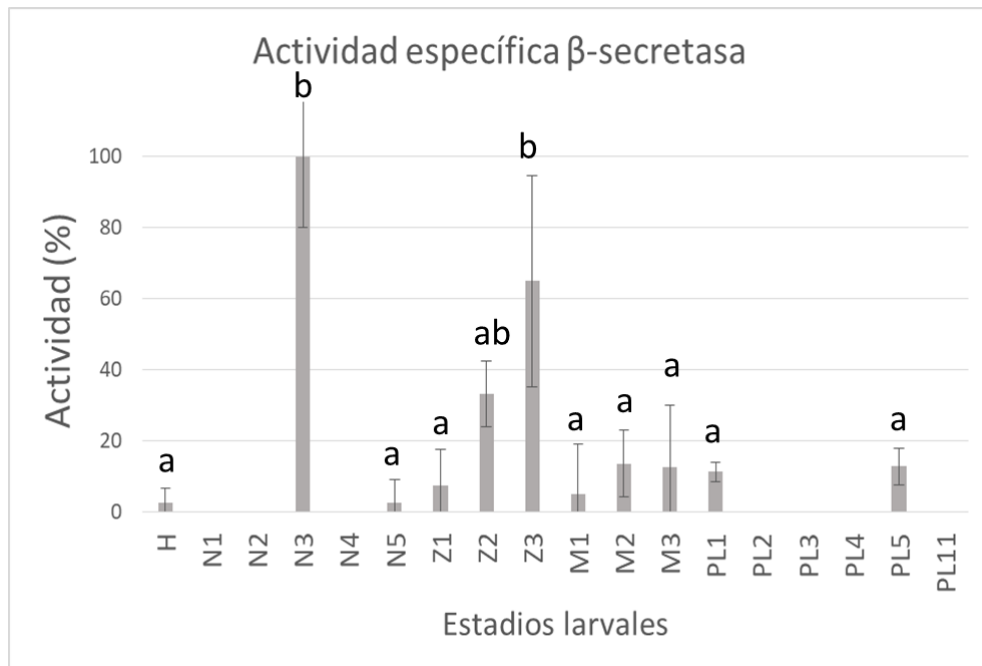


Figura 10. Actividad específica de β -secretasa en el desarrollo larval de *L. vannamei*. Las barras representan el porcentaje de actividad de cada uno de los subestadios muestreados \pm el error estándar de cada una de las réplicas. H– representa el estadio de huevo, N1-N5 los estadios de nauplio, Z1-Z3 los estadios de zoea, M1-M3 los estadios de mysis y PL1-PL11 los estadios de postlarva.

7.4 Expresión de catepsina D y β -secretasa a lo largo del desarrollo larval de *L. vannamei*

En las figuras 11 y 12 se observa la expresión relativa de ambos genes que se cuantificó mediante qPCR y analizado por el método de $2^{-\Delta CT}$, para catepsina D se observa aumento significativo ($P=0.05$) durante los estadios mysis 2 y 3 calculado mediante el análisis de ANOVA de una vía. Por otra parte, la expresión de β -secretasa no mostró diferencia significativa a lo largo del desarrollo larval, solo en el último estadio (postlarva 11) es significativamente mayor con el mismo valor de confianza que la prueba anterior.

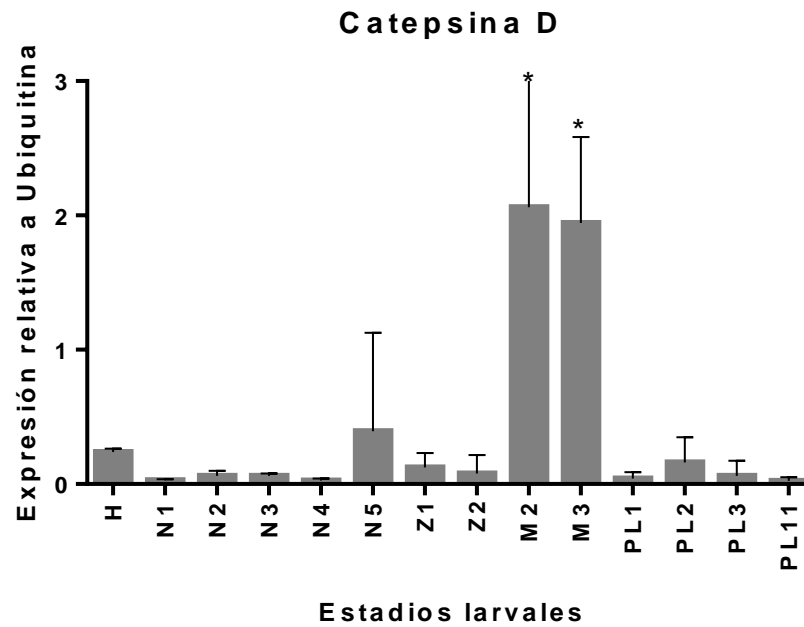


Figura 11. Cuantificación relativa de transcritos de catepsina D en el desarrollo larval de *L. vannamei*. En el eje de las abscisas se muestran los estadios larvares y en el eje de las ordenadas la expresión relativa a ubiquitina. H—representa el estadio de huevo, N1-N5 los estadios de nauplio, Z1-Z2 los estadios de zoea, M2-M3 los estadios de mysis y PL1-PL11 los estadios de postlarva. Los * indican diferencias significativas analizadas mediante la prueba de Tukey con un valor de $P=0.05$, en cada estadio se muestra el error estándar de las cuantificaciones obtenidas por qPCR.

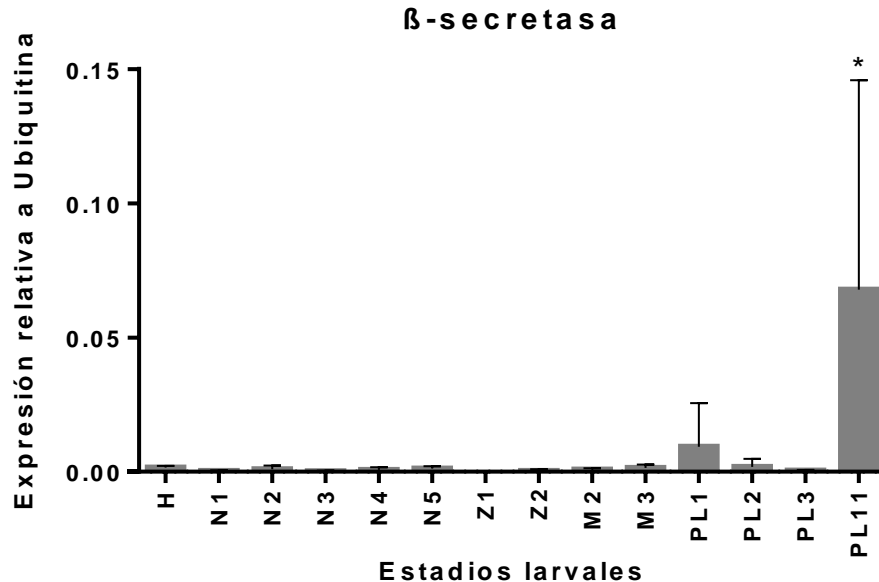


Figura 12. Cuantificación relativa de transcritos de β -secretasa en el desarrollo larval de *L. vannamei*. En el eje de las abscisas se muestran los estadios larvarios y en el eje de las ordenadas la expresión relativa a ubiquitina. H–representa el estadio de huevo, N1-N5 los estadios de nauplio, Z1-Z2 los estadios de zoea, M2-M3 los estadios de mysis y PL1-PL11 los estadios de postlarva. Los * indican diferencias significativas analizadas mediante la prueba de Tukey con un valor de $P=0.05$, en cada estadio se muestra el error estándar de las cuantificaciones obtenidas por qPCR.

.7.5 Efecto del dsRNA en la expresión de los genes catepsina D y β -secretasa

Se realizaron dos ensayos en microplacas de 24 pozos en donde dsRNA de catepsina D fue agregado directamente al agua del cultivo (2 mL) a concentración de 15 μ g de dsRNA específico de los genes correspondientes, cada uno de los tratamientos se realizó por cuadruplicado, además de los genes de interés se incluyeron controles positivos (dsRNA del gen LvFAMeT) y negativos (sin dsRNA y dsRNA del gen GFP no presente en *L. vannamei*). El primer bioensayo se inició en el estadio N1 mientras que el segundo ensayo comenzó en el estadio N3, para ambos ensayos la expresión de los genes se cuantificó en organismos en el estadio N5 en donde fueron colectados y almacenados para su procesamiento. Estas muestras se

analizaron por medio de qPCR y los cambios en la expresión genética fueron calculados de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Para ambos ensayos se determinó la sobrevivencia relativa a los tratamientos utilizados, lo anterior para corroborar que la presencia del dsRNA desnudo en el medio no afectaba la sobrevivencia de las larvas, cuantificando del porcentaje de organismos que sobrevivieron desde el inicio del tratamiento hasta el punto en que se colectaron para su análisis. En la figura 13 se observa la sobrevivencia de las larvas a los tratamientos, a partir de estos resultados se observó que la presencia del dsRNA en el medio no afecta negativamente a la sobrevivencia o al avance en el desarrollo larva, ya que no se encuentran diferencias de los tratamientos con el control, el cual carecía de dsRNA desnudo, con esto podemos concluir que la mortalidad registrada no está relacionada a los tratamientos.

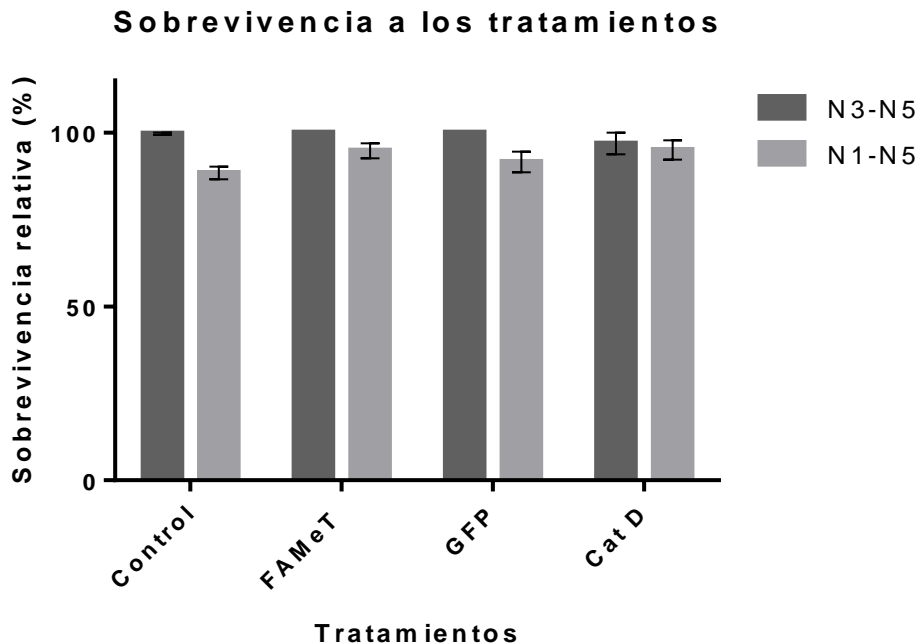


Figura 13. Supervivencia relativa a los tratamientos con dsRNA desnudo al término del bioensayo, el primero comenzó en el estadio de nauplio 1 mientras que el segundo inicio en nauplio3, ambos terminaron cuando los organismos se encontraban en el estadio de nuplio 5.

En la figura 14 se observa la expresión de los genes de FAMEt y catepsina D mediante qPCR, nuestros resultados indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al control, por lo que se puede concluir que los genes no fueron silenciados mediante el método de inmersión en dsRNA. En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos durante el segundo ensayo que va de los estadios nauplio 1 a nauplio 5, en este ensayo tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes, de hecho para todos los tratamientos la expresión del gen FAMEt muestran una tendencia a aumentar. La expresión de catepsina D permanece constante para todos los tratamientos. Para determinar si las diferencias entre los tratamientos son significativas, una vez cumplido el supuesto de distribución normal de los valores, se aplicó una prueba paramétrica de ANOVA con un valor de $P=0.05$ mediante el software STATISTICA, los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos (Tukey, 1949).

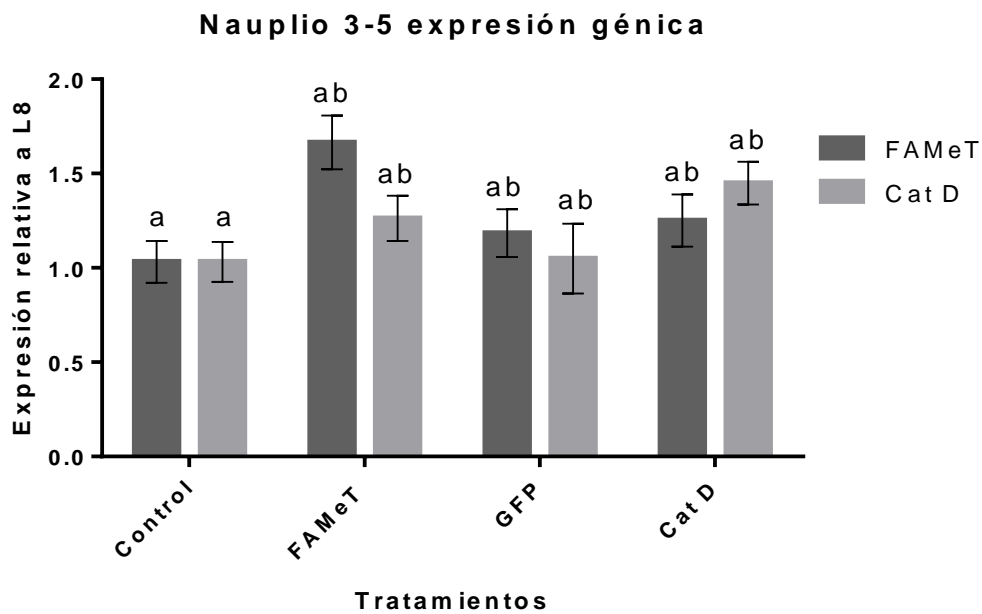


Figura 14. Expresión génica de FAMEt y catepsina D en los diferentes tratamientos utilizando RNAi en una concentración de 15 ug, el tratamiento comenzó en el estadio de nauplio 3 y finalizó en el estadio de nauplio 5. En el eje de las abscisas se muestran los estadios larvarios y en el eje de las ordenadas la expresión relativa a L8, las letras indican la formación de tres grupos homogéneos (a, ab y b) formados mediante la prueba de Tukey con un valor de $P=0.05$, en cada estadio se muestra el error estándar de las cuantificaciones obtenidas por qPCR. .

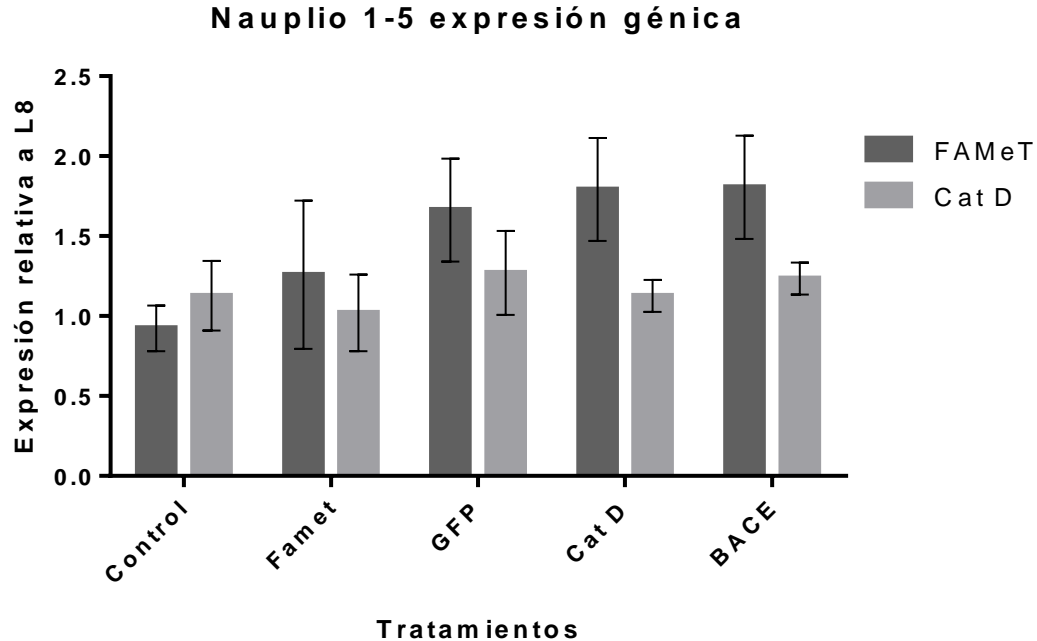


Figura 15. Expresión génica de FAMEt y catepsina D en los diferentes tratamientos utilizando RNAi en una concentración de 15 ug, el tratamiento comenzó en el estadio de nauplio III y finalizó en el estadio de nauplio V. En el eje de las abscisas se muestran los estadios larvarios y en el eje de las ordenadas la expresión relativa a L8.

8. DISCUSIÓN

En estudios realizados en crustáceos se ha demostrado que existe una gran diversidad de peptidasas cuya función se encuentra dirigida a procesos específicos de su biología, enzimas como tripsinas y quimotripsinas (Galgani *et al.*, 1985; Hernández-Cortés *et al.*, 1997), catepsinas B (Aoki *et al.*, 2003), catepsina L (Teschke y Saborowski, 2005) y catepsinas D (Rojo, Sotelo-Mundo, *et al.* 2010) por mencionar algunas. De las diversas clases de peptidasas, las aspártico proteasas son una de las menos estudiadas y cuya función fisiológica y participación en el desarrollo larvario de *L. vanamei* está aún por ser elucidada. En estudios previos se ha identificado que a lo largo del desarrollo larval la actividad de aspártico proteasa varía dependiendo del estadio en el que se encuentre (Romero-Hernández, 2017),

estas variaciones de concentración se acompañan del cambio en la estrategia de alimentación, así como de las modificaciones fisiológica puntuales que se presentan en su metamorfosis para convertirse en organismos adultos (Poulin *et al.*, 2001).

Por otro lado, las caracterizaciones de transcritos de aspártico proteasas en crustáceos son contados pero detalladas, los resultados de este trabajo aportan en ese aspecto. El análisis de la secuencia del transcrito de catepsina D de *L. vannamei* muestra regiones conservadas que la identifican como miembro de las aspártico proteasas, con base en la estructura primaria observamos la presencia de dos residuos de ácido aspártico que se han descrito tanto en mamíferos (Faust *et al.*, 1985) como en crustáceos (Rojo *et al.*, 2010), y que se conoce se encuentran asociados al sitio activo donde se realiza la hidrólisis de proteínas (Tang and Wong 1987). La secuencia obtenida se comparó con otras reportadas en decápodos por medio de un alineamiento (Fig. 5) a partir del cual se construyó un cladograma, en donde se observó que las secuencias se separaron en dos clados principales (Fig. 6), esta separación ya había sido reportada por Rojo y colaboradores (2010) quienes describen que estos dos clados corresponden a catepsinas digestivas y no digestivas respectivamente, de los diversos taxos analizados. Unas de las características importantes de la separación de ambos clados es la presencia de un loop denominado “polyproline loop” (Padilha *et al.* 2009), diversos análisis han encontrado que la presencia o ausencia de este loop determina si la enzima es considerada como digestiva o no (Rojo *et al.*, 2010). El alineamiento realizado para comparar la catepsina D de *L. vannamei* denota la presencia del polyproline loop, en *H. americanus* la isoforma catepsina D2 presenta esta misma característica por lo cual se encuentra descrita como una enzima con funciones no digestivas, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren, que de manera similar a *H. americanus*, *L. vannamei* presenta dos isoformas, posiblemente involucradas en procesos diferentes.

Por lo establecido anteriormente podemos asumir que la enzima descrita para camarón blanco no se encuentra relacionada a funciones que intervienen en el

proceso digestión, sino a procesos alternativos como degradación del vitelo o de la cutícula en preparación para la muda, como ha sido reportado para otras larvas de artrópodos (Gui *et al.* 2006), ya que los proceso de muda es particularmente constante durante el desarrollo larvario de peneidos (Vijayan *et al.*, 1997).

A pesar de que en la β -secretasa de *L. vannamei* los amino ácidos de los sitios activos se encuentran conservados (Fig. 7), el cladograma (Fig. 8) realizado a partir de estas secuencias muestra una separación marcada entre mamíferos y el camarón blanco. Las secuencias difieren en muchas de sus características estructurales, empezando por el péptido señal, ambas secuencias de camarón tienen diferentes amino ácidos asociados en comparación a los que presentan las secuencias de mamíferos. Una de las características que sobresalen es la ausencia del motif ACDL en el transcrito de camarón, dado que en mamíferos esta enzima es un intermembranal este le brinda las características necesarias para el transporte dentro de la célula, la ausencia del mismo dentro de las secuencias de camarón podrían indicar que participa de diferentes procesos o que su ubicación puede ser diferente, en cualquier caso es necesario realizar estudios más meticulosos para poder inferir diferencias entre las funciones de las enzimas de mamíferos e invertebrados (He *et al.*, 2005).

La actividad proteolítica específica de las aspártico proteasas varía a lo largo del desarrollo larval, el sustrato utilizado para la cuantificación de la actividad de catepsina D (Fig. 9) muestra que es durante la fase nauplio en donde se observa la mayor actividad en comparación con los demás estadios, durante la fase naupliar el organismo no requiere de alimentación, puesto que las reservas alimenticias que lo nutren se encuentran en el vitelo, por lo que la actividad proteolítica encontrada puede estar asociada a la hidrólisis de las proteínas del vitelo.

En mamíferos la catepsina D se encuentra como una proteinasa lisosomal capaz de digerir bacterias y demás sustancias por medio de fagocitosis (Tang y Wong, 1987), además de esta función se ha demostrado su participación en procesos de

apoptosis (Boya y Kroemer, 2008). Por otra parte en diferentes especies de artrópodos, la catepsina D contribuye a procesos extracelulares principalmente relacionados con la digestión de alimentos (Blanco-Labra *et al.* 1996; Williamson *et al.* 2003), específicamente en crustáceos se ha descrito que la catepsina D de *H. americanus* que representa dos isoformas (Rojo *et al.*, 2010). Debido a la metodología empleada durante los ensayos no es posible determinar la ubicación anatómica de la enzima de la cual obtuvimos las cuantificaciones de actividad, sin embargo podemos deducir es posible que la actividad de catepsina D también se encuentre asociada a la eliminación de estructuras por medio de apoptosis como lo describe Gui y colaboradores (2006) para *B. mori*, sin embargo la verificación de su participación en dichos procesos debe ser probada experimentalmente.

β -secretasa es un aspártico proteasa intermembranal que ha sido ampliamente estudiada en mamíferos y específicamente en humanos por su relación con la enfermedad neurodegenerativa Alzheimer (Yankner 1996), diversos esfuerzos se han realizado en la descripción de su participación y regulación en los procesos en los que interviene, un ejemplo es el papel que desempeña en la hidrólisis de la APP (proteína precursora amiloidea), que es uno de los factores que intervienen en la acumulación de las placas seniles, péptidos formados de entre 40 y 49 aminoácidos que son los principales responsables de esta enfermedad (Cai *et al.*, 2001). La actividad de esta enzima y su participación con APP se observó durante estudios en ratones mediante el mecanismo de silenciamiento génico conocido como “gene knockdown”, los ratones silenciados no mostraron formación de placas seniles además de que no se reportaron efectos biológicos negativos, lo que indica que la inhibición del gen es tolerable para los organismos experimentales (Cai *et al.*, 1993). A pesar de que los estudios en artrópodos son escasos encontramos trabajos como el de Bolkan y colaboradores (2012) quienes analizaron en *D. melanogaster* un gen ortólogo a β -secretasa denominado dBACE, el cual es esencial para la sobrevivencia de las células gliales debido a que su inhibición en las neuronas

fotorreceptoras propicia la degradación de la glía en la zona de la lámina basal ubicada en la corteza cerebral.

Respecto a la actividad de β -secretasa (Fig. 10), los resultados obtenidos en este trabajo arrojaron que en los estadios de zoea y mysis se presenta un aumento en comparación con los demás estadios, sin embargo, el estadio en el que se detectó la mayor actividad fue nauplio 2, lo que concuerda con reportes anteriores realizados para la misma especie (Romero-Hernández, 2017). Pese a que no podemos corroborar que la actividad obtenida corresponda específicamente a una β -secretasa o a un tejido en específico, ya que para las mediciones se utilizó un extracto proteico de organismos completos, podemos inferir que es una aspártico proteasa con actividad similar teniendo en cuenta el sustrato fluorogénico utilizado y las características estructurales de la secuencia obtenida.

Las cuantificaciones de los transcritos para catepsina D (Fig. 11) y β -secretasa (Fig. 12) exhiben patrones en los que se observa que entre los diversos estadios se presentan variaciones, cambios en la expresión génica que se producen a lo largo del desarrollo han sido reportados en la misma especie (Lemos *et al.* 1999), para diferentes genes (Hernandez-Cortes *et al.* 2017), y descritos en otras especies de crustáceos (Abzhanov y Kaufman, 2000; Terwilliger y Dumler, 2001; Chung *et al.*, 2006). Pese a pertenecer al mismo grupo de proteinasas cada enzima presenta patrones de expresión individuales (Saborowski *et al.* 2006). Haciendo una comparación entre la expresión y la actividad se observa que los patrones no corresponden, esto podría explicarse debido a la capacidad de enzimas similares a hidrolizar los sustratos fluorogénicos utilizados para la cuantificación de actividad proteolítica, por otra parte es factible que el camarón blanco cuente con alguna isoforma alternativa a la cuantificada aquí de las enzimas analizadas como se ha reportado en otros crustáceos en el caso específico de la catepsina D (Rojo, Muhlia-Almazan, *et al.* 2010).

Los organismos que fueron expuestos a los tratamientos de RNAi mostraron una sobrevivencia mayor al 80% (Fig. 13), dependiendo de la función que cumpla el gen que se desea silenciar en algunos artrópodos se ha establecido que el silenciamiento de los genes propicia mortandad o un impedimento para que continúen de manera regular con posteriores etapas del desarrollo (Barnard *et al.* 2012; Gui *et al.* 2006). Las cuantificaciones de los transcritos de catepsina D (Fig. 14 y 15) con respecto a nuestro gen de referencia (L8) no mostraron una disminución, lo que nos indica que el método de entrega de RNAi utilizado durante los ensayos no logra penetrar las células de las larvas e iniciar el proceso de silenciamiento, por lo que la expresión de las enzimas de interés se mantuvo cercana al 100%. Se ha reportado que en esta especie es factible silenciar genes por medio de RNAi, Hui y colaboradores (2008) realizaron ensayos en los que inhibieron la expresión de FAMeT y evaluaron el efecto en la muda de los camarones, observaron ningún organismo tratado con dsRNA de este gen logra sobrevivir ni llevar a cabo la muda de manera regular.

El éxito del silenciamiento genético por medio de RNAi puede estar determinado por diversas variables, entre ellas el método por el cual se administra el dsRNA y la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo, la mayoría de los estudios en los que se ha logrado inhibir la expresión de un gen se realizan por inyección directa en la membrana artropodal del quinto pereopodo en juveniles y adultos de *L. vannamei* (Hui *et al.*, 2008; Han-Ching *et al.*, 2010; Barnard *et al.*, 2012), sin embargo, para otros artrópodos se ha demostrado que el sistema RNAi puede inducirse durante etapas larvarias (Gui *et al.* 2006). Los métodos directos de inserción del dsRNA, como la micro inyección, suelen ser más efectivos al integrar el material genético a las células, la efectividad en el silenciamiento se encuentra asociado en igual medida al modo en el que se desarrolla cada tejido, la captación y el transporte del dsRNA hasta el lugar donde se requiere (Miller *et al.*, 2008). Por lo que el método de entrega probado en este estudio (sumersión directa en agua con

dsRNA) puede no ser eficiente para inducir el silenciamiento génico en larvas de *L. vannamei*.

9. CONCLUSIONES

Dentro de los análisis obtenidos se demostró que durante las fases larvales de *L. vannamei* la actividad proteolítica de las aspártico proteasas varía dentro de los diferentes estadios, posiblemente asociados a procesos específicos durante el desarrollo del organismo.

Las secuencias que se obtuvieron para ambas enzimas muestran características propias del grupo de las aspártico proteasas, teniendo los sitios conservados de los residuos de ácido aspártico, el péptido señal y regiones con alta probabilidad de presentar glicosilaciones, además de estas regiones conservadas encontramos que en el caso de catepsina D comparte la región del polyproline loop, en la secuencia de β -secretasa se observó que en comparación con las demás secuencias la obtenida para el camarón blanco carece del motif ACDL, el cual juega un papel importante el transporte intermembranal.

Con base en lo observado durante los ensayos de silenciamiento génico, el método de sumersión para la administración del dsRNA en larvas de camarón blanco, demostró no ser el método óptimo. En relación a lo establecido anteriormente es recomendable utilizar un método de transfección directo en el que se asegure que el dsRNA sea administrado de manera adecuada en el organismo.

Este primer acercamiento nos permite tener un punto de partida para continuar con futuras investigación y comprender los mecanismos y procesos sujetos al grupo de las aspártico proteasas durante el desarrollo larval de los peneidos.

10. LITERATURA CITADA

- Abzhanov, A., T. C. Kaufman. 2000. Embryonic Expression Patterns of the Hox Genes of the Crayfish *Procambarus Clarkii* (Crustacea, Decapoda). *Evolution and Development*. 2(5):271-283.
- Aoki, H., M. N. Ahsan, S. Watabe. 2003. Molecular Cloning and Characterization of Cathepsin B from the Hepatopancreas of Northern Shrimp *Pandalus Borealis*. *Comp. Biochem. Phys. B*. 134(4):681-694.
- Barnard, A. C., A. M. Nijhof, W. Fick, C. Stutzer, C. Maritz-Olivier. 2012. RNAi in Arthropods: Insight into the Machinery and Applications for Understanding the Pathogen-Vector Interface. *Genes*. 3(4):702-741.
- Barrett, a. J., J. K. McDonald. 1986. Nomenclature: Protease, Proteinase and Peptidase. *Biochem. J*. 237(3):935-935.
- Benes, P., V. Vetvicka, M. Fusek. 2008. Cathepsin D-Many Functions of One Aspartic Protease. *Crit. Rev. Oncol. Hemat*. 68(1):12–28.
- Blanco-Labra, A., N. A. Martinez-Gallardo, L. Sandoval-Cardoso, J. Delano-Frier. 1996. Purification and Characterization of a Digestive Cathepsin d Proteinase Isolated from *Tribolium Castaneum* Larvae (Herbst). *Insect. Biochem. Molec*. 26(1):95-100.
- Bolkan, B. J., T. Triphan, D. Kretzschmar. 2012. β -Secretase Cleavage of the Fly Amyloid Precursor Protein Is Required for Glial Survival. *J. Neurosci*. 32(46):16181-16192.
- Boya, P., G. Kroemer. 2008. Lysosomal Membrane Permeabilization in Cell Death. *Oncogene*.c27 (50):6434-6451.

- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72(1–2):248–54.
- Brusca, R., G. J. Brusca. 2005. *Invertebrados*. Mc Graw Hill/Interamericana de España. 2da edición. España. 1005p.
- Cai, H, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price, P. C. Wong. 2001. BACE1 Is the Major β -Secretase for Generation of A β Peptides by Neurons. *Nat. Neurosci.* 4(3):233-234.
- Cai, X. D., T. E. Golde, S. G. Younkin. 1993. Release of Excess Amyloid β Protein from a Mutant Amyloid β Protein Precursor. *Science.* 259(5094):514-516.
- Carmine-Simmen, K., T. Proctor, J. Tschäpe, B. Poeck, T. Triphan, R. Strauss, D. Kretschmar. 2009. Neurotoxic Effects induced by the Drosophila Amyloid- β Peptide Suggest a Conserved Toxic Function. *Neurobiol. Dis.* 33(2):274-281.
- Chomczynski, P. 1993. A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques.* 15(3):532-537.
- Chung, J. S., D. C. Wilcockson, N. Zmora, Y. Zohar, H. Dircksen, S. G. Webster. 2006. Identification and Developmental Expression of MRNAs Encoding Crustacean Cardioactive Peptide (CCAP) in Decapod Crustaceans. *J. Exp. Biol.* 219(19):3862-3872.
- Dall, W., J. Hill, P. Rothlisberg, D. Staples. 1990. The Biology of Penaeidae. *Adv. Mar. Biol.* 27(C):127-157.
- Drewes, C. 2004. New Lights on Phototaxis and Phototropism. *Proceedings of the 25th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education* 25:398–405.

- Fang, L. S., B. N. Lee. 1992. Ontogenic Change of Digestive Enzymes in *Penaeus Monodon*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 103(4):1033-1037.
- FAO. 2009. World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. Roma. Italia. 295p.
- Faust, P. L., S. Kornfeld, J. M. Chirgwin. 1985. Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Human Cathepsin D. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82(15):4910-4914.
- Figueiredo, M., A. J. Anderson. 2003. Ontogenetic Changes in Digestive Proteases and Carbohydrases from the Australian Freshwater Crayfish, Redclaw *Cherax Quadricarinatus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Aquac. Res.* 34(13):1235-1239.
- Fischer, E. 1894. Einfluss Der Configuration Auf Die Wirkung Der Enzyme. II. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 27(3):3479-3483.
- Fusek, M., M. Mares, V. Vetvicka. 2014. Cathepsin D. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Tercera edición. Rawlings, N. D., G. Salvesen. Elsevier. Londres. 54–63p.
- Galgani, F. G., Y. Benyamin, A. Van Wormhoudt. 1985. Purification, Properties and Immunoassay of Trypsin from the Shrimp *Penaeus Japonicus*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 81(2):447-452.
- García, S. C. 2012. “Gen Ajeno o Exógeno: Transgén.” *Universidad de Salamanca* 4:187–99.
- Gianni, S., J. Dogan, Pe. Jemth. 2014. Distinguishing Induced Fit from Conformational Selection. *Biophys. Chem.* 189:33-39.
- Gui, Z., S. Kwang, Y. Bo, S. Yong, D. Ya, Y. M. Young, D. K. Pil, J. Hyung, I. Kim, H. Yeon, J. Sook, M. Sang, X. Guo, D. Hung, R. Byung. 2006. Functional Role of Aspartic Proteinase Cathepsin D in Insect Metamorphosis. *B.M.C. Dev. Biol.* 6(1):49.

- Han-Ching W., C. W. Tseng, H. Y. Lin, I. Chen, Y. Chen, Y. Chen, T. Chen, H. L. Yang. 2010. RNAi Knock-down of the *Litopenaeus Vannamei* Toll Gene (LvToll) Significantly Increases Mortality and Reduces Bacterial Clearance after Challenge with *Vibrio Harveyi*. *Dev. Comp. Immunol.* 34(1):49-58.
- He X., F. Li, W. P. Chang, J. Tang. 2005. GGA Proteins Mediate the Recycling Pathway of Memapsin 2 (BACE). *J. Biol. Chem.* 280(12):11696-11703.
- Hernández-Cortes, P., C. Rivera-Pérez, F. García-Carreño, D. Martínez-Alarcón. 2017. Proteinases during Early Development of the Pacific Whiteleg Shrimp *Penaeus Vannamei*. *Biol. Bull.* 232(1):2-11.
- Hernández-Cortés, P., J. R. Whitaker, F. L. García-Carreño. 1997. Purification And Characterization Of Chymotrypsin From *Penaeus Vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Food. Biochem.* 21(1):497-514.
- Hoeg, J., W. Martin, J. Olesen, T. Jens. 2015. Atlas of Crustacean Larvae. Jhon JHopkins University Press. Baltimore. U.S.A. 370p.
- Holthuis, L., I. P. Farfante, B. Kensley, I Farfante. 1998. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *J. Crustacean. Biol.* 18(3):621.
- Hui, J., S. Tobe, S. Chan. 2008. Characterization of the Putative Farnesoic Acid O-Methyltransferase (LvFAMeT) cDNA from White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*: Evidence for Its Role in Molting. *Peptides.* 29(2):252-260.
- Johnston, D. J. 2003. Ontogenetic Changes in Digestive Enzyme Activity of the Spiny Lobster, *Jasus Edwardsii* (Decapoda; Palinuridae). *Mar. Biol.* 143(6):1071-1082.
- Koshland, D. 1995. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 33(2324):2375-2378.

- Laubier-Bonichon, A., A. Van Wormhoudt, D. Sellos. 1977. Croissance Larvaire Controlée de *Penaeus Japonicus* Bate Enzymes Digestives et Changements de Régimes Alimentaires. no.Enero:1–13.
- Lemos, D., M. P. Hernández-Cortés, A. Navarrete, F. L. Garcia-Carreño, V. N. Phan. 1999. Ontogenetic Variation in Digestive Proteinase Activity of Larvae and Postlarvae of the Pink Shrimp *Farfantepenaeus Paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Mar. Biol. 135(4): 653–62.
- Li, Ha., B. Yin, S. Wang, Q. Fu, B. Xiao, K. Lü, J. He, C. Li. 2018. RNAi Screening Identifies a New Toll from Shrimp *Litopenaeus Vannamei* That Restricts WSSV Infection through Activating Dorsal to Induce Antimicrobial Peptides. Plos. Pathog. 14(9):1-34.
- Livak K., Schmittgen, T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. Methods 25(4):402–8.
- López, T., D.Silva, S. López, C. Arias. 2007. RNA de Interferencia: El Silencio de Los Genes. UNAM. 110-118p
- Lovett, D., D. Felder. 1990a. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus Setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Biol. Bull. 178(2):144-159.
- Lovett, D., D. Felder. 1990b. Ontogenetic Changes in Enzyme Distribution and Midgut Function in Developmental Stages of *Penaeus Setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Biol. Bull. 178(2):144-159.
- Martínez-Alarcón, D., R. Saborowski, L. Rojo-Arreola, F. García-Carreño. 2018. Is Digestive Cathepsin D the Rule in Decapod Crustaceans? Comp. Biochem. Phys. B. 215:31-38.

- Masuo O., S. Cole, M. Yasvoina, J. Zhab, M. Citron, R. Berrb, J. Disterhofta, R. Vassarb. 2007. BACE1 Gene Deletion Prevents Neuron Loss and Memory Deficits in 5XFAD APP/PS1 Transgenic Mic. *Neurobiol. Dis.* 26(8):134–45.
- Meister, G., T. Tuschl. 2004. Mechanisms of Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Nature.* 431(7006):343-349.
- Metcalf, P., M. Fusek. 1993. Two Crystal Structures for Cathepsin D: The Lysosomal Targeting Signal and Active Site. *Embo. J.*14(4):1293-1302.
- Miller, S., S. J. Brown, Y. Tomoyasu. 2008. Larval RNAi in *Drosophila*?. *Dev. Genes. Evol.* 218(9):505-510.
- Morcelle, S., M. Gomes, S. Cavalli. 2015. Caracterización Bioquímica y Estructural de Proteasas. *Biologia.*163–76.
- Muhammad, F., F. Zhang, M. Shao, Y. Dong, S. Muhammad. 2012. Ontogenesis of Digestive System in *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea: Decapoda). *Ital. J. Zool.* 79(1):77–85.
- Nelson, D. L., Claudi, M. Cuchillo, A. Lehninger, M. Cox. 2005. *Lehninger: Principios de Bioquímica.* 4ª edición. Omega. Barcelona. 1264p.
- Padilha, M., A. Pimentel, A. Ribeiro, W. Terra. 2009. Sequence and Function of Lysosomal and Digestive Cathepsin D-like Proteinases of *Musca Domestica* Midgut. *Insect. Biochem. Molec.* 79(1):77-85.
- Poulin, ÉI, S. Boletzky, J. Féral. 2001. Combined Ecological Factors Permit Classification of Developmental Patterns in Benthic Marine Invertebrates: A Discussion Note. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257(1):109–15.
- Romero-Hernández, R.. 2017. Variaciones En La Actividad Proteolítica Específica En La Ontogenia Del Camarón *Litopenaeus Vannamei*. Tesis (Licenciatura en Biólogo Marino). Baja California Sur, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 62p.

- Rabiner, L., B. Juang. 1986. An Introduction to Hidden Markov Models. IEEE ASSP Magazine. 3(1):4-16.
- Rawlings, N., G. Salvesen. 2013. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd edición. Academic Press. Londres. Inglaterra. 984p.
- Rodriguez, A., L. Le Vay, G. Mourente, D. A. Jones. 1994. Biochemical Composition and Digestive Enzyme Activity in Larvae and Postlarvae of *Penaeus Japonicus* during Herbivorous and Carnivorous Feeding. Mar.Biol. 118(1):45-51.
- Rojo, L., A. Muhlia-Almazan, R. Saborowski, F. García-Carreño. 2010. Aspartic Cathepsin D Endopeptidase Contributes to Extracellular Digestion in Clawed Lobsters *Homarus Americanus* and *Homarus Gammarus*. Mar. Biotechnol. 12(6):696–707.
- Rojo, L., R. Sotelo-Mundo, F. García-Carreño, L. Gráf. 2010. Isolation, Biochemical Characterization, and Molecular Modeling of American Lobster Digestive Cathepsin D1. Comp. Biochem. Phys. B. 157(4):394-400.
- Rueda Zarzosa, E. M. 2003. Ciclo Circadiano de Proteasas Digestivas de *Litopenaeus Vannamei* de Estanque de Cultivo Comercial. Tesis (Ingeniería en Pesquería). Baja California Sur, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 72p.
- Saborowski, R., S. Thatje, J. A. Calcagno, G. A. Lovrich, K. Anger. 2006. Digestive Enzymes in the Ontogenetic Stages of the Southern King Crab, *Lithodes Santolla*. Mar. Biol. 149(4):865-873.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones, A. J. Enright. 2007. Genomic Analysis of Human MicroRNA Transcripts. P. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104(45):17719-17724.
- Shabalina, S. A., E. V. Koonin. 2008. Origins and Evolution of Eukaryotic RNA Interference. Trends. Ecol. Evol. 23(10):578-587.

- Sojka, D., D. Hartmann, P. Bartošová-Sojková, Ja. Dvořák. 2016. Parasite Cathepsin D-Like Peptidases and Their Relevance as Therapeutic Targets. *Trends. Parasitol.* 32(9):708-723.
- Tang, J., G. Koelsch. 2013. Cathepsin D. En *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Tercera edición. Rawlings, N. D., G. Salvesen. Elsevier. Londres. 87–93p.
- Tang, J., R. Wong. 1987. Evolution in the Structure and Function of Aspartic Proteases. *J. Cell. Biochem.* 33(1):53-63.
- Teh, S., T.Tan, C. Lai, K. Lee. 2018. Catalysis. *Top. Appl. Phys.* 107-125.
- Terwilliger, N., K. Dumler. 2001. Ontogeny of Decapod Crustacean Hemocyanin: Effects of Temperature and Nutrition. *J. Exp. Biol.* 204(5):1013-1020.
- Teschke, M., R. Saborowski. 2005. Cysteine Proteinases Substitute for Serine Proteinases in the Midgut Glands of *Crangon Crangon* and *Crangon Allmani* (Decapoda: Caridea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 316(2):213-229.
- Thiel, M., G. A. Wellborn. 2018. *The Natural History of the Crustacea. Volume 5: Life Histories.* (Eds) Oxford: Oxford University Press. Segunda edición. Inglaterra. Reino Unido. 438p.
- Treece, G. D., M. E. Yates. 1993. *Manual Del Laboratorio Para El Cultivo de Larvas de Camarón Peneido.* Texas A&M University. U.S.A. 83p.
- Tukey, J. W. 1949. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics.* 5(2):99.
- Vay, L. L, D. A. Jones, A. C. Puello-Cruz, R. S. Sangha, C. Ngamphongsai. 2001. Digestion in Relation to Feeding Strategies Exhibited by Crustacean Larvae. *Comp. Biochem. Phys. A.* 128(3):621-628.
- Vijayan, K., K. Sunilkumar Mohamed, D. Diwan. 1997. Studies on Moulst Staging, Moulting Duration and Moulting Behaviour in Indian White Shrimp *Penaeus*

- Indicus* Milne Edwards (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Aquaculture in Tropics*. 12(1):53-64.
- Vogt, A. D., E. Di Cera. 2012. Conformational Selection or Induced Fit? A Critical Appraisal of the Kinetic Mechanism. *Biochemistry*. 51(30):5894-5902.
- Webber, W., G. Fenwick, J. Bradford-Grieve, S. Eagar, J. Buckeridge, G. Poore, E. Dawson, L. Watling, J. Jones, J. Wells, N. Bruce, S. Ahyong, K. Larsen, M. Chapman, J. Olesen, J. Ho, J. Green, J. Shiel, C. Rocha, L. Lorz, G. Bird, W. Charleston. 2010. Phylum Arthropoda, Subphylum Crustacea - Shrimps, Crabs, Lobsters, Barnacles, Slaters, and Kin. En *New Zealand Inventory of Biodiversity: Volume Two: Kingdom Animalia - Chaetognatha, Ecdysozoa, Ichnofossils*. Canterbury universidad de Press. Editado por D. Gordon. :98–232.
- Wei, J., X. Zhang, Y. Yu, H. Huang, F. Li, J. Xiang. 2014. Comparative Transcriptomic Characterization of the Early Development in Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Plos. One*. 9(9).
- Williamson, A., P. J. Brindley, G. Abbenante, B.J. D. Datu, P. Prociv, C. Berry, K. Girdwood. 2003. Hookworm Aspartic Protease, Na -APR-2, Cleaves Human Hemoglobin and Serum Proteins in a Host-Specific Fashion. *J. Infect. Dis*. 187(3):484-494.
- Yankner, B. A. 1996. Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer 's disease. *Neuron*. 16(5):921–32.