



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**SERIN-PROTEINASAS Y SUS INHIBIDORES EN
LA RESPUESTA INMUNE DEL CAMARÓN
BLANCO (*Penaeus vannamei*)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Florinda Jiménez Vega

La Paz, B.C.S. Febrero de 2004.

Resumen

Los camarones son organismos capaces de combatir exitosamente a los patógenos. Aunque la especificidad de su sistema inmune parece estar limitada, son capaces de diferenciar lo propio y lo extraño, respondiendo a través de mecanismos celulares y humorales, los cuales pueden combinarse para constituir sistemas multiméricos, como el sistema de activación de la profenoloxidasa (proFO) y el sistema de coagulación. Ambos sistemas están constituidos por cascadas enzimáticas donde las proteinasas tienen un papel decisivo en la activación. Sin embargo, la actividad proteolítica debe ser mantenida dentro de parámetros fisiológicos para evitar daños tisulares. Por ello, las proteinasas y sus inhibidores, han sido considerados como parte importante en el control de la respuesta inmune.

Utilizando macroarreglos de un banco de cDNA de hemocitos de camarón, fue posible la identificación de clones codificantes para serin-proteinasas, inhibidores tipo Kazal y proteínas tipo WAP. Los insertos fueron secuenciados y se buscó establecer variaciones en su expresión en respuesta a la inoculación de *Vibrio alginolyticus*.

Además del dominio proteolítico, las serin-proteinasas de hemocitos de crustáceos, característicamente, contienen un dominio llamado clip. Se encontró un clon codificante para una serin-proteinasas que contiene un dominio clip incompleto, el cual es similar a otros reportados en insectos. Del mismo modo, se caracterizó el inserto de un clon conteniendo la región codificante parcial para otra serin-proteinasas, la cual tiene Gly en lugar de Ser en su sitio catalítico. Este tipo de serin-proteinasas homólogas han sido reportadas en artrópodos.

Los inhibidores de proteinasas del tipo Kazal han sido descritos como proteínas de bajo peso molecular caracterizados por un dominio de 6 cisteínas. Las proteínas pueden contener varios dominios, aunque no todos con actividad inhibitoria. Un clon codificante para una proteína conteniendo 4 dominios Kazal fue aislado del banco de genes de hemocitos de camarón. Por su secuencia de aminoácidos deducida se pudo predecir que el tercer dominio inhibe subtilisina y el cuarto tripsina, sin embargo los dos primeros parecen no tener actividad.

Otros inhibidores de proteinasas poseen un dominio WAP (Whey acidic protein) y algún otro dominio (por ejemplo, Kunitz, trapping, cem). Del banco de genes de hemocitos de camarón, se aisló un clon codificante para una proteína conteniendo un dominio WAP. Sin embargo, esta proteína está constituida únicamente por un dominio WAP, siendo el primer caso en invertebrados. Así mismo, se encontró otro clon codificante para una proteína que contiene dos dominios WAP.

Diferencias en los niveles de expresión de los genes codificantes para las proteinasas y sus inhibidores por la inoculación de *Vibrio alginolyticus*, fue confirmada por RT-PCR. El inhibidor de tipo Kazal y la proteína conteniendo dos dominios WAP aumenta sus niveles 0.1 veces a las 6 h, disminuyendo 50% a las 12 y 24 h. Por otro lado, la proteína conteniendo un dominio WAP y la serin-proteinasa homóloga aumenta sus niveles en 2 y 3 veces a las 6 h, mientras que la expresión de la pseudo-clip serin-proteinasa no fue modificada.

Aunque no se confirmó la actividad bioquímica, los resultados apoyan la idea que las serin-proteinasas y sus inhibidores se encuentran involucrados en la respuesta inmune del camarón.

Palabras claves: Serin proteinasa, Inhibidor de proteinasas, Proteínas WAP.

Dr. Francisco Vargas-Albores

Abstract

The shrimps are able to destroy successful pathogen. Although the specificity of the immune system appears be limited, they can distinguish self and non-self material and to establish a response through cellular and humoral mechanisms, which can constitutes multimeric systems, as those responsible to prophenoloxidase (proFO) activation and coagulation. Both systems are constituted by enzymatic cascades were the proteinases plays an important role in their activation. However, the proteolytic activity has to be kept into physiological levels in order to avoid tissue damage. By this, proteinase and their inhibitors have been considered as important component on the immune response regulation.

Using macroarrays, from a cDNA library of shrimp hemocytes, several clones encoding for serine-proteinase, Kazal inhibitors and WAP-containing protein were identified. The insert was sequenced and changes in expression as response to *Vibrio alginolyticus* inoculation were investigated.

Beside the proteolytic domain, the serine-proteinase from crustacean hemocytes characteristically contains an additional domain, called clip. A clone contained an insert encoding to a serine proteinase was found. However, this protein contains an incomplete clip domain, similar to other reported in insects. A clone encoding for other serine proteinase was also isolated. Such deduced protein has Gly instead Ser in the active site. This kind of serine proteinase homologs has been also reported in arthropods.

Kazal proteinase inhibitors have been described as low molecular weight proteins containing one or more typical domains characterized by a 6-cysteins core. Although multiple domains can be present, not necessarily all have inhibitory activity. A clone encoding for a 4-Kazal domains protein was isolated and full sequenced. According the deduced amino acid sequence, the third and fourth domains seem to have inhibitory activity toward subtilisin and trypsin, respectively. Meanwhile for the other domains inhibitory activity was not predicted.

Other proteinase inhibitors are formed by one or two WAP (Whey acidic protein) domain or by one WAP and anyone domain, p. example, Kunitz, trapping or cem. A clone encoding for a WAP domain containing protein was isolated and sequenced. The deduced sequence showed that this

protein is constituted only by a WAP domain and it is the first case of a single WAP containing-protein (SWP) in invertebrates. By the same way, other clone encoding for a 2-WAP domains containing protein was isolated.

Changes in the expression levels of genes encoding for proteinases and its inhibitors in response to *Vibrio alginolyticus* inoculation was confirmed by RT-PCR. mRNA encoding for Kazal and 2-WAP domain containing protein have a modest increment in their expression levels at 6 h, but they decrease up to 50% at 12 and 24 h. On the other hand, the SWD protein and the serine-proteinase homologs transcript levels were increased 2-3 times at 6 h, while the pseudoclip serine proteinase messenger was not modified.

Although biochemical activity was not confirmed, the results support the idea that serine proteinases and its inhibitors are involved in the shrimp immune response.

Keywords: Serine-proteinase, proteinase inhibitor, WAP proteins

Dedicatoria

A mis padres por inculcarme los hábitos al trabajo arduo y honesto, herramientas esenciales para mantener la frente en alto y alcanzar cualquier meta trazada.

Gracias

A mis hermanos y familia por estar siempre ahí.

A la libertad, por permitirme volar más lejos.

Agradecimientos

Al CIBNOR por la formación académica recibida durante tantos años, con especial gratitud al Programa de Posgrado.

Al CONACyT por los apoyos económicos recibidos durante esta etapa estudiantil (beca 118082) y al proyecto de investigación 41564-Z “Identificación de proteínas expresadas en las diferentes poblaciones de hemocitos del camarón blanco (*Penaeus vannamei*)”.

Al CIAD por albergarme, adoptándome como un estudiante más y permitir la realización de la fase experimental del presente trabajo de tesis. Muy especialmente a la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal y al Laboratorio de Biotecnología Marina que fue mi primera casa por tanto tiempo.

Al Departamento de Fisiología Comparada de la Universidad de Uppsala por permitirme conocer las fronteras de la ciencia y por toda la ayuda brindada.

A los miembros de los comités participantes en esta tesis, por contribuir con sus enseñanzas cristalizando la culminación de este proyecto, gracias

por su tiempo y paciencia. En especial a mi director de tesis por 11 años de formación y deformación en este maravilloso mundo científico que ha dejado una gran huella.

A todas aquellas personas y en especial a mis amigos, que tuvieron palabras de aliento en momentos claves, por su confianza de que esto llegaría a su fin.

GRACIAS

Prefacio

La presente tesis integra los siguientes artículos

Jiménez-Vega, F., Vargas-Albores, F., and Söderhäll, K. (2004)
Characterization of a Serine Proteinase from *Penaeus vannamei*
Hemocytes. Fish and Shellfish Immunology. En prensa

Jiménez Vega, F., Yepiz-Plascencia, G., Söderhäll, K. and Vargas-
Albores, F. (2004) A single WAP domain-containing protein from
Litopenaeus vannamei hemocytes. Biochemical and Biophysical
Research Communications 314: 681-687.

Conformación de comités

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Francisco Vargas-Albores Profesor adjunto CIBNOR

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Ricardo Vázquez-Juárez CIBNOR
Dra. Gloria Yepiz-Plascencia CIAD
Dr. Rogerio Sotelo-Mundo CIAD
Dr. Kenneth Söderhäll Uppsala University-Suecia

El comité revisor estuvo integrado por:

Dr. Francisco Vargas-Albores Profesor adjunto CIBNOR
Dr. Ricardo Vázquez-Juárez CIBNOR
Dr. Fernando García-Carreño CIBNOR
Dra. Gloria Yepiz-Plascencia CIAD
Dr. Rogerio Sotelo-Mundo CIAD

Miembros del Jurado de defensa de tesis:

Dr. Francisco Vargas-Albores Profesor adjunto CIBNOR
Dr. Ricardo Vázquez-Juárez CIBNOR
Dr. Fernando García-Carreño CIBNOR
Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra CIBNOR
Dra. Patricia Hernández-Cortés CIBNOR
Dr. Felipe Ascencio-Valle (Suplente) CIBNOR

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
FACTORES CELULARES	2
FACTORES HUMORALES	3
Moléculas de reconocimiento y unión celular	4
SISTEMA DE COAGULACIÓN	7
SISTEMA PROFENOLOXIDASA	8
SERIN-PROTEINASAS	10
INHIBIDORES DE PROTEINASAS	13
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
REACTIVOS Y MATERIALES	26
INÓCULO	26
BIOENSAYO	27
OBTENCIÓN DE LOS HEMOCITOS	27
OBTENCIÓN DEL MRNA	28
CONSTRUCCIÓN DEL BANCO DE GENES	28
Excisión masiva	29
Aislamiento de los clones	30
Análisis de los clones	30
Análisis del producto de PCR	31
MACROARREGLOS	32
Preparación de la sonda	32
Cuantificación de la sonda	33
Inmovilización de DNA	34
Hibridización	34
Detección de la hibridización	35
NORTHERN BLOT	36
DNA marcado radiactivamente	36
Extracción de RNA total	37
Integridad del RNA	38
Inmovilización y detección del mensaje	38
ANÁLISIS DE LOS CLONES	39
Extracción de DNA plasmídico	39
Cuantificación del DNA	40
Determinación de la secuencia nucleotídica	41
Identificación de las secuencias	41
DISEÑO DE PRIMERS	42
TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR	43
Síntesis de cDNA	43
Amplificación por PCR	44
AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE LOS EXTREMOS 5' DE CDNA (RACE)	45
Clonación de los productos de PCR	46

RESULTADOS	47
BANCO DE GENES	47
SERIN-PROTEINASA HOMÓLOGA (PvHm SPH-01).....	51
PSEUDO-CLIP SERIN PROTEINASA (PvHm PCSP-01).....	56
INHIBIDOR TIPO KAZAL	61
PROTEÍNA CONTENIENDO UN SOLO DOMINIO WAP (SWD)	65
PROTEÍNA CON DOMINIO WAP (WAP-P)	69
DISCUSIÓN	74
SERIN PROTEINASA HOMÓLOGA (PvHm SPH-01).....	78
PSEUDO-CLIP SERIN PROTEINASA (PCSP-1)	80
INHIBIDOR TIPO KAZAL	83
INHIBIDORES WAP	86
PROTEÍNA CONTENIENDO UN SOLO DOMINIO WAP (SWD)	89
PROTEÍNA TIPO WAP (WAP-P).....	91
DISCUSIÓN FINAL	93
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA.....	97

Anexos: Publicaciones

Lista de Figuras

FIGURA 1.	DISTRIBUCIÓN DE CLONES BASADOS EN LA EXPRESIÓN ANTE LA ESTIMULACIÓN CON <i>V. ALGINOLYTICUS</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE MACROARREGLOS	47
FIGURA 2.	DETECCIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS POR MACROARREGLOS	51
FIGURA 3.	ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL DOMINIO SP Y 3'-UTR DE PvHm SPH-01	52
FIGURA 4.	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DEL DOMINIO SP USANDO CLUSTAL-W	53
FIGURA 5.	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y DEDUCIDA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE UNA SERIN PROTEINASA HOMÓLOGA DE CAMARÓN BLANCO <i>P. VANNAMEI</i> SPH-01	55
FIGURA 6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA PvHm-SPH-01	56
FIGURA 7.	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y DEDUCIDA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UNA SERIN PROTEINASA DE <i>P. VANNAMEI</i> (PvHm-PcSP-01)	57
FIGURA 8.	ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL DOMINIO CLIP DE SERIN PROTEINASAS EN ARTRÓPODOS	58
FIGURA 9.	ALINEAMIENTO DE PSEUDOCLIP SERIN PROTEINASA DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i> PvHm PcSP-01 Y <i>P. MONODON</i> PMHm PCSP-01	59
FIGURA 10.	DETECCIÓN DEL mRNA DE LA PvHm PCSP-01 EN DIFERENTES TEJIDOS	60
FIGURA 11.	ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE COMPLETA DEL INHIBIDOR DE PROTEINASAS DE TIPO KAZAL DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	61
FIGURA 12.	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DEL INHIBIDOR DE PROTEINASAS DE TIPO KAZAL DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	62
FIGURA 13.	ALINEAMIENTO DE LOS DOMINIOS TIPO KAZAL DEL INHIBIDOR DE PROTEINASAS DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	63
FIGURA 14.	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE INHIBIDORES KAZAL	64
FIGURA 15.	ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA CONCENTRACIÓN DEL mRNA DEL INHIBIDOR DE PROTEINASAS DE TIPO KAZAL DE HEMOCITOS	65
FIGURA 16.	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y DEDUCIDA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UNA PROTEÍNA CONTENIENDO UN DOMINIO WAP DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i> (SWD)	66
FIGURA 17.	NORTHERN BLOT DE <i>P. VANNAMEI</i> SWD	67
FIGURA 18.	ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DEDUCIDAS DE AMINOÁCIDOS DE SWD DE <i>P. VANNAMEI</i> Y <i>P. MONODON</i>	68
FIGURA 19.	ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL DOMINIO WAP	68
FIGURA 20.	EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA SWD DE HEMOCITOS EN <i>P. VANNAMEI</i>	69
FIGURA 21.	ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS AMPLIFICACIONES OBTENIDAS POR RACE DE LA WAP-P DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	70
FIGURA 22.	ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE COMPLETA DE WAP-P DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	71
FIGURA 23.	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE WAP-P DE HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	71
FIGURA 24.	ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA CONTENIENDO DOS DOMINIOS WAP	72
FIGURA 25.	EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA WAP-P DE HEMOCITOS EN <i>P. VANNAMEI</i>	73

Lista de Tablas

TABLA I.	PRIMERS ESPECÍFICOS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR	44
TABLA II.	ETIQUETAS DE SECUENCIA EXPRESADAS IDENTIFICADAS POR MACROARREGLOS COMO CLONES ESTIMULADOS	49
TABLA III.	ETIQUETAS DE SECUENCIA EXPRESADAS IDENTIFICADAS POR MACROARREGLOS COMO CLONES APAGADOS	50

Introducción

Al igual que en otros países con clima tropical, en México, la camaronicultura se ha estimulado con la intención de atender la demanda no cubierta por la captura. Sin embargo, la introducción de organismos silvestres a las líneas de producción, así como las altas densidades de población prevalentes en los laboratorios y estanques de cultivo, han propiciado el establecimiento y la diseminación de enfermedades infecciosas. Aunque se han empleado antibióticos y desinfectantes como tratamientos, estos no han sido eficientes, debido a que elevan los costos de producción y tienen un impacto sobre el medio ambiente.

Desde hace algunos años se ha propuesto que la inmunoestimulación puede ser una vía adecuada para prevenir infecciones (Scholz *et al.*, 1999; López *et al.*, 2003), reduciendo así los riesgos y costos de producción. Sin embargo, para lograrlo se requiere profundizar en el conocimiento sobre el sistema inmune del camarón y principalmente en su regulación para poder proponer estrategias confiables de manipulación y estimulación.

Por otro lado, el suministro de camarones reproductores silvestres carece de condiciones que permitan asegurar la calidad y cantidad requeridas para la camaronicultura. Esto ha llevado a las empresas a producir sus

propios pies de cría, estimulando los programas de mejoramiento genético. Obviamente, los camarones son seleccionados sobre la base de su rápido crecimiento, altas tasas de conversión alimenticias y resistencia a enfermedades. Sin embargo, aún no se cuenta con marcadores genéticos de las proteínas involucradas en el sistema inmune del camarón y se desconocen los mecanismos de estimulación que permitan el seguimiento de camarones con mejores atributos genéticos relacionados con el sistema inmune. Para lograrlo, se requiere una descripción molecular de los componentes involucrados y su respuesta a la estimulación por agentes patógenos.

El camarón, al igual que otros invertebrados, posee factores celulares y factores humorales (Vargas-Albores, 1995b), los cuales constituyen un sistema de defensa eficiente. La respuesta celular es un conjunto de mecanismos de defensa donde se requiere la presencia de las células sanguíneas llamadas hemocitos que son los responsables de la fagocitosis, la encapsulación, la formación de nódulos y la citotoxicidad.

Factores celulares

La fagocitosis es el proceso más común de defensa por medio del cual ocurre el reconocimiento e ingestión de partículas extrañas (Ratner y Vinson, 1983); mientras que durante el encapsulamiento se atrapan los patógenos que invaden al organismo y no pueden ser eliminados por

fagocitosis, constituyendo un nódulo. La reacción citotóxica, por su parte, es la encargada de la destrucción de células extrañas por el contacto directo de los hemocitos (Battistella *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista morfológico, tres poblaciones celulares han sido descritas en camarón: células hialinas, células granulares y células semigranulares (Vargas-Albores, 1992a). En el camarón café *Penaeus californiensis*, se ha reportado que la mayoría de las células (80%) son granulares y semigranulares (gránulos grandes y pequeños), mientras que las células hialinas constituyen el 20%. Las células granulares presentan forma alargada (25 x 15 μm , promedio) con extensiones citoplasmáticas, bordes irregulares y gránulos fácilmente observados. Los gránulos pueden ser de 1 ó 0.5 μm . Las células hialinas toman la forma circular (20 μm de diámetro), con bordes regulares y no presentan gránulos (Vargas-Albores, 1995a). Similarmente en camarón japonés *Penaeus japonicus*, los hemocitos presentan la misma composición celular (Tsing *et al.*, 1989).

Factores humorales

Los factores humorales que participan en el sistema inmune de camarón, son proteínas de reconocimiento, efectoras como los péptidos antimicrobianos, y los sistemas multiméricos de la coagulación y el sistema de activación de la profenoloxidasas (proFO).

Moléculas de reconocimiento y unión celular

Son proteínas capaces de unirse al material extraño y desarrollar respuestas efectoras desencadenando adhesión, fagocitosis y encapsulamiento (Lackie, 1980). En este grupo se encuentran las aglutininas, las cuales son proteínas polivalentes que se unen a azúcares sin ser afectadas químicamente durante este proceso. Estas proteínas participan en los mecanismos de defensa como factores de reconocimiento, que pueden aglutinar bacterias y disparar la activación del sistema proFO (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998). Una aglutinina que se une a lipopolisacáridos bacterianos fue reportada en plasma de camarón café *P. californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1993b), esta proteína es capaz de aglutinar bacterias y aumentar la capacidad fagocítica de las células (Vargas-Albores, 1995a). Este tipo de actividad aglutinante también ha sido detectada en otros peneidos (Ratanapo y Chulavatnatol, 1990, 1992; Vargas-Albores *et al.*, 1992b; Bacheré *et al.*, 1995; Maheswari *et al.*, 1997; Cominetti *et al.*, 2002).

Otra proteína de reconocimiento ha sido caracterizada en camarón café *P. californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1996) y en camarón blanco *P. vannamei* (Vargas-Albores *et al.*, 1997) como una proteína plasmática de aproximadamente 100 kDa, esta misma proteína en *P. vannamei* se ha caracterizado a nivel del cDNA describiendo que el mensaje es expresado

en hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias, pero no en hemocitos (Romo-Figueroa *et al.*, 2004), adicionalmente aumento de 13 veces en los niveles de mRNA por inoculación con partículas de Sephadex DEAE fueron observados (Morales, 2003). En *Pacifastacus leniusculus* se ha demostrado que esta proteína reacciona con β -1,3 glucanos formando un complejo, el cual se une a un receptor localizado en la membrana de hemocitos, desencadenando degranulación y activación del sistema proFO. En *Penaeus monodon*, otra proteína de 39.5 kDa, que une también β -1,3 glucanos fue caracterizada demostrando que la molécula es constitutivamente expresada en hemocitos (Sritunyalucksana *et al.*, 2002).

Dentro de los factores humorales, se han descrito péptidos antibacterianos. En camarón blanco *P. vannamei*, una familia de péptidos, llamados peneidinas han sido (Destoumieux *et al.*, 2000). Estos péptidos son sintetizados en hemocitos y almacenados en gránulos citoplasmáticos desde donde son liberados durante la respuesta inmune. La expresión y localización de peneidina fueron analizadas por estimulación con bacterias, observando una disminución en los niveles de mRNA durante las primeras 3 h de estimulación y un aumento en la concentración de peneidina en plasma después de la estimulación (Destoumieux *et al.*, 2000). Recientemente otro grupo de proteínas antibacteriales de 11.5 kDa denominadas crustins han sido descritas en dos especies de peneidos, *P. vannamei* y

Penaeus setiferus. Otra proteína antibacterial, lisozima, involucrada en el sistema de defensa con actividad lítica, fue clonada a partir de cDNA de hemocitos de camarón blanco usando como base información de una etiqueta de secuencia expresada (EST), su actividad fue demostrada partiendo de un lisado de hemocitos de camarón blanco *P. vannamei* (Sotelo-Mundo *et al.*, 2003).

Los factores hemolíticos, cuya actividad ha sido demostrada experimentalmente por lisar eritrocitos, parecen tener un papel de respuesta inmune destructivo ante la presencia de partículas extrañas además de presentar propiedades antibacteriales. En camarón café *P. californiensis*, fue descrita una proteína de 23.5 kDa con actividad hemolítica la cual puede ser inhibida por fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), sugiriendo que se trata de una serin-proteinasa (Guzmán-Murillo *et al.*, 1993).

Por otra parte, la peroxinectina es una molécula de adhesión celular con actividad de peroxidasa y capaz de funcionar como opsonina (Johansson, 1999). El clon de cDNA, codificante para esta proteína fue aislado de un banco de genes de hemocitos de camarón tigre *P. monodon* y consta de 2337 nucleótidos, que codifican para una proteína madura de 84.4 kDa. La peroxinectina tiene dos regiones características de unión de las integrinas RGD (Arg-Gly-Asp) y KGD (Lys-Gly-Asp), y se ha demostrado

que sus niveles de mRNA disminuyen ante la presencia de β -1,3 glucanos (Sritunyalucksana *et al.*, 2001).

Los inhibidores de proteinasas también parecen ser componentes del sistema inmune de crustáceos (Kanost, 1999). La α_2 -macroglobulina del camarón blanco es una proteína de 400 kDa capaz de inhibir proteinasas de diferentes tipos incluyendo, tripsina, leucina, aminopeptidasa, quimo-tripsina, elastasa y papaína (Gollas-Galván *et al.*, 2003).

Sistema de coagulación

Los sistemas involucrados en la inmunidad de camarón, comprenden cascadas de reacciones que integran, reconocimiento, efectores y regulación. Por ejemplo, el proceso de coagulación evita la pérdida de hemolinfa a través de una herida previniendo la introducción y diseminación de microorganismos (Durliat, 1985). En artrópodos, se han descrito tres tipos de coagulación: tipo A, caracterizado por agregación celular rápida; tipo B, en el cual ocurre una agregación celular acompañada de una coagulación limitada y tipo C, en donde ocurre lisis celular necesaria para la coagulación del plasma (Tait, 1911). Este último es el que ocurre en los camarones (Montaño-Pérez *et al.*, 1999).

Característicamente este tipo de coagulación es mediada por “una proteína plasmática llamada coaguladora” (CP: Clotting Protein) y una transglutaminasa (TGasa) presente en el interior de los hemocitos hialinos. La TGasa cataliza la formación de enlaces cruzados entre los residuos de glutamina y lisina de diferentes cadenas de CP, induciendo la polimerización y con ello la formación del coágulo (Tait, 1911; Lorand y Conrad, 1984). La CP ha sido purificada y caracterizada en camarón blanco *P. vannamei* (Montaño-Pérez *et al.*, 1999), camarón tigre *P. monodon* (Yeh *et al.*, 1998) y camarón japonés *P. japonicus* (Chen *et al.*, 1993). En todos los casos, se describe una proteína de 400 kDa formada por dos subunidades unidas por puentes disulfuro y solo requiere a TGasa para coagular (Martin *et al.*, 1991; Montaño-Pérez *et al.*, 1999). Por otro lado la CP también presenta actividad de proteínasa de tipo cisteína al ser desnaturalizada o después de formar el coágulo (Reyes-Izquierdo y Vargas-Albores, 2001).

Sistema Profenoloxidasa

El sistema proFO, uno de los componentes más importante de los procesos de inmunidad, es el responsable del reconocimiento y estimulación de actividades celulares. El sistema proFO es estimulado por componentes de la pared celular de microorganismos, finalizando con una actividad fungistática y bactericida, dada por la síntesis de melanina o bien respuestas de tipo celulares como fagocitosis, encapsulamiento y formación de nódulos

(Vargas-Albores, 1995a). El componente final es la fenoloxidasa (FO), la cual oxida fenoles a quinonas. Estos últimos continúan su oxidación por vía no enzimática, hasta la formación de melanina. La melanina constituye una importante barrera de defensa al depositarse alrededor de objetos encapsulados, en nódulos de hemocitos y en los sitios de infección cuticular causada por hongos (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998). Durante la síntesis de melanina también se producen radicales libres hidroxilo y anión superóxido, que además de ser oxidantes tienen capacidad antimicrobiana (Vargas-Albores *et al.*, 1998; Hernández-López *et al.*, 2000). En *P. vannamei* la proFO es almacenada en el interior de los gránulos de los hemocitos (Gollas-Galván *et al.*, 1999) como una proteína monómerica de peso molecular de 114 kDa. Sin embargo en el camarón tigre *P. monodon*, esta proteína tiene un peso molecular de 78 kDa conteniendo seis sitios de unión a cobre (Sritunyalucksana *et al.*, 1999).

La activación del sistema proFO puede iniciarse por lipopolisacáridos (LPS) o β -1,3 glucanos presentes en la pared celular de hongos y microalgas, los cuales se unen a proteínas de reconocimiento desencadenando la liberación del contenido granular, donde la proFO es convertida a FO mediante una serin-proteinasa, llamada enzima activadora de la profenoloxidasa (EaproFO) y que es dependiente de calcio (Hernández-López *et al.*, 1996; Gollas-Galván *et al.*, 1997, 1999; Hernández-López *et al.*, 2000).

En los dos sistemas descritos, coagulación y proFO, el papel de las proteínas en la activación de dichas cascadas es decisivo. Sin embargo, la actividad proteolítica tienen que ser controladas para evitar daños tisulares, por lo que los inhibidores de proteínas se han considerado como reguladores o puntos de control de la respuesta inmune (Söderhäll y Cerenius, 1998; Krem y Cera, 2002).

Serin-proteinasas

Las serin-proteinasas, llamadas así por contener un residuo de serina en el sitio catalítico, constituyen la familia más ampliamente distribuida y de mayor importancia en procesos biológicos. Las serin-proteinasas de los hemocitos de artrópodos, se caracterizan por contener dos regiones conservadas: el dominio catalítico serin-proteinasa (SP) conteniendo la tríada His, Asp, Ser, localizado en el extremo carboxilo y un dominio clip en la región amino terminal (Jiang y Kanost, 2000).

Se han descrito dos familias de proteínas de tipo serina, llamadas I y II, la tríada catalítica esta conformada por los mismos aminoácidos (His, Asp, Ser) pero en diferente posición (Jiang y Kanost, 2000). La subtilisina, único representante de la familia II, (Siezen y Leunissen, 1997) , tiene una estructura tridimensional diferente, sin embargo tiene un mecanismo catalítico idéntico al resto de las serin-proteinasas (Dodson y Wlodawer, 1998).

La Familia I de serin-proteinasas, se subdividen en dos grupos llamados 1 y 2. La mayor diferencia radica en que los miembros del grupo 2 tienen una pequeña inserción entre la His y el Asp. Esta inserción incluye dos Cys, las cuales pueden formar un enlace disulfuro y estructuralmente conformar un lazo. Otra diferencia entre los dos grupos de serin-proteinasas de la Familia I, es el sitio de corte requerido para la activación del zimógeno, mientras que en las enzimas del grupo 1 la activación se produce después de Leu o Ile, en las enzimas del grupo 2, se lleva a cabo por Arg o Lys (Jiang y Kanost, 2000). Esta diferencia significa que, aunque similares fisiológicamente, estos zimógenos son activados por proteinasas con diferente especificidad. La EaproFO de insectos es un buen ejemplo del grupo 2 de las serin-proteinasas de la Familia I (Jiang y Kanost, 2000).

Por otro lado, los dominios clip de las serin-proteinasas, contienen seis Cys estrictamente conservadas. Estos dominios se han clasificado en dos grupos: El grupo 1 contiene 8-16 residuos aminoacídicos entre la Cys3 y la Cys4, mientras que los integrantes del grupo 2 característicamente tienen una secuencia más larga (22-26 residuos) en esta región (Jiang y Kanost, 2000). Un ejemplo del dominio clip tipo 1, se encuentra en la proenzima coagulante y el factor B de la cacerola de mar *Limulus sp* (Muta *et al.*, 1990), así como en proteinasas expresadas en el cuerpo graso del gusano del tabaco *Manduca sexta* (Jiang *et al.*, 1999). Ejemplos del tipo 2,

se encuentran en la EaproFO descrita en el gusano de seda *Bombyx mori*, gusano del tabaco y el escarabajo *Halotrichia diomphalia* (Lee *et al.*, 1998; Krem y Cera, 2002). La función del dominio clip no ha sido totalmente descrita y puede ser múltiple. Los dominios clip pueden interactuar con proteínas de reconocimiento favoreciendo la inmovilización de las proteinasas cerca de la fuente de infección. En otro caso, por ejemplo, en la catepsina L y las convertasas, el dominio clip aparentemente actúa como un inhibidor de la misma proteínasa donde está unido (Carmona *et al.*, 1996; Boudreault *et al.*, 1998). Además, el arreglo tridimensional del dominio clip es similar al de las defensinas, por lo que se ha sugerido su papel antibacteriano. El dominio clip de la enzima activadora de la profenoloxidasa de *P. leniusculus* fue sobre-expresado en *Escherichia coli* y mostró actividad antibacteriana contra *Micrococcus luteus* y *Bacillus megaterium*. Sin embargo, aún es incierto si esta capacidad se mantiene en la molécula completa (Wang *et al.*, 2001).

En *Manduca sexta*, se han aislado dos serin-proteinasas de hemocitos involucradas en el sistema de defensa (Ramesh *et al.*, 1988). En el mosquito *Anopheles gambiae*, después de inoculación con LPS, se detectó la inducción de 17 genes de serin-proteinasas, algunos de los cuales codifican para proteínas que participan en la activación del sistema proFO, en la coagulación y en procesos de adhesión (Gorman y Paskewitz, 2001). En

este mismo mosquito se han descrito cuatro serin-proteinasas; tres de ellas son similares en secuencia a EaproFO e interesantemente, su dominio catalítico contiene dos cisteínas extras (Dimopoulos, 2000; Gorman y Paskewitz, 2001). Adicionalmente, en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* se han aislados serin-proteinasas que participan en la transducción de señales que activan citocinas y moléculas de respuesta antifúngica (Khursh y Lemaitre, 2000). En larvas del gusano *Hyphantria cunea*, 3 horas después a la inyección de *E. coli*, se identificó la inducción de una serpina (Woon *et al.*, 1998). En el erizo de mar, *Sea urchin*, los animales estimulados con LPS, expresaron diferencialmente genes homólogos a serin-proteinasas como trombina, elastasa y plasmina, así como inhibidores de tipo Kazal (Smith *et al.*, 1996).

Inhibidores de proteinasas

La participación de las proteinasas en el sistema de inmunidad innata de los invertebrados es evidente. Sin embargo, esto ha llevado a plantear la existencia de inhibidores de esta actividad para evitar daño tisular en el hospedero. En general, los inhibidores de proteinasas actúan como pseudosustratos interactuando con el sitio activo de la proteinasa. Dentro de los inhibidores de serin-proteinasas de artrópodos, se han descrito familias como: serpinas, α_2 -macroglobulinas (α_2 M), inhibidores tipo Kazal, tipo Kunitz y pacifastina.

Los inhibidores tipo serpina (del inglés serpins: Serine-Proteinase Inhibitors), actúan irreversiblemente y se caracterizan por tener un sitio expuesto cerca del extremo carboxilo, el cual actúa como anzuelo donde se une la serin-proteinasa formando un complejo estable (Kanost, 1999). Este tipo de inhibidores participa en el proceso de coagulación, activación de complemento y respuesta inflamatoria, que han sido ampliamente descritos en humanos (Kirchhoff *et al.*, 1991). La familia de las serpinas ha sido ampliamente estudiada en invertebrados y se han descrito como excelentes inhibidores de elastasa, quimotripsina y tripsina participando en la regulación de procesos inmunes (Kanost, 1999). En la cacerola de mar *Tachypleus tridentatus*, tres serpinas involucradas en la inhibición de los factores G y C del sistema de coagulación, han sido descritas (Iwanaga *et al.*, 1998). En *M. sexta*, las serpinas tienen identidad en secuencia de aminoácidos y estructura, a las serpinas de mamíferos; Sin embargo, su función biológica es la regulación del sistema proFO (Ramesh *et al.*, 1988).

Los inhibidores del tipo α_2 macroglobulina (α_2 M), se caracterizan por su alto peso molecular y por el mecanismo único que les permite inhibir todo tipo de proteinasas. La α_2 M tiene una región “anzuelo” (bait) susceptible a proteólisis y un dominio tioléster (Armstrong y Quigley, 1999). El corte en la región anzuelo por cualquier tipo de proteinasa, produce un cambio conformacional que atrapa físicamente a la proteinasa en su cavidad

molecular. También se forma un enlace covalente entre la región tioréster a través de ϵ -Lys y un γ -glu de la proteinasa, produciendo una inhibición irreversible, pero sin bloquear el sitio activo de la proteinasa (Sottrup-Jensen, 1989). Así, la proteinasa se encuentra impedida para hidrolizar proteínas, pero puede digerir sustratos pequeños que puedan difundir al interior de la cavidad molecular. La α_2 M ha sido descrita en camarón *P. vannamei* (Gollas-Galván *et al.*, 2003), en los langostinos *Astacus astacus* (Stöcker *et al.*, 1991), y *P. leniusculus* (Hall *et al.*, 1989; Hall y Söderhäll, 1994) y en cacerola de mar (Kopáček *et al.*, 2000), como una proteína formada por dos subunidades idénticas de 180-190 kDa, muy similar secuencial y estructuralmente a la α_2 M de vertebrados (Sottrup-Jensen, 1989).

Los inhibidores tipo Kazal fueron originalmente descritos en vertebrados como proteínas de bajo peso molecular (5-25 kDa), almacenadas en gránulos de células pancreáticas que son secretadas durante la digestión, con alta especificidad para inhibir serin-proteinasas. Sin embargo, su papel no está restringido a la digestión. En invertebrados como el langostino *P. leniusculus* y en la mosca *D. melanogaster*, los inhibidores Kazal han sido localizados en flujos proteicos provenientes de mitocondrias, en el citosol y en rutas secretorias de hemocitos donde participan como reguladores en la activación del sistema proFO (Johansson *et al.*, 1994; Niimi *et al.*, 1999).

Los inhibidores tipo Kunitz son proteínas que típicamente contienen seis Cys que forman tres puentes disulfuro (Kato y Tominaga, 1979) y con capacidad para inhibir tripsina, aunque pueden tener multidominios de inhibición para otras proteinasas (Laskowski y Kato, 1980). Además el dominio Kunitz puede estar unido a otro dominio como por ejemplo la quelonianina es un ejemplo de un inhibidor del tipo Kunitz, primeramente descrita en la tortuga roja *Caretta caretta* y que tiene dos dominios funcionales, uno de tipo Kunitz que inhibe tripsina y un segundo dominio de tipo WAP (Whey acidic protein) que inhibe subtilisina (Kato y Tominaga, 1979). En invertebrados, los inhibidores tipo Kunitz con capacidad para inhibir tripsina y quimiotripsina (Antuch *et al.*, 1993), han sido descritos en la cacerola de mar y la anémona marina *Anemonia sulcata*. En *B. mori*, se ha caracterizado un proteína llamada Lacunina conteniendo dominios tipo Kunitz esta involucrada en el plegamiento de monocapas epiteliales en el desarrollo embriogénico (Nardi *et al.*, 1999).

Recientemente otra familia de inhibidores, llamada pacifastina, ha sido descrita en *B. mori* (Simonet *et al.*, 2002), el langostino *P. leniusculus* (Liang *et al.*, 1997) y en chapulín *Locusta migratoria* (Liang *et al.*, 1997). Son inhibidores de bajo peso molecular que contienen tres puentes disulfuros y puede ser aislada de la hemolinfa. En el chapulín, se ha demostrado que este inhibidor es sintetizado en el cerebro y secretado a la hemolin-

fa por vía neuroendócrina, lo cual sugiere que, además de participar en la regulación de la proFO, la pacifastina esta involucrada en otros procesos fisiológicos como neurosecreción, muda, reproducción y desarrollo ovárico (Simonet *et al.*, 2002).

Con excepción de la $\alpha 2M$, no existe información sobre proteinasas y sus inhibidores involucrados en el sistema inmune del camarón. Por ello, este trabajo busca describir serin-proteinasas e inhibidores de serin-proteinasas de hemocitos del camarón blanco *P. vannamei* involucrados en respuesta a la inoculación con *Vibrio alginolyticus*. Para lograr este propósito, se han descrito varias metodologías. Inicialmente el uso de EST asumió importancia por su bajo costo y accesibilidad, describiendo genes de cerebro humano (Adams *et al.*, 1992). Y genes involucrados en el sistema cardiovascular, donde analizaron más de 3500 EST's, con base en sus funciones celulares y estructurales (Liew *et al.*, 1994). Por otro lado en el erizo de mar *Sea urchin*, genes activados en respuesta a LPS han sido descritos como EST's, de los cuales, el 30% muestran homología con proteínas del sistema de complemento, proteínas regulatorias y factores de coagulación. También encontraron similitud con genes inmuno-efectores donde incluyen inhibidores de proteinasas, proteinasas, proteínas de superficie celular, proteínas involucradas en señalización y proteínas de secreción (Smith *et al.*, 1996).

Otra técnica utilizada para describir genes activados durante la respuesta inmune de los artrópodos, es el despliegue diferencial (del inglés differential display). En el mosquito *Anopheles gambiae* por despliegue diferencial por respuesta a la inoculación con Malaria y LPS, se describieron 23 genes de la respuesta inmune, incluyendo proteinasas y sus inhibidores, así como moléculas reguladoras y genes sin función conocida (Oduol *et al.*, 2000). Sin embargo, una mayor información se ha obtenido por el uso de bancos de genes. De un banco de genes de cDNA de líneas celulares de hemocitos de *A. gambiae* estimulados con malaria, se aislaron 5,925 secuencias de nucleótidos, de las cuales, 1118 mostraron identidad con homólogos reportados en otras especies, pero solo 27 eran conocidos en mosquitos. Dentro de las secuencias con similitud a genes relacionados con inmunidad, se localizaron 38 que podían estar implicados en reacciones de defensa; 19 de estos fueron descritos como experimentalmente inducibles. En este mismo trabajo se reportaron varias clones, cuyos insertos codifican para proteinasas y serpinas similares a las descritas en *P. leniusculus*, así como proteínas de adhesión descritas en *D. melanogaster*, y otros con similitud a péptidos antimicrobianos, proteínas de señalización, melanización, proteínas involucradas en el metabolismo de hierro y genes que codifican para complemento y α 2-macroglobulina (Dimopoulos, 2000).

En el mosquito *Aedes aegypti*, el cDNA codificante de defensinas, fue clonado y caracterizado, observando que su traducción a nivel de aminoácidos presenta los tres puentes disulfuro clásicos de este tipo de moléculas. La síntesis de mRNA de este inserto codificante para defensina fue analizada a las 1.5 h post inoculación con *E. coli*, observando un incremento a las 24 h y manteniendo niveles altos hasta las 30 h (Cho *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1997). La cecropina, es otro antibacteriano que tienen actividad contra bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos y levaduras (Lowenberger *et al.*, 1995). Así también su expresión fue evaluada ante la inducción por malaria durante diferentes estados de desarrollo, observandose cambios en los niveles de RNA en diferentes partes del cuerpo en el mosquito adulto, así como una limitada expresión en el estado temprano de la pupa (Vizioli *et al.*, 2000).

En el gusano *Hyphantria cunea*, se han aislado y caracterizado genes expresados en respuesta a *E. coli* utilizando expresión diferencial e hibridización sustractiva. De los genes aislados 11 fueron inducidos y presentaron homología con la superóxido dismutasa, inhibidor de proteinasas, lectinas, atacina y hemolina (Woon *et al.*, 1998).

Utilizando hibridización sustractiva en el gusano del tabaco *M. sexta*, se describieron 54 nuevos genes relacionados con inmunidad innata,

incluyendo proteínas de reconocimiento, proteínas antimicrobianas, serin-proteinasa y sus inhibidores (Zhu *et al.*, 2003).

Así mismo, en este insecto se han utilizado técnicas de expresión diferencial, para la búsqueda de genes de la respuesta inmune, detectándose genes de la familia de las proteínas antibacteriales como atacina, el cual es un miembro de la familia de las cecropinas (Bengt *et al.*, 1995). Por su parte, Lemaitre en 1997 (Lemaitre *et al.*, 1997) demostró que los insectos responden a infecciones microbianas activando genes que codifican para péptidos antimicrobianos y a través de la activación de distintas vías de regulación (Tzou *et al.*, 2000).

Estudios más ambiciosos sobre los genes que controlan el desarrollo en *Drosophila* han sido recientemente realizados por Khursh (2000), marcando la pauta sobre la descripción de los procesos biológicos y los reguladores de la respuesta inmune ante infecciones microbianas. Subsecuentemente, algunas de las rutas de señalización que controlan genes de expresión antimicrobial han sido caracterizados (Imler y Hoffmann, 2000). Estos estudios han demostrado que genes participantes en la respuesta a infecciones están regulados por factores de transcripción de tipo NF- κ B compuestos de tres proteínas del tipo Rel (Dorsal, Relish y DIF: dorsal-related immunity) y el sistema Toll, inicialmente caracterizado como un

regulador de respuesta celular del desarrollo embrionario dorso ventral (Imler y Hoffmann, 2000). En *D. melanogaster*, un EST de la proteína TOLL (mostrada por funcionar como un fungistático en la respuesta inmune), sirvió como sonda para clonar y caracterizar una proteína TOLL homóloga en humanos.

Los macroarreglos ha sido utilizados para estudiar la cinética de expresión de mRNAs y en la identificación de nuevos genes (Krebs *et al.*, 2002). Además, la información obtenida de estos arreglos puede ser utilizada para caracterizar interacciones de procesos biológicos y su nivel transcripcional (Miller *et al.*, 2002). En términos generales, esta herramienta permite conocer el papel funcional de diferentes genes que participan en un proceso, sus interacciones y las variaciones en sus niveles de expresión en diferentes tipos de células, estados fisiológicos o de desarrollo, así como su participación en respuesta a la presencia de patógenos o tratamiento con fármacos (Brazma y Vilo, 2000). Por ejemplo, esta técnica fue utilizada para la búsqueda específica de genes expresados en el estado embrionario del erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus* (Rast *et al.*, 2000) o para definir los genes específicos expresados en estado larval y pupa en el mosquito *A. aegypti* (Krebs *et al.*, 2002).

Específicamente en crustáceos, los EST han sido utilizados como estrategias de estudio en bancos de genes de cDNA de cefalotórax, tallo ocular y pleópodos en el camarón tigre *P. monodon* (Gross *et al.*, 2001; Rojtinnakorn *et al.*, 2002). Estos estudios han sido la base para describir 49 nuevos genes y 11 que ya habían sido reportados en crustáceos (Lehnert *et al.*, 1999).

Rojtinnakorn y cols.(2002) han estudiado la expresión de genes de hemocitos en *P. japonicus*, en respuesta a la infección con el virus de la mancha blanca construyendo bancos de genes de hemocitos y secuenciación de EST's. Un total de 370 clones fueron secuenciados de los cuales 47.0% presenta similitud con los reportes depositados en las bases de datos. De aquí, 152 proteínas deducidas fueron identificadas como nuevas, y de éstas 28 corresponden a cDNAs nuevos y que codifican para proteínas involucradas en el sistema de respuesta inmune en *P. japonicus*, 6 genes nuevos corresponden a proteínas relacionadas con apoptosis y genes anteriormente descritos de inhibidores de proteinasas, peneidinas, factores de coagulación y profenoloxidasa.

Gross y cols, (Gross *et al.*, 2001) reportaron la identificación de genes inmunes de hemocitos y hepatopáncreas del camarón blanco *P. vannamei* y del camarón blanco del Atlántico *P. setiferus*, donde se construyeron 4 bancos de genes de cDNA y se aislaron 2045 EST's del banco de genes de hemocitos. El 27.6% en *P. setiferus* y 21.2% en *P. vannamei*, corresponde a

proteínas con posible papel en la respuesta inmune. En el hepatopáncreas también se localizaron genes relacionados con inmunidad: 4.4% en *P. setiferus* y 5.6% en *P. vannamei*. Dentro de los genes descritos como involucrados en la respuesta inmune se encuentran moléculas antimicrobianas, predominantemente peneidinas, serin-proteinasa, inhibidores de proteinasas, proteínas de choque térmico, enzimas como la proFO, peroxinectina y transglutaminasa así como nuevos genes de respuesta inmune en estas dos especies de camarón. Por otra parte la expresión genes que codifican para proteínas de unión a LPS y β -1,3-glucanos (LGBP) fue evaluada ante la presencia de virus de la mancha blanca en camarón azul, *Penaeus stylirostris*, observando que cambios en los niveles de expresión del mRNA de LGBP, definiéndola como una molécula inducible, y que por lo tanto juega un papel importante no solo en la patogénesis fúngica y bacterial, sino también en la patogénesis viral (Roux *et al.*, 2002).

En trabajos realizados en CIAD se han descrito EST de hepatopáncreas, los cuales presentaron identidad con genes de hemocianina y tripsina (Felipe Ortega, 2000). Así mismo, en hemocitos de camarón *P. vannamei* estimulados con partículas inertes, cargadas positiva y negativamente se han demostraron cambios en los niveles de mRNA utilizando la técnica de expresión diferencial observando una respuesta activa ante dicho estímulo (Gómez, 2003). En este mismo organismo, los niveles de mRNA de 3 genes de hepatopáncreas que codifican para proteína unidora de β -glucanos, α -

glucosidasa y α -amilasa en respuesta a la inoculación con partículas de Sephadex DEAE, fue evaluado, demostrando cambios en la expresión solamente en la proteína unidora de β -glucanos (Morales, 2003).

La metodología utilizada en los trabajos citados con anterioridad ha permitido la identificación de genes expresados diferencialmente, así como el análisis de bancos de genes de cDNA, mediante la descripción de EST's. Sin embargo, es necesario confirmar los resultados sobre la expresión de los genes y su correcta identidad.

Por su parte el camarón es capaz de responder a la presencia de agentes no propios, a través de su sistema de respuesta inmune. Con la finalidad de implementar herramientas para evaluar la expresión de genes que codifiquen para inmunoproteínas inducibles en camarón, se propuso la construcción de un banco de genes de hemocitos de camarón blanco estimulados por *Vibrio alginolyticus*. Los clones fueron analizados por macroarreglos para determinar las diferencias en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune. Adicionalmente, considerando que los resultados obtenidos por esta técnica dependen de factores como la cantidad de DNA inmovilizado, la calidad del RNA utilizado para la síntesis de la sonda, la eficiencia del marcaje de la sonda y la hibridización no-específica de la sonda (Burgess, 2001). Adicionalmente se confirmó las variaciones detectadas por hibridización mediante el uso de Northern blot o RT-PCR.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la región codificante completa deducida de una serin proteinasa o un inhibidor de proteinasas involucrada en la respuesta inmune de camarón blanco, *P. vannamei*.

Objetivos particulares

- Construir un banco de genes de cDNA de hemocitos de camarón blanco estimulados con *Vibrio alginolyticus*.
- Aislar y secuenciar el cDNA codificante para serin-proteinasas o sus inhibidores.
- Detectar estructuras funcionalmente importantes en la proteina-
sa, a partir de su secuencia deducida.
- Demostrar variaciones en la expresión del mRNA de hemocitos por la inoculación de *V. alginolyticus*.
- Proponer el papel biológico y/o funcional en términos de la vía o cascada de participación en la respuesta inmune.

Materiales y Métodos

Reactivos y Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado bioquímico o calidad biología molecular y el material libre de DNAsas y RNAsas.

Como parte de un entrenamiento técnico, un clon conteniendo un inserto codificante para una serin-proteinasa (pCSP-01) se obtenido a partir de un banco de genes de hemocitos de *P. vannamei* no estimulados, el cual fue construido utilizando ZAP Express cDNA synthesis kit (Stratagene) por la Dra. Yepiz (CIAD), a quien se le agradece.

Inóculo

El *V. alginolyticus* fue cultivado en caldo marino (Difco Laboratories) durante 24 h, a 30 °C. Las bacterias fueron muertas por calor, en una autoclave (121 °C, 15 psi, 30 min), y centrifugadas a 2000 *g* durante 20 min. El paquete celular fue resuspendido en solución isotónica para camarón (SIC: NaCl 450 mM; KCl 10 mM; Hepes 10 mM, pH 7.3) adicionada con 10 mM de EDTA (Vargas-Albores *et al.*, 1993a). La concentración de bacterias se ajustó a una A_{600nm} de 0.5 y se prepararon alícuotas de 20 μ l para la inoculación.

Bioensayo

Se utilizaron ejemplares adultos de camarón blanco *P. vannamei* de ambos géneros, aparentemente sanos, provenientes de la granja comercial “Acualarvas S.A.”, Huatabampito, Sonora de aproximadamente 12-15 g. Los camarones se aclimataron por lo menos una semana en tinas con aireación y salinidad de 36 ppm. Grupos de 5 animales fueron inoculados con 20 µl de la suspensión bacteriana, en la región dorsal del músculo. Los animales se sangraron a diferentes tiempos para la toma de hemolinfa.

Obtención de los hemocitos

Después de la inoculación, la hemolinfa fue extraída a diferentes tiempos (3, 6, 12 y 24 h), utilizando SIC-EDTA, como anticoagulante. Los hemocitos fueron recuperados por centrifugación de la hemolinfa a 800 *g* por 10 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con SIC preparado en agua estéril conteniendo 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC). Los hemocitos se dividieron en dos alícuotas y se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, LiCl 500 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0, 1% LiDS, 5 mM dithiotheitol) para la obtención del mRNA y en 500 µl de Trizol (Invitrogen), para la extracción de RNA total.

Obtención del mRNA

El mRNA fue aislado utilizando esferas magnéticas Dynabeads (DynaL Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los hemocitos contenidos en la solución de lisis, fueron homogenizados manualmente con un disruptor de tejidos. Se adicionaron 200 μ L de Dynabeads, mezclando perfectamente e incubando por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y las esferas se lavaron dos veces con 200 μ L de solución de lavado A (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; LiCl 0.15 M, EDTA 1 mM y LiDS 0.1%). Las esferas magnéticas fueron transferidas a un tubo limpio y se lavaron dos veces con 200 μ L de la solución B (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; LiCl 0.15 M y EDTA 1 mM). Finalmente las esferas fueron resuspendidas en 20 μ L de agua libre de RNasas y el mRNA fue eluido incubando los Dynabeads a 65 °C durante 2 min y centrifugando. El sobrenadante conteniendo el mRNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Construcción del banco de genes

El banco de genes fue construido con 5 μ g de mRNA proveniente de hemocitos inoculados con *V. alginolyticus* utilizando el sistema Zap Express cDNA Synthesis (Stratagene). El cDNA fue insertado entre los sitios *EcoRI-XhoI* y empaquetado utilizando el sistema Gigapack III Gold Cloning Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene).

Excisión masiva

El plásmido recombinante producto de la excisión en el sistema Zap Express tiene como base el vector pBK-CMV (Stratagene). Estos plásmidos recombinantes se usan para transformar *E. coli* que se siembra en un medio selectivo para formar colonias.

Para llevar a cabo la transformación de los fagémidos a plásmidos, se siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene). Células XLI-Blue MRF' se cultivaron en caldo NZY suplementado con maltosa al 2% y MgSO₄ 10 mM. Así mismo se cultivaron células XL0LR en caldo NZY a 30 °C durante toda la noche a 200 rpm. Los cultivos fueron centrifugados a 100 *g* y el pellet fue resuspendido en MgSO₄ 10 mM, ajustando a una densidad óptica a 600 nm de 1.0. Posteriormente en un tubo se mezcló 1 µL del banco de genes conteniendo 1 x 10⁷ pfu/ µL con 200 µL de la suspensión de *E. coli* XL1-Blue MRF', y se adicionó 1 µL del bacteriófago ExAssist helper phage (1 x 10⁹ pfu/µL), la mezcla fue incubada a 37 °C por 15 min. Posteriormente se adicionaron 20 mL de caldo NZY incubando a 37 °C por 2.5 h en agitación constante a 225 rpm. La mezcla se incubó a 70 °C por 20 min y posteriormente fue centrifugada a 1000 x *g* durante 15 min.

El sobrenadante conteniendo al fagémido pBK-CMV fue titulado, combinando 1 µL del sobrenadante con 200 µL de células XL0LR e incubando a

37°C por 15 min. Posteriormente, se adicionó 40 µL de 5X NZY y la muestra fue incubada a 37 °C por 45 min. Finalmente 100 µL de la mezcla fue esparcida en agar LB-kanamicina (50 µg/mL) incubando toda la noche a 37 °C y contando las colonias, las cuales contienen el plásmido de doble cadena con el inserto del DNA clonado contenido en el vector pBK-CMV.

Aislamiento de los clones

Se aislaron 788 colonias a partir del proceso de excisión masiva, cultivando en forma individual cada colonia en 500 µL de caldo Luria (LB) adicionado con 50 µg/mL de kanamicina (LB-kanam). El cultivo fue incubado toda la noche a 37 °C con agitación constante a 225 rpm. Posteriormente, se adicionaron 500 µL de glicerol para su almacenamiento a -80 °C.

Análisis de los clones

Cada una de las 788 colonias aisladas fue crecida en microplacas estériles de 96 pozos, conteniendo 100 µL de caldo LB-kanam. La placa fue incubada toda la noche a 37 °C con agitación constante a 225 rpm. 10 µL del cultivo fue mezclado con 30 µL de agua estéril y las bacterias fueron lisadas calentando a 100 °C por 5 min.

2.5 µL del lisado fue utilizado como templado para amplificar por PCR utilizando los oligonucleótidos complementarios al vector y que se encuentran adyacentes al sitio múltiple de clonación. Las condiciones finales de la

reacción fueron: buffer PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), mezcla de dNTP's 0.2 mM cada uno, MgCl₂ 1.5 mM, primer T3 y primer T7 20 µM de cada uno y polimerasa Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) 2.5 U en 25 µL siguiendo las instrucciones del fabricante. Los componentes se mezclaron y se adicionaron 25 µL de aceite mineral. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (DNA Thermal cycler, modelo 480, Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C por 2 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 48 °C por 45 seg, 72 °C por 2 min, finalizando con una extensión a 72 °C por 8 min.

Análisis del producto de PCR

Después de eliminar el aceite mineral, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE (Tris acetato de sodio 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). 2.5 µL de la reacción se mezclaron con 1 µL de buffer carga 10X para DNA conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.5% (Sambrook *et al.*, 1989) . Como estándar se utilizó 375 ng del marcador 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). La electroforesis se corrió a 70 volts hasta que el colorante recorrió un 75% del gel.

El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/µL) durante 1.5 min y lavado por 15 min con agua destilada. Las bandas fueron visualizadas por luz UV a una longitud de onda corta de 302 nm y fotografiadas. El tamaño de las bandas de DNA fue calculado utilizando el sistema EDAS DC120 (Kodak).

Macroarreglos

Preparación de la sonda

La sonda de cDNA se preparó apartir de RNA total de organismos inoculados con *V. alginolyticus* (mezcla de 3 y 6 h después de la inoculación) y organismos control. 5 µg de RNA total fue utilizado para la síntesis del cDNA, empleando el kit Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), modificando la concentración de los deoxiribonucleótidos, el cual consiste en mezclar 5 µg de RNA con 0.4 µL de dATP 25 mM, 0.4 µL de dCTP 25 mM, 0.4 µL de dGTP 25 mM, 0.1 µL de dTTP, 1.4 µL de DIG-11-dUTP 1 mM (Roche) mas 1 µL de Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ 500 ng/µL ajustando a un volumen de 20 µL con agua estéril. La mezcla fue incubada a 65 °C, para alinear el primer Oligo dT con la cola poliadenilada (poli A⁺) del mRNA. Posteriormente la mezcla fue incubada en hielo por 1 min.

A cada reacción, se adicionaron 9 µL de la siguiente mezcla de reacción 2 µL de buffer 10X RT (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) mas 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de RNase OUT, incubando a 42 °C durante 2 min. Después 1 µL de transcriptasa reversa Superscript II (50 U/µL) fue adicionada manteniendo la incubación a 42 °C por 50 min. La reacción fue terminada por incubación durante 15 min, a 70 °C y posteriormente se colocó en hielo y las soluciones se colectaron por centri-

fugación. Para eliminar el RNA presente, se adicionó 1 μ L de RNasaH y se incubó por 20 min a 37 °C, el cDNA así sintetizado y marcado, estuvo listo para su cuantificación.

Cuantificación de la sonda

La cuantificación se realizó de acuerdo con el Kit DIG DNA Labeling (Roche), utilizando el DNA marcado con digoxigenina contenido en el kit (concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 pg/ μ L). Se hicieron diluciones seriadas del DNA a cuantificar (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64) y 1 μ L de cada dilución, y de los estándares, fue inmovilizado en membranas de nylon cargada positivamente Hybond+ (Amersham). Para la detección, la membrana fue incubada 5 min en buffer de lavado (ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M pH 7.5; 0.3% Tween 20) y, posteriormente por 30 min en la solución de bloqueo 1X (reactivo de bloqueo 1% en ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 disuelto a 65°C). La membrana se incubó 30 min con el anticuerpo anti-DIG-conjugado con fosfatasa alcalina (1:5000 disuelto en solución de solución de bloqueo 1X) y se lavó dos veces, incubando 15 min cada vez, con 10 mL del buffer de lavado. Finalmente se equilibró con 10 mL de buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50 mM pH 9.5) y se incubó con NBT/BCIP (100 μ L en 5 mL de buffer de detección), en oscuridad, hasta alcanzar la coloración deseada.

Inmovilización de DNA

1.5 μ L del producto de PCR fue desnaturalizado por calor a 99°C por 5 min, posteriormente se mantuvo en hielo y se adicionaron 1.5 μ L de solución SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M pH 7.0), la mezcla fue inmovilizada en membranas de nylon Hybond + previamente cortadas de 7 x 7 cms y cuadrículadas de 0.5 x 0.5 cms. Dos alícuotas (1.5 μ L) de cada muestra fueron aplicadas en dos membranas, las cuales sería utilizadas para hibridizar con las sondas marcadas control y de los organismos inoculados.

Una vez absorbido el material, las membranas se incubaron por 2 min en una solución de NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M para desnaturalizar el DNA, posteriormente se neutraliza por 5 min, en NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, pH 8. Posteriormente las membranas se lavaron 30 seg en una solución de Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5, buffer SSC 2X. El exceso de humedad fue removido colocando las membranas sobre un papel filtro y posteriormente el DNA fue fijado por luz UV a 150 mJoules en un Crosslinker GS-Gen (BioRad).

Hibridización

Las membranas fueron pre-hibridizadas en un horno de hibridización (VWR) con 15 mL de solución de hibridización 5X SSC (N-Laurilsarcosina 0.1%, SDS 0.02%, reactivo de bloqueo 1 %) a 65 °C por 30 min con agita-

ción constante. La desnaturalización de las sondas marcadas se hizo calentándolas a 100 °C, 5 min e inmediatamente colocándolas en hielo por 1 min. Las membranas fueron colocadas en una bolsa plástica perfectamente sellada la cual contenía 15 ng de sonda marcada diluida en 1.25 mL de solución de hibridización, asegurando que no quedaran burbujas de aire en la bolsa. El proceso de hibridización se realizó por 16 h a 68 °C con agitación constante. Posteriormente, las membranas se lavaron 2 veces por 5 min con 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente y otras 2 veces por 15 min en 1X SSC, 0.1% SDS a 68 °C con agitación constante. La membrana fue lavada incubándola 5 min en buffer de lavado (ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5; 0.3% Tween 20) y después por 30 min en solución de bloqueo 1X (reactivo de bloqueo 1% en ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 disuelto a 65 °C). La membrana se incubó 30 min con anti-DIG-conjugado con fosfatasa alcalina (1:20000 disuelto en solución de bloqueo) y posteriormente se lavaron 2 veces, 15 min, con 10 mL de buffer de lavado. Finalmente, la membrana se equilibró con 10 mL de buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5) y se procedió a la detección por quimioluminiscencia.

Detección de la hibridización

El revelado se realizó siguiendo el protocolo recomendado para la detección con el sustrato quimioluminiscente CDP-Star, ready-to-use (Roche).

Para ello, la membrana fue colocada en una bolsa de hibridización adicionando 2 gotas del sustrato e incubando por 5 min evitando la formación de burbujas de aire. Posteriormente, la membrana (mantenida en la bolsa) fue colocada, dentro de un cassette (todo en oscuridad) herméticamente sellado, cubriéndola con una película radiográfica Lumi chemiluminiscent detection film (Roche) y exponiéndola por 1 min.

La película fue revelada en oscuridad, colocándola 2 min en la solución reveladora (Kodak GBX developer and replenisher, Kodak). Posteriormente se lavó por 30 seg con agua destilada y se colocó en solución fijadora (Kodak GBX fixer and replenisher, Kodak) durante 2 min. Finalmente, la película se lavó 1 min en agua destilada y se dejó secar al aire. Las películas se observaron en un transiluminador de luz visible y se documentaron utilizando el sistema EDAS 190 (Kodak).

Northen Blot

DNA marcado radiactivamente

Del DNA plasmídico, se liberó el inserto de los clones recombinantes del vector pBK-CMV, el cual contenía la región codificante completa del gen SWP de hemocitos de *vannamei*. La digestión fue realizada con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, utilizando 1 U/ μ g de DNA incubando por 1.5

h a 37 °C. La digestión fue analizada en gel de agarosa al 1%, y la banda correspondiente al inserto se cortó y se eluyó utilizando el kit GFX-PCR (Amersham). 25 ng de DNA fueron marcados radiactivamente con [α P³²] dCTP 10 mCi/ μ l usando oligonucleótidos aleatorios (random primers) utilizando el kit Megaprimer DNA labelling System (Amersham), la reacción fue purificada para retirar los nucleótidos no incorporados utilizando columnas (Nick columns, Amersham).

Extracción de RNA total

Para la extracción del RNA total se utilizó TRIZOL (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, GIBCO). Se tomaron 0.5 mL de Trizol fue adicionado al paquete de hemocitos obtenido de cada camarón de forma independiente. Las células fueron homogenizadas con un disruptor plástico estéril y después de una incubación a temperatura ambiente por 5 min, se adicionó 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla fue agitada en vórtex, incubada 15 min a temperatura ambiente y centrifugada a 10,000 g por 15 min a 4 °C. Posteriormente se separó la fase superior (acuosa) transfiriendo a un tubo limpio y realizando una precipitación con 500 μ L de isopropanol, mezclando por inversión e incubando por 15 min a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a 10,000 g , 15 min y el precipitado fue lavado 2 veces con etanol al 75%, centrifugando 3 min a 13 000 g . El RNA precipitado fue secado a temperatura

ambiente y resuspendido en 20 μ L de agua-DEPC. La cuantificación se determinó por absorbancia a 260 nm, utilizando la siguiente ecuación, la cual deriva de 1 OD_{260nm} =40 μ g de RNA /mL (Sambrook *et al.*, 1989) .

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} (\text{Factor de dilución})(40)/1000$$

Integridad del RNA

La calidad del RNA recién aislado se analizó por electroforesis en gel al 1% de agarosa conteniendo 2 M de formaldehído al 37% (Sambrook *et al.*, 1989) . La agarosa fue disuelta en buffer MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0) por calentamiento, una vez enfriado a 40 °C se adicionó el formaldehído. Para desnaturalizar la muestra 2 μ g de RNA fueron incubados a 65 °C con 5 μ L de buffer muestra (0.75 mL de formamida, 0.15 mL MOPS 10X, 0.24 mL formaldehído al 37%, 0.1 mL agua-DEPC, 0.1 mL de glicerol, 0.08 mL de azul de bromofenol al 10%) y 2 μ L de bromuro de etidio (1 mg/mL), durante 5 min. La electroforesis se corrió a 70 volts hasta que el colorante migró al 75% del gel. Las bandas fueron visualizadas por luz UV y fotografiadas utilizando el sistema EDAS DC 120 (Kodak).

Inmovilización y detección del mensaje

Se utilizaron 8 μ g de RNA total de hemocitos y hepatopáncreas aislados y analizados como fue descrito anteriormente. El gel conteniendo el RNA, fue lavado 2 veces por 10 min con 10X SSC, el RNA fue transferido a una

membrana Nylon Hybond⁺ (Amersham) por capilaridad durante toda la noche (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente el RNA fue fijado por luz UV a 150 mJoules.

La membrana conteniendo el RNA fue prehibridizada a 65 °C en 6X SSC, 5X solución Denhardt's (0.1% albúmina de suero bovina, 0.1% Ficoll y 0.1 polivinilpirrolidona) 0.5% SDS y 20 mg/mL de DNA de esperma de salmón desnaturalizado durante 1 h. Posteriormente se adicionó 200 µL de la sonda marcada radiactivamente (1.5×10^9 dpm), previamente desnaturalizada por ebullición a 100 °C por 5 min incubando por 12 h a 65 °C. La membrana fue lavada con 2X, 1X y 0.5X SSC conteniendo 0.1% SDS a 65 °C, y expuesta a película de rayos X BioMax MS (Kodak) a -80 °C durante toda la noche y analizada en un phosphoimager FUJIX BAS2000 II (Fuji).

Análisis de los clones

Extracción de DNA plasmídico

El DNA plasmídico de los clones que se modificaron (inducidos y apagados) fue aislado utilizando el protocolo para micropreparaciones o minipreps (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente, el DNA plasmídico se resuspendió en 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) adicionado con 10 mg/mL de RNasa A (TE-RNasa) y se realizó una extracción utilizando 1

volúmen de fenol neutro/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se agitó en vórtex, se centrifugó 2 min y se recuperó la fase acuosa (DNA), la cual se extrajo 2 veces más con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Al sobrenadante acuoso se le adicionaron 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA en solución a -20 °C por 1 h. Posteriormente la mezcla fue centrifugada por 30 min a 12 000 *g* y el DNA precipitado fue lavado 2 veces con 100 µL de etanol frío al 70%. Finalmente el material fue sometido a un proceso de secado por 30 min en un equipo SpeedVac AES2010 (Savant) y resuspendido en 20 µl de H₂O Mili Q estéril.

Cuantificación del DNA

La concentración del DNA plasmídico fue determinada por espectrofotometría de UV a 260/280 nm, en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda Bio 20 (Perkin Elmer) utilizando la siguiente ecuación, la cual deriva de 1 OD_{260nm} =50 µg de DNA plasmídico /mL.

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} (\text{Factor de dilución})(50)/1000$$

La relación de pureza fue calculada basándose en A_{260}/A_{280} , siendo los valores de 1.7-1.9 indicadores de buena pureza (Sambrook *et al.*, 1989).

Determinación de la secuencia nucleotídica

El DNA plasmídico fue enviado para su secuenciación al Laboratory of Molecular Systematics and Evolution de la Universidad de Arizona, en un secuenciador automático ABI 3730 (Perkin Elmer) utilizando los primers que flanquean al sitio múltiple de clonación T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') ó T7 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'). En algunos casos, la secuenciación se realizó con primers específicos del clon a estudiar: SPH-620_SP, 5'-GTGACGGAGGAGGACCC-3'; pCSP-360_SP, 5'-CGTGGTTTGCGTCCCTC-3'; pCSP-503_SP, 5'-GTCGTATTCTCCAAGACG-3'; Kazal-711_KZ, 5'-GTCTGATGGACCGTGTGG-3', los cuales fueron diseñados como se describe más adelante.

Identificación de las secuencias

Las secuencias fueron comparadas en bases de datos GenBank en el NCBI (National Center of Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov), usando los algoritmos BLASTX y BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) contra bases no redundantes y EST. Debido al alto número de secuencias utilizadas en los análisis de secuencia, en este documento, solo se muestran los números de acceso de la base de datos del GenBank; para cualquier dato adicional, referirse con este número a la base antes mencionada.

Las secuencias fueron editadas utilizando el software EditSeq (Lasergene) y Bio Edit (Hall, 1999). Las secuencias del vector se detectaron y eliminaron y las secuencias de los clones se alinearon utilizando SeqMan (Lasergene); el alineamiento entre especies y análisis clustal se realizó utilizando el software MegAlign (Lasergene). Las secuencias nucleotídicas fueron traducidas utilizando el software MapDraw (Lasergene). La composición de aminoácidos y el punto isoelectrico de las proteínas, se calculó utilizando el software Protean (Lasergene) y la predicción del péptido señal se realizó utilizando el programa SIGNALP (Nielsen *et al.*, 1997) en el sitio <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Diseño de primers

A partir de la secuencia de los clones estudiados, se diseñaron primers específicos para obtener la secuencia de la región codificante completa o, para evaluar la expresión de los genes inducidos y apagados. Para el diseño se consideraron los siguientes parámetros: contenido de GC del 50%, temperatura de alineación, longitud, formación de primers-dimers y formación de estructura secundaria, utilizando el programa Oligo calculator-Genosys (http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe).

Transcripción Reversa y PCR

Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 5 µg de RNA total de hemocitos, obtenido como se describió anteriormente, para la síntesis se utilizó el kit Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, el cual consiste en mezclar 5 µg de RNA total con 1.0 µL de mezcla de dNTP's 10 mM mas 1 µL de Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ 500 ng/µL ajustando a un volúmen de 20 µL con agua estéril. La mezcla fue incubada a 65 °C para alinear el primer Oligo dT con el poli-A⁺ del mRNA. Posteriormente la mezcla fue incubada en hielo, por 1 min. A cada reacción, se le adicionaron 2 µL de buffer 10X RT (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, 500 mM KCl), 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de RNase OUT, y se incubó a 42 °C durante 2 min. Posteriormente, se agregó 1 µL de transcriptasa reversa Superscript II (50 U/µL) y se mantuvo la incubación a 42 °C por 50 min. La reacción fue terminada por incubación durante 15 min a 70 °C y posteriormente se mantuvo en hielo, las soluciones se colectaron por centrifugación. Para eliminar el RNA presente, se adicionó 1 µL de RNasa H y se incubo por 20 min a 37 °C. Finalmente, el cDNA recién sintetizado fue almacenado a -20 °C, hasta su utilización.

Amplificación por PCR

A partir de 5 µg de RNA total, se sintetizaron aproximadamente 50 ng de cDNA contenidos en un volumen de 20 µL. Aproximadamente 2.5 ng (1 µL) de cDNA o 10 ng de DNA plasmídico fueron amplificados utilizando primers específicos.

Tabla I Primers específicos utilizados para la amplificación por PCR			
Nombre	Secuencia 5'-3'	T _m (°C)	Gene codificante
PcSP Fw	CTGTGGTTTGGAGCGATTCTC	57	Pseudoclip-SP
PcSP Rv	CAGCTCCATATATACTTTTAATTCAAG	57	Pseudoclip-SP
PcSP Fw	CTGTGGTTTGGAGCGATTCTC	60	Pseudoclip-SP
PcSP Nested Rv	GAGTTAACGTCGAAGGTAGTGCAG	60	Pseudoclip-SP
SPH Fw	GCGAGGAGAGAGTCAGGTTC	60	SP-Homóloga
SPH Rv	CAGTCCTTATGGGGTAGGCA	60	SP-Homóloga
SPH Nested Fw	GGTCGTTCCCTCACAGCCGC	65	SP-Homóloga
SPH Nested Rv	GACATAGACGCCGGGCAGG	65	SP-Homóloga
Kazal Rv	TCTTGCACTTTGCAATCTCG	60	Inhibidor de SP
Kazal Fw	CAGTCTCTGGCTACGGGAAG	60	Inhibidor de SP
SWD Fw	CTCCGTTTCCGTAAGGAGG	60	Un dominio WAP
SWD Rv	GGTCAGCGTCAAGGAGGTTC	60	Un dominio WAP
WAP-P Fw	GCTTGAGTGGTTGCGGAAAG	60	Dos dominios WAP
WAP-P Rv	CCCCAACCGAAAATACACATAC	60	Dos dominios WAP
L13 Fw	CAYCTTGMYMGGYCGCCTGG	60	Ribosomal L13
L13 Rv	CCAGCCKACYTCRTGMGASAGRCG	60	Ribosomal L13

Las condiciones finales de la reacción fueron: buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), mezcla de dNTP's 0.2 mM de cada uno, MgCl₂ 1.5 mM, primer sentido y primer antisentido 20 μM y 2.5 U de Polimerasa (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen) en 25 μL. Los componentes se mezclaron, se colocaron 25 μL de aceite mineral en la parte superior. La amplificación se hizo en un termociclador (DNA Thermal cycler, modelo 480, Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, temperatura alineamiento X °C por 1 min (de acuerdo a la T_m de los primers utilizados como se describe en la Tabla I), 72 °C por 2 min; un ciclo de extensión a 72 °C por 8 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, como se describió anteriormente.

Amplificación Rápida de los Extremos 5' de cDNA (RACE)

Para este experimento se utilizó el Kit GeneRacer (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. RNA total (5 μg), fueron sujetos a defosforilación, remoción de la estructura Cap, ligación del oligonucleótido de RNA en el extremo 5', obtención del cDNA por transcripción reversa y amplificación por PCR, con los siguientes primers: GeneRace 5'Fw, 5'-CGACTGGAGCACGAGGCACATGA-3'; SWD Rv, 5'-GTTGCACGAGTGGTG-

GTAGTGGATGC-3'; GeneRacer 5'Nested Fw, 5'-GGACACTGACATGGACTG-AAGGAGTA-3'; SWD Nested Rv, 5'-GTTGCACGAGTGGTGGTAGTGGATGC-3'.

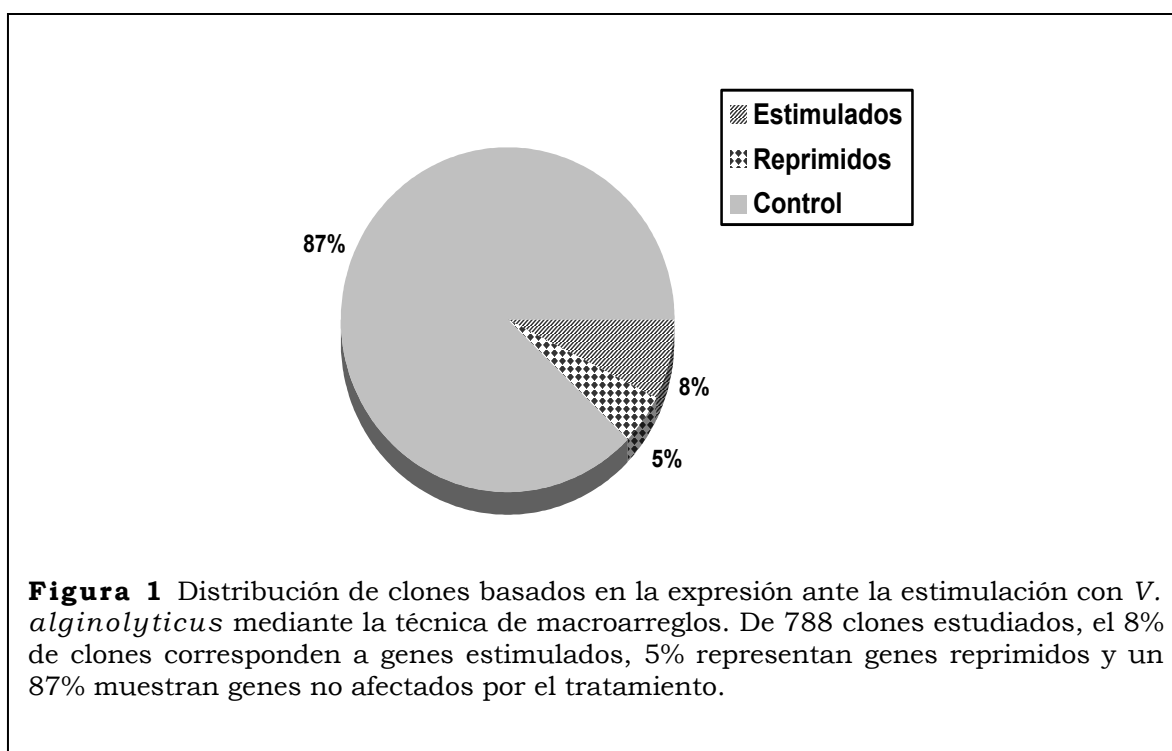
Clonación de los productos de PCR

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa, las bandas de interés se cortaron del gel y se eluyeron utilizando el Kit GFX-PCR (Amhersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de clonación se hizo utilizando el Kit TOPO TA cloning for sequencing (Invitrogen), incubando 4 μ L (10-100 ng) del material eluido con 1 μ L de solución salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) y 1 μ L de vector (10 ng) pCR 4.0-TOPO, incubando 5 min a temperatura ambiente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transformación se realizó, mezclando 6 μ L de la reacción de ligación con 50 μ L de células de *E. coli* (cepa TOP 10) químicamente competentes. La mezcla se incubó por 15 min en hielo y después a 42 °C por 30 seg. La mezcla fue incubada nuevamente en hielo por 2 min, añadiendo 250 μ L de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 2M, glucosa 20 mM) y se incubó en agitación a 200 rpm por 1 h. Posteriormente, 30, 60 y 120 μ L del cultivo se extendieron en placas LB-ampicilina (100 μ g/ μ L), las cuales fueron incubadas a 37°C toda la noche. Finalmente, se seleccionaron 3 colonias y se sembraron de manera individual en caldo LB, para que después de incubarlas toda la noche a 30 °C, se utilizaron para la purificación del DNA plasmídico como anteriormente se describió.

Resultados

Banco de Genes

Dentro de los trabajos de genómica funcional realizados en el laboratorio de Biotecnología Marina, se construyó un banco de genes de hemocitos de camarón blanco *P. vannamei* inoculados con *V. alginolyticus*, utilizando el vector unidireccional pBK-CMV, obteniendo un título del banco de genes amplificado de 1.7×10^6 pfu/uL. Los fagos obtenidos fueron transformados a plásmidos por excisión masiva utilizando un fago ayudador Helper phage y células *E. coli* XL0LR.



Se aislaron 788 clones y cada uno fue crecido en medio LB y almacenado a -85 °C en LB conteniendo 50% de glicerol. Una alícuota de cada clon fue utilizada como templado para la amplificación del inserto por PCR, utilizando los primers del vector (T3 y T7). Los productos de PCR fueron inmovilizados en membranas de Nylon e hibridizados con cDNA marcado con digoxigenina, proveniente de organismos control y tratados.

Al comparar la intensidad de las señales de las hibridizaciones obtenidas de los macroarreglos, se observó que el 8% de los clones presentaban una señal más fuerte con el cDNA de los animales inoculados que los del control, indicando que habían sido estimulados. En otros casos la señal fue mayor en el control que en los inoculados (4.7%), por lo que fueron considerados como reprimidos. Sin embargo, en la mayoría de los casos (87%) se observó una intensidad similar entre el control y experimental, por lo que probablemente corresponden a genes constitutivos o no alterados como respuesta al tratamiento (Fig. 1). Los insertos de los clones identificados como estimulados fueron secuenciados y se identificaron EST's correspondientes a timosina, péptidos antibacterianos, quelonianina, factor anti-LPS, factor de elongación 1-alfa, proteínas ribosomales, oxidoreductasas, transglutaminasa, profenoloxidasa, serin proteinasas, inhibidor de proteinasas, proteína de la seda, tirosin-cinasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y tirosinasa como se describe en la tabla II.

Tabla II Etiquetas de secuencia expresadas identificadas por macroarreglos como clones estimulados.

Identidad a nivel de nucleótidos con el gen reportado en el GenBank

Clon No.	Identidad	%	No. de acceso
1, 48, 149, 274, 609	Actina	97	AF300705_1
152	Antileucoproteinasa	55	AAH19734.1
78, 139, 248, 322, 499, 518	Anti-LPS	47	A23931
52, 494	Factor de elongacion 1 alfa	92	AAC03145.1
570	G3P deshidrogenasa	91	BAC77082.1
282, 96, 598	Inhibidor de proteinasa	51	CAA56043.1
150	Leonardo/ Oxidoreductasa	47	NP_628997.1
270	Neuraminidasa	33	XP_136975.1
168	Neuroparsin A	28	NP_849541.1
280, 600	Oxido reductasa	85	BE015536
525, 578, 582	Péptido antimicrobiano	38	AF430074.1
34	Permeasa	19	NP_847797.1
174	Profenoxidasa	95	AF521948_1
131	Proteína conteniendo un WAP	96	BE188608
532	Proteína de la seda	30	AAA99804.1
290	Receptor de serpiente	28	NP_505140.1
125	Proteína de pared celular	30	1604465A
87	Ribosomal 12S, tRNA-Val	98	AY046914.1
7, 342	Proteína ribosomal S8	80	AAL62472.1
170, 273, 284	Proteína ribosomal L17	75	AAN09183.1
256	Reductasa	30	AAO61162.1
568, 604	16S rRNA	97	AY046914.1
158	Serine proteinasa	46	CAC12696.1
184, 203, 283, 542, 269	Sin identidad		
14, 76, 335, 176	Timosina	62	AAO92284.1
51	Tirosin-cinasa	32	CAC27586.1
380	Transglutaminasa	74	AF469484.1

Dentro de los insertos de clones caracterizados como reprimidos y secuenciados, se encontro similitud con leucoproteinasa, factor de despolimerización de actina, proteínas ribosomales, profilina, amidasa y ubiquitina como se presenta en la tabla III.

Los insertos clonados que presentaron similitud a serin-proteinasas y sus inhibidores, se seleccionaron para continuar su estudio, confirmando su

Tabla III Etiquetas de secuencia expresadas identificadas por macroarreglos como clones apagados.

Identidad a nivel de nucleótidos con el gen reportado en el GenBank

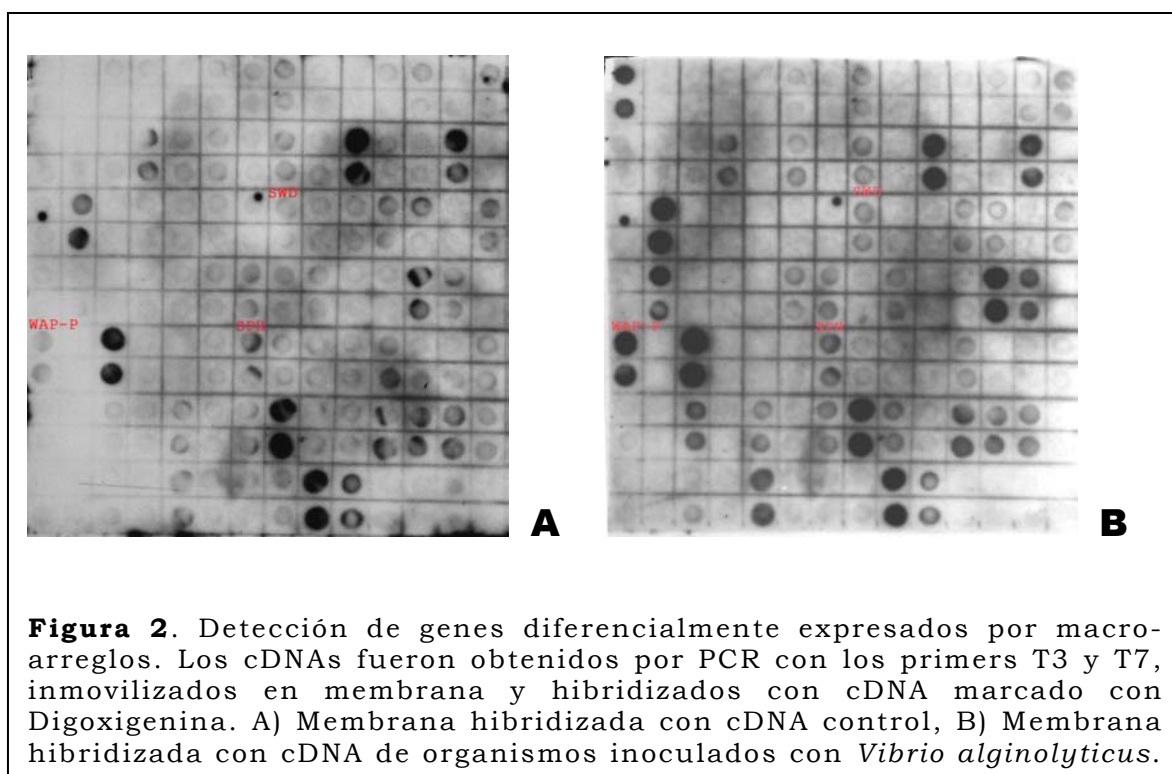
Clon	Identidad	%	No. de acceso
549	Leucoproteinasa	38	AAH39173.1
692, 695, 530, 133	Sin identidad		
526	Factor de despolimerización de actina	69	XP_320468.1
591	Proteína de unión a Retinoblastoma	33	AAH53856.1
586	Proteína ribosomal 11.2	78	NP_508413.1
572	Proteína ribosomal L11	78	AAA83599.1
504	Proteína ribosomal L19	63	AAF47305.1
563	Proteína ribosomal L27	54	BAC56473.1
717, 718	Proteína ribosomal S7	65	AAN77896.1
406, 446	Transglutaminasa	54	AF469484_1

secuencia al obtener la segunda cadena y re-secuenciando cuando fue necesario. En algunos casos fue necesario hacer RACE en el extremo 5' o re-secuenciar secciones internas. Al tener la secuencia completa, se continuó describiendo las características de la proteína deducida y analizando cambios en su expresión por la inoculación de bacterias.

Las serin-proteinasas han sido reportadas frecuentemente como componentes de la respuesta inmune y, aunque han sido detectadas específicamente en bancos de genes de camarón (Lehnert *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2001; Rojtinnakorn *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2002), su función no ha sido confirmada.

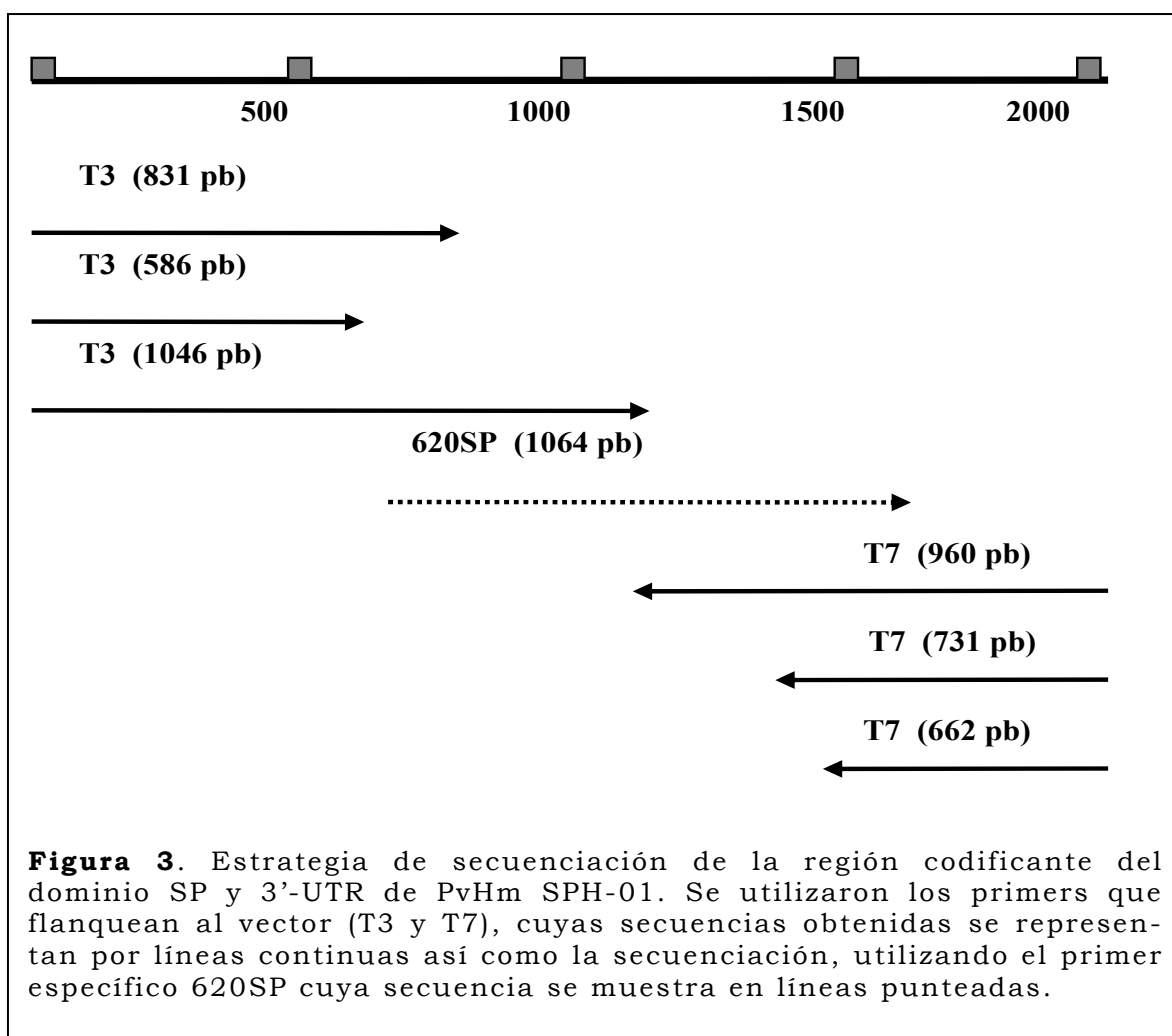
Serin-proteinasa homóloga (PvHm SPH-01)

Un clon conteniendo un inserto de 975 pb (clon 158) aparentemente fue estimulado por la inoculación de *V. alginolyticus*, como se observó por macroarreglos (Fig. 2). El BLASTX reportó que la secuencia del clon tiene 54% similitud (119/220 aminoácidos) con una serin-proteinasa identificada como el factor de activación de la proFO del escarabajo *Tenebrio monitor* (CAC12696). La secuencia fue confirmada, secuenciando parcialmente la segunda cadena y alineando. Al no encontrar errores, ni ambigüedades, se definió la secuencia consenso. Aunque se encontró un ORF continuo para un polipéptido de 252 aminoácidos, no se encontró la metionina inicial, ni la región 3'-UTR. Para poder secuenciar la 3'UTR se



diseñaron primers específicos a partir de la secuencia consenso obteniendo un UTR de 1206 pb. La estrategia de secuenciación se muestra en la figura 3.

La comparación en el GenBank, utilizando BLASTX, mostró que la PvHm SPH-01 tiene similitud con el factor de activación de la profenoloxidasa de *T. molitor* (CAC12696) y el de *H. diomphalia* (CAC12665), así como a una serin-proteinasa de *M. sexta* (A518768) y una de *A. gambiae* (CAB93496) (Fig. 4). Dentro del mismo análisis, se determinó que el dominio serin-



proteínasa (SP) (PROSITE: TRYPSIN_DOM, Accession number PS50240) está comprendido entre los residuos 39 y 242. Aunque la secuencia deducida contiene los residuos catalíticos His y Asp, la Ser ha sido sustituida por Gly, por lo que el producto de este clon es un homólogo de serin-proteínasa y se nombró PvHm-SPH-01.

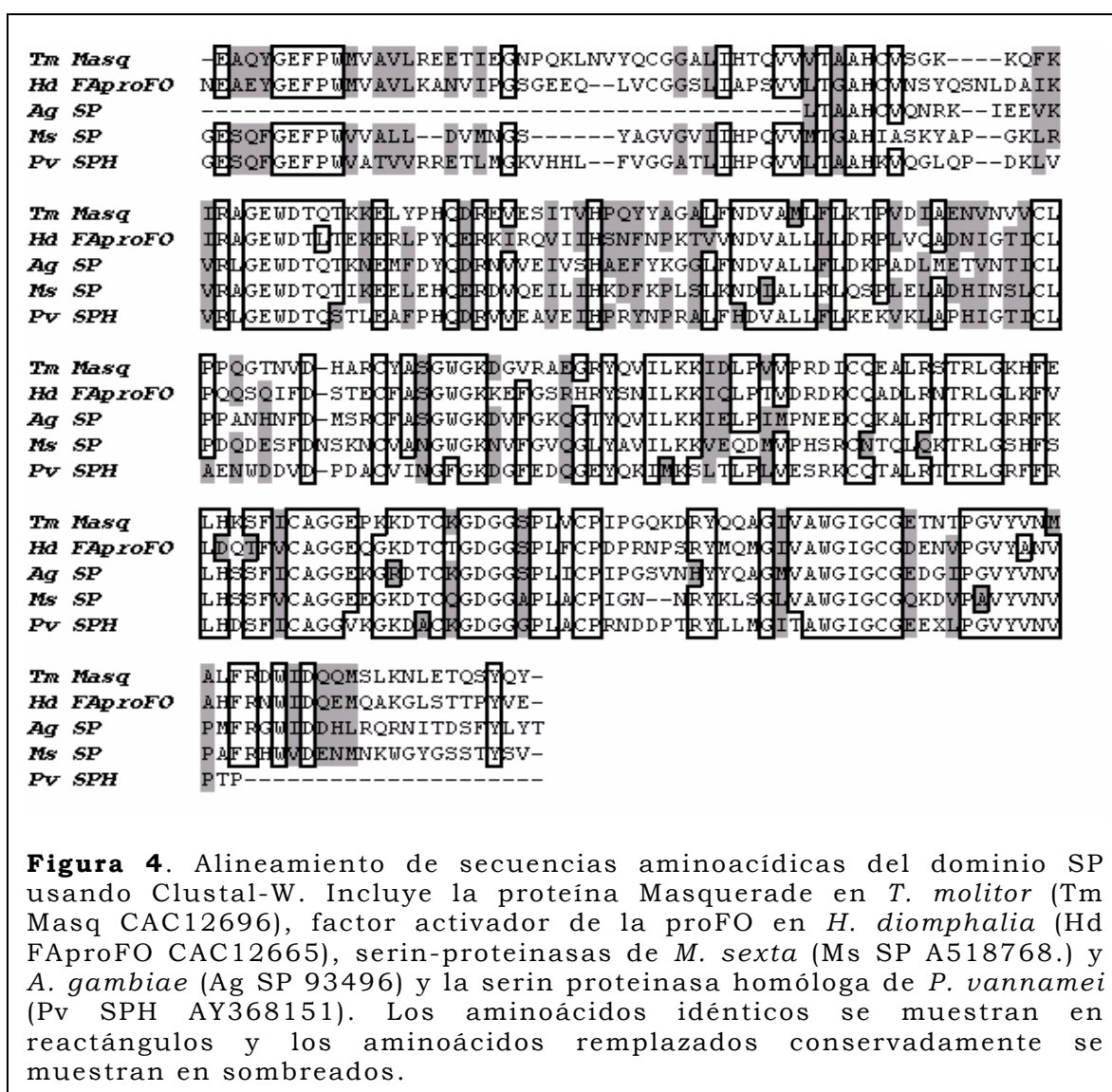


Figura 4. Alineamiento de secuencias aminoacídicas del dominio SP usando Clustal-W. Incluye la proteína Masquerade en *T. molitor* (Tm Masq CAC12696), factor activador de la proFO en *H. diomphalia* (Hd FaproFO CAC12665), serin-proteínasas de *M. sexta* (Ms SP A518768.) y *A. gambiae* (Ag SP 93496) y la serin proteínasa homóloga de *P. vnamei* (Pv SPH AY368151). Los aminoácidos idénticos se muestran en rectángulos y los aminoácidos reemplazados conservadamente se muestran en sombreados.

Además de la tríada His, Asp, Ser que forman el sitio catalítico, otras estructuras y secuencias características están presentes en el dominio SP. Seis Cys, formando tres puentes disulfuros que estabilizan el dominio parecen ser muy conservadas; sin embargo, algunas SP poseen dos o cuatro puentes disulfuro (Jiang y Kanost, 2000), sin detrimento de sus propiedades catalíticas. Los aminoácidos que conforman la región de unión al sustrato denominada “pocket” del dominio SP, es también importante y está caracterizada por Asp 190, Gly 216 y Gly/Ala/Ser 266 para proteinasas con especificidad similar a la tripsina (Perona y Craik, 1995). Todas estas características estructurales mencionadas están presentes en la PvHm-SPH01 como se aprecia en la figura 5. Sin embargo, la ausencia de Ser en el sitio catalítico pone en duda su capacidad proteolítica.

Por otro lado, variaciones en la expresión de PvHm-SPH-01, fueron evaluadas por RT-PCR observando un aumento de 2 y 3 veces en los niveles de mRNA post-inoculación de *V. alginolyticus*, a las 3 y 6 h, manteniendo posteriormente a las 12 y 24 h sus niveles normales con respecto al control como se observa en la figura 6 confirmando el resultado obtenido por macroarreglos.

```

GGCACGAGGGTGAGAGCTCGCATCCTCGGATTCCGCGAGGGAGAGAGTCAGTTCGGGGAG 60
G T R V R A R I L G F R E G E S Q F G E
TTCCTCCCTGGGTGGCCACCGTCTCGTCAGGAGGGAGACGCTGATGGCAAGGTCCACCACCTC 120
F P W V A T V V R R E T L M G K V H H L
TTCGTAGGGGGCCACGCTCATCCACCCTGGGGTCGTCTCACAGCCGCGCATAAGGTC 180
F V G G A T L I H P G V V L T A A H K V
CAAGGACTGCAGCCGGACAAACTGGTGGTGCGGCTGGGCGAGTGGGACACGCAGAGCACC 240
Q G L Q P D K L V V R L G E W D T Q S T
CTCGAGGCCTTCCCGCACCAGGACCGCGTCTCGTAGGGCGGTGGAGATCCACCCGCGATAC 300
L E A F P H Q D R V V E A V E I H P R Y
AACCCAAGGGCCCTCTTCCATGACGTGGCCCTCTCTTCTCTGAAGGAGAAGGTCAAGTTG 360
N P R A L F H D V A L L F L K E K V K L
GCTCCGCACATCGGCACCATCTGCCTGGCGGAGAACTGGGATGACGTGGATCCTGATGCC 420
A P H I G T I C L A E N W D D V D P D A
TGTGTCAACCGTTTCGGCAAAGATGGCTTTGAGGACCAAGGAGAGTACCAGAAGATC 480
C V I N G F G K D G F E D Q G E Y Q K I
ATGAAGAGCCTGACGCTGCCTCTGGTGGAGAGCCGCAAGTGCAGACCCGCCCTCAGGACC 540
M K S L T L P L V E S R K C Q T A L R T
ACGCGCCTTGGGAGGTTCTTCCGCTCCACGATTCTTTCATCTGTGCCGGAGGAGTCAAG 600
T R L G R F F R L H D S F I C A G G V K
GGGAAGGATGCGTGCAAGGGTGACGGAGGAGGCCCTCGCATGCCCCGAAACGACGAC 660
G K D A C K G D G G G E P L A C P R N D D
CCAACACGCTACCTCCTCATGGGCATCACCGCTGGGGCATCGGCTGCGGAGAGGAAGGC 720
P T R Y L L M G I T A W G I G C G E E G
CTGCCCGCGTCTATGTCAACGTGCCTACCCCATAAAGGACTGGATAAAACAGACGGTTGA 780
L P G V Y V N V P T P *
TGCCAGATTCCTCAACTACGACCACTTCGACGACGACGACGACAACAACCACGACGACCAC 840
GACCACTGATGAGTTCTCGGATTACCTGCAAGGAGAAAGCGACTACGATTACGAAGAGTG 900
GGAAGAGCGAAGGAGGAAGAAGAAGGGCAAGGGCAAGAAGTACGAGAAAACCCCGAGGGA 960
TGACATTAGAGCTATCAGAAGAGAAGAAGGAAGAGGAGAAGACAAGAGAGAAGGCCGAT 1020
GGGAAGGGGGGAGAGAAAGTAAACCAGCAATATGACAGACATCGATGTGAATGCAATTA 1080
ATGCAAAAGAAAGAAATGTAACAATAAATGATGATTGAAAGATGCAATAAAAAATAAATGA 1140
TAATTGAAAGATGCAATAAGAAAGATTGCAAAACATAAAGTACAAAAATGAAGGTTAGGT 1200
AGTTACATTGACTAATTAAGGTACCTGTCATGCAACAGGTTAATTATTGCTTACAAATTA 1260
CTTTACACTGTGCTCATTAACACTGCTGCTTTTCTTTCCATGATTTCAGTTGATACCCAAG 1320
TCCCTTGTGTTACTGCTGATTGCACAAATTATTTTACATGGTTTTCAACAAAATTTGTGTA 1380
TATGTACACAGTATCTAATGGCCCTGGTTGTATCCAGATGTATTCATAGGAGTCAATGT 1440
TAGTTCTTAACTTTCAGAGATAATGGTGAAATGGCCATAACTATCATGGGTTTCCCACGC 1500
CAGATTTCTTGGAAATAAAGGTATACAGCTCTTAGCCACATAGATAAGCTTGGCGCATGTT 1560
CTGAGAGAATTCTGATCTGTCTTCCCTGGGACTGTGATGAACCTACATGTCAACCTTTGT 1620
TCCATACAGTAAAAAGTCTTCCCTGCTCTTTCTGACAATTTGTACAGCCTATACTTGG 1680
CATATAAAAAGAGAGAGACAAACATGATGAGTTATTACTAAGAGAGGACTTTCTCCTTC 1740
CATTTTTACGTTTTCTTTCACTGCTCTTTCTGATAACTTGTACAGCCTATACTTGGCAT 1800
ATAAAAAGAGAAAGAGACACAGACATGATGAGTTTTTACTAAGAGAGGACTTTCTCCTT 1860
CTTCCATTTTTTACACTTTTTTTTTTTTACCGAATGGTTTTCCCTCTGAGACCTTGTAAA 1920
TAAACATTATCATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1963

```

Figura 5. Secuencia nucleotídica y deducida secuencia aminoacídica de una serin proteinasa homóloga de camarón blanco *P. vannamei* SPH-01. Los aminoácidos correspondientes a la tríada catalítica (H, D, G) se localizan en rectángulos, la secuencia nucleotídica de los primers utilizados para análisis de expresión se localiza subrayada, la secuencia subrayada y en itálicas corresponde al primer utilizado para la estrategia de secuenciación. El codón de terminación se representa en negritas y la señal de poliadenilación en itálicas.

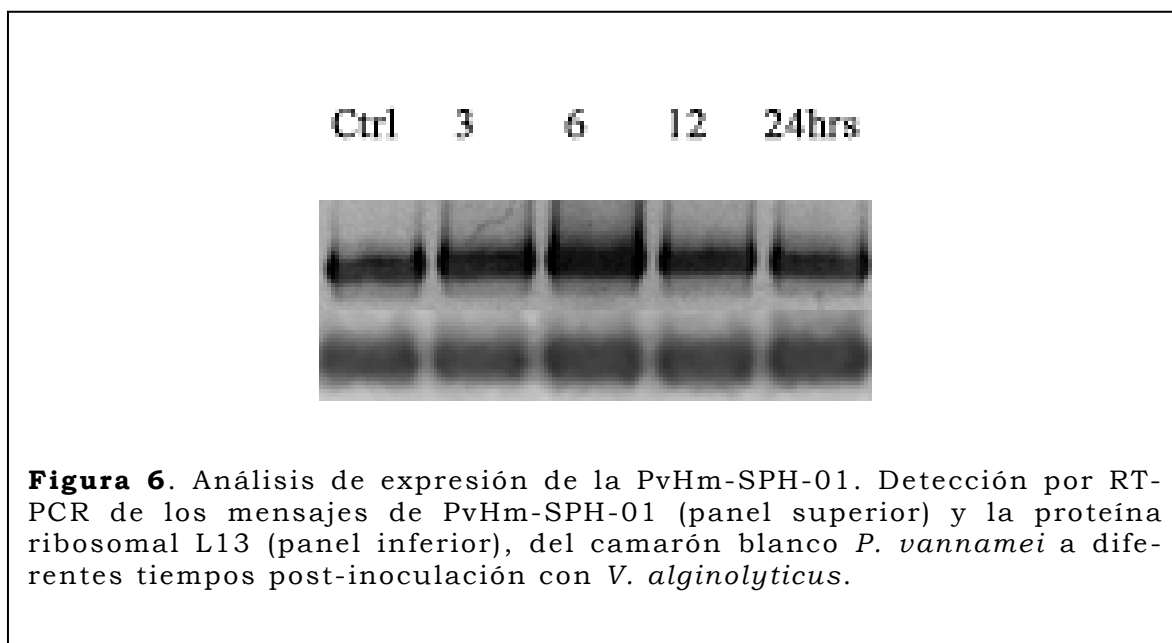


Figura 6. Análisis de expresión de la PvHm-SPH-01. Detección por RT-PCR de los mensajes de PvHm-SPH-01 (panel superior) y la proteína ribosomal L13 (panel inferior), del camarón blanco *P. vannamei* a diferentes tiempos post-inoculación con *V. alginolyticus*.

Pseudo-Clip Serin Proteinasa (PvHm pCSP-01)

Un clon conteniendo un inserto de 1.1 Kb codificante para una serin-proteinasa, según BLASTX y BLASTN fue aislado del banco de genes de hemocitos de *P. vannamei* elaborado por la Dra. Yepiz-Plascencia. La segunda cadena fue secuenciada, sin embargo fue necesario diseñar primers internos específicos, para obtener la secuencia completa del clon, el cual tiene una región 5'-UTR de 83 pb (Fig. 7), un ORF de 972 pb y una región 3'UTR que contiene la señal de poliadenilacion (ATTAAA) (Proudfoot *et al.*, 2002) y la secuencia poli(A). El ORF de la PvHm pCSP-01, codifica para un polipéptido de 323 residuos, con una masa molecular estimada de 35 kDa. Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997), se predijo el sitio del corte del péptido señal en Gly 16, produciendo una proteína madura de 33.5 kDa (307 aminoácidos).

La proteína resultante posee un dominio SP y es similar a otras serin-proteinasas de hemocitos de artrópodos registradas en el GenBank: *P. leniusculus* (AJ007668), *A. gambiae* (AJ250916), *M. sexta* (AF017663) y *T. tridentatus* (AAA30094). La secuencia correspondiente al dominio SP,

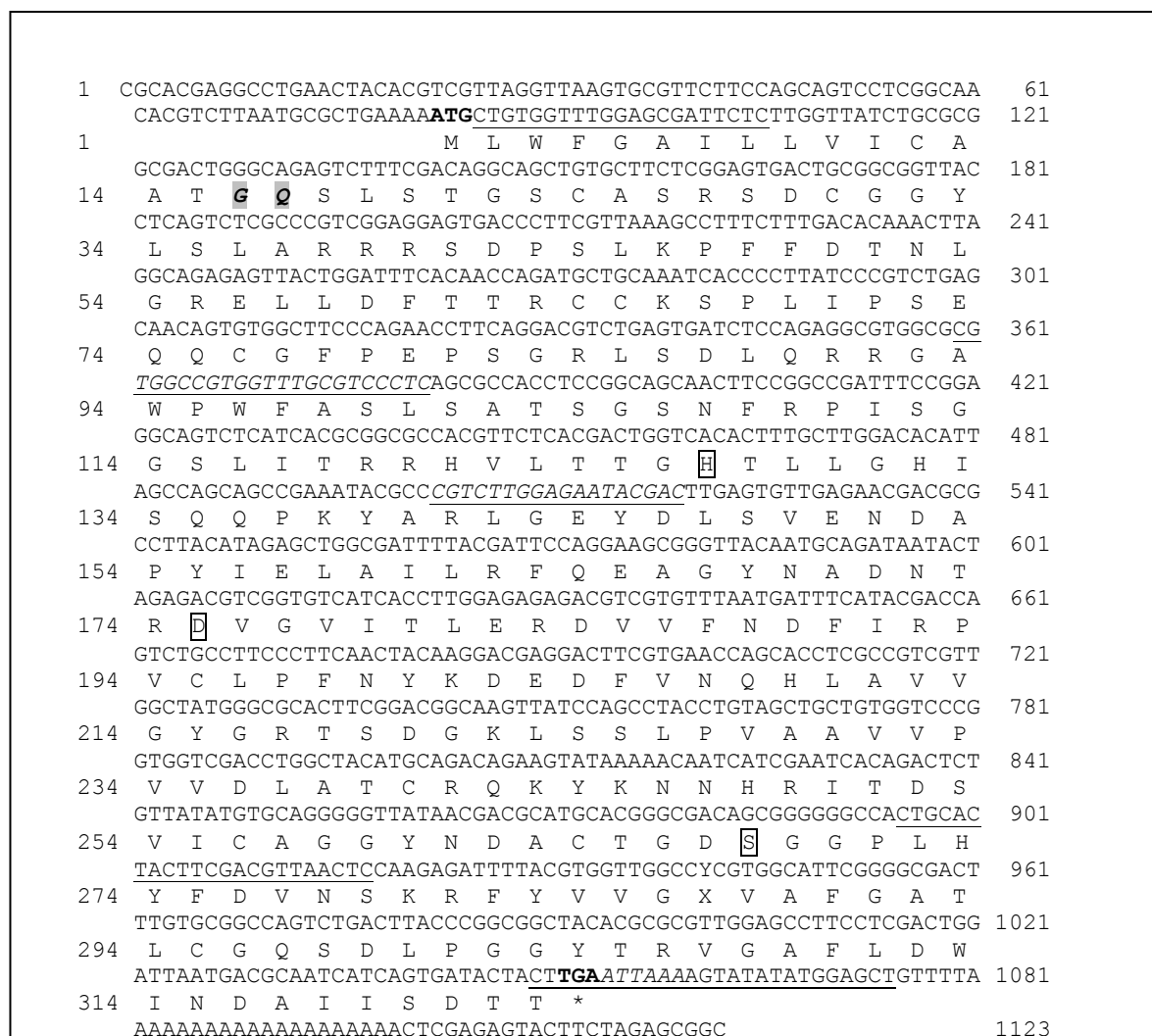
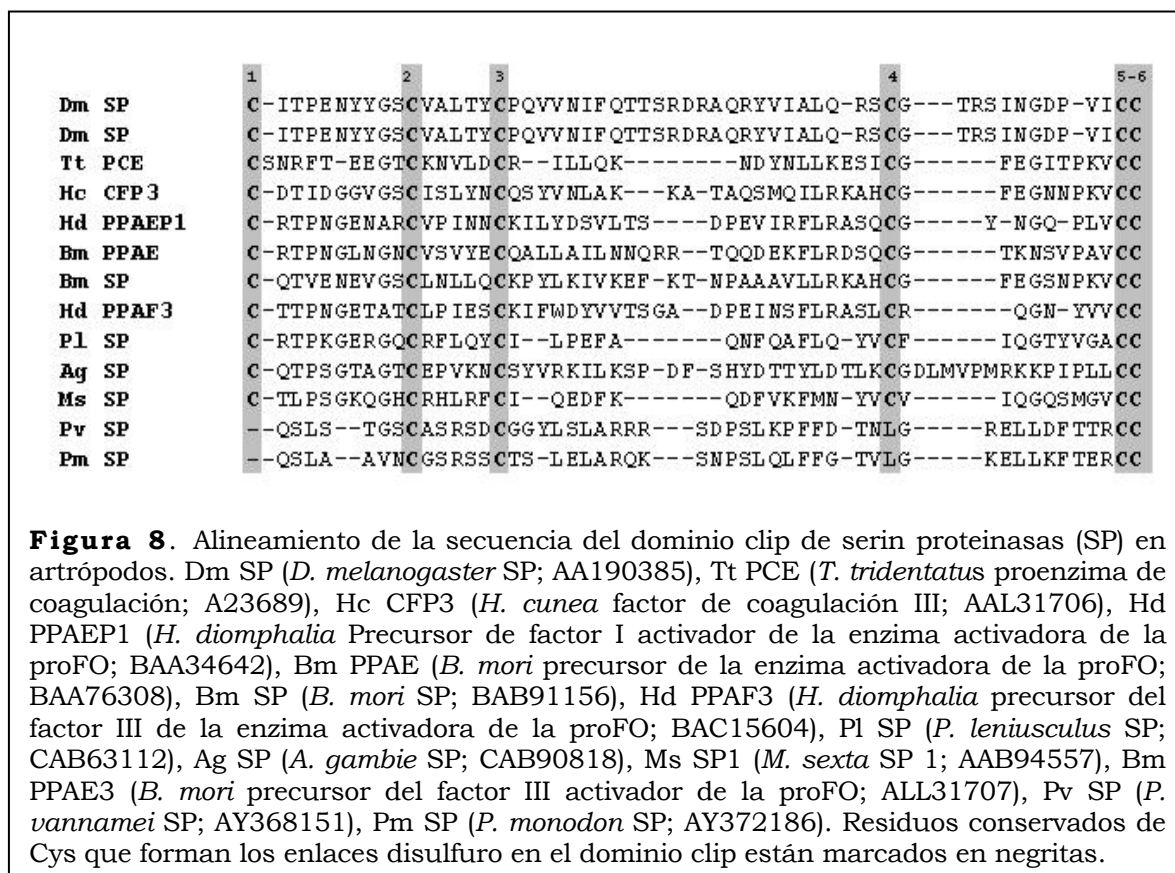


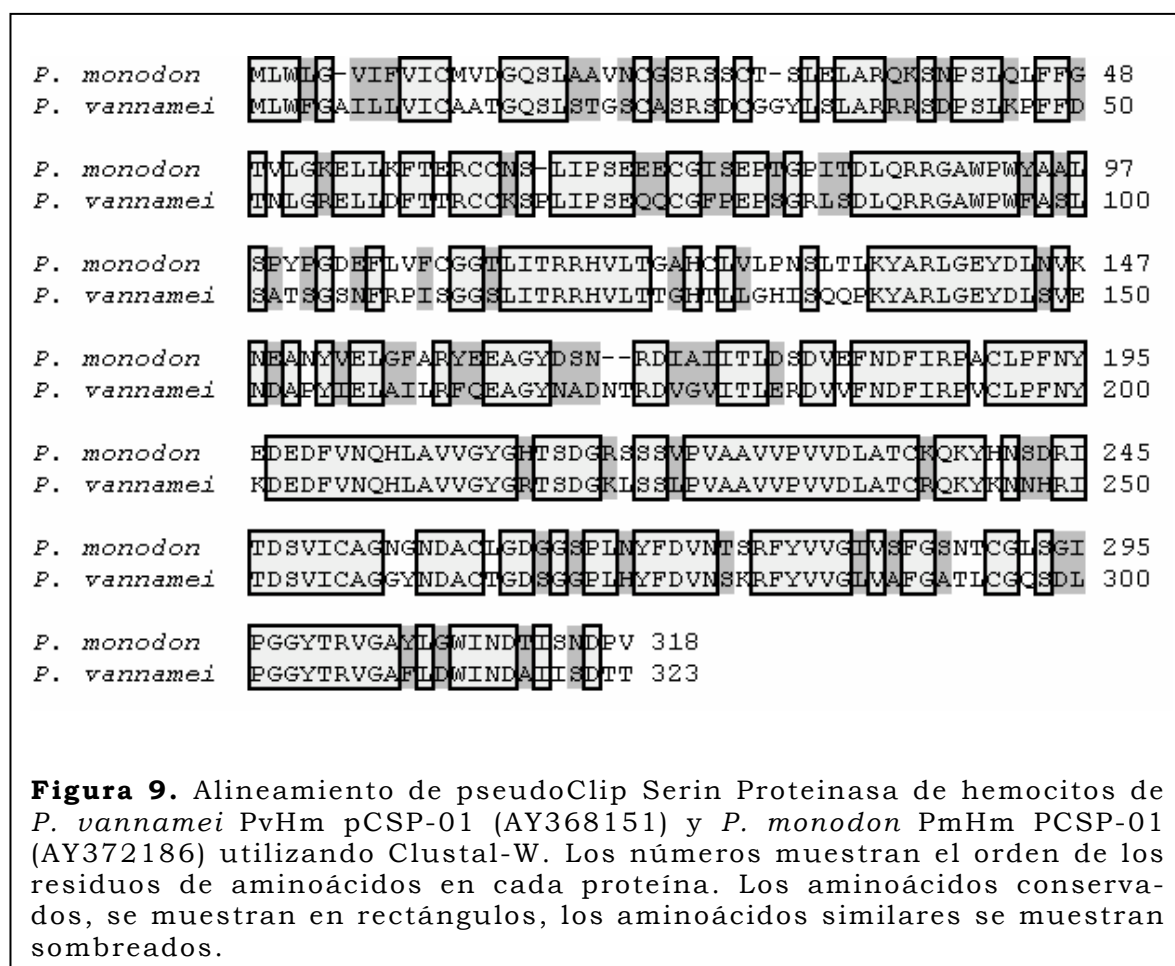
Figura 7. Secuencia nucleotídica y deducida secuencia de aminoácidos de una serin proteinasa de *P. vancouverensis* (PvHm-PcSP-01). Los aminoácidos que participan en el corte del péptido señal se marcan en itálicas y en negritas, los aminoácidos que conforman la tríada catalítica están enmarcados, primers específicos para los análisis de expresión se presentan subrayados, y primers específicos como estrategia de secuenciación se muestran subrayados y en itálicas. El codón de inicio y terminación se muestra en negritas.

contiene los residuos His 127, Asp 175, Ser 268 que conforman la característica tríada catalítica de las SP. (Davis et al., 1985; Wang et al., 1993). La proteína también contiene el sitio de unión al sustrato (pocket) característico de las SP con especificidad similar a tripsina (Asp 262, Gly 291 y Gly 302).

Sin embargo, esta proteinasa de camarón, solamente tiene 4 de las 6 cisteínas conservadas del dominio clip, característico de las serin-proteinasas de hemocitos de artrópodos (Fig. 8) (Jiang y Kanost, 2000). Por eso, esta estructura fue considerada como un pseudoclip y la proteína fue denominada PvHm pCSP-01 (pseudoClip Serin-Proteinasa, de Hemocitos de *P. vannamei*). El término pseudoclip ha sido utilizado para definir



dominios clip incompletos (Ross *et al.*, 2003) de serin-proteinasas de *Drosophila*. Una proteína homóloga se buscó en un banco de genes de hemocitos de *P. monodon*, donde se encontró un clon conteniendo un inserto de 1123 pb, codificando para una pseudoclip serin-proteinasas (PmHm pCSP-01). Ambas pCSP muestran muy alta similitud (89%) en su secuencia de aminoácidos (Fig. 9), indicando que éste tipo de serin--proteinasas están ampliamente distribuido entre los camarones penidos (Jiménez-Vega *et al.*, 2003).



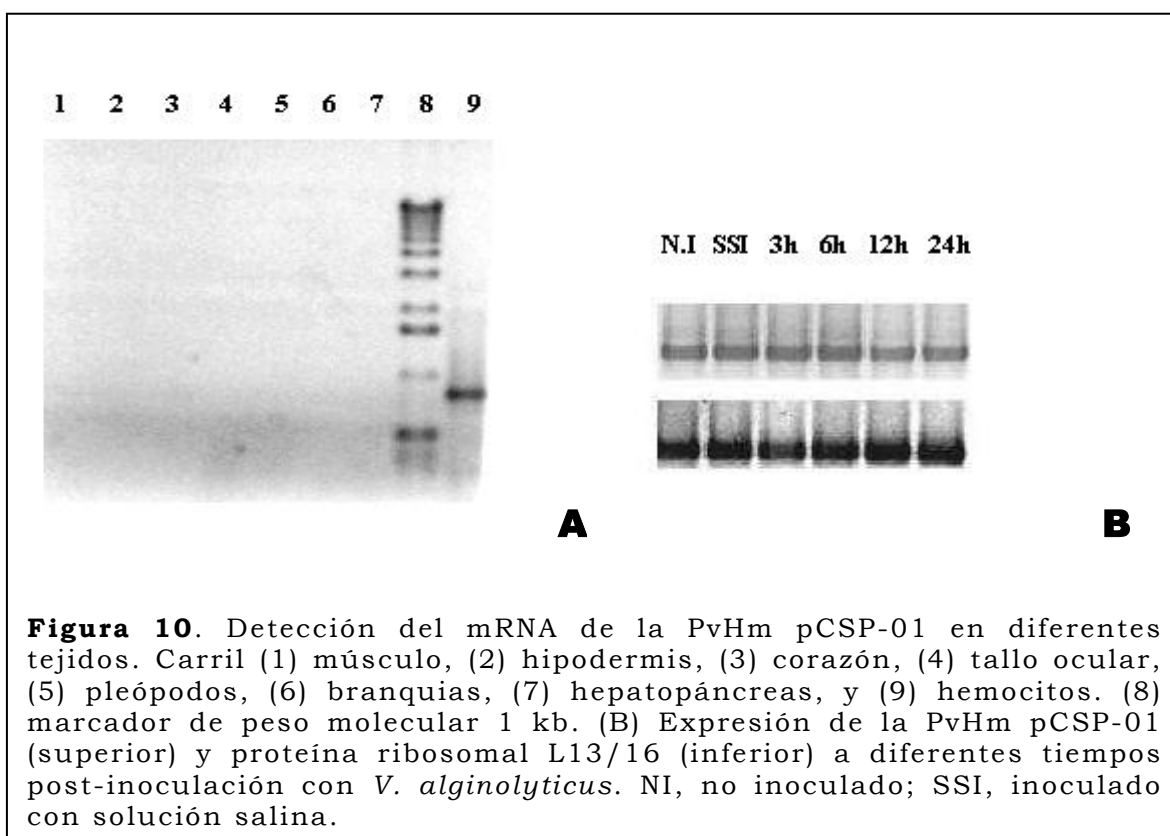
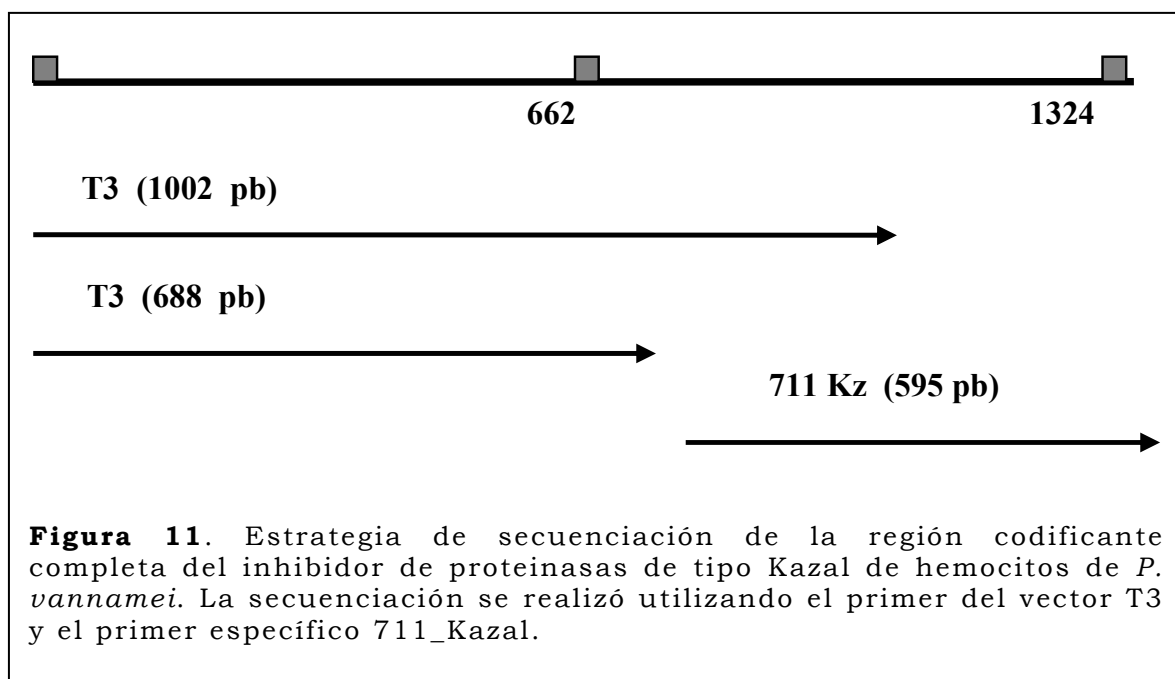


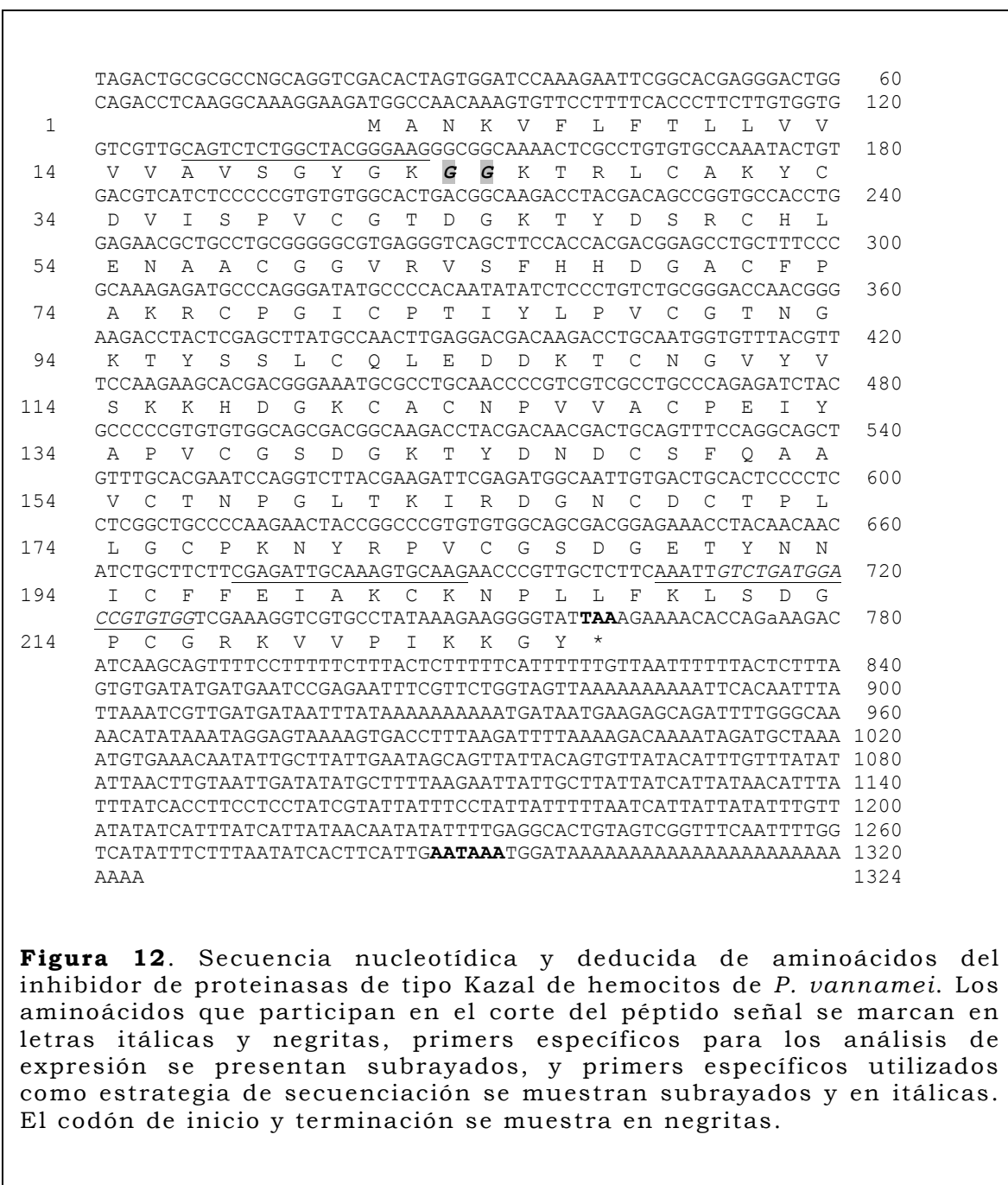
Figura 10. Detección del mRNA de la PvHm pCSP-01 en diferentes tejidos. Carril (1) músculo, (2) hipodermis, (3) corazón, (4) tallo ocular, (5) pleópodos, (6) branquias, (7) hepatopáncreas, y (9) hemocitos. (8) marcador de peso molecular 1 kb. (B) Expresión de la PvHm pCSP-01 (superior) y proteína ribosomal L13/16 (inferior) a diferentes tiempos post-inoculación con *V. alginolyticus*. NI, no inoculado; SSI, inoculado con solución salina.

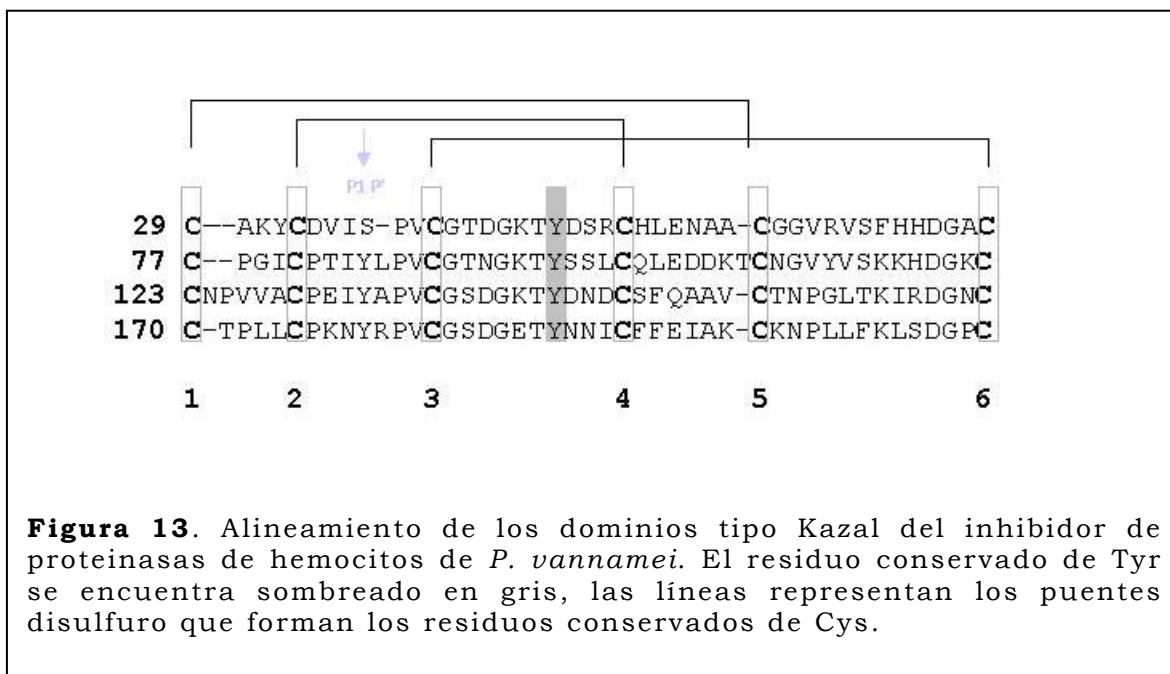
Adicionalmente, utilizando primers específicos, se demostró por RT-PCR que PvHm pCSP-01 es sintetizada exclusivamente en hemocitos (Fig. 10) y que sus niveles de expresión se mantienen después de la inoculación de *V. alginolyticus*, como se demostró por PCR del cDNA de hemocitos obtenidos a diferentes tiempos (Fig. 10). No obstante, por su localización y similitud con otras SP descritas en invertebrados, es altamente probable que esta proteína se encuentre involucrada en algún proceso de la respuesta inmune del camarón.

Inhibidor tipo Kazal

El clon número 282 del banco de genes de hemocitos estimulados, identificado como inducido por la técnica de macroarreglos, el inserto contenido en este clon fue secuenciado utilizando los primers que flanquean al vector. La secuencia de 1002 nucleótidos presenta un ORF de 681 nucleótidos, un 5'-UTR de 82 nucleótidos y un 3'UTR conteniendo una cola de poli (A). Sin embargo, la secuencia tenía algunas ambigüedades y fue necesario utilizar primers específicos para obtener su secuencia completa (1324 pb), como se indica en la estrategia de secuenciación presentada en la figura 11. La secuencia nucleotídica codifica para un polipéptido de 227 residuos con una masa molecular de 24.1 kDa, y pI de 8.12 (Fig. 12).







Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) se predijo que el rompimiento del péptido señal ocurre entre Gly 23 y Glu 24, originando una proteína madura de 21.7 kDa (204 aminoácidos) conteniendo 4 dominios Kazal (Fig. 13).

Comparaciones utilizando BLASTN mostraron que la secuencia tiene una identidad con EST's descritos para estos inhibidores Kazal en *P. setiferus* (BE846612), *P. leniusculus* (BI018076) y *P. monodon* (AW600679). Usando el programa BLASTX y BLASTP la secuencia mostró similitud con un inhibidor de serin-proteinasas de *Procambarus clarkii* (AAQ22771), al inhibidor de proteinasas (PAPI I) de *P. leniusculus* (CAA56043) y al inhibidor tipo trombina de *Triatoma infestans* (AAK57342), como se observa en la figura 14.

El análisis de secuencia deducida de la proteína tipo Kazal de *P. vannamei* (PvHm-Kazal 01), reveló que los aminoácidos involucrados en la actividad inhibidora de proteinasas no están presentes en los dominios 1 y 2. Sin embargo, el dominio 3 tiene en su sitio activo, P1 Glu-P1' Ile, por lo que se considera inhibidor de subtilisina. Por su parte, el dominio 4 tiene P1 Lys-P1' Asn, por lo que posiblemente sea un inhibidor de tripsina (Fig. 13).

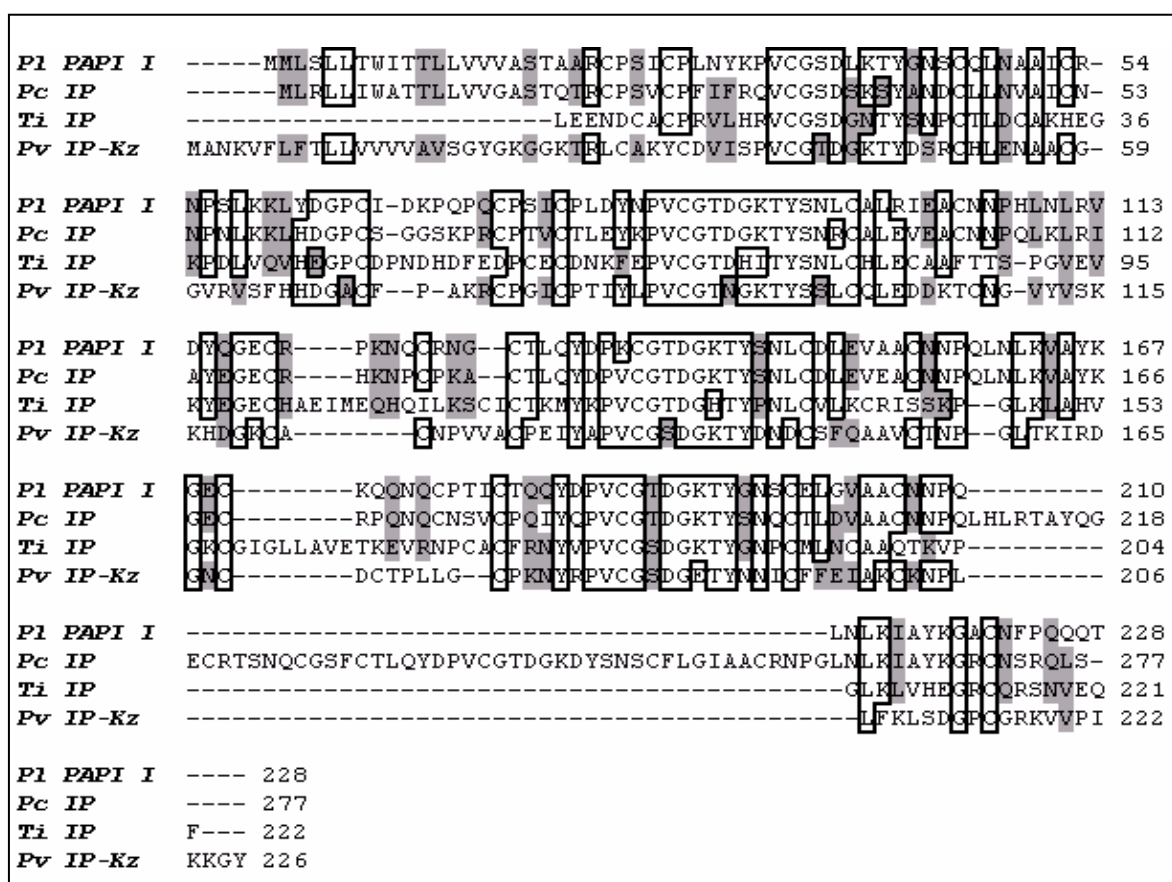
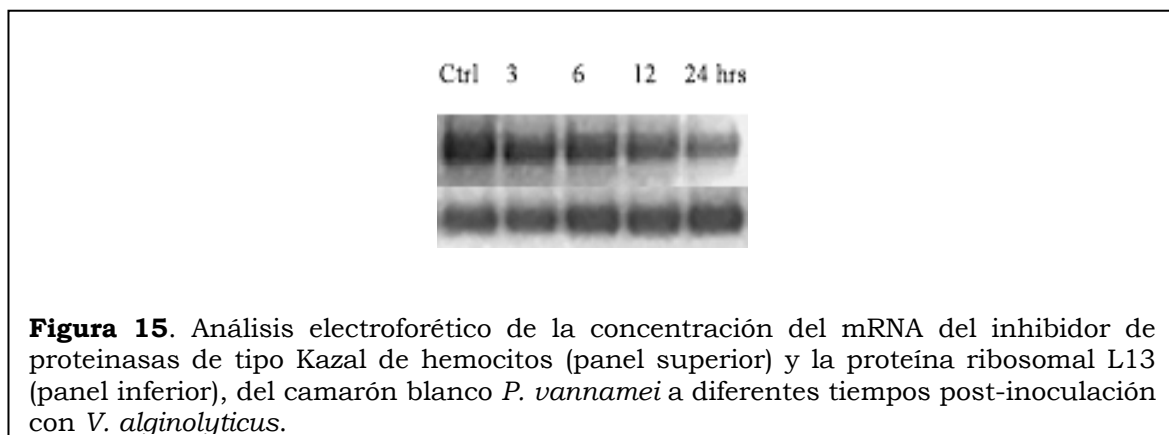


Figura 14. Alineamiento de secuencias de inhibidores Kazal. Se incluyen el inhibidor de proteinasas PAPI I de *P. leniusculus* (P1 PAPI I CAA56043), inhibidor de proteinasas de *P. clarkii* (Pc IP AAQ22771), inhibidor de tipo trombina de *T. infestans* (Ti AAK57342) e inhibidor de tipo Kazal de *P. vannamei* (Pv IP-Kz). Los aminoácidos idénticos se muestran en recuadros, los aminoácidos reemplazables se presentan sombreados.



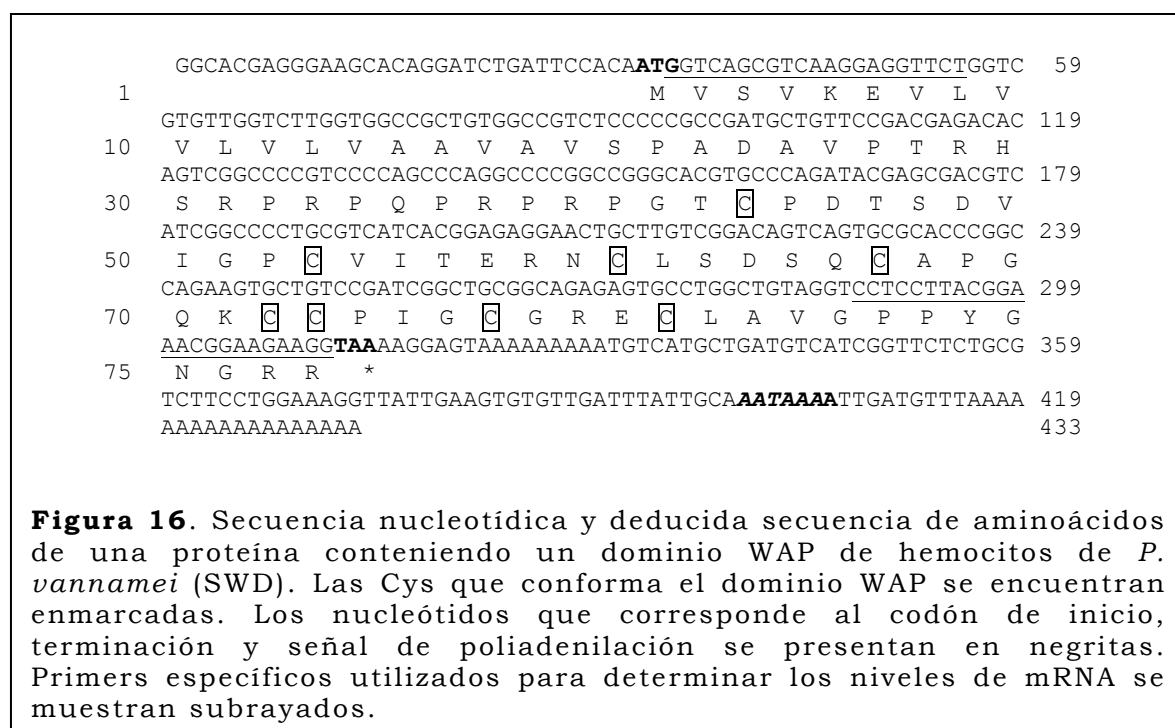
Estudios de expresión por RT-PCR utilizando cDNA de hemocitos inoculados a diferentes tiempos con *V. alginolyticus* y primers específicos, mostraron que la expresión de esta proteína disminuye 0.2 y 0.4 veces a las 12 y 24 h post-inoculación (Fig. 15), indicando su participación en la respuesta inmune del camarón.

Proteína conteniendo un solo dominio WAP (SWD)

El clon 131, detectado por macroarreglos como estimulado (Fig. 2), fue secuenciado por ambas cadenas. El clon conteniendo un inserto de 433 nucleótidos tiene un ORF continuo para un polipéptido de 93 residuos, un 5'-UTR de 54 nucleótidos y un 3'-UTR de 124 nucleótidos que presenta la típica señal de poliadenilación (AATAAA) (Proudfoot *et al.*, 2002) y cola de poli(A). La secuencia deducida corresponde a una proteína con peso molecular de 9.7 kDa y un pI de 8.34. Utilizando el programa SignalP

(Nielsen *et al.*, 1997), se predijo que la hidrólisis del péptido señal ocurre entre Ala24 y Val25, originando una proteína madura de 7.3 kDa (Fig. 16).

Utilizando BLASTN en el GenBank, se encontró alta similitud con EST's descritos como quelonianina en los peneidos *P. vannamei* (BE188608), *P. monodon* (AW600774) y *Marsupenaesus japonicus* (AU176270.1). Usando el programa BLASTX, la secuencia mostró similitud con quelonianina de la tortuga *Careta careta* (P00993) a proteína epididimal descritas en humanos (NP_852479), antileucoproteinasas ó SPLI (P03973) y elafin, un inhibidor de elastasa (2392716). Por BLASTP, la secuencia mostró alta similitud con la proteína KALI del síndrome de Kallmann reportada en *Danio rerio*



(AAF25779) la cual es homóloga a KAL-1 descrita en *B. mori* (AAL73339). Todas las proteínas que mostraron similitud contienen un dominio WAP, pero también contienen otro dominio.

El clon de *P. vannamei* contenía la secuencia del inserto codificante solamente para un dominio WAP, y una metionina que podía ser la inicial, por lo que era necesario confirmar que se trataba de un transcrito completo. Por Northern blot, se pudo determinar que el tamaño del transcrito corresponde al tamaño del inserto en el clon (aproximadamente 450 pb), como se puede apreciar en la figura 17. Además este tipo de mRNA se buscó en una genoteca de *P. monodon*, donde se pudo encontrar un clon con tamaño y secuencia similar (Fig. 18). De este modo, aparentemente proteínas conteniendo solo un dominio tipo WAP (SWD y SWD-Pm) parecen estar distr.-

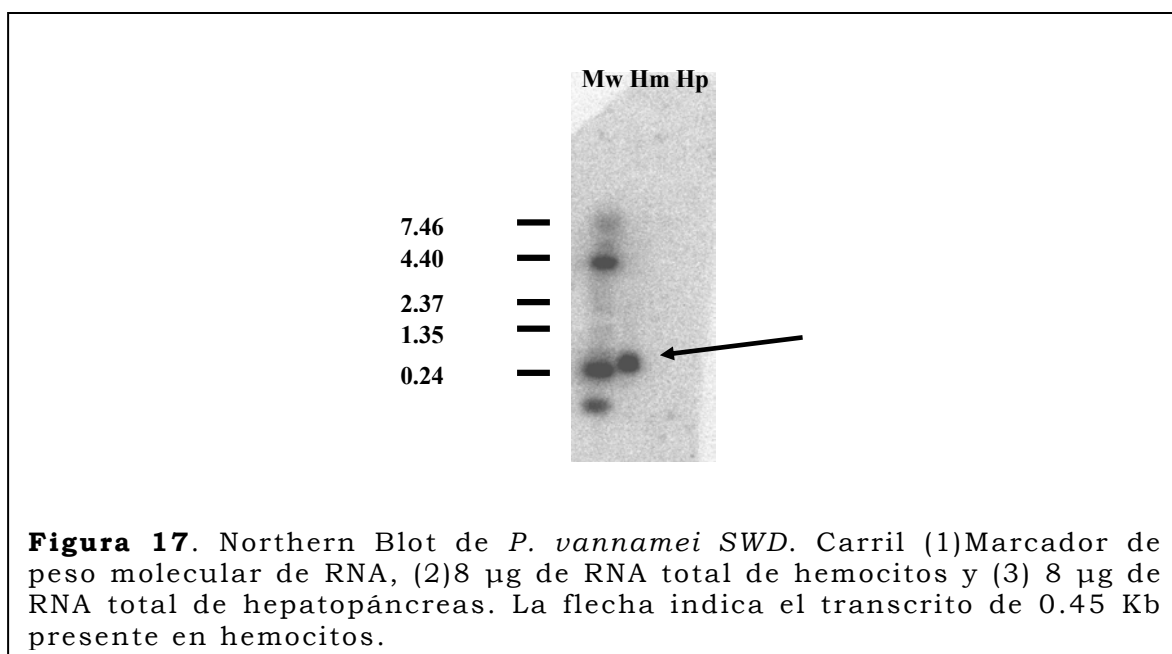
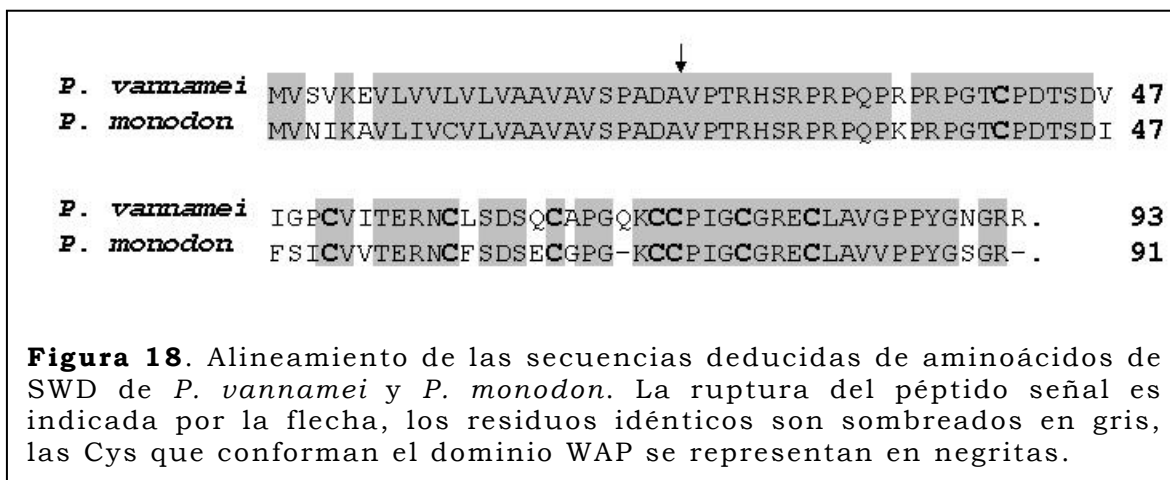
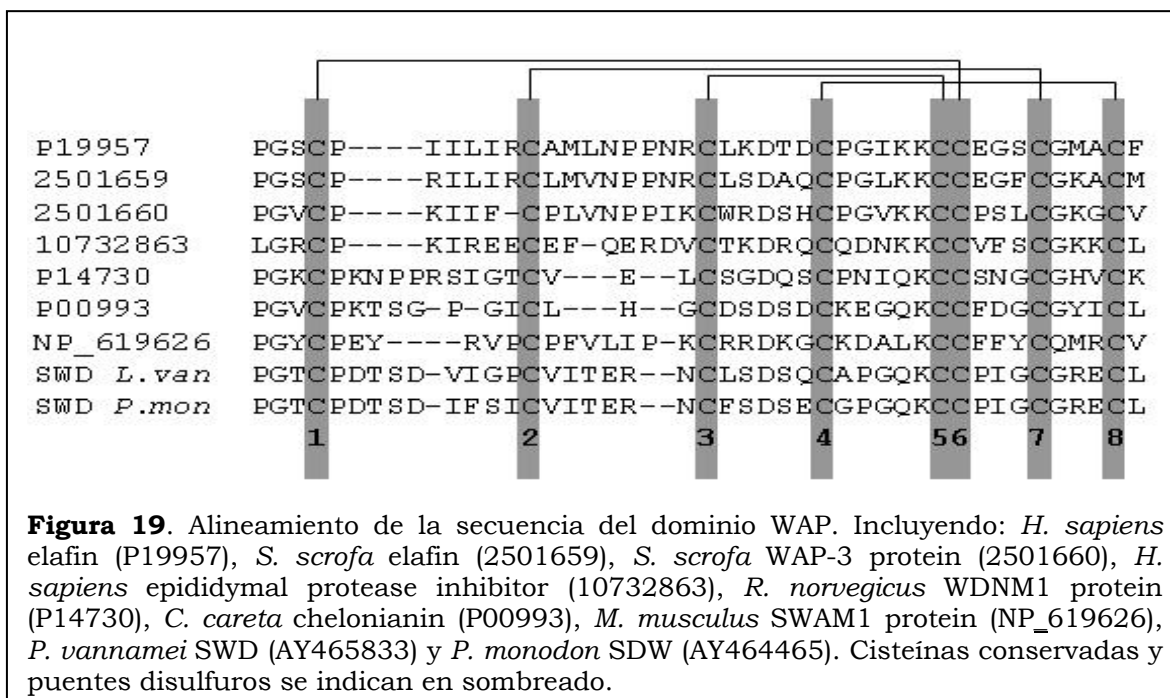
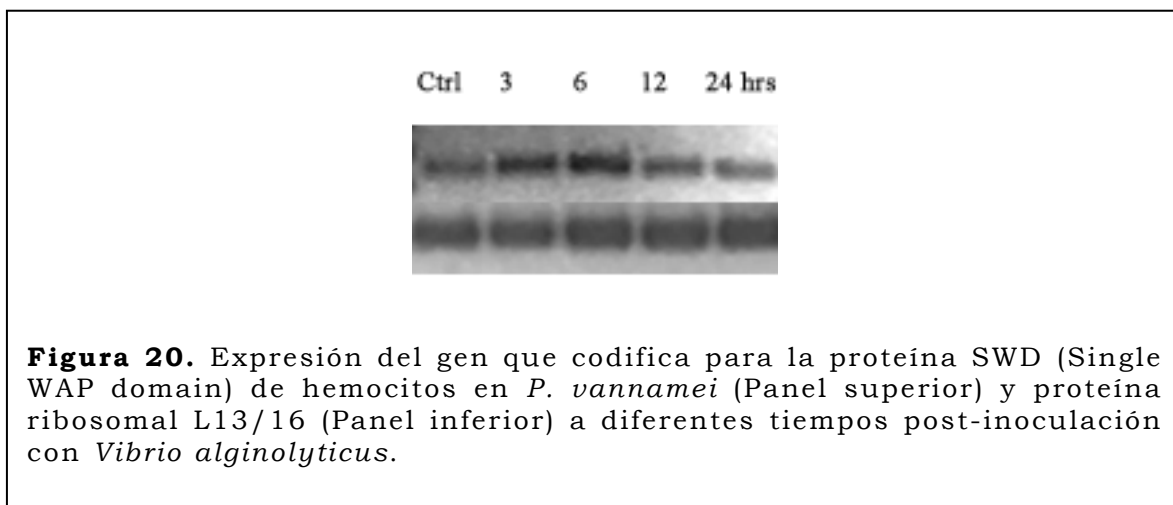


Figura 17. Northern Blot de *P. vannamei* SWD. Carril (1) Marcador de peso molecular de RNA, (2) 8 µg de RNA total de hemocitos y (3) 8 µg de RNA total de hepatopáncreas. La flecha indica el transcrito de 0.45 Kb presente en hemocitos.



buidas entre los peneidos. En la figura 19, se presenta un alineamiento de la SWD con otras proteínas conteniendo un dominio WAP: quelonianina en la tortuga *Careta careta* (P00993), proteínas ácidas de suero de humanos (NP852479), SPLI (P03973) y elafin (2392716).

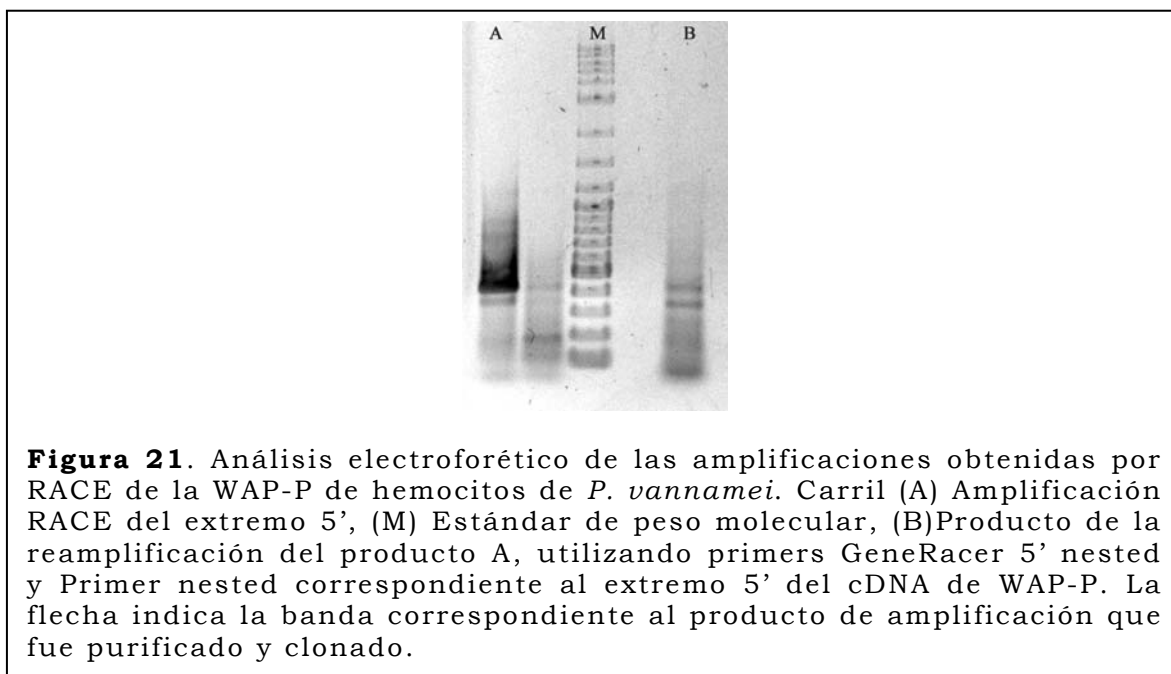




La actividad bioquímica de SWD de *P. vannamei* tendrá que ser investigada, aunque la proteína está relacionada con la respuesta inmune de camarón debido a que se detectaron cambios en su expresión, por RT-PCR, en hemocitos, con un aumento a 2 y 3 veces en sus niveles de mRNA después de las 3 y 6 h, y una disminución a 1.7 y 2 veces respectivamente a las 12 y 24 h post-inoculación con *V. alginolyticus*, con respecto al control (Fig. 20).

Proteína con dominio WAP (WAP-P)

El clon 152 conteniendo un inserto de 520 pb, fue detectado por macroarreglos como aparentemente estimulado por la inoculación de bacterias (Fig. 2). Por BLASTX, su secuencia mostró similitud con una proteína de vertebrados (CAD27771) conteniendo un dominio WAP. Considerando que el dominio WAP ha sido asociado a inhibidores de proteinasas, la secuencia del clon fue confirmada secuenciando la segunda cadena, alineándolas y, al no encontrar errores o ambigüedades, se definió la secuencia consenso.



Esta secuencia tiene un ORF continuo que codifica para un polipéptido de 76 residuos y un 3'-UTR de 299 pb, con la señal de poliadenilación (AATAAA) (Proudfoot *et al.*, 2002) y la típica cola poli(A). Sin embargo, el 5'-UTR, la metionina inicial y el péptido señal no fueron localizados en la secuencia del clon. Por 5'-RACE se obtuvieron 2 bandas de 0.2 y 0.5 Kb, respectivamente, como se muestra en la figura 21. Ambas bandas fueron clonadas, secuenciadas y analizadas, lo que permitió deducir la secuencia completa del transcrito, a través de la banda de 0.5 Kb, bajo la estrategia de secuenciación que se muestra en la figura 22.

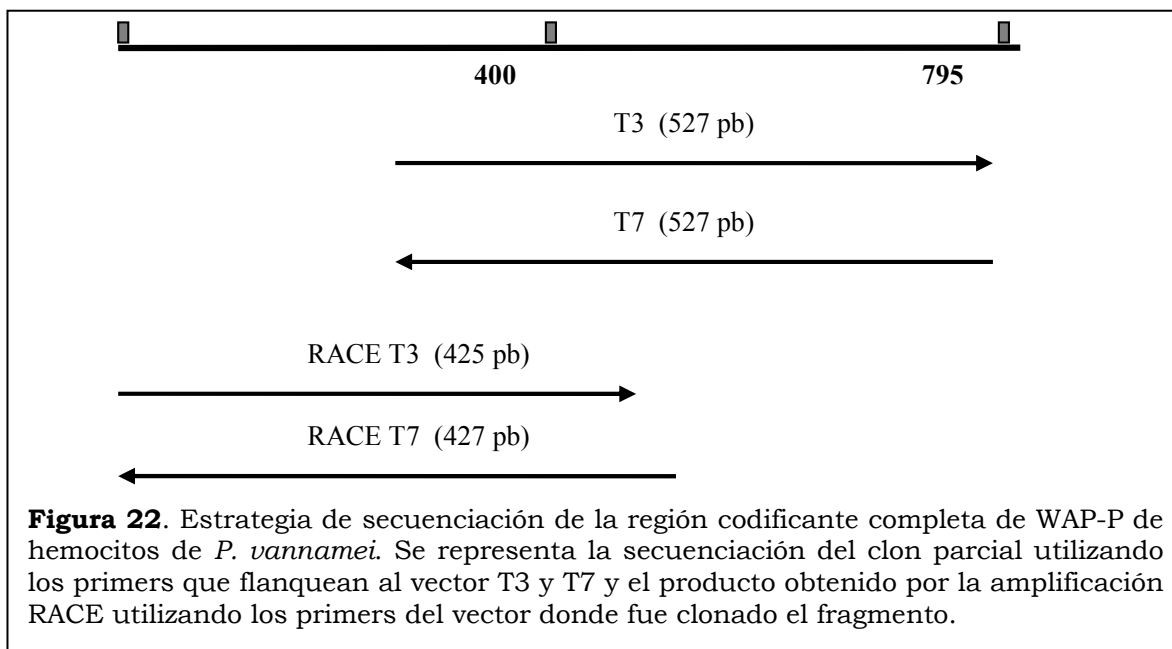


Figura 22. Estrategia de secuenciación de la región codificante completa de WAP-P de hemocitos de *P. vannamei*. Se representa la secuenciación del clon parcial utilizando los primers que flanquean al vector T3 y T7 y el producto obtenido por la amplificación RACE utilizando los primers del vector donde fue clonado el fragmento.

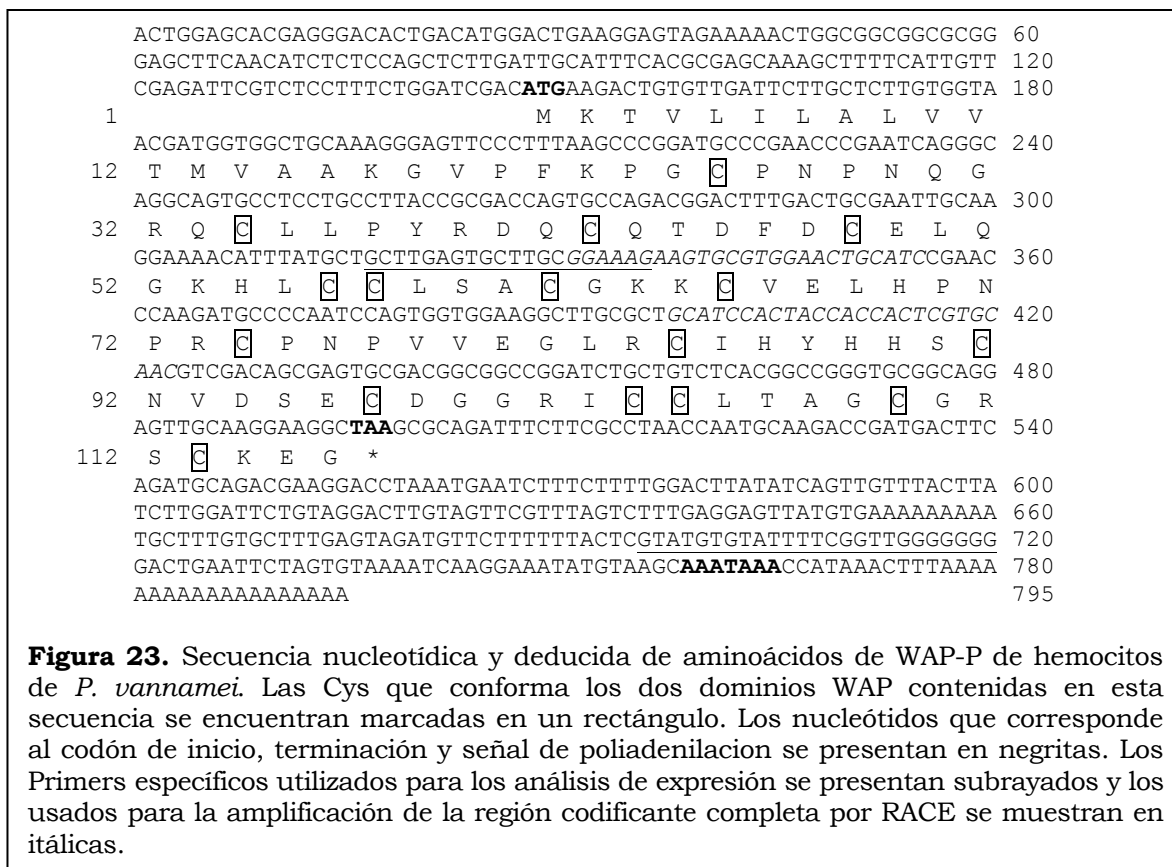
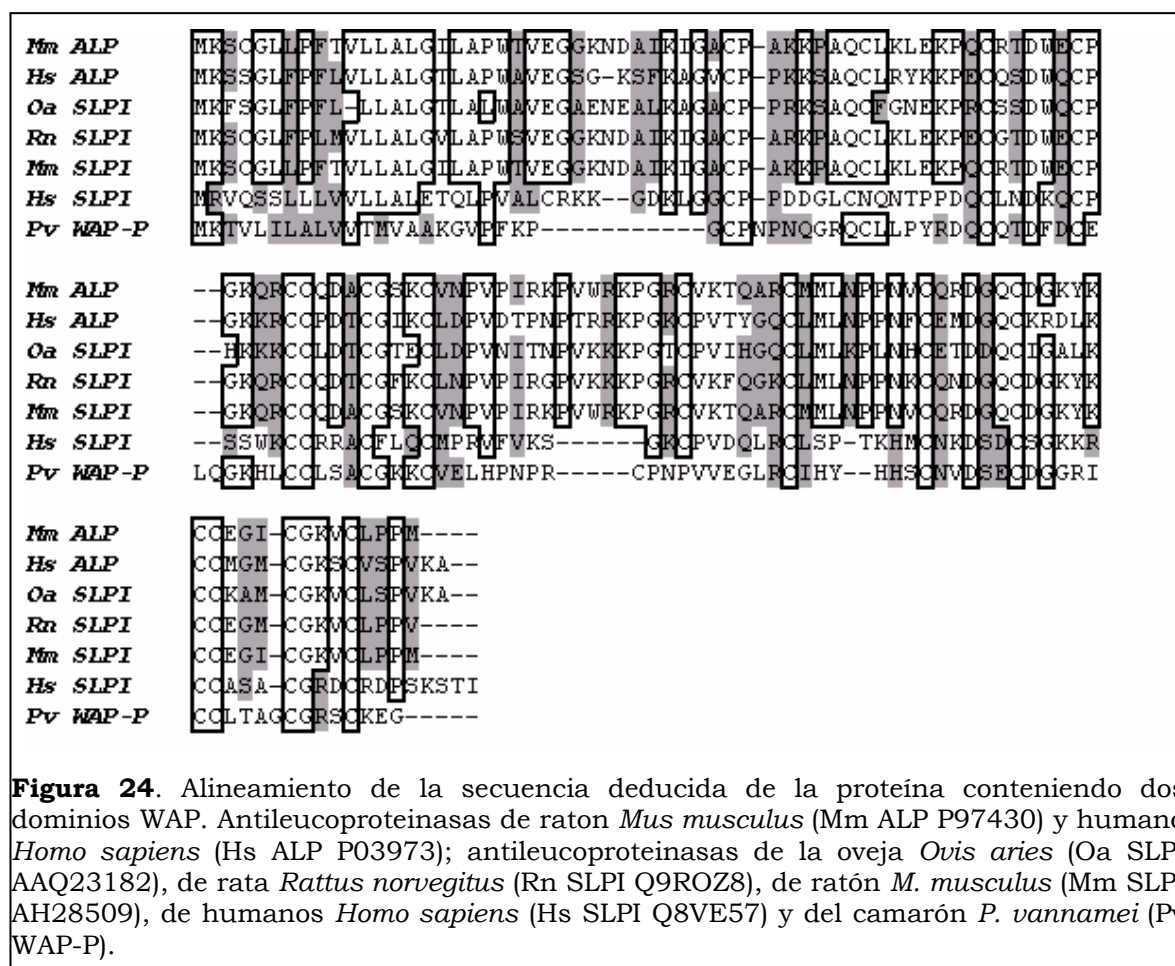
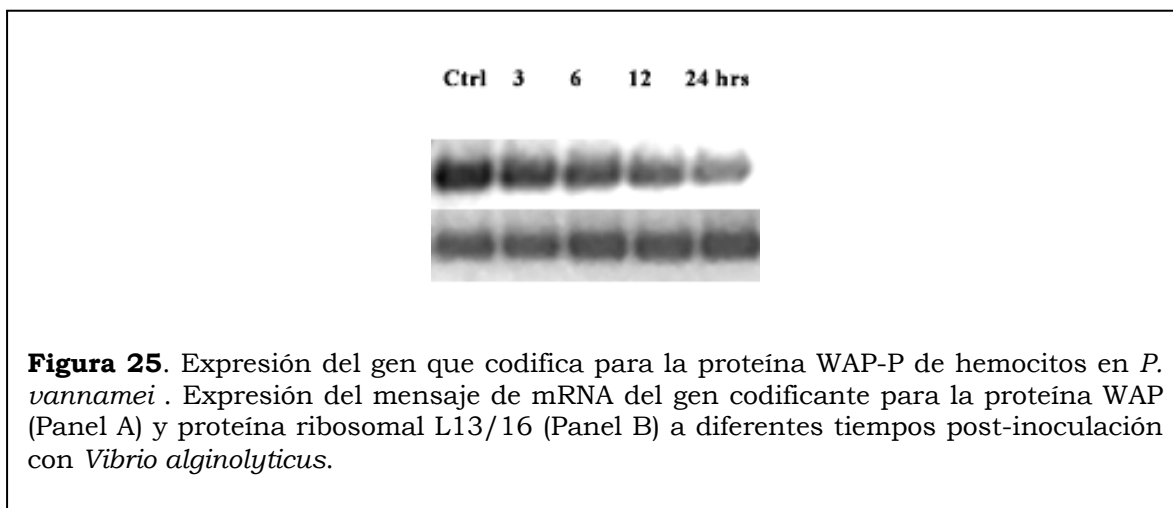


Figura 23. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de WAP-P de hemocitos de *P. vannamei*. Las Cys que conforma los dos dominios WAP contenidas en esta secuencia se encuentran marcadas en un rectángulo. Los nucleótidos que corresponde al codón de inicio, terminación y señal de poliadenilación se presentan en negritas. Los Primers específicos utilizados para los análisis de expresión se presentan subrayados y los usados para la amplificación de la región codificante completa por RACE se muestran en itálicas.

El ORF contiene la información para un polipéptido de 117 residuos, con una masa molecular estimada de 12.58 kDa (Fig. 23). El corte del péptido señal fue predicho entre los residuos Ala 16- Lys 17, obteniendo una proteína madura de 10 kDa (100 aminoácidos). La secuencia consenso fue comparada por BLASTX en la base de datos del NCBI, donde se confirmó su similitud con proteínas que contienen dominios de tipo WAP: antileucoproteinasas de ratón *Mus musculus* (P_97430), una antileucoproteinasa (SLPI) de humanos (P_03943) y una SLPI de rata *Rattus norvegicus* (Q9R0Z8)





(Fig. 24). Por ello, el producto de este clon fue designado como una proteína WAP (WAP-P), la cual contiene dos dominios WAP que mantienen su estructura altamente conservada.

Para confirmar la diferencia de expresión observada por macroarreglos, se utilizó RT-PCR. Los primers específicos fueron diseñados en base a la secuencia consenso obtenida durante la secuenciación de ambas cadenas. Por este método se determinó que la expresión de WAP disminuye a las 12 y 24 h (Fig. 25). Lo anterior indica que esta proteína podría tener un papel importante en el sistema de defensa del camarón.

Discusión

Los arreglos moleculares constituyen una metodología basada en la inmovilización en vidrio ó membranas de nylon, de un conjunto de secuencias de DNA o cDNA, generalmente construido con la finalidad de estudiar los genes o transcritos expresados ante un tratamiento específico o una determinada etapa de desarrollo (Rast *et al.*, 2000). Estos arreglos han sido utilizados para elucidar la cinética de expresión de mRNA y para identificar nuevos genes. Además, la información obtenida a través de esta metodología ha sido muy útil para caracterizar complejos biológicos y procesos durante la transcripción (Miller *et al.*, 2002).

En términos generales, esta herramienta permite conocer el papel funcional de diferentes genes que participan en un proceso, sus interacciones y las variaciones en sus niveles de expresión en diferentes tipos de células, estados fisiológicos o de desarrollo, así como la respuesta a la presencia de patógenos a tratamientos con fármacos (Brazma y Vilo, 2000). Por ejemplo, esta técnica fue utilizada para la búsqueda específica de genes expresados en el estado embrionario del erizo de mar *S. purpuratus* (Rast *et al.*, 2000) o para definir los genes específicos en estado larval y pupa en el mosquito *A. aegypti* (Krebs *et al.*, 2002).

La técnica de macroarreglos se implementó en nuestro modelo de estudio como base para la identificación y análisis de expresión de genes relacionados con el sistema inmune. Aunque es una técnica sencilla y sensible, todos los pasos del proceso deben ser cuidadosamente verificados. La calidad y validez de los resultados en esta técnica, depende de factores como la cantidad de DNA inmovilizado, la calidad del RNA utilizado para la síntesis de la sonda y la eficiencia de marcaje (Burgess, 2001), además de la hibridización no-específica de la sonda. Por ello, algunos autores (Lopez y Pluskal, 2003) han recomendado la confirmación de los resultados por PCR.

Utilizando macroarreglos se hizo un screening de la genoteca de hemocitos de camarón inoculados con *V. alginolyticus*, donde se pudo detectar que el 8% de los clones fueron, aparentemente, estimulados y el 4.7% reprimidos. Estos clones fueron secuenciados utilizando inicialmente el primer del vector T3, lo que permitiría conocer si el clon estaba completo. Las secuencias del inserto se compararon por BLASTN contra la base de datos Others-EST y nr (non-redundant) del GenBank. La comparación con la base others-EST se hizo con la finalidad de reducir el tiempo de búsqueda ya que se excluyen los ESTs de humanos (>5 millones) y ratón (casi 4 millones), a la vez que se hace más específica para organismos evolutivamente cercanos como vertebrados inferiores e invertebrados. La comparación en la base de datos nr se hizo solamente para aquellas secuencias

que no mostraron similitud en la base others-EST. En caso de no encontrar similitud adecuadas ($E < 10^{-10}$) o para confirmar las encontradas por BLASTN, se realizó la comparación por BLASTX utilizando la base de datos nr (GenBank CDS, translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF). Debido a que el banco de genes fue construido direccionalmente, solamente se consideraron los ORFs positivos cuando la secuenciación se realizó utilizando el primer T3 y los ORFs negativos cuando se utilizó la secuencia de la cadena complementaria obtenida con el primer T7.

Dentro de los genes que modificaron su expresión por la inoculación de *V. alginolyticus*, se identificaron ESTs correspondientes a 1) efectores de la respuesta inmune (crustin, factor anti-LPS, profenoloxidasa y transglutaminasa), 2) proteínas del citoesqueleto y probablemente involucradas en la movilidad celular, fagocitosis y exocitosis (factor de despolimerización de actina, profilina y timosina), 3) proteínas involucradas en la síntesis de proteínas (factor de elongación 1-alfa, ubiquitina y proteínas ribosomales), 4) varias enzimas cuya participación en el sistema inmune no ha sido definida (oxido-reductasas, quinasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, proteína de la seda, amidasa y tirosinasa), 5) así como serin-proteinasas e inhibidor de proteinasas cuya identidad y participación en la respuesta inmune del camarón se discuten a continuación.

En los artrópodos, la activación del sistema proFO, como un mecanismo de defensa contra agentes patógenos y parásitos, requiere una serie de reacciones en cascada de serin-proteinasas (Söderhäll *et al.*, 1990; Söderhäll *et al.*, 1994; Söderhäll y Cerenius, 1998). En este trabajo dentro de los clones de una genoteca de hemocitos del camarón blanco, se detectaron dos cDNA codificantes de este tipo de proteínas. Ambas serin-proteinasas poseen una secuencia característica de unión al sustrato Asp, Gly y Gly presente en la tripsina (Kraut, 1977; Graf *et al.*, 1988), lo que hace suponer que tienen una especificidad similar. Sin embargo una de ellas, llamada SPH-01, no contiene la serina típica perteneciente a la tríada catalítica, por lo que su actividad proteolítica es cuestionable; sin embargo, aún se encuentra en estudio. La segunda fue llamada pCSP-01, porque el dominio clip, característico de las SP de hemocitos de artrópodos, se encuentra incompleto y ha sido definido como pseudoclip. Este tipo de modificaciones han sido detectadas en serin-proteinasas de otros artrópodos (Ross *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003), por lo que es probable que tengan un papel importante dentro del sistema inmune del camarón blanco. Así también, se encontró un clon (# 282) codificante para un inhibidor tipo Kazal y dos proteínas que contienen el dominio WAP (clones #131 y #152), el cual ha sido asociado con inhibidores de proteinasas, pero también con actividad antibacteriana.

Serin proteinasa homóloga (PvHm SPH-01)

El clon 158, de la genoteca de cDNA de hemocitos inoculados con *V. alginolyticus*, contiene un inserto que codifica para un SP. El dominio SP, detectado durante los análisis por BLAST, contiene la región “pocket” (Asp, Gly y Gly) y contiene dos de los tres residuos catalíticos: His y Asp. Sin embargo la serina, esencial para la catálisis, ha sido sustituida por glicina, como puede observar en la figura 5. El remplazo del residuo catalítico ha sido descrito y caracteriza a las serin-proteinasas homólogas (SPH), las cuales carecen de actividad proteolítica (Jiang y Kanost, 2000; Yu *et al.*, 2003). Sin embargo, las SPH pueden ser necesarias para la transformación de proFO en FO, como se ha descrito en *M. sexta* (Yu *et al.*, 2003). De igual forma, una SPH con secuencia similar a la proteína masquerade de *D. melanogaster* es necesaria para la activación de proFO por PAP en escarabajos (Lee *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2000) o el factor de activación de la proPO (PPAF-II), una SPH que sirve como cofactor para que la serin-proteinasa PPAF-I activadora la proFO (Kim *et al.*, 2002). Además, en invertebrados, las SPH están involucradas en la respuesta antimicrobiana en la cacerola de mar (Kawabata *et al.*, 1996), en el proceso de reconocimiento en el langostino (Huang *et al.*, 2000), la unión de músculos somáticos durante el desarrollo embrionario en mosca (Murugasu-Oei *et al.*, 1995), así como en reacciones de respuesta inmune en mosquito (Dimopoulos *et al.*, 1997). Por lo anterior, es altamente probable que la

SPH-01 participe en los mecanismos de respuesta de defensa, incluyendo procesos de coagulación, inducción de síntesis de péptidos antimicrobianos o una participación directa en la activación del sistema proFO de peneidos.

Adicionalmente, un aumento en los niveles de expresión del mRNA codificante de la SPH-01, fue detectado por RT-PCR en los hemocitos del camarón blanco, después de las 3 y 6 h de la inoculación con *V. alginolyticus*; con una disminución a las 12 y 24 h (Fig 6). Un patrón de expresión similar ha sido observado en la proteína de reconocimiento a péptidoglucano (PGRP) de *M. sexta*, donde los niveles de mRNA se incrementaron a las 2-8 h post-inoculación con bacterias (Zhu *et al.*, 2003). Por otra parte, modificaciones en la expresión de la proFO de *P. stylirostris* fueron detectadas después de 8 h, con una disminución de la expresión de las 12 a 32 h post-inoculación (Roux *et al.*, 2002). En *P. vannamei*, un incremento en la expresión de peneidina fue observado a las 48 y 72 h, después de una disminución a las 6 y 12 h (Muñoz *et al.*, 2002).

Además de los residuos de la triada catalítica y la región pocket, el dominio SP posee seis cisteínas, formando 3 puentes disulfuros (Cys 141-Cys 205, Cys 174-Cys 195 y Cys 215-Cys 236), siendo los dos últimos altamente conservados, así como las regiones conservadas que rodean los residuos

catalíticos TAAHC, DIAL y GDGGGP, lo cual confirma que se trata de una proteína homóloga a serin-proteinasas. Por último, las SP de hemocitos de invertebrados también poseen un dominio clip en su extremo-amino con funciones adicionales que son discutidas más adelante.

Pseudo-Clip Serin Proteinasa (pCSP-01)

Para obtener la secuencia completa de la segunda serin-proteinasa aislada de un banco de genes de hemocitos preparado por la Dra. Yepiz-Plascencia (pCSP-01) fue necesario utilizar primers específicos internos, diseñados a partir de la secuencia parcial obtenida con los primers T3 y T7. El clon conteniendo el inserto codificante para una serin-proteinasa de 323 aminoácidos, que muestra un dominio SP, un dominio clip incompleto y fue denominado pseudoclip serin-proteinasa ó pCSP-01. El dominio SP contiene los residuos His 127, Asp 175, Ser 268 que conforman la triada catalítica y el típico sitio de unión al sustrato caracterizado por los residuos Asp 262, Gly 291 y Gly 302. Estas secuencias motif características de la familia de las tripsinas, se encuentra altamente conservado en las serin-proteinasas de crustáceos. La Asp 262 tienen un papel importante en la especificidad en las tripsinas, ya que interacciona a través de fuerzas iónicas con los residuos Lys y Arg que realizan la activación del sitio de corte de los sustratos. Aunque las tripsinas y quimotripsinas se carac-

terizan por contener tres puentes disulfuro (Jiang y Kanost, 2000), en la pCSP-01 solamente se localizaron dos puentes disulfuro (Cys 240-Cys 256, Cys 264-Cys 295), aunque contiene todas las demás características estructurales de las serin proteinasas.

Una búsqueda en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLASTP, muestra que la secuencia deducida de PvHm pCSP-1, es muy similar a otras SP de hemocitos de artrópodos, principalmente de insectos: *D. melanogaster* (AAL90385, AAF47847, AAF56677), *B. mori* (BAB91156) y *A. gambiae* (CAB90818, EAA14160). También se observó alta similitud con proteinasas cuya función ha sido claramente definido, como son: el factor activador de la profenoloxidasa en *B. mori* (AAL31707), Factor III de la profenoloxidasa en *H. diomphalia* (BAC15604) y la enzima de coagulación de *T. tridentatus* (A23869).

Adicional al dominio SP localizado en el extremo carboxilo, las serin-proteinasa de hemocitos están caracterizadas por la presencia de un dominio amino-terminal denominado “clip”, el cual, es una secuencia de 37-55 aminoácidos conteniendo tres puentes disulfuro formando una estructura compacta. Ambos dominios, SP y clip, se encuentran unidos por un puente disulfuro adicional (Jiang y Kanost, 2000). Aunque la función del clip no se ha podido precisar, se ha propuesto en *D. melanogaster*

pueden estar asociado con la habilidad de regular la actividad de serin-proteinasas (Ross *et al.*, 2003). En el caso de la catepsina L (Carmona *et al.*, 1996) y convertasas PC1/3 (serin-proteinasas de la familia de las subtilisinas) (Boudreault *et al.*, 1998), se ha sugerido que el dominio clip actúa como un inhibidor de la misma proteínasa. Por otro lado, el arreglo tridimensional del dominio clip es similar al de las defensinas, por lo que se ha sugerido su papel antibacteriano (Jiang y Kanost, 2000; Yu *et al.*, 2003). De hecho, el dominio clip de la enzima activadora de la proFO del langostino ha sido clonado y su actividad antibacteriana demostrada (Wang *et al.*, 2001), sin embargo su papel en la molécula completa no ha sido confirmado.

Por otro lado, con excepción de las cisteínas, las secuencias del dominio clip parecen ser poco conservados, incluso frecuentemente se observan diferencias en distancias entre sus Cys. De hecho las distancias entre la Cys 3 y la Cys 4, se han propuesto para un sistema de clasificación (Jiang y Kanost, 2000; Yu *et al.*, 2003). Por otro lado, algunas serin-proteinasas de hemocitos contienen más de un dominio clip y el número de dominios no ha podido ser correlacionada con alguna función en particular. Por ejemplo en proteínas relacionadas con el sistema de coagulación, como el factor III activador de la proteína de coagulación y el precursor de la enzima de coagulación donde estructuralmente contienen 3 y 1 dominio

clip, respectivamente (Muta *et al.*, 1990). Así también, en proteínas relacionadas con el sistema proFO como EaproFO, el factor III activador de la proFO y masquerade, se presentan 2, 1 y 5 dominio clip, respectivamente (Sato *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002).

Adicionalmente, Ross y cols (Ross *et al.*, 2003) describieron en varias serin-proteinasas de *D. melanogaster* a un dominio clip incompleto, denominándolo dominio pseudoclip, que se encuentra. La pCSH-01 de *P. vannamei* contiene el pseudoclip y sirvió de sonda para su identificación en *P. monodon* (Jiménez-Vega *et al.*, 2003). Finalmente dentro de los pseudoclips existen diferencias muy importantes en su secuencia que podrían incluso afectar su estructura terciaria, lo cual dificulta delucidar su función. En el caso de la pCSP-01 de *P. vannamei*, no se observaron modificaciones en su expresión en respuesta a la presencia de la bacteria (Fig 11). No obstante, por su localización y similitud con otras SP descritas en invertebrados, es altamente probable que esta proteína se encuentre involucrada en la respuesta inmune del camarón.

Inhibidor tipo Kazal

El inserto contenido en el clon número 282 identificado como inducido por macroarreglos, fue secuenciado utilizando los primers que flanquea al vector; sin embargo, fue necesario utilizar primers específicos para resol-

ver la secuencia completa. El inserto presenta un ORF de 681 nucleótidos que codifica para una proteína madura de 204 aminoácidos, contiendo 4 dominios Kazal. Estos dominios se caracterizan por tener tres enlaces disulfuro altamente conservados, bajo el siguientes esquema Cys 1-Cys 5, Cys 2-Cys 4, Cys 3-Cys 6. Aunque se han descrito proteínas que contienen un solo dominio Kazal, la mayoría contiene varios dominios, pero no todos tienen capacidad inhibitoria (Laskowski y Kato, 1980). En vertebrados, los inhibidores Kazal característicamente son almacenados como zimógenos en gránulos y secretados en jugos pancreáticos (Stephen *et al.*, 2001). Por su parte en invertebrados, este tipo de inhibidores se han encontrado en el hepatopáncreas y forma parte de la batería bioquímica digestiva (Hernández-González, 2003) y en los hemocitos donde su papel se ha relacionado con la regulación de las proteinasas del sistema inmune (Kanost, 1999). En el langostino de agua dulce *P. leniusculus*, se ha descrito un cDNA que codifica para una proteína monomérica de 23 kDa, que contiene cuatro dominios Kazal típicos y con la capacidad de inhibir quimotripsina (Johansson *et al.*, 1994). Los dominios de esta proteína han sido clasificados como tipo no-clásico debido a la longitud de la secuencia presente entre sus Cys: pocos aminoácidos entre las Cys 1 y Cys 2, así como entre las Cys 5 y Cys 6; pero una extensión entre Cys 4 y Cys 5. Por su localización dentro de los gránulos secretorios y su liberación durante la activación del sistema proFO, se considera que en *P. leniusculus*, esta proteína puede además

funcionar como inhibidor de proteinasas microbianas (Johansson *et al.*, 1994). En la chinche besucona *Dipetalogaster maximus*, se ha descrito una proteína de 344 aminoácidos conteniendo tres dominios Kazal con capacidad de inhibir trombina, actuando como un anticoagulante durante los mecanismos de absorción y digestión sanguínea (Mende *et al.*, 1999).

Analizando la secuencia deducida del inhibidor Kazal detectado en hemocitos de *P. vannamei* (PvHm-Kazal I), se pudo predecir que los dominios 1 y 2 (numerados a partir del extremo-NH₂) no tienen los residuos requeridos para la actividad inhibidora. Por su parte, el dominio 3 tiene la secuencia P1 Glu-P1' Ile, por lo que aparentemente tiene la capacidad de inhibir subtilisina mientras que el cuarto dominio, con la secuencia P1 Lys-P1' Asn, parece ser un inhibidor de tripsina (Laskowski y Kato, 1980).

Si bien se ha aceptado que los inhibidores de proteinasas participan manteniendo los niveles de la actividad proteolítica dentro de parámetros fisiológicos, esto es muy difícil de comprobar *in vivo*. Por otro lado, demostrar su capacidad inhibitoria *in vitro*, tampoco es suficiente ya que debe comprobarse que son capaces de bloquear específicamente las proteinasas generadas durante la respuesta inmune. En una forma indirecta, en este trabajo se demostró que la expresión del gen de la Kazal-1 de hemocitos del camarón blanco se modifica después de la inoculación

de *V. alginolyticus*. Aunque el significado clínico y fisiológico de este fenómeno no fue dilucidado se presenta la evidencia de que esta proteína Kazal es modificada durante un reto bacteriano.

Inhibidores WAP

Otros inhibidores de proteinasas han sido descritos entre los artrópodos; sin embargo, en camarón existen pocos reportes sobre este tipo de proteínas. Recientemente un inhibidor del tipo α_2 -macroglobulina con capacidad de inhibir diferentes tipos de proteinasas incluyendo tripsina, quimotripsina, elastasa y papaina ha sido reportado (Gollas-Galván *et al.*, 2003). El estudio de genes involucrados en la respuesta inmune se ha acelerado recientemente gracias a la descripción de EST. Sin embargo, el uso de los macroarreglos permite el estudio de los cambios en los niveles de mRNA, identificando genes co-regulados ante la presencia de un estímulo, permitiendo definir las vías activadas y su regulación. Hasta ahora, este es el primer estudio de genómica funcional en camarón, donde además se detallan características estructurales de las proteínas que son codificadas por los genes caracterizados como estimulados. Esto permite asegurar la participación de tales proteínas en la respuesta inmune del camarón, demostrada por macroarreglos y confirmada por RT-PCR, y la presencia de nuevas estructuras que

ampliarán el horizonte en la búsqueda de inmunoproteínas y la comprensión de la respuesta inmune de invertebrados.

En el presente estudio se describen dos proteínas conteniendo el dominio WAP y su posible función como inhibidores de proteinasas. Además, queda demostrada su participación en el sistema inmune, al observarse cambios en las concentraciones de mRNA durante la respuesta a la inoculación de *V. alginolyticus*.

Se detectaron y estudiaron dos clones (# 131 y # 152) que codifican para proteínas que contienen el dominio WAP. Estructuralmente, el dominio WAP lo forman 45-50 aminoácidos, incluyendo 8 residuos cisteínas que forman 4 puentes disulfuros, los cuales conforman el 4-DSC (four disulfide core) que proporciona una estructura molecular estable (Ranganathan *et al.*, 1999; Schalkwijk *et al.*, 1999; Hagiwara *et al.*, 2003). A partir de un detallado análisis de las secuencias, Ranganathan (1999) ha propuesto que el dominio WAP tiene la siguiente fórmula: C1-(Xn)-C2-(Xn)-C3-(X5)-C4-(X5)-C5-C6-(X3, X5)-C7-(X3,X4)-C8, la cual sirve como base para su identificación.

En base a su funcionalidad y el tejido de origen, las proteínas conteniendo el dominio WAP han sido agrupadas en familias, incluyendo las antileuco-

proteinasas (Heinzel *et al.*, 1986), inhibidor de elastasa (Elafin) (Wiedow *et al.*, 1990), proteínas específicas de tipo epididimal (Kirchhoff *et al.*, 1991) y ovulatorio (Garczynski y Goetz, 1997). El dominio WAP puede tener la capacidad de inhibir serin-proteinasas o de presentar actividad antibacteriana (Torres *et al.*, 2003). En algunas proteínas se han detectado ambas actividades, pero estas radican en diferentes dominios WAP. Por ejemplo, el dominio WAP del extremo amino de la antileucoproteinasas humana presenta actividad anti-tripsina; mientras que la actividad anti-elastasa y anti-quimotripsina están localizadas en el dominio carboxilo-terminal (Kramps *et al.*, 1990). El dominio WAP, puede ser detectado en proteínas de mayor tamaño que contienen otro dominio. Por ejemplo, la queloniana contiene adicionalmente un dominio de tipo Kunitz (Kato y Tominaga, 1979), las proteínas trappin tienen un dominio denominado cem (Schalkwijk *et al.*, 1999) y proteína KAL-1 que contiene un dominio fibronectina (Hu *et al.*, 2003).

En general las proteínas con dominio WAP, contienen otros dominios, incluyendo otro WAP. Recientemente se reportaron en ratón las primeras proteínas conformadas solamente por un dominio WAP. Estas proteínas (SWAM1 y SWAM2) están estrechamente relacionados y poseen actividad antibacteriana, demostrada experimentalmente (Hagiwara *et al.*, 2003).

Proteína conteniendo un solo dominio WAP (SWD)

Una secuencia de cDNA codificando para una proteína conteniendo un dominio de tipo WAP, fue aislada y secuenciada completamente por ambas cadenas utilizando los primers que flanquean al vector. Comparaciones nucleotídicas, utilizando BLASTN, mostraron identidad con EST's descritos como quelonianina en peneidos: *P. vannamei* (BE188608.1), *P. monodon* (AW600774) y *M. japonicus* (AU176270.1). Por otro lado, usando el programa BLASTX, la secuencia mostró similitud con la quelonianina de la tortuga *Careta careta* (P00993), a proteínas descritas en humanos como: proteína epididimal (NP_852479), antileucoproteinasas ó SPLI (P03973) y elafin, un inhibidor de elastasa (2392716). Por BLASTP, la secuencia mostró alta similitud con la proteína del síndrome de Kallmann reportada in *Danio rerio* (AAF25779) la cual es homóloga a KAL-1 descrita en *B. mori* (AAL73339). Ambas proteínas contienen un dominio WAP, pero también contienen el dominio tipo III de fibronectina.

La secuencia del clon, aparentemente, contiene la región codificante completa, con la metionina inicial y una región hidrófoba con todas las características del péptido señal; lo que sugería que no poseía otro dominio. Como se mencionó anteriormente, con excepción de las proteínas de ratón SWAM1 y SWAM2, el dominio WAP se encuentra en proteínas que contienen otro dominio, incluyendo un segundo dominio WAP. Por lo tanto

para comprobar que el mensaje estaba completo se utilizó Northern Blot y como puede apreciarse en la Fig 17, se determinó que el mensaje es de aproximadamente 450 nucleótidos, confirmando que el clon representa un transcrito completo para una proteína que contiene solamente un dominio WAP. Aunque esta proteína, estructuralmente parece ser similar a las SWAM de ratón (Hagiwara *et al.*, 2003), en ausencia de evidencias que indiquen homología con la proteína encontrada en hemocitos de *P. vannamei*, esta última ha sido llamada SWD (Single WAP Domain) y constituye el primer reporte en invertebrados, de una proteína formada únicamente por un dominio WAP. Adicionalmente, proteínas conteniendo solo un dominio tipo WAP parecen estar distribuidas entre los peneidos, ya que una proteína similar (SWD-Pm) también fue detectada en *P. monodon* (Jiménez -Vega *et al.*, 2004). Algunos EST que se encuentran registrados como quelonianinas de peneidos en el GenBank, ante esto y por la similitud de la secuencia es probable que corresponda a SWD de peneidos.

La capacidad de inhibir proteinasas ha sido demostrada en algunas proteínas conteniendo el dominio WAP; sin embargo, en otros casos, dicha actividad ha sido propuesta en base a la secuencia de su sitio activo (Ota *et al.*, 2002). Además, en algunas proteínas los aminoácidos de la secuencia inhibitoria se encuentran sustituidos por aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos, lo cual sugiere que la actividad inhibitoria de proteinasas se

ha perdido (Alia *et al.*, 2002). Sin embargo, esta sustitución proporciona a la proteína características anfipáticas importantes para presentar actividad antibacteriana (Zasloff, 2002; Hagiwara *et al.*, 2003); pero la deducción de la actividad antibacteriana, a partir de la secuencia, no es fácil ni confiable, por lo que deberá ser demostrada.

Aunque la actividad bioquímica de SWD de *P. vannamei* no fue establecida la secuencia entre Cys 2 y Cys 3, es muy similar a la secuencia encontrada en la SWAM de ratón, con actividad antibacteriana demostrada (Hagiwara *et al.*, 2003), por lo que podría esperarse una actividad similar. Por otro lado, la proteína SWD está relacionada con la respuesta inmune de camarón debido a que cambios en la expresión fueron detectados por RT-PCR en hemocitos, con un aumento después de las 3 y 6 h, recuperándose a niveles como los observados en el control a las 12 y 16 h post-inoculación con *V. alginolyticus* (Fig 21).

Proteína tipo WAP (WAP-P)

Otra secuencia codificante para una proteína conteniendo un dominio WAP, también fue detectada dentro de los clones de la genoteca de hemocitos del camarón blanco. La secuencia deducida, de 76 residuos, contiene 13 Cys, 8 de ellas constituyendo un dominio WAP y las 5 restantes aparentemente forman parte de un segundo dominio WAP. Este supuesto,

fue confirmado al obtener la secuencia completa utilizando RACE. La proteína, producto de este gen, tiene dos dominios WAP, el primero de ellos comprendido entre la Cys 25 y la Cys 66; y el segundo entre la Cys 71 y la Cys 114. Al igual que la anti-leucoproteinasa y otras proteínas que contienen dos dominios WAP, en la WAP-P de camarón uno de ellos parece ser inhibidor de proteinasas y otro tener actividad antibacteriana. El dominio WAP-NH₂ tiene entre la Cys 2 y Cys 3, la secuencia LLPYRDQ. La presencia de tirosina y aspártico es compartida con los WAP anti tripsina. Por otro lado, este motif es muy similar a la secuencia inhibitoria de las proteínas Kazal (TLEYRPL), teniendo el LE como punto de inhibición. Por su parte, el dominio WAP-COOH contiene seis Histidinas entre el Cys 2 y Cys 3, lo que sugiere una actividad antibacteriana. Esta secuencia es similar a los péptidos aislados de secreciones de la piel de la rana y en proteínas de ratón SWAM1 y SWAM2, las cuales poseen actividad antibacteriana y hemolítica (Ali *et al.*, 2002; Hagiwara *et al.*, 2003).

Independientemente de su actividad, el clon conteniendo el inserto codificante a esta proteína presentó diferentes niveles de expresión, cuando fue analizado por macroarreglos. Estas variaciones fueron confirmadas por RT-PCR donde se observó una reducción en los niveles de mRNA a las 6, 12 y 24 h después de la inoculación de *V. alginolyticus* (Fig 25). Este tipo de modificación en la expresión de genes ha sido descrito en proFO de *P.*

stylirostris, observando una disminución a las 12-32 h post-inoculación (Roux *et al.*, 2002). Por otro lado, aunque en vertebrados, las proteínas conteniendo el dominio WAP también han sido estimuladas; en ratón la síntesis de SLPI ha sido observada a los 60 min, después de la inoculación con LPS obteniendo una máxima expresión a las 24-36 h (Jin *et al.*, 1998). Aunque su papel en el sistema de defensa del camarón no ha sido confirmado, su localización, posible actividad bioquímica y modificaciones en su expresión apoyan la idea de que esta proteína conteniendo dos dominios WAP se encuentra involucrada en los mecanismos de defensa.

Discusión final

Los cDNAs correspondientes a dos serin-proteinasas y un inhibidor de proteínasa de tipo Kazal de hemocitos del camarón fueron caracterizados. Ambas serin-proteinasas parecen contener, además del dominio SP, un dominio clip, el cual es característico de serin-proteinasas de hemocitos de artrópodos. Ambas serin-proteinasas presentan algunas sustituciones y singularidades en la estructura, que permiten suponer la amplia diversidad de este tipo de proteínas involucradas en la activación de zimógenos de la respuesta inmune.

Por otro lado, tres proteínas deducidas fueron seleccionadas por su posible papel como inhibidores de proteinasas. Una de ellas es un inhibidor multi-

dominio Kazal típico y de acuerdo a su secuencia y estructura deducida, tiene capacidad de inhibir tripsina y subtilisina. Las otras dos proteínas poseen un dominio WAP, el cual ha sido asociado con inhibidores de proteinasas involucrados en la respuesta inmune de vertebrados. Una de estas proteínas está constituida únicamente por un dominio WAP, siendo la primera proteína de este tipo descrita en invertebrados y similar a la recientemente descrita en ratón (SWAM). La segunda proteína WAP, está constituida por dos dominios WAP, unos de ellos con posible actividad inhibidora de tripsina, mientras que el otro dominio tiene una posible actividad antibacteriana, en forma similar a la proteína aislada de leucocitos e involucrada en la respuesta inmune de vertebrados.

Aunque en algunos casos, será necesaria la confirmación de la actividad bioquímica de las proteínas codificadas en los clones de la genoteca de cDNA de hemocitos de camarón blanco, aún falta continuar con el análisis de otros clones, donde podrían encontrarse proteinasas y sus inhibidores. Esto permitiría tener una mayor idea de la diversidad de las proteinasas y sus inhibidores, involucrada en la respuesta inmune. Así mismo, el estudio completo permitiría crear relaciones filogenéticas para encontrar la homología y diferencias de la respuesta inmune entre vertebrados e invertebrados. Es claro que algunas proteínas parecen tener la misma localización, función y hasta estructura en ambos grupos animales, como

el caso de la antileucoproteína de vertebrados y la WAP-P descrita en camarón.

Por otro lado, la utilidad de una genoteca y su análisis por macroarreglos ha sido demostrada en el estudio de la respuesta inmune del camarón. Inoculaciones con otros patógenos o con inmunoestimulantes podrán ser evaluadas por este procedimiento, que ahora, después de la descripción de estos clones, facilitará la identificación de los genes activados. De este modo, se tendrá un acercamiento bastante preciso a los mecanismos desencadenados y los participantes de la respuesta inmune del camarón.

Conclusiones

- Se demostró experimentalmente que los hemocitos del camarón responden a la inoculación de bacterias, expresando diferentes genes, incluyendo los codificantes de serin-proteinasas y sus inhibidores.
- La presencia y participación en la respuesta inmune de una serin proteinasa (pCSP01) y una homóloga de serin-proteinasa (SPH) en peneidos ha quedado establecida. Sus características estructurales han sido definidas y, aunque posiblemente no tengan actividad proteolítica, las modificaciones en su expresión indican su papel en la respuesta a bacterias.
- Se aislaron clones que codifican para proteínas conteniendo dominios WAP, cuya expresión es modificada por la inoculación de bacterias. Una de las proteínas, SDW, constituye el primer reporte en invertebrados de proteínas que solamente contienen un dominio WAP.
- Se describe un transcrito codificante para un inhibidor Kazal, conteniendo cuatro dominios, cuyo análisis estructural predice que dos de sus dominios son funcionales y su expresión es modificada por inoculación de *V. alginolyticus*

Bibliografía

- Adams, D., M., Dubnick, M., Kerlavage, R., A., Moreno, F., R., Keller, M. Y., Utterback, R., T., Nagle, W., J., Fields, C. y Venter, C., J. 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Science*. 355: 632-634.
- Ali, M. F., Lipsb, R. K., Knoopc, C. F., Fritzscha, B., Millera, C. y Conlon, J. M. 2002. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1601: 55-63.
- Alia, M. F., Lipsb, R. K., Knoopc, C. F., Fritzscha, B., Millera, C. y Conlon, J. M. 2002. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1601: 55-63.
- Altschul, S. F., Gish, G., Miller, W., Myers, E. W. y Limpin, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Antuch, W., Berndt, K. D., Chavez, M. A., Delfin, J. y Wuthrich, K. 1993. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 212: 675-684.
- Armstrong, P. B. y Quigley, J. P. 1999. $\alpha 2$ -macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 375-390.
- Bacheré, E., Mialhe, E. y Rodriguez, J. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (bate) - prospects and applications. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 597-612.
- Battistella, S., Bonivento, P. y Amirante, G. A. 1996. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian J. Zool.* 63: 337-343.
- Bengt, A., Mitchell, S., Dushay. y Dan, H. 1995. Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the attacin A gene and the evolution of attacin like proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 511-518.
- Boudreault, A., Gauthier, D. y C., L. 1998. Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and hfurin. *J. Biol. Chem.* 273: 31574-31580.
- Brazma, A. y Vilo, J. 2000. Gene expression data analysis. *FEBS Lett.* 480: 17-24.
- Burgess, J. K. 2001. Gene Expression Studies Using Microarrays. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28: 321-328.

- Carmona, R., Dufour, E., Plouffe, C., Takebe, S., Mason, P., Mort, J. S. y Ménard, R. 1996. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine protease. *Biochemistry*. 35: 8149-8157.
- Chen, Y. L., Huang, S. H., Cheng, J. H. y Tsai, I. H. 1993. Relationship between hemolymph-coagulation and disease in shrimps: II. Purification and characterization of the hemolymph coagulogen of Penaeids. *Rep. Fish Dis. Res.* 40: 1-9.
- Cho, W.-L., Fu, Y.-C., Chen, C. C. y Ho, C.-M. 1996. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 395-402.
- Cho, W.-L., Fu, T.-F., J-Y, C. y Chen, C.-C. 1997. Molecular characterization of a defensin gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 351-358.
- Cominetti, M. R., Marques, M. R., Lorenzini, D. M., Lofgren, S. E., Daffre, S. y Barracco, M. A. 2002. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 715-21.
- Davis, C. A., Riddell, D. C., Higgins, M. J., Holden, J. J. A. y White, B. N. 1985. A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucleic Acids Res.* 13: 6605-6619.
- Destoumieux, D., Munoz, M. y Bachère, E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *CMLS.* 57: 1260-1271.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet, P., Comps, M. y Bachère, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113: 461-469.
- Dimopoulos, G., Richman, A., Muller, H. M. y Kafatos, F. C. 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 11508-11513.
- Dimopoulos, G., Casavant, T.L., Chang, S., Scheetz, T., Roberts, Ch., Donohue, M., Schultz, J., Benes, V., Bork, P., Ansorge, W., Soares, B.M., Kafatos, F.C. 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: Identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97: 6619-6624.
- Dodson, G. y Wlodawer, A. 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* 23: 347-352.
- Durliat, M. 1985. Clotting processes in crustacea decapoda. *Biol. Rev.* 60: 473-498.

- Felipe Ortega, F., X. 2000. Caracterización de secuencias nucleotídicas parciales (ESTs, STSs) de genes del camarón blanco *Penaeus vannamei*, obtenidos con oligonucleotídos para CP-VHDL. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Garczynski, M. A. y Goetz, F. W. 1997. Molecular characterization of a ribonucleic acid transcript that is highly up-regulated at the time of ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary. *Biol. Reprod.* 57: 856-864.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. y Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 117A: 419-425.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. y Vargas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 122B: 77-82.
- Gollas-Galván, T., Sotelo-Mundo, R., Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Requena, C. y Vargas-Albores, F. 2003. Purification and characterization of $\alpha 2$ -macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 134C: 431-438.
- Gómez-Gamez, A. I. 2003. Cambios en la expresión de mRNA en hemocitos del camarón blanco *Penaeus vannamei* inoculado con DEAE Sephadex y *Vibrio alginolyticus*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Gorman, M. J. y Paskewitz, S. M. 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 257-262.
- Graf, L., Jancso, A., Szilagy, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradszky, K. y Rutter, W. J. 1988. Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85: 4961-4965.
- Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W. y Warr, G. W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 565-577.
- Guzmán-Murillo, A., Ochoa, J. L. y Vargas-Albores, F. 1993a. The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 271-275.
- Hagiwara, K., Kikuchi, T., Endo, Y., Huqun., Usui, K., Takahashi, M., Shibata, N., Kusakabe, T., Xin, H., Hoshi, S., Miki, M., Inooka, N., Tokue, Y. y Nukiwa, T. 2003. Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif. *J. Immunol.* 170: 1973-1979.

- Hall, M., Söderhäll, K. y Sottrup-Jensen, L. 1989. Amino acid sequence around the thiolester of α 2-macroglobulin from plasma of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. FEBS Lett. 254: 111-114.
- Hall, M. y Söderhäll, K. 1994. Crayfish α -macroglobulin as a substrate for transglutaminases. Comp. Biochem. Physiol. 108B: 65-72.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- Heinzel, R., Appelhans, H., Gassen, G., Seemuller, U., Machleidt, W. H., Fritz, W. H. y Hans, G. S. 1986. Molecular cloning and expression of cDNA for human antileukoprotease from cervix uterus. Eur. J. Biochem. 160: 61-67.
- Hernández-González, J. A. 2003. Aislamiento, clonación y secuenciación de genes que codifican para inhibidores Kazal en camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La, Paz, B.C.S, México.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. y Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113C: 61-66.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. y Vargas-Albores, F., 2000. El sistema de activación de la profenoloxidasas de crustáceos: un modelo de reconocimiento y defensa de los invertebrados. Ciencia: 21-26.
- Hu, Y., Tanriverdi, F., MacColl, G. S. y Bouloux, P. M. 2003. Kallmann's syndrome: molecular pathogenesis. Int. J Biochem. Cell Biol. 35: 1157-1162.
- Huang, T.-S., Wang, H., Lee, S. Y., Johansson, M. W., Soderhall, K. y Cerenius, L. 2000. A cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase homologue similar to *Drosophila* masquerade. J. Biol. Chem. 275: 9996-10001.
- Imler, J. y Hoffmann, J. A. 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. Curr. Opin. Microbiol. 3: 16-22.
- Imler, J. y Hoffmann, J. A. 2000. Toll receptors in innate immunity. Trends Cell Biol. 11: 304-311.
- Iwanaga, S., Kawabata, S. I. y Muta, T. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: Their structures and functions. J. Biochem. 123: 1-15.
- Jiang, H., Wang, Y. y Kanost, M. R. 1999. Four serine proteinases expressed in *Manduca sexta* haemocytes. Insect Mol. Biol. 8: 39-53.
- Jiang, H. y Kanost, M. R. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 95-105.

- Jiménez -Vega, F., Yepiz Plascencia, G., Vargas-Albores, F. y Söderhäll, K. 2004. A WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 681-687.
- Jiménez-Vega, F., Vargas-Albores, F. y Söderhäll, K. 2003. Characterization of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* In Press:
- Jin, F., Nathan, C. F., Radzioch, D. y Ding, A. 1998. Lipopolysaccharide-Related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect. Immun.* 66: 2447-2452.
- Johansson, M. W., Keyser, P. y Söderhäll, K. 1994. Purification and cDNA cloning of a four-domains Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. *Eur. J. Biochem.* 223: 389-394.
- Johansson, M. W. 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 303-315.
- Kanost, M. R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 291-301.
- Kato, I. y Tominaga, N. 1979. Trypsin-subtilisin inhibitor from red sea turtle egg white consists of two tandem domains -- one Kunitz -- one of a new family. *Fed. Proc.* 38: 832-832.
- Kawabata, S., Tokunaga, F., Kugi, Y., Motoyama, S., Miura, Y., Hirata, M. y Iwanaga, S. 1996. *Limulus* factor D, a 43-kda protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 398: 146-150.
- Khursh, R. S. y Lemaitre, B. 2000. Genes that fight infection. What the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet.* 16: 442-449.
- Kim, M. S., Baek, M. J., Lee, M. H., Park, J. W., Lee, S. Y., Söderhäll, K. y Lee, B. L. 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J. Biol. Chem.* 277: 39999-40004.
- Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R. y Krull, N. 1991. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol. Reprod.* 45: 350-357.
- Kopáček, P., Weise, C., Saravanan, T., Vítova, K. y Grubhoffer, L. 2000. Characterization of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur. J. Biochem.* 267: 465-475.
- Kramps, J. A., Twisk, C., Appelhans, H., Meckelein, B., Nikiforov, T. y Dijkman, J. H. 1990. Proteinase inhibitory activities of antileukoprotease are represented by its second COOH-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1038: 178-185.

- Kraut, J. 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 331-358.
- Krebs, K. C., Brzoza, K. L. y Lan, Q. 2002. Use of subtracted libraries and macroarray to isolate developmentally specific genes from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1757-1767.
- Krem, M. M. y Cera, E. D. 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci.* 27: 67-74.
- Kwon, T. H., Kim, M. S., Choi, H. W., Joo, C. H., Cho, M. Y. y Lee, B. L. 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 267: 6188-6196.
- Lackie, A. M. 1980. Invertebrate immunity. *Parasitology.* 80: 393-412.
- Laskowski, M. J. y Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinase. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 593-626.
- Lee, S. Y., Cho, M. Y., Hyun, J. H., Lee, K. M., Homma, K. I., Natori, S., Kawabata, S. I., Iwanaga, S. y Lee, B. L. 1998. Molecular cloning of cDNA for pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3-beta-glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 257: 615-621.
- Lehnert, S. A., Wilson, K. J., Byrne, K. y Moore, S. S. 1999. Tissue-specific expressed sequence tags from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 1: 465-476.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. y Hoffman, J. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94: 14614-14619.
- Liang, Z. C., Sottrupjensen, L., Aspán, A., Hall, M. y Söderhäll, K. 1997. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94: 6682-6687.
- Liew, C., C., Hwang, M., D., Fung, W., Y., Laurensen, C., Cukerman, E., Tsui, S. y Lee, Y., C. 1994. A catalogue of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10645-10649.
- Lopez, M. F. y Pluskal, M. G. 2003. Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. *J. Chromatogr.* 787B: 19-27.
- Lopéz, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A. y Rosas, C. 2003. Physiological, nutritional and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture.* 224: 223-243.

- Lorand, L. y Conrad, S. M. 1984. Transglutaminases. *Mol. Cell. Biochem.* 58: 9-35.
- Lowenberger, C., Bulet, P., Charlet, M., Hetru, C., Hodgeman, B., Christensen, B. M. y Hoffmann, J. 1995. Insect Immunity: Isolation of three novel inducible antibacterial defensin from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 867-873.
- Maheswari, R., Mullainadhan, P. y Arumugam, M. 1997. Characterization of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards). *Fish Shellfish Immunol.* 7: 17-28.
- Martin, G. G., Hose, J. E., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T. y McKrell, N. 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 517-522.
- Mende, K., Petoukhova, O., Koulitchkova, V., Schaub, G. A., Lange, U., Kaufmann, R. y Nowak, G. 1999. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization. *Eur. J. Biochem.* 266: 583-590.
- Miller, N. A., Gong, Q., Bryan, R., Ruvolo, M., Turner, L. A. y LaBrie, S. T. 2002. Cross-hybridization of closely related genes on high-density macroarrays. *Biotechniques.* 32: 620-625.
- Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I. y Vargas-Albores, F. 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122B: 381-387.
- Morales, C. M. 2003. Expresion de los genes HDL-BGBP, α -glucosidasas y α -amilasa en el hepatopáncreas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en respuesta a la inoculación de glucanos. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D. y Bacheré, E. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* 269: 2678-2689.
- Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X. y Chia, W. 1995. Masquerade, a novel secreted serine proteinase-like molecule is required for somatic muscle attachment in *Drosophila* embryo. *Gene Developmental.* 9: 139-154.
- Muta, T., Hashimoto, R., Miyata, T., Nishimura, H., Toh, Y. y Iwanaga, S. 1990. Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes. cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 265: 22426-433.

- Nardi, J., Martos, R., K, O., Walden, D. y Hugh, R. 1999. Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 883-897.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
- Niimi, T., Yokoyama, H., Goto, A., Beck, K. y Kitagawa, Y. 1999. A *Drosophila* gene encoding multiple splice variants of Kazal-type serine protease inhibitor-like proteins with potential destinations of mitochondria, cytosol and the secretory pathway. *Eur. J. Biochem.* 266: 282-292.
- Oduol, F., Xu, J., Niare, O., Natarajan, R. y Vernick, K. D. 2000. Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97: 11397-11402.
- Ota, Y., Shimoya, K., Zhang, Q., Moriyama, A., Chin, A. y Murata, Y. 2002. The expression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the fallopian tube: SLPI protects the acrosome reaction of sperm from inhibitory effects of elastase. *Hum. Reprod.* 17: 2517-2522.
- Perona, J. J. y Craik, C. S. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4: 337-360.
- Proudfoot, J. N., Furger, A. y Dye, J. M. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 108: 501-512.
- Ramesh, N., Sugumaran, M. y Mole, J. E. 1988. Purification and characterization of two trypsin inhibitors from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *J. Biol. Chem.* 263: 11523-11527.
- Ranganathan, S., Simpson, J. K., Shaw, C. D. y Nicholas, K. R. 1999. The whey acidic protein family: A new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J. Mol. Grap. Modell.* 17: 106-113.
- Rast, J. P., Amore, G., Calestani, C., Livi, B., Ransick, A. y Davidson, E. H. 2000. Recovery of developmentally defined gene sets from high-density cDNA macroarrays. *Develop. Biol.* 228: 270-286.
- Ratanapo, S. y Chulavatnatol, M. 1990. Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 515-520.
- Ratanapo, S. y Chulavatnatol, M. 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 855-859.
- Ratner, S. y Vinson, S. B. 1983. Phagocytosis and encapsulation: cellular immune responses in arthropoda. *Am. Zool.* 23: 185-194.
- Reyes-Izquierdo, T. y Vargas-Albores, F. 2001. Proteinase activity in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) clotting protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 287: 332-336.

- Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., Takahashi, K. y Aoki, T. 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 69-83.
- Romo-Figueroa, M. G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R. R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Söderhäll, K. y Yepiz-Plascencia, G. 2004. Molecular cloning of a b-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev. Comp. Immunol.* En prensa
- Ross, J., Jiang, H., Kanost, M. R. y Wang, Y. 2003. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene.* 304: 117-131.
- Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R. y Dhar, A. K. 2002. The Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected Shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.* 76: 7140-7149.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual.* 2nd Edition ed. Laboratory, C. S. H. New York: Cold Spring Harbor.
- Satoh, D., Horri, A., Ochaiai, M. y Ashida, M. 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 274: 7441-7453.
- Schalkwijk, J., Weidow, O. y Hirose, S. 1999. The trapping gene family: protein defined by N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core. *Biochem. J.* 340: 569-577.
- Scholz, U., Garcia-Diaz, G., Ricque, D., Cruz-Suarez, L. E., Vargas-Albores, F. y Latchford, J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* (Boone) by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture.* 176: 271-283.
- Siezen, J. y Leunissen, J. 1997. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* 6: 501-23.
- Simonet, G., Claeys, I. y Van den Broeck, J. 2002. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 132 B: 247-255.
- Smith, C., L., Chang, L., Britten, J., R. y Davidson, H., E. 1996. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. *J. Immunol.* 156: 593-602.
- Söderhäll, K., Aspán, A. y Duvic, B. 1990. The proPO system and associated proteins -Role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.* 141: 896-907.

- Söderhäll, K., Cerenius, L. y Johansson, M. W. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712: 155-161.
- Söderhäll, K. y Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- Sotelo-Mundo, R., Islas Osuna, M., E., D. L. R., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. 2003. Lysozyme from hemocytes of the white shrimp *Penaeus vannamei*: cDNA sequencing and enzymatic activity. *Fish & Shellfish Immunol.* 15: 325-331.
- Sottrup-Jensen, L. 1989. α -macroglobulin: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* 264: 11539-11542.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. y Söderhäll, K. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 179-186.
- Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M. W. y Söderhäll, K. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 353-363.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S. Y. y Soderhall, K. 2002. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 237-245.
- Sritunyalucksana, K. S., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B. y Flegel, T. W. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 21-30.
- Stephen, M. L., Wuyuan, L., Qasim, M. A., Anderson, S., Apostol, I., Ardelt, W., Bigler, T., Chiang, Y. W., Cook, J., M., J. N. G., Kato, I., Kelly, C., Kohr, W., Komiyama, T., Yin Lin, T., Ogawa, M., Otlewski, J., Park, S., Qasim, S., Ranjbar, M., Tashiro, M., Warne, N., Whatley, H., Wieczorek, A., Wieczorek, M., Wiluszi, T., Wynn, R., Zhang, W. y M., L. 2001. Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98: 1410-1415.
- Stöcker, W., Breit, S., Sottrup-Jensen, L. y Zwilling, R. 1991. α 2-macroglobulin from the haemolymph of the freshwater crayfish *Astacus astacus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 501-509.
- Tait, J. 1911. Types of crustacean blood coagulation. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 9: 191-198.
- Tong, J., Lehnert, S. A., Byrne, K., Kwan, H. S. y Chu, K. H. 2002. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in penaeid genetics. *Aquaculture.* 208: 69- 79.

- Torres, A. M., Wong, H. Y., Desai, M., Mochchala, S., Kuchel, P. W. y Kini, R. N. 2003. Identification of a novel family of proteins in snake venoms: Purification and structural characterization of Nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. *J. Biol. Chem.* 278: 40097-40104.
- Tsing, A., Arcier, J.-M. y Brehlin, M. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 64-77.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.-M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A. y Imler, J. L. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity.* 13: 737-748.
- Vargas-Albores, F. 1992a. El sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M. A. y Ochoa, J.-L. 1992b. Size-dependent haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.* 103A: 487-491.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, A. y Ochoa, J. L. 1993a. A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A: 407-413.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M. A. y Ochoa, J.-L. 1993b. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F. 1995a. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.* 3: 153-156.
- Vargas-Albores, F. 1995b. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia.* 46: 33-45.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. y Söderhäll, K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Dev. Comp. Immunol.* 20: 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B: 453-458.
- Vargas-Albores, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Montaña-Pérez, K., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. En: Flegel, T. W., Editor. *Advances in shrimp biotechnology*, Bangkok, p. 26-30.

- Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. 1998. Shrimp Immunity. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 5: 197-210.
- Vizioli, J., Bulet, P., Charlet, M., Lowenberger, C., Blass, C., Müller, H.-M., Dimopoulos, G., Hoffmann, J., Kafatos, F. C. y Richman, A. 2000. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 9: 75-84.
- Wang, R., Lee, S. Y., Cerenius, L. y Söderhäll, K. 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 268: 895-902.
- Wang, S., Magoulas, C. y Hickey, D. A. 1993. Isolation and characterization of a full-length trypsin-encoding cDNA clone from the lepidopteran insect, *Choristoneura fumiferana*. *Gene.* 136: 375-376.
- Wiedow, O., Schroderjz, J., Gregoryq, H., Young, J. A. y Enno, C. 1990. Elafin: An elastase-specific inhibitor of human skin. *J. Biol. Chem.* 265: 14791-14795.
- Woon, S., Sang, Park, S.-S., Park, D.-S., Gwang, K., Mi., Chang, K., Sun., Brey, T., Paul. y Park, H.-Y. 1998. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 827-837.
- Yeh, M.-S., Chen, Y.-L. y Tsai, I.-H. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B: 169-176.
- Yu, X. Q., Jiang, H., Wang, Y. y Kanost, M. R. 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologos are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 197-208.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415: 389-395.
- Zhu, Y., Johnson, T. J., Myers, A. A. y Kanost, M. 2003. Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22: 541-559.