

**CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION
Y DESARROLLO A. C.**

EXPRESIÓN DE LOS GENES HDL-BGBP, α -GLUCOSIDASA y
 α -AMILASA EN EL HEPATOPANCREAS DE CAMARON
BLANCO *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*) EN
RESPUESTA A LA INOCULACIÓN DE GLUCANOS

Por

MIREYA MORALES CORRAL

Tesis aprobada por la

Comisión de Examen de Tesis de la Universidad de Sonora

del Departamento de Alimentos y Nutrición

como Requisito Parcial para Obtener el Grado de

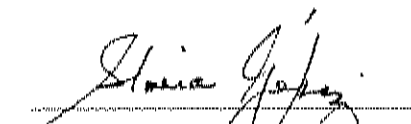
Maestría en Ciencias

Hermosillo, Sonora


Junio del 2003

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q.B. Mireya Morales Corral, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.



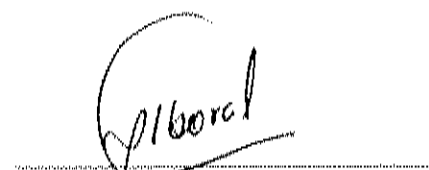
Dra Gloria Yebiz Plascencia
Directora de Tesis



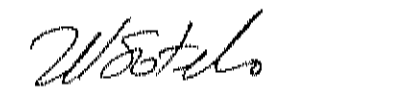
Dra. Maria A. Islas Osuna



M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte



Dr. Francisco Vargas Albores



Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves al material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y DESARROLLO, A.C. (CIAD), Apdo. Postal 1735, Hermosillo Sonora

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos de esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis

Firma

Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar

Director General

DEDICATORIA

A DIOS

A mi esposo Juan Rubén y a mi hijo Joan Rubén

Por hacerme comprender que es lo que realmente vale en esta vida y por haberme regalado el placer de

amarlos

AGRADECIMIENTOS

Mi mas sincero agradecimiento a la Dra Gloria Yepiz Plascencia por haberme dado la oportunidad de involucrarme en el tema, por su estimulante apoyo intelectual, por su amistad, tiempo, ideas, consejos y amabilidad que fueron muy motivantes para concluir este trabajo.

A mi comité de tesis Dr. Vargas-Albores, Dra. Islas-Osuna, M. C. Peregrino-Uriarte y al Dr. Sotelo-Mundo, por sus observaciones y disponibilidad de tiempo en todo momento para el presente trabajo.

A CONACYT: Por la beca para realizar mis estudios de maestría y el apoyo a los proyectos 31544-B "Genes de la respuesta inmune del camarón: diferencias en la expresión" y 29091, "Clonación, caracterización y expresión de los genes de las lipoproteínas plasmáticas del camarón blanco *Penaeus vannamei*".

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por su hospitalidad y el apoyo que me brindaron cada uno de los que laboran en esta institución.

A mis compañeros de laboratorio Carmen y Gaby por su amistad y a todo el equipo de BMOA: Gracia, Luis Enrique, Karina, Rogerio, Sarahí, Alma, Alonso, Claudia, Edgar, quienes siempre me dieron la mano.

A mis compañeros de generación, fue muy grato estar en ese grupo.

A mis padres y hermanos por su amor y su apoyo incondicional en todo momento.

A mi comadre Ana Dolores y a Javier Encinas por ser amigos por siempre.

CONTENIDO

APROBACION.....	2
DECLARACION INSTITUCIONAL.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	9
CONTENIDO.....	6
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	14
Carbohidratos y Proteínas Ligadoras de Carbohidratos.....	14
Enzimas Digestivas de Carbohidratos.....	16
Carbohidrasas de Camarones Peneidos.....	17
α -Amilasa.....	17
α -Glucosidasa.....	19
HDL-BGBP.....	21
Síntesis de α -amilasa, α -glucosidasa y HDL-BGBP por el hepatopáncreas.....	23
Métodos para Cuantificación de la Expresión de Genes.....	24
Análisis por Northern Blot.....	26
Protección Contra RNasas.....	26
Cuantificación del mRNA Utilizando PCR.....	27
Estándares Internos.....	27
Estándares Externos.....	27
JUSTIFICACION.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	33
Objetivos Particulares.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Animales Experimentales.....	34
Bioensayo.....	34
Obtención de RNA de Hepatopáncreas.....	34
Aislamiento del RNA total.....	35
Cuantificación y Evaluación de la Calidad del RNA total.....	35
Síntesis de cDNA.....	36
Diseño de Oligonucleótidos para la Amplificación.....	37
Obtención de Fragmentos por PCR.....	39
Análisis de los Productos de PCR.....	40
Digestión con Enzimas de Restricción.....	41

Estandarización de Condiciones de Amplificación	42
Determinación de la Fase Lineal de la Amplificación	44
Evaluación de la Amplificación de los Tratamientos	44
RESULTADOS Y DISCUSION	46
Calidad y Concentración de RNA Total	46
Diseño de Oligonucleótidos y obtención de los fragmentos de los genes	48
Identidad de los Fragmentos Obtenidos por RT-PCR	49
Estandarización de las Condiciones de Amplificación	51
Fase Lineal de la Amplificación	53
Efecto de la Inoculación con Sephadex DEAE Sobre la Expresión de HDL-BGBP, α - Amilasa y α -Glucosidasa	56
Expresión de HDL-BGBP	56
Expresión de α -Amilasa y α -glucosidasa	60
Expresión del Gen de la Proteína Ribosomal L8 Comparado con los Genes de HDL/BGBP, α -Amilasa y α -Glucosidasa	64
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Condiciones especificadas en el programa Primer3 para el diseño de los oligonucleótidos α -glucosidasa, α -amilasa, HDL-BGBP y proteína ribosomal L8.....	38
2	Características de los oligonucleótidos para α -amilasa, α -glucosidasa, HDL-BGBP y L8.....	39
3	Endonucleasas y sitios de corte de los fragmentos obtenidos por RT-PCR.....	42
4	Programas de PCR utilizado para la amplificación de los fragmentos de PCR.....	43
5	Composición de las reacciones de amplificación de los genes de α -glucosidasa, α -amilasa y HDL, utilizando como control la proteína ribosomal L8.....	45
6	Concentración, calidad y rendimiento del RNA total extraído de hepatopáncreas de los dos tratamientos.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Electroforesis en gel de agarosa-formaldehido del RNA total obtenido a partir de hepatopáncreas de camarón blanco.....	47
2	Productos de PCR de los genes de HDL, α -glucosidasa, α -amilasa y proteína ribosomal L8 usando cDNA de hepatopáncreas y DNA genómico de <i>P. vannamei</i>	49
3	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de digestiones de los fragmentos amplificados de los genes de HDL-BGBP, α -glucosidasa, α -amilasa y proteína ribosomal L8.....	50
4	Electroforesis en geles de agarosa al 1.2% de reacciones de amplificación sencillas.....	53
5	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de reacciones de amplificación doble.....	53
6	Análisis de la cinética de la amplificación del gen de α -amilasa y la proteína ribosomal L8 en camarones tratados (Sephadex DEAE) y control.....	55
7	Niveles del mRNA de la HDL-BGBP en hepatopáncreas de camarón blanco.....	57
8	Concentración del mRNA del gen de α -amilasa en hepatopáncreas de camarón blanco.....	61
9	Concentración del mRNA del gen de α -glucosidasa en hepatopáncreas de camarón blanco.....	62
10	Niveles de L8 (gen constitutivo) en camarones inoculados y efecto de la co-amplificación.....	65

RESUMEN

Los camarones utilizan enzimas digestivas para la hidrólisis de proteínas, lípidos y polímeros de carbohidratos, presentes tanto en alimentos naturales o dietas preparadas. Entre las glicohidrolasas encontradas en camarones se encuentran las

α -amilasas, α -glucosidasas y quitinasas. La acción de las glicohidrolasas involucra el reconocimiento del polímero del carbohidrato, seguida de la catálisis para la digestión. También se han descrito proteínas reconocedoras de glucanos, sin acción hidrolítica conocida como la llamada BGBP (β -Glucan Binding Protein, por sus siglas en inglés). La BGBP es una proteína de hemolinfa que reconoce β -glucanos presentes en microorganismos invasores formando un complejo BGBP- β glucano que es reconocido por los hemocitos circulantes y los mecanismos de defensa. La BGBP es también una lipoproteína que transporta lípidos por lo que se le considera una proteína bifuncional.

Debido al interés en el cultivo de camarón, ya no basta con entender los factores ambientales para optimizar la producción, sino también es necesario estudiar los procesos metabólicos moleculares. Por lo anterior, en el presente trabajo se propuso estudiar la expresión de tres genes que reconocen carbohidratos, la HD-BGBP, α -glucosidasa y α -amilasa en respuesta a la inoculación de partículas de Sephadex DEAE (β -glucanos) a camarones por medio de la evaluación de los niveles respectivos de mRNA utilizando transcripción reversa y amplificación por PCR para contribuir al conocimiento de inducción de genes de hepatopáncreas por glucanos. Se incluyó la evaluación del mRNA de la proteína ribosomal L8 para normalizar la respuesta de los genes estudiados y descartar el efecto sobre cambios generales en los niveles estables de los mRNAs (transcripción y degradación). En los camarones inoculados se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles del mRNA de la HDL-BGBP, a diferencia de la α -amilasa y α -glucosidasa que no presentaron diferencias significativas.

Los niveles de mRNA de HDL-BGBP aumentaron 13,0 veces por el efecto de la inoculación con la función de

reconocimiento de β -glucanos por esta proteína. Por otro lado, la evaluación del gen constitutivo LS como control de expresión indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos tratados y los (flora) control. En el HUC parece haber una ligera acumulación (k) en el mRNA de L8, de la misma familia que de α -amilasa y β -glucosidasa. Los resultados indican que el tratamiento con el glucosido ocasiona un reclutamiento específico del mRNA de la L8. BGLT, una proteína que reconoce la H₂OH y no a los carbohidratos, sugiriendo respuestas dependientes al tipo de enlace en los carbohidratos.

INTRODUCCIÓN

El camarón es uno de los recursos marinos económicamente más importante en México debido a su alta demanda en países como Estados Unidos y Japón (Redmayne, 1998). El estado de Sonora, ubicado en el litoral del Pacífico Mexicano, es un estado muy productivo en diferentes actividades dentro de las cuales destaca la obtención de productos marinos como el camarón, el cual se obtiene por captura y acuicultura. Sin embargo, la camaronicultura enfrenta problemas por estrés y debilitamiento relacionados con las condiciones de crecimiento fuera del medio natural que permiten el ataque oportunista de organismos patógenos (Lightner, 1983; Muta & Iwanaga, 1996). Por consecuencia, se ha incrementado el interés por fomentar programas encaminados al fortalecimiento de la acuicultura.

Para una acuicultura eficiente es necesario establecer dietas adecuadas que permitan el sano crecimiento y óptimo desarrollo de los camarones en cultivo, que incluyan porciones adecuadas de proteínas, lípidos y carbohidratos. Estos últimos son constituyentes dietarios importantes por ser fuente principal de energía y componente de complejos macromoleculares con proteínas y lípidos. Además, son parte integral de diversas estructuras celulares y del exoesqueleto del camarón.

Los camarones peneidos poseen una amplia variedad de enzimas digestivas que incluyen proteasas, lipasas y glicohidrolasas, similares bioquímicamente a los otros crustáceos decápodos (Dall y Moriarty, 1983). Las enzimas digestivas hidrolizan proteínas, lípidos y carbohidratos, presentes en alimentos naturales o dietas preparadas. Entre las glicohidrolasas encontradas en camarones se encuentran α -amilasas, α -glucosidasas y quitinasas (Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999).

La acción de las glicohidrolasas involucra el reconocimiento del carbohidrato, seguida de la catálisis para la digestión de los carbohidratos. Sin embargo, también se han descrito proteínas reconocedoras de glucanos, sin acción hidrolítica como la BGBP (β -1,3-glucan

binding protein, por sus siglas en inglés) (Vargas-Albores, *et al.*, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 1997; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998a), LGBP (Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein) (Lee, *et al.*, 2000), GBP (β -1,3-glucan binding protein) (Sritunalucksana, *et al.*, 2002) y GRP (glucan recognition protein) (Sritunalucksana, *et al.*, 2002; Ochiai y Ashida, 2000). Estas proteínas se han descrito en algunos artrópodos, incluyendo insectos y crustáceos.

La BGBP es una proteína de hemolinfa que reconoce β -glucanos presentes en microorganismos invasores (Vargas-Albores, *et al.*, 2000), formando un complejo BGBP- β glucano que es reconocido por un receptor en la membrana de los hemocitos circulantes activando el sistema profenoloxidasa (ProPo) (Vargas-Albores, *et al.*, 2000). El sistema ProPo es considerado uno de los principales sistemas de defensa en invertebrados y ha sido ampliamente estudiado en insectos como es el caso de la BGBP que ha sido purificada de insectos como *Blaberus crantifer* (Söderhäll, *et al.*, 1988) y *Bombyx mori* (Ochiai, & Ashida, 1988); del langostino de agua dulce *Pacifastacus leniusculus* (Hall, *et al.*, 1995) y de los peneidos *Penaeus vananmei* (Vargas-Albores, *et al.*, 1997) y *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores, *et al.*, 1996; Vargas-Albores, *et al.*, 2000). En la última década, el interés en el camarón ha motivado la realización de estudios bioquímicos, moleculares y genéticos para incrementar el conocimiento sobre esta especie.

En este trabajo se propuso estudiar el efecto de la inoculación con partículas de Sephadex DEAE (glucanos β ,1-6 unidos a DEAE (2-dietilamino-etil)) sobre la expresión de genes que codifican proteínas reconocedoras de carbohidratos y producidas por el hepatopáncreas. Se seleccionaron los genes de dos enzimas α -amilasa y α -glucosidasa y el de HDL-BGBP que reconoce β -glucanos, pero no se ha descrito que tenga actividad catalítica.

ANTECEDENTES

Los antecedentes de este trabajo se han dividido en dos secciones. En la primera se revisaron aspectos relevantes sobre carbohidratos y proteínas involucradas en su hidrólisis o reconocimiento. En la segunda sección, se revisaron las metodologías utilizadas para evaluar la expresión génica.

Carbohidratos y Proteínas Ligadoras de Carbohidratos

Los carbohidratos son la principal fuente de energía de las células, y comprenden un grupo muy diverso de compuestos con pesos moleculares muy variables. Son derivados aldehídicos o cetónicos de los alcoholes polihídricos y se clasifican sistemáticamente en monosacáridos (incapaces de hidrolizarse en carbohidratos más simples) como la glucosa; disacáridos (al hidrolizarse, dan lugar a dos moléculas de monosacárido) como la lactosa; oligosacáridos (al hidrolizarse, producen de 2 a 10 unidades de monosacárido) como la maltotriosa; y los polisacáridos (los que por hidrólisis forman más de 10 moléculas de monosacáridos) como el almidón, glucógeno y la celulosa (Murray, *et al.*, 1999; Mathews, & Van Holde, 1995).

Los carbohidratos tienen funciones estructurales y metabólicas. En las plantas, la glucosa se sintetiza mediante la fotosíntesis a partir de bióxido de carbono y agua, y se almacena como almidón o se convierte en la celulosa proporcionando soporte. En cambio, los animales tienen capacidad limitada para sintetizar algunos carbohidratos a partir de las grasas y las proteínas, por lo que el volumen mayor de los carbohidratos se obtiene finalmente de las plantas (Murray, *et al.*, 1999).

Los monosacáridos como la glucosa, fructosa, galactosa y manosa son usados directamente por las células como combustible, aunque la glucosa constituye el carbohidrato más importante y ampliamente usado, ya que la mayor parte de los

carbohidratos de la dieta se absorben como glucosa al torrente sanguíneo o se convierten en ésta en el hígado y a partir de la glucosa se forman otros carbohidratos (Murray, *et al.*, 1999; Mathews, & Van Holde, 1995). La oxidación de la glucosa produce energía en forma de ATP que se utiliza para los procesos metabólicos celulares y para las actividades musculares como el ejercicio (Morrison & Boyd, 1979).

Los carbohidratos forman parte importante de distintas combinaciones químicas (con péptidos, proteínas o lípidos) en los diferentes "cementos" del organismo (substancia intersticial tisular) o en la elaboración de muchas secreciones (por ejemplo, las mucinas del moco y la fracción de polisacáridos de muchas hormonas), además de que en combinación con proteínas forman glucoproteínas y proteoglicanos; también son muy importantes la D-ribosa y la D-desoxirribosa se usan en la síntesis de nucleótidos y, por consiguiente, de ácidos nucleicos, así como también de ciertas coenzimas (Purves, *et al.*, 1991).

El almidón en las plantas, tiene la función de almacenamiento de energía y es un homopolímero denominado glucosano o glucano, porque solo produce glucosa cuando se hidroliza. El almidón es una mezcla de dos tipos de polímeros de glucosa unidas por enlaces α : el primero es llamado amilosa, la cuál es insoluble en agua, constituye el 20% del almidón natural y está formada por una cadena lineal de 1000 o más unidades de glucosa unidas por enlaces α (1 \rightarrow 4). El otro polímero de glucosa que se encuentra en el almidón es la amilopectina que es soluble en agua, presenta una estructura altamente ramificada y está formada por polímeros cortos de 20 a 25 unidades de glucosa unidas por enlaces α (1 \rightarrow 4) y (1 \rightarrow 6) (Lynch, *et al.*, 1988).

Por otro lado, los polisacáridos que tienen papel estructural son la celulosa y la quitina, que son considerados como el primer y segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. El primero, es el componente predominante en la pared celular de las plantas y contiene cadenas largas, no ramificadas, con unas 10 000 unidades de glucosa unidas por enlaces β (1 \rightarrow 4). Debido a que algunos organismos carecen de las enzimas que se

requieren para hidrólizar las uniones β , la celulosa de frutas y verduras permanece sin digerir. Como consecuencia del número de enlaces de hidrógeno entre las cadenas poliméricas de la celulosa, se forman fuertes fibras resistentes al agua, como las del algodón, el cual posee un 98% de celulosa o la madera que posee un 50% de celulosa (Mathews, & Van Holde, 1995; Osmondí, & Stark, 1996). La quitina es un homopolímero de β (1 \rightarrow 4) N-acetilglucosamina y su estructura es similar a la celulosa (Trudel, & Asselin, 1989; Hwee-Tan, *et al.*, 2000) y está presente en levaduras, hongos, protozoarios, arácnidos, insectos, crustáceos, nemátodos y otros invertebrados. En los artrópodos y moluscos constituye el material estructural del exoesqueleto.

Enzimas Digestivas de Carbohidratos

Para que muchos procesos biológicos se lleven a cabo, se necesita la participación de enzimas encargadas de digerir macromoléculas a sus unidades monoméricas más simples. Existen muchas enzimas diferentes y según sea el tipo o cantidad de enzima, éstas cambian continuamente durante el desarrollo y maduración del organismo. De igual manera su actividad enzimática puede también ser diferente en cada órgano, tejido o célula (Whitaker, 1972).

Todas las enzimas cortan las uniones químicas de las macromoléculas a través de una reacción que agrega una molécula de agua en el sitio de corte, por lo que generalmente se le llaman enzimas hidrolíticas y se clasifican de acuerdo a los compuestos que hidrolizan: las glicohidrolasas, que hidrolizan carbohidratos; las proteasas, que hidrolizan proteínas; peptidasas, péptidos; lipasas, grasas; y nucleasas, a los ácidos nucleicos (ribonucleasas y desoxirribonucleasas) (Purves, *et al.*, 1991). Los prefijos exo (fuera) y endo (dentro) indican corte en la parte interna o solamente por los extremos.

Las α y β amilasas son glicohidrolasas que hidrolizan la molécula de almidón; la alfa amilasa es una enzima tipo endo, es decir, que ataca al azar a las secciones lineales del

almidón (amilosa) mientras que la acción de la beta amilasa es de tipo exo, atacando la amilosa por sus extremos no reductores o por la parte más externa de la molécula. La α -glucosidasa tiene un papel muy importante en los últimos pasos de degradación del almidón; las celulasas digieren celulosa y producen glucosa y las hemicelulasas que hidrolizan a la hemicelulosa o también llamadas pentosanasas; este último es un complejo multienzimático formado por arabinoxilanasas y xilanasas principalmente con actividades colaterales de amilasas, celulasas y glucanasas (Cosbert, 1998).

Glicohidrolasas de Camarones Peneidos

Los camarones peneidos poseen una amplia variedad de enzimas digestivas que incluyen proteasas, lipasas y glicohidrolasas, similares a los de otros crustáceos decápodos (Dall y Moriarty, 1983). Los camarones utilizan enzimas digestivas para la digestión de proteínas, lípidos y polímeros de carbohidratos, presentes en alimentos sencillos o complejos. Entre las glicohidrolasas encontradas en camarones se encuentran α -amilasas, α -glucosidasas y quitinasas (Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999).

α -Amilasa

La α -amilasa (α -1,4 glucan-4-glucanohidrolasa, E. C. 3.2.1.1) es una hidrolasa que hidroliza las uniones α -1,4-glucosídicas de polisacáridos como el almidón y glucógeno. Se han descrito los genes de α -amilasa en procariotes, plantas y algunos vertebrados dentro de los cuales están el puero (Janecek, 1994a), la rata (Pictet, *et al.*, 1981) y el humano (Janecek, 1994a). En el hombre, la α -amilasa de la saliva y del páncreas juegan un papel muy importante en la hidrólisis del almidón o de los oligosacáridos de los alimentos ingeridos, los cuales son hidrolizados a di o trisacáridos. La α -amilasa humana es de aproximadamente 50, 000 Da y contiene un átomo de Ca (II) por molécula. En contraste, los estudios de α -amilasa de invertebrados son aun limitados, aunque existe

información sobre las enzimas del mosquito (*Aedes aegypti*) y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Boer & Hickey 1986; Grossman & James 1993).

La α -amilasa del camarón *Penaeus vannamei* es una de las enzimas producidas por el hepatopáncreas, correspondiendo a aproximadamente el 1% de la proteína total soluble y está asociada con las funciones digestivas de este tejido. Existen dos formas activas (a y b) con pesos moleculares de alrededor de 30 kDa (Van Wormhoudt, *et al.*, 1995), comparado con 55 kDa de α -amilasas de otros orígenes (Keller *et al.*, 1971). Estas isoenzimas presentan importantes variaciones durante el crecimiento (Van Wormhoudt y Sellos, 1980), el desarrollo larval (Van Wormhoudt, 1973), los ciclos de intermuda (Van Wormhoudt, 1974-1983) y en diferentes estados de nutrición (Le Moullac 1994). Además, se conoce que las hormonas, metabolitos y temperatura influyen enormemente en la actividad de esta enzima (Van Wormhoudt, 1980). Una represión de la expresión de la isoforma (a) se reportó en experimentos dietarios en las cuales la concentración de caseína fue aumentada (Van Wormhoudt, *et al.*, 1996).

Van Wormhoudt *et al.* (1995) estudiaron el polimorfismo de la α -amilasa en 40 especies de crustáceos pertenecientes a 4 infraórdenes de decápoda. Las actividades específicas de α -amilasas de extractos de hepatopáncreas de diferentes especies de crustáceos, incluyendo *Carcinus*, *Munida*, *Nephrops* y *Palinurus*, fueron muy bajas comparadas con la del camarón y el cangrejo. El contenido de amilasa en el extracto crudo fue de aproximadamente 0.1% de la proteína total del hepatopáncreas en *Carcinus maenas* y *Eupagurus bernhardus*, y 1% en *P. vannamei* y *Procambarus clarkii*. El peso molecular de las amilasas para *Eupagurus* y *Procambarus* fue de 55 kDa a diferencia de las amilasas de *Carcinus* y *Penaeus* que fue de 30 kDa. Finalmente, usando ensayos de inmunodifusión e inhibición de enzimas con anticuerpos preparado contra la amilasa de *Palaemon serratus*, se demostró que todas las α -amilasas de los decápodos están inmunológicamente relacionadas entre sí, pero son diferentes a los de copépodos, bacillos y cerdo.

Se han reportado tres cDNAs de α -amilasa en *P. vannamei*. En el clon AMY SK 37 (GenBank, número de acceso X77318) a partir de la secuencia deducida de aminoácidos se dedujo que es una pro-enzima de 511 residuos conteniendo un péptido señal altamente hidrofóbico de 16 aminoácidos. Usando análisis de Northern blot del RNA total se detectó el mRNA de ~1,600 bases; de acuerdo a los resultados del clon AMY SK 28 que contiene la secuencia madura completa de amilasa y deduciendo que pertenece a la misma familia caracterizada y es similar también en el extremo 3', sin embargo presenta 4 cambios de aminoácidos; mientras que el clon AMY SK 20, presenta un extremo 3' diferente y 57 cambios de aminoácidos. Los análisis de la secuencia total de *P. vannamei* mostraron un 59-63% de identidad con mamíferos y 52-62% de identidad con la amilasa de insectos a nivel de aminoácidos (Van Wormhoudt, & Sellos, 1996). Por lo tanto, esto indica que existen por lo menos 3 genes codificantes para α -amilasa en *P. vannamei*.

α -Glucosidasa

La α -glucosidasa (E. C. 3.2.1.20) es una glucosil-hidrolasa que tiene un papel muy importante en los pasos finales de la digestión del almidón (Whitaker, 1972). Esta enzima tiene la propiedad para exohidrolizar uniones α -1-4 glucosídicas, que rompe rápidamente a oligosacáridos, aunque los polisacáridos son hidrolizados mas lentamente o de forma parcial.

En general, las α -glucosidasas se han encontrado en microorganismos, plantas y animales, además hay reportes de varias estructuras primarias completas. Estas glucosidasas se localizan en diferentes compartimientos celulares incluyendo el lisosomal (Jeffray, *et al.*, 1970), ancladas en el borde de la membrana intestinal o secretadas como en el caso de microorganismos (Shanta, *et al.*, 1993).

Le Chevalier *et al.* (2000) reportaron la secuencia completa de un cDNA de 3 kb y la estructura genómica del extremo 5' para un gen que codifica para la α -glucosidasa de

camarón blanco *P. vannamei*. El cDNA obtenido de hepatopáncreas de camarón consta de 2830 pares de bases con un cuadro de lectura abierto de 919 aminoácidos. Este cDNA mostró una alta similitud con la sucrasa-isomaltasa de humanos, maltasa-glucoamilasa humana y α -glucosidasa lisosomal humana, que contienen los mismos dominios estructurales. En base a la gran similitud que existe entre estas proteínas, esta enzima se incluyó dentro de la familia 31 de las glucosil hidrolasas. Además, este fue el primer reporte que describió una secuencia satélite en la estructura genómica 5' - antes de la caja TATA en una secuencia de invertebrados.

La acción de las glicohidrolasas involucra el reconocimiento del carbohidrato, seguida de la catálisis. Sin embargo, también se han descrito proteínas reconocedoras de glucanos, sin acción hidrolítica como las BGBP (β -1,3-glucan binding protein, siglas en inglés) (Vargas-Albores, *et al.*, 1996, 1997; Vargas-Albores, & Yepiz-Plascencia, 2000; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998), LGBP (Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein) (Lee, *et al.*, 2000), GBP (β -1,3-glucan binding protein) (Sritunaluksana, *et al.*, 2002), GRP (glucan recognition protein) (Sritunaluksana, *et al.*, 2002; Ochiai y Ashida, 2000). Estas proteínas se han descrito también en otros artrópodos, como insectos (Ma, & Kanost, 2000; Lee, *et al.*, 2000).

En el langostino *P. lentusculus*, se caracterizó una proteína unidora de lipopolisacáridos y β -1,3-glucanos (LGBP) obtenida a partir de hemocitos. La LGBP es de 36 a 40 kDa y tiene la capacidad de unir laminarina y curdlan, pero no tiene capacidad de unir peptidoglicano. La clonación y secuenciación de la LGBP demostró que la secuencia tiene regiones similares a la proteína unidora de bacterias Gram (-) así como a las β 1,3 glucanasas. La LGBP también mostró similitud en estructura y función con el factor citolítico celómico I (CCF-1) del gusano de tierra *Eisenia foetida* (Lee, *et al.*, 2000).

En el camarón tigre *Penaeus monodon*, la proteína que une β 1,3- glucanos (GBP), es de 31 kDa y a partir del banco de genes de hemocitos se logró aislar su cDNA correspondiente. La secuencia deducida de aminoácidos presentó una identidad del 67%

y una similitud del 76% al compararla con la secuencia deducida de la LGBP de langostino. Sin embargo, la GBP no tiene la capacidad de unir lipopolisacáridos (Sritunaluksana, *et al.*, 2002).

Los análisis de alineamientos de GBP de *P. monodon* con proteínas de reconocimiento de otros invertebrados que contienen regiones del tipo glucanasa revelaron una alta homología de la región del terminal amino en todas las secuencias, sugiriendo que esta región está involucrada en la unión a la pared celular de los microorganismos, lo cual ha sido demostrado para la proteína de reconocimiento de β -beta-1,3-glucanos (BGRP) de *Bombyx mori* (Sritunacksana, *et al.*, 2002; Ochiai y Ashida, 2000). La comparación de la secuencia deducida de aminoácidos demostró que la BGRP contiene una región que va desde la Thr 264 a la Pro 386 que es similar al sitio catalítico de las β -1,3-glucanasas, sin embargo, se demostró que no tiene afinidad considerable por los beta-1,3-glucanos, ya que un péptido recombinante conteniendo la región comprendida entre la Tyr 1 a la Ala 102 de la BGRP de *Bombyx mori*, unió fuertemente a los beta-glucanos demostrando de esta manera que la región del terminal amino es la involucrada en el reconocimiento (Ochiai y Ashida, 2000).

HDL-BGBP

La BGBP es una proteína de hemolinfa que reconoce β -glucanos presentes en microorganismos invasores (Vargas-Albores *et al.*, 1996; Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia, 2000); formando un complejo BGBP- β glucano que es reconocido por un receptor en la membrana de los hemocitos circulantes activando el sistema profenoloxidasas (Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia, 2000). Este sistema es considerado uno de los principales sistemas de defensa en invertebrados y ha sido ampliamente estudiado en insectos como *Blaberus craniifer* (Söderhäll, *et al.*, 1988) y *B. mori* (Ochiai, & Ashida, 1988); así como el crustáceo del langostino de agua dulce *P.*

leniusculus (Cerenius, *et al.*, 1994) y de los peneidos *P. vannamei* (Vargas-Albores, *et al.*, 1997) y *P. californiensis* (Vargas-Albores, *et al.*, 1996; Vargas-Albores, *et al.*, 2000).

Por otro lado, la primer lipoproteína plasmática reportada en el camarón blanco *P. vannamei* es una HDL (lipoproteína de alta densidad) no asociada con el sexo, que tiene una densidad entre 1.11-1.17 g/mL, lo cual la clasifica como una lipoproteína de alta densidad y contiene una apolipoproteína con una masa molecular estimada por SDS-PAGE de 100 kDa (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1995). Además, es una proteína glicosilada con oligosacáridos del tipo alto en manosa y presenta un punto isoeléctrico de 5.8, similar a la HDL de *Potamon potamius* (Stratakis, *et al.*, 1992).

Los lípidos constituyen el 57% (p/p) de la HDL, de los cuales el 43% son fosfolípidos, 9.5% de acilgliceroles, 4.8% de colesterol y pequeñas cantidades de ácidos grasos libres (Ruiz, *et al.*, 1997). Los fosfolípidos son la clase mayoritaria de lípidos, similar a lo reportado en otros crustáceos como el cangrejo *Cancer magister*, la langosta espinosa *Panulirus interruptus*, el cangrejo *Cancer antennarius*, y los crustáceos de agua dulce *Potamon potamius* y *P. leniusculus* (revisado en Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2000).

La HDL-BGBP de camarón contiene altas proporciones de asparagina/ácido aspártico y glutamina/ácido glutámico; característica también encontrada en las lipoproteínas plasmáticas de *P. potamius*, el gusano del tabaco *Manduca sexta* y en la apo A-I de humano. En contraste, la secuencia amino terminal de la HDL de *P. vannamei* solo es similar a la región del terminal amino de la BGBP de *P. californiensis* (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998a) y de la BGBP de *P. leniusculus* (Cerenius, *et al.*, 1994). También se ha reportado la presencia de la proteína y mRNA de la HDL en hepatopáncreas (García-Bañuelos, *et al.*, 1997; Gollas-Galván, *et al.*, 1999; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2000a), de donde se presume es secretada a la hemolinfa. Por lo tanto, la HDL y la BGBP es la misma proteína tanto en camarón (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 1998) como en el langostino, *P. leniusculus* en donde fue descrita por primera vez (Hall, *et al.*, 1995). Así, esta proteína HDL-BGBP tiene una doble función: el reconocimiento de material extraño,

activando el sistema proPO (Vargas-Albores, *et al.*, 1997) y el transporte de lípidos en la hemolinfa (Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2000a).

Recientemente se obtuvo la secuencia completa del cDNA de la HDL-BGBP de *P. vannamei* y en donde se encontraron regiones similares a glucanasa y con dominios de adhesinas, por lo que se sugiere que éstas podrían ser las regiones involucradas en el reconocimiento de los carbohidratos y relacionadas con la interacción con la membrana de los hemocitos (Romo-Figueroa *et al.*, enviado). En contraste con la BGBP de *P. leniusculus*, de la cual solo se ha detectado el mRNA correspondiente en hepatopáncreas (Cerenius *et al.*, 1994), la HDL-BGBP de *P. vannamei* también se expresa por lo menos en branquias, pleópodos y músculo, pero no fue detectado en hemocitos (Romo-Figueroa *et al.*, enviado).

Síntesis de α -amilasa, α -glucosidasa y HDL-BGBP por el hepatopáncreas

La HDL-BGBP (García-Bañuelos, *et al.*, 1997; Yepiz-Plascencia, *et al.*, 2000a), α amilasa (Van Wormhoudt, *et al.*, 1995; Van Wormhoudt, *et al.*, 1996), y α glucosidasa (Le Chevalier *et al.*, 2000) son sintetizadas en el hepatopáncreas. Este es un órgano de vital importancia de los decápodos involucrado en la síntesis y secreción de enzimas digestivas (proteasas, lipasas, glicohidrolasas) y la absorción de nutrientes. Las funciones de este órgano también se han relacionado con la excreción, ciclo de muda y metabolismo de lípidos y carbohidratos. Por lo menos algunas de estas funciones son controladas neuroendocrinamente (Gibson & Barker, 1979; Rosas, *et al.*, 1995). La glándula digestiva o hepatopáncreas, es también, el principal almacenamiento de lípidos, los cuales son aparentemente utilizados para obtener energía durante el período de ayuno previo a la muda (Barclay, *et al.*, 1983).

Métodos para Cuantificación de la Expresión de Genes

De los miles de genes presentes en un eucariote, en una célula determinada, y en un tiempo dado, quizás solamente se exprese un 15% de ellos, siguiendo la vía gen DNA→ mRNA→ proteína. La regulación de la expresión ocurre en forma temporal y espacial diferencial, lo cual da origen y especializa a los diferentes tejidos y órganos, siendo esto la base de los mecanismos que controlan la biología celular. La comparación de la expresión de los genes en diferentes tipos de células brinda la información necesaria para analizar los procesos biológicos que controlan las vidas (Liang y Pardee, 1992). Los genes que son expresados diferencialmente, tanto en tiempo como en espacio, son la base del proceso que lleva a una simple célula, a través del proceso del desarrollo embrionario, a dar origen a organismos con una extraordinaria variedad de tipos celulares (Blumberg & Izpisúa-Belmonte, 1999).

La expresión genética se puede analizar de diferentes formas, en el ámbito de DNA, (cuando se altera el número de copias de un gen dado), como RNA y como proteínas. Esta última es la fase final de la expresión de los genes y su análisis es menos conveniente para detectar alteraciones o caracterizar periodos fisiológicos por ser mas complejo y laborioso. Es mas adecuado el estudio de los ácidos nucleicos (DNAs y RNAs) para los estudios de expresión de genes en donde se requiere sensibilidad, precisión y reproducibilidad en las mediciones y la técnica mas exitosamente utilizada es la PCR. Esta es una poderosa herramienta para amplificar mRNAs específicos, especialmente aquellos que están presentes en un bajo numero de copias o mensajes raros (poco abundantes) presentes en una mezcla de células normales, así como también el análisis de inducción del mRNA en respuesta a un estímulo externo (drogas, hormonas, infección por virus o bacterias) o cualquier cambio en una variedad de condiciones como el estrés, la temperatura, etc. (Giulietti, *et al.*, 2001).

Sin embargo, a pesar de que la PCR es un proceso de amplificación exponencial, la alta eficiencia de la PCR puede amplificar pequeñas diferencias en cada ciclo de la reacción y

traducirse a grandes diferencias en la obtención del producto final amplificado. Estas pequeñas variaciones que afectan la cuantificación del mensaje, ocurre con mayor frecuencia en las reacciones que son preparadas con mezclas de RNAs o en tubos separados. Esto sucede aún cuando los parámetros de la reacción de la PCR sean controlados al 100% como son: la concentración de la polimerasa, dNTPs, Mg^{++} , DNA y oligonucleótidos, T_m de los oligos, números de ciclos y la presencia de DNA contaminante (Russell, *et al.*, 2001).

Los primeros estudios de cuantificación de expresión de genes se realizaron en 1970, utilizando la técnica de cinética de reasociación. La reasociación de los ácidos nucleicos en solución resulta de la unión de las cadenas complementarias seguido por su cinética (Wetmur & Davidson, 1968). Esta relación de hibridización es inversamente proporcional a la concentración inicial de las cadenas complementarias y la concentración absoluta de un RNA particular podía ser calculado de la cinética de su reasociación con su DNA templado (Kohne & Britten, 1971 citado en Sambrook & Russell, 2001).

Durante la década que siguió al desarrollo de la clonación molecular, se diseñaron experimentos de reasociación para medir la concentración de mRNAs. Sin embargo, estos presentaban generalmente dos problemas: la concentración de reactivos en la reacción de hibridización era muy baja y la reacción de reasociación requería tiempos largos (horas) para generar cantidades significativas de híbrido; las columnas de hidroxiapatita usadas para separar a los ácidos nucleicos híbridos eran muy costosas y muy tedioso el procedimiento, ya que con la práctica una persona entrenada podía correr máximo 24 columnas pequeñas de hidroxiapatita al mismo tiempo (Kohne & Britten, 1971 citado en Sambrook & Russell, 2001).

Actualmente, existen una gran cantidad de procedimientos para medir la abundancia de un mRNA en particular en una preparación de RNA total o RNA poliadenilado. Los métodos más populares son Northern blots, ensayos de manchas (dot blots), protección contra ribonucleasas y cuantificación por PCR (cuantitativo o semicuantitativo) y más recientemente, los microarreglos.

Análisis por Northern Blot

Esta técnica requiere grandes cantidades de muestra, es necesaria la existencia de grandes diferencias entre los tratamientos y la integridad del RNA es esencial, ya que los resultados son severamente afectados por su degradación. Su sensibilidad es baja y es solo semicuantitativo, sin embargo tienen la particularidad de que suministran información del tamaño y abundancia del mRNA problema. Esta dualidad es particularmente utilizada cuando se compara la expresión de variantes de un transcrito en diferentes tejidos. La cuantificación depende de la hibridización con una sonda a un transcrito de un gen constitutivo o estándar agregado externamente (Vanden Heuvel, 1998).

Protección Contra RNAsas

Este ensayo se usa para medir la abundancia de mRNAs específicos y las características topológicas de su mapa. El método consiste en la hibridización de los RNAs a una sonda complementaria marcada (ribosondas), seguido por la digestión de los segmentos no hibridizados con una o más ribonucleasas específicas de cadena sencilla. Al final de la digestión, las ribonucleasas son inactivadas y los fragmentos protegidos de RNA marcado son analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y detectados por autoradiografía. La técnica requiere RNA intacto, es aproximadamente 20 a 100 veces más sensible que la hibridización por Northern y es capaz de detectar aproximadamente 10^5 copias de un transcrito específico. El método puede usarse fácilmente con varios mRNAs simultáneamente porque la intensidad de la señal es directamente proporcional a la concentración del RNA analizado, así pues, se puede comparar el nivel de expresión del gen problema en diferentes tejidos. Sin embargo, esta técnica trabaja mejor con sondas antisentido que son exactamente complementarias al mRNA problema. Esto puede ser un problema si los experimentos generan híbridos de RNA-RNA conteniendo bases traslapadas que son susceptibles al corte por RNAsas, por ejemplo, cuando se analizan familias de RNAs relacionados (Sambrook & Russell, 2001).

Cuantificación del mRNA Utilizando PCR

La sensibilidad de la técnica de la PCR resulta en que pequeñas diferencias en las condiciones de la reacción, llevan a que el coeficiente de variabilidad de la producción del producto formado es típicamente del 10 al 20 % en las réplicas de las muestras (Sambrook, *et al.*, 1989). Para monitorear esta variabilidad de tubo a tubo y lograr una cuantificación lo mas exactamente posible se utilizan dos tipos de controles: estándares internos y estándares externos.

Estándares Internos

Es una secuencia control que es utilizada para minimizar la variabilidad existente de tubo a tubo en la eficiencia de la amplificación. Normalmente un estándar interno es una molécula sintética que contiene las mismas secuencias de los oligonucleótidos que el gen de interés (Vanden Heuvel, 1998).

El criterio de selección para un estándar interno es el siguiente: 1) Un estándar interno debe de amplificarse con la misma eficiencia que la secuencia problema. 2) El producto del estándar interno debe de ser fácilmente distinguible de la secuencia blanco. Esto significa que los dos productos deben ser resueltos o diferenciables en un gel o por la adición de un sitio de restricción. 3) El estándar interno debe ser un buen control para detectar las diferencias en la eficiencia de la transcripción reversa (Vanden-Heuvel, 1998).

Estándares Externos

Este es un tipo de estándar que es usado para controlar las diferencias en templados como mRNA, cDNA o DNA presentes de tubo a tubo. Se utilizan como estándar externo genes constitutivos o también llamados genes de casa (house keeping) que son muy usados en las cuantificaciones por coamplificación y la característica clave de este tipo de genes es

que no son afectados por algún tratamiento en particular. Este tipo de control no se agrega a la muestra porque ya está presente en una cantidad finita en cada tubo. Típicamente los estándares externos incluyen β -actina, β_2 -microglobulina, tubulina, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), hipopurina ribosa transferasa (HPRT) o cualquier proteína ribosomal (Vanden Heuvel, 1998).

PCR semicuantitativa. Es también llamada semicuantitativa RT-PCR, coamplificación o estándares externos RT-PCR y requiere la amplificación de un gen constitutivo con un gen problema. Con este método el producto acumulado es medido durante la fase exponencial de la reacción por interrupción de la PCR después de un determinado número de ciclos, por lo que es de vital importancia que el producto de PCR sea medido durante la fase exponencial de la reacción (Giulietti, et al., 2001).

Como ejemplo de la aplicación de esta técnica, en un ensayo se optimizó la PCR semicuantitativa para la detección de una o varias moléculas introducidas por translocación en una secuencia de DNA humana y comparadas con la adición de un exceso de células normales humanas (7 μ g). Con este procedimiento se evitó los análisis por hibridización y se utilizó 20-22 ciclos de amplificación. La semicuantificación por PCR, permitió detectar una sola molécula de DNA con translocación en células mutantes entre la región del proto-oncogene *bcl-2* y una secuencia de un gen de inmunoglobulina J_H [t(14;18)] que se pudo distinguir de un DNA normal humano entre 10^6 células (Zhang & Ehrlich, 1994).

RT-PCR cuantitativa. Es un método muy sensible y rápido que requiere dos pasos enzimáticos secuenciales: la síntesis de DNA a partir del templado de RNA y PCR. Con este método se puede determinar la abundancia de un mRNA en particular, cambios en la abundancia de un mRNA sobre el tiempo o después de una inducción y el número actual de moléculas de mRNA en la muestra. También requiere la utilización de controles internos para evitar variaciones de las muestras.

Dukas *et al.*, (1993), diseñaron un método de cuantificación por RT-PCR, con el cual se logró la amplificación de varios mRNAs. Primero se obtuvo el cDNA a partir del RNA total por acción de la enzima transcriptasa reversa MMLV usando oligo (dT)₁₅, como oligonucleótido iniciador y después, el análisis en la fase lineal de PCR, seguido por la detección de los productos por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio. Además, para obtener una amplificación similar de varios genes en el mismo sistema de PCR, fue necesario ajustar la concentración de cada par de oligonucleótidos, utilizar altas condiciones de astringencia (temperaturas de alineación) y la adición de solventes orgánicos. El método se evaluó probando variaciones de los mRNAs de c-Ki-Ras, ornitina descarboxilasa (ODC), α -amilasa y de β -actina durante el crecimiento de células tumorales pancreáticas AR4-2J. La expresión del gen de gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa (GADPH), mostró muy poca variación, lo cual confirma que éste representa un buen estándar interno para el estudio de expresión de genes. En la amplificación por PCR del cDNA y el templado interno, se lograron bandas muy intensas y bien definidas en amplificaciones simultáneas, lo cual valida el aspecto cuantitativo del método. Mientras que en estas evaluaciones se observó el nivel de expresión del RNA en c-Ki-Ras incrementó 5 veces, además se observó un alto nivel de mRNA de ODC en el crecimiento temprano de AR4-2J y finalmente en cuanto a los resultados observados en α -amilasa, el perfil de acumulación del mRNA fue similar a lo observado en c-Ki-Ras pero solo un incremento de 2 veces fue observado.

Otro estudio usó RT-PCR cuantitativo en tiempo real para estudiar la coordinación de la regulación transcripcional de 588 genes identificados en cultivos primarios de melanocitos normales de humanos después de una dosis de irradiación de luz ultravioleta (UVA 365 nm). Este tipo de irradiación genera especies de oxígeno reactivas y consecuentemente induce al daño del DNA. La irradiación UVA se considera que es un importante agente carcinogénico, especialmente en el desarrollo del melanoma y se considera que esta radiación activa varios procesos en células de mamíferos. Los resultados mostraron que de los 588 genes estudiados, 11 fueron sobreexpresados o inducidos y estos genes están involucrados en la regulación del ciclo celular (GADD45,

CIP1/WAF1), en respuesta por estrés (HSP70, HSP40, HSP86), en apoptosis (GADD153) y genes que codifican para factores de transcripción (EGR-1, ETR-101, c-JUN, ATF4), ETR-101 pertenece a una familia de múltiples genes que incluye numerosos factores de transcripción (Jean, *et al.*, 2001).

PCR cuantitativo en tiempo real. El método se refiere al monitoreo continuo del progreso de la amplificación durante la fase exponencial de la reacción, combinando la amplificación y detección en un solo paso. Para la medición directa, se usa una sonda de oligonucleótidos doblemente marcada, la cual emite una señal de fluorescencia solamente cuando es cortado por una Taq DNA polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 5'→3' afectando los colorantes reportero y apagador que son los encargados de emitir la fluorescencia basados en el principio de la Transferencia de la Energía por Resonancia de la Fluorescencia (FRET). En el extremo 5' de la sonda se encuentra el colorante reportero como 6-carboxifluoresceína (FAM) y un colorante apagador como el 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo contrario. Una vez que la sonda sufre un corte por la polimerasa que tiene actividad de exonucleasa, los colorantes reporteros y el apagador son separados y la emisión de colorante reportero es transferida al colorante apagador, resultando con esto el incremento de la emisión de la fluorescencia. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de PCR (Giulietti, *et al.*, 2001; Walker, 2001).

Esta es una técnica muy segura y sensible y puede ser usado en muestras muy pequeñas. El método también es llamado PCR competitivo cuantitativo porque requiere de la amplificación de un "competidor" con la muestra desconocida en el mismo tubo. Este control interno consiste de un DNA o RNA que es ligeramente modificado (Giulietti, *et al.*, 2001). La introducción de este nuevo procedimiento basado en la cinética de la amplificación por fluorescencia por PCR permite la cuantificación de la acumulación del producto durante la fase exponencial de la reacción de PCR en tiempo real. Esta técnica tiene la ventaja de que no requiere manipulaciones post PCR a diferencia de otras

técnicas que utilizan tinciones con bromuro de etidio en geles de agarosa o poliacrilamida o inclusive el manejo de radiactivos; pero tiene la desventaja que utiliza equipo muy sofisticado y costoso. Existen diferentes sistemas para la cuantificación en tiempo real, entre ellos están la sonda de TaqMan, molecular beacons, scorpions y la hibridización por sondas. Los tres últimos no utilizan actividad de nucleasa de la Taq polimerasa. Además, existe la tinción con el colorante SYBR Green que no requiere la utilización de sondas de oligonucleótidos marcados (Walker, 2001).

JUSTIFICACION

El contenido y tipo de RNA celular puede variar durante el crecimiento, y desarrollo, tipo de tejidos y células, así como con el estado fisiológico y ambiental. La glándula digestiva de crustáceos, llamada también hepatopáncreas, es el principal tejido productor de enzimas digestivas y de almacenamiento de carbohidratos y lípidos que son usados como reserva energética. Recientemente se ha sugerido la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcripcional en la tripsina producida por el hepatopáncreas en respuesta al ayuno (Sánchez-Paz *et al.*, 2003) y a diferentes concentraciones de proteína en la dieta (Muhlía-Almazán, 2003).

También se reportó que el gen de la de la HDL-BGBP se expresa principalmente en hepatopáncreas (Romo-Figueroa, 2003, enviado), pero se desconoce si este gen puede ser regulado en respuesta a estímulos internos o externos. Para investigar la posible modulación de la expresión de éste gen, se inocularon camarones con glucanos (Sephadex-DEAE) y se midió el mRNA de la HDL-BGBP y de dos glicohidrolasas producidas por hepatopáncreas (α -amilasa y α -glucosidasa) para realizar estudios comparativos en la respuesta de genes por ésta glándula.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de la inoculación de Sephadex DEAE sobre la expresión de los genes de α -glucosidasa, α -amilasa y HDL-BGBP en el hepatopáncreas de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*.

Objetivos Particulares

- 1) Diseñar oligonucleótidos para detectar la presencia de los genes de α -glucosidasa, α -amilasa, HDL-BGBP y proteína ribosomal L8 a partir de mRNA de hepatopáncreas.
- 2) Optimizar condiciones de amplificación por PCR simultánea para α -glucosidasa, α -amilasa, HDL-BGBP y proteína ribosomal L8.
- 3) Comparar la abundancia de los mRNAs en hepatopáncreas de camarones estimulados y no estimulados utilizando RT-PCR y análisis densitométricos de los productos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales Experimentales

Se utilizaron 10 camarones juveniles de la especie *P. vannamei* de 8 a 22 g de peso con apariencia saludable, de ambos sexos, proporcionados por el Centro de Investigaciones Biológicas (CIBNOR) de Guaymas, Sonora. Los organismos se aclimataron durante 3 días y se mantuvieron vivos en un acuario con agua salina artificial 35 a 36 ppm de salinidad, a una temperatura de 19 a 20°C y con aireación constante.

Bioensayo

Después de la aclimatación, los organismos se dividieron al azar en dos grupos de 5 y se sometieron al siguiente tratamiento: los camarones del grupo tratamiento (T1, T2, T3, T4 y T5) se inocularon con una suspensión (10 mg/ml) de Sephadex-DEAE (Pharmacia); los del grupo control (C1, C2, C3, C4 y C5) se inocularon con SIC, solución isotónica para camarón (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3) a la cual se agregó EDTA 10 mM y preparada con agua libre de pirógenos (Vargas-Albores, *et al.*, 1993). La inoculación se realizó por medio de una punción en el músculo con una jeringa de 1 ml (aguja de 27 x 13 mm), aplicándose 50 µl de volumen total del inóculo (Cedano-Thomas, 2000).

Obtención de RNA de Hepatopáncreas

Después de 24 horas de realizada la inoculación se sacrificó a los camarones, previamente lavados con agua-DEPC (dietil pirocarbonato) 0.1% estéril y secados con gasa estéril. El cefalotorax fue separado del músculo, dejando al descubierto al

hepatopáncreas, el cuál se cortó con tijeras y pinzas estériles. Al tejido se le agregó 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, LiCl 500 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0, LiDS 1%, ditioneitol (DTT) 5 mM, pH 8.0) por cada 200 mg y se trituró con un homogenizador polytron PT MR2100 (KINEMATICA, A.G., Switzerland) a 22 rpm durante 30 segundos y los lisados se almacenaron a -20°C para el posterior aislamiento del RNA.

Aislamiento del RNA total

El RN. o el reactivo TRIzol, solución monofásica de
 isotoci Bibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD),
 siguei or Chomezinsky & Sacchi (1987): a cada 500 µl de
 lisado igual del reactivo de TRIZOL y se mezclaron con
 vorte: a temperatura ambiente por 5 minutos, se agregó 200
 µl de µl de isopropanol, mezclando por inversión e
 incu or 15 minutos.
 min or 15 minutos.
 de or 15 minutos.
 inc or 15 minutos.

Las a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C y el precipitado se lavó
 dos veces con 200 µl de etanol al 75%, centrifugando a 7500 x g por 5 minutos a 4°C
 cada vez. El RNA precipitado fue secado al aire y finalmente, fue resuspendido en 100 µl
 de agua libre de nucleasas.

Cuantificación y Evaluación de la Calidad del RNA total

La concentración del RNA total se calculó por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta Lambda Bio 20 (Perkin Elmer, Norwalk, CT)

(Sambrook *et al.*, 1989). La pureza se determinó mediante la relación A260/280 nm, en donde valores entre 1.7-2.1 indican RNA puro (Sambrook *et al.*, 1989).

La calidad del RNA se determinó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa-formaldehído (Lehrach & Diamond, 1977; Fourny *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989). La cámara de electroforesis y sus componentes (base y peine) se lavaron en una solución de HCl 1 N (toda la noche) y las soluciones utilizadas se prepararon con agua tratada con DEPC al 0.1%. Para preparar el gel, la agarosa (1%) se disolvió en buffer MOPS-EDTA 1X (MOPS 0.2 M, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0), libre de ribonucleasas y se agregó formaldehído al 37%, para tener una concentración final de 2.2 M, como una modificación de la técnica de Yepiz-Plascencia (2000). El gel se dejó reposar una hora a temperatura ambiente antes de su uso y como buffer de corrida se empleó MOPS-EDTA 1X.

El RNA se mezcló con un volumen igual de buffer para RNA (0.75 ml de formamida deionizada, 0.15 ml de MOPS 10X, 0.21 ml de agua tratada con DEPC, 0.1 ml de glicerol, 0.08 ml de azul de bromofenol al 10% p/v) y las muestras se calentaron a 75°C por 20 minutos en baño de agua, se colocaron en hielo y se le agregó 0.5 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml). Se cargó también en el mismo gel, estándares de RNA con tamaños de 9.49, 7.46, 4.4, 2.37, 1.35 y 0.24 Kb (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). El gel se corrió a 50 V hasta ver la migración del azul de bromofenol $\frac{3}{4}$ partes del gel. Las bandas se visualizaron por UV en un transiluminador modelo TFX-35M (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD, EUA) y se fotografiaron con una cámara digital EDAS DC120 Zoom (Kodak, Rochester, NY).

Síntesis de cDNA

La transcripción reversa se realizó siguiendo las indicaciones para la Superscript™ First-Strand Síntesis System for RT-PCR (Invitrogen™, Life Technologies, CA). A 5 µg de

RNA total se le agregó 1 μ l (0.5 μ g) de oligo (dT)₁₂₋₁₈, 1 μ l (10 mM) de la mezcla de dNTPs y agua estéril tratada con DEPC hasta completar un volumen final de 10 μ l. Enseguida se incubaron a 65°C por 5 minutos en baño de agua y después se enfrió en hielo por 2 minutos. A esta mezcla se le adicionó 2 μ l de una solución de 10X RT buffer (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM), 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de RN_{ASE}OUT (Recombinant RNase Inhibitor), se mezcló suavemente y se incubó a 42°C por 2 minutos y se colocó inmediatamente en hielo.

Posteriormente, se agregó 1 μ l (50 U) de Superscript II RT y se incubó a 42°C por 50 minutos. La reacción se inactivó por calor a 70°C durante 15 minutos, se colocó en hielo y una vez completa la síntesis de cDNA, el RNA total fue degradado usando RNasa H y RNasa A (Lewin, 1997).

Diseño de Oligonucleótidos para la Amplificación

Se diseñaron 3 juegos de oligonucleótidos específicos a partir de las secuencias de los genes de α -glucosidasa, α -amilasa (genes a evaluar) y una proteína ribosomal L8 (gen constitutivo, que se usó como control). Para α -glucosidasa se usó la secuencia con número de acceso en GenBank AJ250828 (Le Chevalier, *et al.*, 2000), para α -amilasa la reportada en GenBank AJ132379 (Van Wormhoudt y Sellos, 2000 no publicada) que contiene intrones, cuidando que los oligonucleótidos sentido y antisentido quedaran en dos exones diferentes, de manera que esto sirviera como un control ante la presencia de DNA genómico contaminante.

Para el diseño de los oligonucleótidos de la proteína ribosomal L8 se usó una secuencia determinada en un trabajo previo (Tavares-Sánchez & Yepiz-Plascencia, 2001, sin publicar). Los oligonucleótidos para el gen de HDL los facilitó Romo-Figueroa *et al.*, 2003. El diseño de los oligonucleótidos se hizo mediante el programa Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) bajo las condiciones que se

especifican en la Tabla 1 y se evaluaron con el programa de Oligo Calculator de Genosys (http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe). Los parámetros evaluados fueron longitud, temperatura de alineación, no formación de regiones con estructura secundaria, porcentaje de GC y no formación de primers-dimers por complementariedad parcial de bases. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys, (The Woodlands, TX) y las características principales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Condiciones especificadas en el programa Primer3 para el diseño de los oligonucleótidos para α -glucosidasa, α -amilasa y proteína ribosomal L8

Característica	Característica
Rango del tamaño del producto de PCR (pb)	400-1000
Tamaño óptimo del primer (nt)	22
Tamaño mínimo del primer (nt)	20
Tamaño máximo del primer (nt)	24
Tm óptimo (°C)	55
Tm mínimo (°C)	50
Tm máximo (°C)	60
Contenido mínimo de GC (%)	40
Contenido máximo de GC (%)	50

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos para α -amilasa, α -glucosidasa, HDL-BGBP y L8.

Oligonu- cleótido	Longitud	T _m (°C)	%GC	Estructura Secundaria	Tamaño Producto (pb)	Secuencia 5'--3'
Amy Fw	22	64.0	50	Débil	980	GATCCCAACTCTAGCAATGGAC
Amy Rv	22	64.0	50	No	980	CGGAAGGTAAGGATCATGTCTC
α -Glu Fw	22	58.0	38	No	633	AGAGAGAGGATGAAAGTTATGG
α -Glu Rv	22	58.0	35	Débil	633	GTGTGATCACTAATCTTCTTGC
L8 Fw	22	64.0	50	Muy Débil	430	GAAGAGGATCGGTGTYCAAAGTC
L8 Rv	22	64.0	50	Débil	430	CTCCTGAAGGAAGCTTTACACG
HDL3 Fw	22	58.0	35	Débil	870	TAAATGCTGATGGTAGAGAATC
HDL12 Rv	20	56.0	35	Muy Débil	870	GAATGAAATGTCAAAGGAAG

Obtención de Fragmentos por PCR

Utilizando los oligonucleótidos para cada gen de interés y el cDNA obtenido a partir del RNA total de hepatopáncreas y DNA genómico de músculo de *P. vannamei* (donado por la Q. B. Padilla-Sánchez), se hicieron reacciones de PCR. Para las reacciones se utilizó 4 μ l de buffer PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 7.5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 3 μ l de la mezcla de dNTPs 2.5 mM de cada uno, 1 μ l del oligonucleótido sentido 20 μ M y 1 μ l del oligonucleótido antisentido 20 μ M, 4 μ l de Taq polimerasa recombinante, 2 μ l del cDNA equivalente a 12.5 ng de mRNA (estimando que el mRNA es ~5% de 250 ng de RNA total), en el caso del DNA genómico se utilizó 100 ng y agua hasta un volumen final de 40 μ l.

Las muestras se se colocaron en un termociclador PTC200 DNA Engine (MJ Research, MA) bajo las siguientes condiciones: 94°C, 3 minutos; 60°C, 1 minuto; 72°C, 3 minutos por 1 ciclo; 94°C, 3 minutos; 52°C, 1 minuto; 72°C, 3 minutos por 1 ciclo; 94°C, 1

minuto; 55°C, 1 minuto; 72°C, 3 minutos por 30 ciclos; 72°C 10 minutos. Una vez concluido el programa, la muestra se almacenó a 4°C hasta su análisis posterior.

Análisis de los Productos de PCR

Los productos de PCR (HDL-BGBP, α -glucosidasa, α -amilasa y la proteína ribosomal L8) se analizaron en geles de agarosa al 1.2% (7 x 15 x 0.5 cm), utilizando buffer de corrida TAE 1X (TAE 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Como estándar de tamaño conocido se aplicó 200 ng de 1 Kb DNA Ladder; (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). A las muestras y a los estándares se les agregó 2 μ l de buffer carga para DNA (0.15% de azul de bromofenol, 0.15% de xilencianol y 33% de glicerol) (Sambrook, *et al.*, 1989). La electroforesis se corrió a 65 V \sim ¼ del gel, se tiñó con bromuro de etidio (1 μ g/ml) por 1 minuto, se lavó con agua destilada por 15 minutos, las bandas se detectaron con luz ultravioleta y se fotografió como anteriormente se describió. Cuando no se obtuvo una buena detección de las bandas en geles de agarosa, se empleó electroforesis en geles de poliacrilamida nativos al 7.5% (Laemmli, 1970) de 1 mm, usando del concentrador al 4% de acrilamida.

El gel se corrió en electroforesis vertical (Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad, Richmond CA)) usando TBE 1X (Tris-base 39 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) con precorrimiento de 30 minutos a 15 mA y la muestra se cargó después de mezclar con un volumen igual de buffer muestra nativo 2X (2.5 ml de buffer para gel concentrador nativo, 2.0 ml de glicerol grado biología molecular, 1.0 ml de azul de bromofenol al 0.5% y 4.5 ml de agua desionizada) y el marcador de peso molecular de 1 Kb (60 ng/carril). El gel se corrió a corriente constante a 15 mA durante 2 horas.

La electroforesis se terminó al salir el frente de migración (azul de bromofenol) y el gel se tiñó con nitrato de plata, siguiendo el método descrito por Wallace (1997), el cual consiste en agregar 25 ml de solución A (etanol al 10%, ácido acético 0.5% en agua desionizada) dos veces durante 3 minutos, 25 ml de solución B (AgNO₃ al 0.1%) por 15

minutos, se lavó dos veces con agua desionizada, se reveló con 25 ml de solución C (NaOH al 1.5% y formaldehído al 0.5%) por 15 minutos. Se agregó finalmente 25 ml de solución D (Na_2CO_3 al 0.75%) durante 10 minutos para detener la reacción. Los geles se fotografiaron y se colocaron en una solución de glicerol al 10% y etanol al 25% para su preservación.

Digestión con Enzimas de Restricción

Los fragmentos de PCR se digirieron con enzimas de restricción para confirmar su identidad. Las secuencias nucleotídicas incluidas en la región amplificada y los sitios de corte de enzimas de restricción se localizaron con el programa DNASIS v. 2.5 (Hitachi Software Engineering America, Ltd. Alameda, CA). Se utilizaron dos enzimas diferentes para cada producto de PCR (Tabla 3). Para este tratamiento se prepararon digestiones simples con 5 μl del producto de PCR, 0.5 μl de distintas enzimas de restricción (10 U/ μl) y 1/10 de su respectivo buffer de reacción 10X (Gibco BRL Gaithersburg MD) y se se incubó por 1.5 horas a 37°C. Las digestiones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 3. Endonucleasas y sitios de corte de los fragmentos obtenidos por RT-PCR

Gene	Tamaño del Producto de PCR (pb)	Enzima	Posición de corte	Tamaños de los productos digeridos (pb)
α -glucosidasa	633	<i>Hind</i> III	1551	122 y 510
		<i>Bam</i> HI	1335	339 y 293
α -amilasa	980	<i>Kpn</i> I	248	179 y 800
		<i>Sal</i> I	345	276 y 703
Proteína ribosomal L8	430	<i>Bgl</i> II	303	189 y 240
		<i>Kpn</i> I	414	300 y 129

Estandarización de Condiciones de Amplificación

Una vez confirmada la identidad de los fragmentos, se optimizaron las concentraciones de los componentes de la amplificación para tener la mayor reproducibilidad posible: MgCl₂, buffer 10X PCR, mezcla de dNTPs. También se probaron las reacciones de amplificación sencilla (usando un juego de oligonucleótidos –sentido y antisentido- para un solo gen), reacciones de amplificación simultánea doble (usando dos juegos de oligonucleótidos –sentido y antisentido- en el mismo tubo para la proteína ribosomal L8 y un gen a evaluar) y reacciones de amplificación simultánea triple (usando oligonucleótidos –sentido y antisentido- para la proteína ribosomal L8 y dos genes a evaluar). Además se variaron las proporciones de los pares de oligonucleótidos (equimolaridad), la adición de dimetil sulfóxido (DMSO) y distintas cantidades de cDNA, como lo recomienda Dukas, *et al.*, (1993), para obtener una amplificación similar e intensa de múltiples muestras problema en el mismo tubo de PCR.

Al trabajar se tuvo el cuidado de usar siempre el mismo bloque del termociclador, tipo de microtubos, pipetas calibradas, condiciones de esterilidad del espacio de trabajo, así como la calidad del agua. La ausencia de contaminación fue rutinariamente verificada por la introducción de controles negativos y controles positivos. Además, para la

amplificación de los fragmentos se probaron 2 programas con diferente astringencia, los cuales se detallan en la Tabla 4.

Teniendo en cuenta todos estos parámetros, se prepararon las reacciones de amplificación por PCR sencillas y simultáneas dobles en una solución conteniendo 4 μ l de buffer PCR 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 6 μ l de MgCl₂ 25 mM, 3 μ l de la mezcla de dNTPs 2.5 mM, con y sin DMSO 2% (v/v). Además se agregó 0.05-1 μ M de cada uno de los oligonucleótidos específicos (equimolares y no equimolares), 4 μ l de Taq polimerasa, 2 y 4 μ l del cDNA (equivalentes a 12.5 ng y 25 ng de mRNA) y agua Milli Q (18 Ω) estéril hasta completar un volumen de reacción de 40 μ l. Los componentes se mezclaron y las reacciones se colocaron en el termociclador bajo las condiciones del programa 1 especificado en la Tabla 4. Las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1.2% y se fotografiaron, como se describió anteriormente.

Tabla 4. Programas de PCR utilizado para la amplificación de los fragmentos de PCR.

Programa 1			Programa 2		
Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min		94°C	3 min	
60°C	1 min	1 ciclo	55°C	1 min	1 ciclo
72°C	3 min		72°C	3 min	
94°C	3 min		94°C	1 min	
52°C	1 min	1 ciclo	42°C	1 min	1 ciclo
72°C	3 min		72°C	3 min	
94°C	1 min		94°C	1 min	
55°C	1 min	30 ciclos	52°C	1 min	33 ciclos
72°C	3 min		72°C	3 min	
72°C	10 min		72°C	10 min	

Determinación de la Fase Lineal de la Amplificación

Para determinar la fase lineal de la cinética de amplificación, se prepararon reacciones de amplificación simultáneas dobles (oligonucleótidos de la proteína ribosomal L8 y oligonucleótidos de un gen a evaluar) usando 2 μ l del cDNA (equivalentes a 12.5 ng de mRNA) y las condiciones antes especificadas para volúmenes en la reacción de 40 μ l, que se corrieron con el programa 1, (Tabla 4). La amplificación se monitoreó a lo largo del programa sacando un volumen igual a los 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos para ser analizados en geles de agarosa al 1.2%. La intensidad de las bandas (abundancia del fragmento de DNA), se cuantificó por densitometría (píxeles) utilizando el programa Kodak Digital Science ID del sistema EDAS (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

Evaluación de la Amplificación de los Tratamientos

Los cambios en la expresión por la inoculación de Sephadex-DEAE se realizó en 5 cDNAs de camarones control y 5 de tratamiento. La evaluación se hizo utilizando la misma preparación del cDNA para evitar cualquier variabilidad en las reacciones y por duplicado para ver la reproducibilidad. Las cantidades de los componentes agregados se especifican en la Tabla 5 y se utilizó el programa 1, (Tabla 4). Las reacciones se pararon en el ciclo 25 del programa 1 y se analizaron en geles de agarosa al 1.2% como se describió anteriormente y se evaluó la expresión de los genes de α -glucosidasa y α -amilasa en amplificación simultánea doble con L8.

En contraste, la evaluación del gen de HDL se hizo por separado, es decir, se realizaron amplificaciones sencillas (un solo juego de oligonucleótidos) para la proteína ribosomal L8 y para el gen de HDL, ya que los intentos de evaluación en forma similar no fueron

exitosos. Las cantidades de los componentes agregados se especifican en la Tabla 5 y se corrieron en el programa 1, pero se le adicionó 5 ciclos más de amplificación (35 ciclos totales). Los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida homogéneos al 7.5% teñidos con bromuro de etidio 1 µg/ml y fotografiados con una cámara digital EDAS DC120.

Tabla 5. Composición de las reacciones de amplificación de los genes de α -glucosidasa, α -amilasa y HDL, utilizando como control la proteína ribosomal L8.

Componente	Genes	α -gluc/L8	α -amilasa/L8	HDL	L8
MgCl ₂ 25 mM		3.0 µl	3.0 µl	6.0 µl	6.0 µl
Mezcla dNTPs 2.5 mM de c/u		1.5 µl	1.5 µl	3.0 µl	3.0 µl
Buffer PCR 10X ^{*1}		2.0 µl	2.0 µl	4.0 µl	4.0 µl
DMSO 2% (v/v)		0.5 µl	0.5 µl	1.0 µl	1.0 µl
Agua MQ estéril		8.0 µl	8.0 µl	18.0 µl	18.0 µl
Oligo Sentido 20 µM		0.5 µl	0.5 µl	1.0 µl	-----
Oligo Antisentido 20 µM		0.5 µl	0.5 µl	1.0 µl	-----
Oligo Sentido 20 µM (L8)		0.5 µl	0.5 µl	-----	1.0 µl
Oligo Antisentido 20 µM (L8)		0.5 µl	0.5 µl	-----	1.0 µl
cDNA ^{*2}		1.0 µl	1.0 µl	2.0 µl	2.0 µl
K-Taq Polimerasa		2.0 µl	2.0 µl	4.0 µl	4.0 µl
Volumen final		20.0 µl	20 µl	40.0 µl	40.0 µl

*1. Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4. *2. 1 µl de cDNA equivalentes a 12.5 ng de mRNA (mRNA siendo 5% del RNA total) SuperscriptTM First-Strand Síntesis System for RT-PCR (InvitrogenTM, Life Technologies, CA).

Las intensidades de cada producto de PCR se determinó por densitometría y se calculó la media y las desviación estándar para cada gen de forma independiente y para cada gen con respecto a L8 para normalizar. Los valores entre el tratamiento (Sephadex-DEAE) y control (SIC-EDTA) fueron comparados. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Statistica 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para investigar el efecto de la inoculación con partículas inertes de Sephadex DEAE (β -glucano unido a dietil-aminoetil), se evaluaron las concentraciones de mRNA de 3 genes: α -glucosidasa y α -amilasa que son enzimas hidrolíticas de carbohidratos y HDL-BGBP que reconoce β -glucanos y transporta lípidos. Las concentraciones de los mRNAs se evaluaron utilizando RT-PCR.

Calidad y Concentración de RNA Total

Utilizando el método de TRIzol, se logró un RNA intacto y de buena calidad y los valores de concentración, calidad y rendimiento de RNA obtenidos, se presentan en la Tabla 6, observándose en todos los casos buenas concentraciones y pureza. El rendimiento varió entre 24 a 39 μ g de RNA por gramo de hepatopáncreas y solo en un caso se obtuvo una cantidad menor, posiblemente porque al homogenizar esta muestra no se trituró totalmente, quedando trozos muy grandes de tejido, de manera que la extracción fue parcial.

En todas las muestras de RNA total se observan patrones de bandas definidos indicando que los RNAs de hepatopáncreas aislados fueron de buena calidad e integridad. En las muestras diferentes se distingue una banda muy abundante de aproximadamente ~2.1 Kb y que corresponde al RNA ribosomal, una gran cantidad de bandas de tamaño variable que corresponden a mRNAs y los tRNA de bajo peso molecular (Figura 1).

Tabla 6. Concentración, calidad y rendimiento del RNA total extraído de hepatopáncreas de los camarones. Control (C) y Tratados (T).

Organismo	Relación $A_{260/280}$	Concentración RNA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	RNA Obtenido (μg)	Rendimiento ($\mu\text{g RNA/g}$)
C1	1.66	6.70	335	22.78
C2	1.89	6.74	337	38.95
C3	1.63	7.84	392	37.15
C4	1.77	6.54	327	32.70
C5	1.83	7.94	397	33.93
T1	1.88	6.16	308	30.80
T2	1.87	6.67	333	24.61
T3	1.68	8.16	408	40.80
T4	1.75	1.00	50	4.73
T5	1.83	5.05	252	23.93

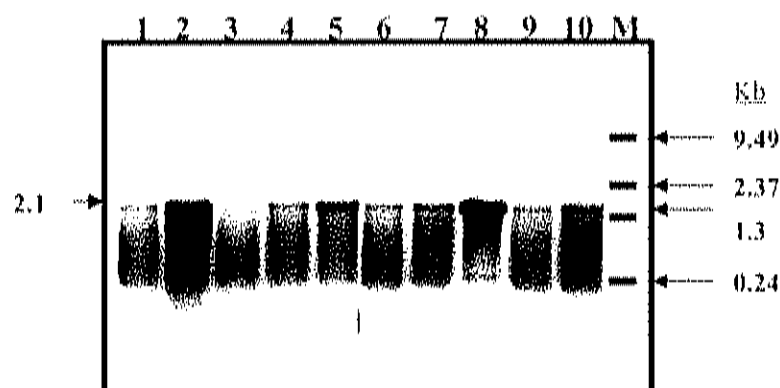


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído del RNA total obtenido a partir de hepatopáncreas de camarón blanco. Carriles 1-5: 5 μg de RNA total de camarones inoculados con SIC. Carriles 6-10: 5 μg de RNA total de camarones inoculados con Sephadex-DEAE. Carril M: marcador de alto peso molecular de RNA de 9,49-0,24 Kb.

Diseño de Oligonucleótidos y Obtención de los Fragmentos de los Genes

En el diseño de todos los oligonucleótidos se buscó que tuviera características similares (Tabla 2) en longitud, T_m , y contenido de GC, para que permitiera la amplificación simultánea de los diversos fragmentos por PCR y de esta manera evitar la competencia por oligonucleótidos (Dukas, *et al.*, 1993). El tamaño de los diversos productos se buscó que fuera diferente por lo menos 100 pb, para distinguir claramente el DNA evaluado durante el análisis por electroforesis y densitométrico para cuantificación.

Se hicieron PCR usando como molde el cDNA obtenido a partir del RNA total de hepatopáncreas y DNA genómico de músculo de *P. vannamei*. Se utilizaron 2 μ l del cDNA equivalente a 12.5 ng de mRNA (250 ng de RNA total) y para el DNA genómico se utilizó 100 ng. Se utilizaron las condiciones probadas y estandarizadas para el análisis de HDL-BGBP (Romo-Figueroa, *et al.*, enviado) descritas en el programa 1 de la Tabla 4; aunque también se probó el programa 2, con el cual se observó mas fondo debido a los ciclos adicionales y menor astringencia del programa.

Al separar por electroforesis los productos de PCR (Figura 2), se observó los fragmentos esperados de 980 pb para α -amilasa, 633 pb para α -glucosidasa, 870 pb para HDL/BGBP y 430 pb para L8. Para el análisis de HDL-BGBP se empleó electroforesis en geles de poliacrilamida nativos al 7.5% (Laemmli, 1970) (figura no mostrada), teñidos con bromuro de etidio.

Al igual que Romo-Figueroa (2003), cuando se usó como templado DNA genómico, solo se detectó amplificación con los oligonucleótidos de HDL-BGBP, obteniendo un fragmento del mismo tamaño que con el cDNA de hepatopáncreas indicando que en esta región el gen de HDL-BGBP no tiene intrones. Para los otros productos de PCR se esperaba que en la amplificación a partir de DNA genómico se obtuvieran bandas del mismo tamaño que los cDNAs correspondientes. Por lo que se corrieron las mismas reacciones en geles de poliacrilamida nativos al 7.5% teñidos con nitrato de plata

(Wallace, *et al.*, 1997), tienen una mayor sensibilidad que los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (figura no mostrada) en donde se detectaron las bandas esperadas (aunque de baja intensidad), debido probablemente al bajo número de copias de los genes (Giulietti, *et al.*, 2001). Al amplificar los cDNA de hepatopáncreas de organismos control y tratamiento, se detectó aproximadamente 5 veces mas alta la abundancia del mensaje de HDL-BGBP en el tratamiento comparado con el control. No se detectó diferencias en los fragmentos correspondientes a α -amilasa, α -glucosidasa y L8 entre el tratamiento y el control.

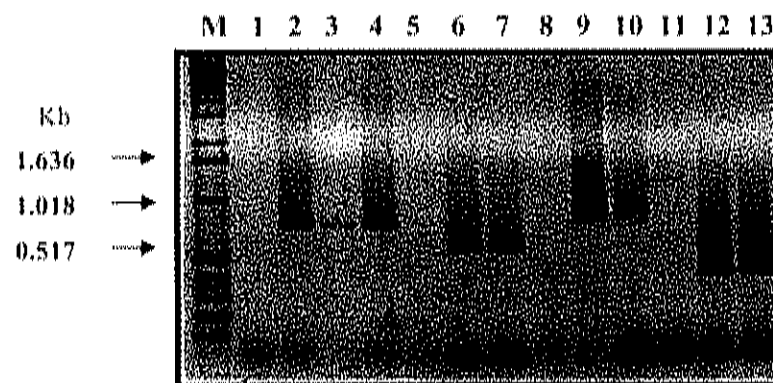


Figura 2. Productos de RT-PCR de HDL, α -glucosidasa, α -amilasa y proteína ribosomal L8 usando cDNA de hepatopáncreas y DNA genómico de *P. vannamei*. Carril M: Estándares de 1 Kb de DNA Ladder; carril 1: control negativo; carril 2: DNA genómico amplificado HDL-BGBP; carril 3 y 4: cDNA de Hp de organismos control y tratamiento para HDL-BGBP; carril 5, 6 y 7: DNA genómico, cDNA de Hp de organismos control y tratamiento amplificados para α -glucosidasa; carriles 8, 9 y 10: DNA genómico, cDNA de Hp de organismos control y tratamiento para α -amilasa; carriles 11, 12 y 13: DNA genómico, cDNA de Hp de organismos control y tratamiento para L8.

Identidad de los Fragmentos Obtenidos por RT-PCR

Existen dos formas para comprobar si los productos de amplificación obtenidos corresponden a los genes esperados: 1) purificar el fragmento amplificado y determinar la secuencia nucleotídica; 2) digerir los fragmentos con enzimas de restricción en base a la presencia de los sitios de restricción en las secuencias nucleotídicas ya conocidas. Para el

análisis se decidió digerir los fragmentos en estudio (α -glucosidasa, α -amilasa, HDL y proteína ribosomal L8) con enzimas de restricción y comprobar la identidad de los productos de PCR. Para esto, se localizaron las regiones incluidas en el fragmento y los sitios de corte con enzimas de restricción, utilizando el programa DNASIS v. 2.5 (Hitachi Software Engineering America, Ltd. Alameda, CA). De acuerdo a este análisis se seleccionó un par de enzimas diferentes para cada producto de PCR (Tabla 3).

La figura 3 muestra las digestiones realizadas. En los fragmentos digeridos se detectaron los tamaños esperados confirmando su identidad. Las sumas de los tamaños de los fragmentos digeridos concuerdan con el tamaño del fragmento completo (sin digerir), lo cual indica que este método resultó ser muy eficiente para la comprobación de la identidad de los productos obtenidos.

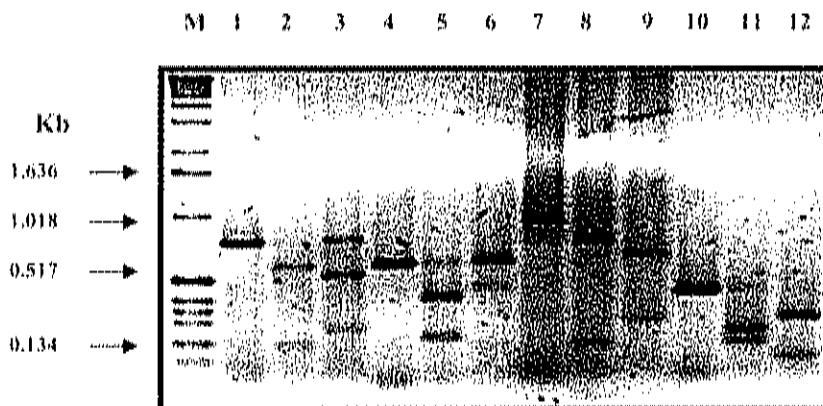


Figura 3. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de digestiones de los fragmentos amplificados de los genes de HDL-BGBP, α -glucosidasa, α -amilasa y proteína ribosomal L8. Carril M: Marcador de peso molecular de 1 Kb; Carril 4, 7 y 10: controles sin digerir de HDL-BGBP, α -glucosidasa, α -amilasa y L8 respectivamente; carriles 2 y 3: fragmento de HDL-BGBP digerido con *Hind*III y *Nde*I; carriles 5 y 6: fragmento de α -glucosidasa digerido con *Hind*III y *Bam*HI; carriles 8 y 9: fragmento de α -amilasa digerido con *Kpn*I y *Sal*I; carriles 11 y 12: fragmento de proteína ribosomal L8 digerido con *Bg*II y *Kpn*I.

Estandarización de las Condiciones de Amplificación

Una vez que se confirmó, mediante digestión con enzimas de restricción, que los productos de amplificación por PCR correspondían a los productos esperados, se procedió a la estandarización de los componentes de la amplificación con el fin de tener la mayor reproducibilidad posible.

Se probaron las reacciones de amplificación sencilla, simultánea doble y simultánea triple. Además, se probaron concentraciones diferentes y proporciones de los pares de oligonucleótidos (equimolaridad), la adición de dimetil sulfóxido (DMSO) y distintas cantidades de cDNA equivalentes de poli A⁺ como lo recomienda Dukas, *et al.*, (1993), para obtener una amplificación similar e intensa de múltiples muestras problema en el mismo tubo de PCR.

Con los ajustes en molaridad, se pretendió reducir los efectos de la poca expresión de los genes. Para aquellos mensajes que se encontraban en bajo número de copias se aumentó la molaridad de los oligonucleótidos para favorecer la formación del producto de PCR. En cambio, a aquellos mRNA que se encontraban en mayor abundancia se les disminuía la concentración de los oligonucleótidos. El DMSO (cosolvente) se utilizó con la finalidad de favorecer la desnaturalización de regiones ricas en GC del DNA, ayudando con esto a la eliminación de estructuras secundarias que afectan la amplificación. También se evaluó la utilización de distintas concentraciones de cDNA equivalentes de poly A⁺, ésto con el fin de lograr una mejor intensidad y/o resolución del bandeo. Cabe aclarar que cada uno de estos componentes se probó por separado y después se analizó su comportamiento en combinaciones de dos componentes.

Al variar la equimolaridad, se niveló de alguna manera la detección de los mensajes, es decir, para aquellos mensajes que se expresaban pobremente se aumentó la molaridad de los oligonucleótidos y con esto se aumentaba la concentración del producto de PCR. En cambio, para aquellos que se encontraban en mayor abundancia se disminuía la concentración de los oligonucleótidos y bajó su producto dando oportunidad a que los

componentes de la reacción de PCR no fueran consumidos solo por el producto más abundante.

En los ensayos preliminares de amplificaciones sencillas se observó que con concentraciones de oligonucleótidos equimolares (Figura 4), se producían bandas bastante intensas y definidas comparadas con las no equimolares, en las cuales también se presentaban bandas definidas pero con menor intensidad. Las bandas de α -glucosidasa, α -amilasa y la proteína ribosomal L8 se observaron claramente en geles de agarosa. En cambio el gen de HDL-BGBP no se detectó debido, probablemente, a la baja presencia del mensaje, por lo que fue necesario trabajar con geles de poliacrilamida por su mayor sensibilidad (Wallace, 1997). La adición del DMSO al 2%, no se modificó en las intensidades de las bandas, pero disminuía el fondo lo cual es muy importante porque disminuye interferencias durante el análisis densitométrico. Dukas *et al.*, (1993), recomiendan utilizar del 1 al 10% de DMSO, sin embargo, en estos análisis sólo se utilizó DMSO al 2% obteniéndose buenos resultados.

En la figura 5, se presentan los resultados de las amplificaciones dobles del gen a evaluar y la proteína ribosomal L8. Los resultados fueron similares a las amplificaciones sencillas; las amplificaciones de las bandas con concentraciones equimolares de oligonucleótidos fueron más intensas que las de las concentraciones no equimolares de los oligonucleótidos. En cuanto al efecto de adición del DMSO al 2%, al igual que en las reacciones sencillas permitió una disminución del fondo, por lo cual se decidió utilizar concentraciones equimolares de oligonucleótidos y agregar DMSO al 2%.

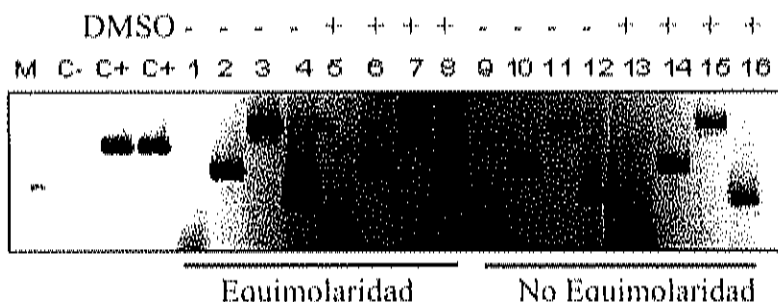


Figura 4. Electroforesis en geles de agarosa al 1.2% de reacciones de amplificación sencillas. Carriles M: marcador de 1 Kb DNA Ladder; carril C-: control negativo; carriles C+: control positivo; carriles 1, 5, 9 y 13: HDL-BGBP; carriles 2, 6, 10 y 14: α -glucosidasa; carriles 3, 7, 11 y 15: α -amilasa; carriles 4, 8, 12 y 16 L8; carriles 1-4 y 9-12 sin DMSO 2%; carriles 5-8 y 13-16 con DMSO 2%; carriles 1-8 equimolares; carriles 9-16 no equimolares.

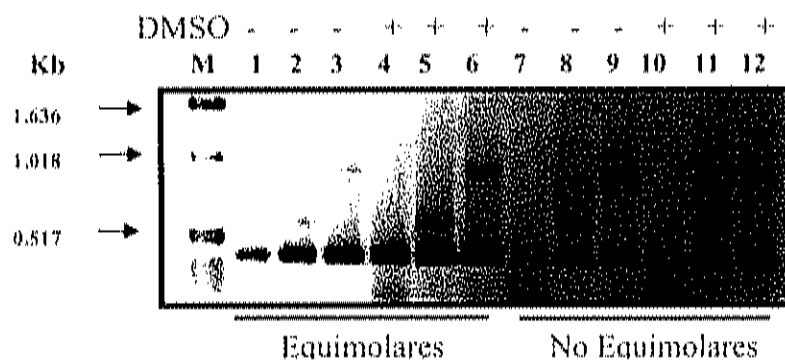


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de reacciones de amplificación doble. Carril M: marcador de 1 Kb de DNA Ladder; carriles 1, 4, 7 y 10: HDL-BGBP/L8; carriles 2, 5, 8 y 11: α -glucosidasa/L8; carriles 3, 6, 9 y 12: α -amilasa/L8; carriles 1-3 y 7-9 sin DMSO 2%; carriles 4-6 y 10-12 con DMSO 2%; carriles 1-6: Equimolares y carriles 7-12: No equimolares.

Fase Lineal de la Amplificación

Antes de evaluar la expresión de los genes por PCR fue necesario determinar la fase lineal de la cinética de amplificación. Para ello se prepararon reacciones dobles

monitoreadas a lo largo de diferentes números de ciclos y se analizaron las bandas obtenidas por densitometría para estimar la intensidad de forma cuantitativa. La Figura 6 muestra los resultados de amplificación para la α -amilasa y proteína ribosomal L8 de tratamiento; en donde la α -amilasa se empieza a detectar en las muestras tratamiento a partir del ciclo 20 aumentando hasta el ciclo 35, a diferencia de las muestras control en las cuales no se detectó (Figura no mostrada). Con respecto a la proteína ribosomal presente en la muestra tratada se observa un claro aumento en las intensidades netas a partir de ciclo 15 hasta el ciclo 30, manteniéndose constante posteriormente.

La cinética presentada por la coamplificación de α -glucosidasa y L8; se empezó a detectar señal de α -glucosidasa a partir del ciclo 15 aumentando gradualmente hasta el ciclo 35 y L8 también se detectó señal a partir el ciclo 15, pero este aumento solo se mantuvo hasta el ciclo 30, ya que a partir de ahí se observó una baja en la cantidad de mensaje, esto se debe posiblemente a problemas de evaporación de las muestras y no cargó el volumen adecuado en el último punto (Figura no mostrada). Este comportamiento de L8 de α -glucosidasa coincide con el que presentó L8 al coamplificarse con HDL-BGBP debido a las mismas causas. En la HDL-BGBP no fue posible determinar la fase lineal de la amplificación ya que no se detectó nada de mensaje en los dos tratamientos, posiblemente debido a una muy baja concentración del mRNA ya que el análisis se hizo solamente en geles de agarosa.

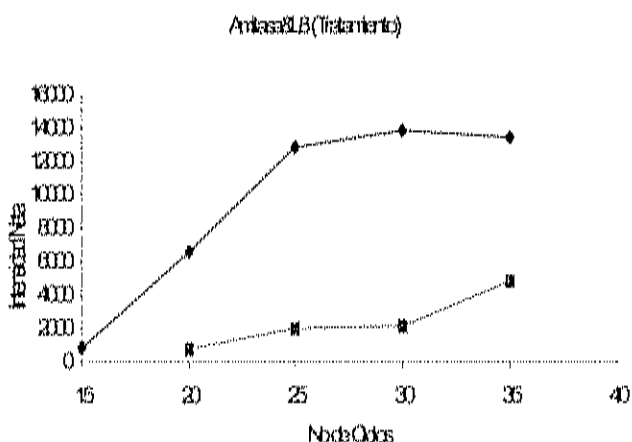


Figura 6. Análisis de la cinética de la amplificación del gen de α -amilasa y la proteína ribosomal L8 en camarones tratados (Sephadex DEAE). \blacklozenge = proteína ribosomal L8, \blacksquare = α -amilasa.

Por lo tanto, con los datos obtenidos en cada una de las amplificaciones dobles se concluyó que 25 ciclos son suficientes para detectar una señal cuantificable dentro del rango lineal de la amplificación y esto se usó para las evaluaciones posteriores.

Estos resultados de la cinética de amplificación siguieron el mismo comportamiento que los reportados por Dukas *et al.*, (1993), quienes diseñaron un método de cuantificación de varios mRNAs por RT-PCR. Encontraron en el monitoreo continuo de la amplificación a lo largo de 30 ciclos, que en los ciclos 25 y 26 se tenían suficiente cantidad para la detección de la señal dentro del rango lineal de la amplificación. Además detectaron los productos de PCR en geles de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio.

Para obtener una amplificación similar de dos genes en el mismo sistema de PCR, fue necesario ajustar la concentración de cada par de oligonucleótidos, utilizar altas condiciones de astringencia alta (temperaturas de alineación) y la adición de solventes orgánicos. El método se evaluó probando variaciones de los mRNAs de c-Ki-Ras, ornitina descarboxilasa (ODC), α -amilasa y de β -actina durante el crecimiento de células tumorales pancreáticas AR4-2J (Dukas, *et al.*, 1993). La expresión del gen de

gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa (GADPH), mostró muy poca variación, lo cual confirmó que éste representa un buen estándar interno para el estudio de expresión de genes. En la amplificación por PCR del cDNA y el templado interno, se lograron bandas muy intensas y bien definidas en amplificaciones simultáneas, lo cual valida el aspecto cuantitativo del método (Dukas, *et al.*, 1993).

Efecto de la Inoculación con Sephadex DEAE Sobre la Expresión de HDL-BGBP, α -Amilasa y α -Glucosidasa

Expresión de HDL-BGBP

Las concentraciones de las bandas producidas en el RT-PCR, fueron cuantificadas por densitometría (píxeles). La expresión del mRNA de la HDL-BGBP en los camarones inoculados con Sephadex DEAE fue estadísticamente diferente comparado con el control ($P > 0.05$). La media de la intensidad de la banda fue de 889.7 y 32 145.65 para los camarones control y tratados respectivamente, correspondiendo a una acumulación de 36 veces en el mRNA de la HDL-BGBP por efecto de la inoculación con Sephadex DEAE (Figura 9, panel A). Cuando se normalizó este dato respecto a las intensidades de L8 utilizada como control constituido, las medias fueron de 0.589 y 0.7644 para el control y el tratamiento (Figura 9B), respectivamente, así la diferencia se reduce a 13X, indicando un efecto general de transcripción que se reflejó en los niveles de L8 (Fig 9B).

A pesar de la gran desviación estándar, en particular de los camarones tratados, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría ser una indicación de la variabilidad individual de los camarones. Si en particular se elimina un camarón que presentó los valores mas diferentes, las desviaciones estándar se reducen significativamente, como se muestra en la figura 9C, pero se mantiene la diferencia estadística.

gliceraldehido-6-fosfato deshidrogenasa (GADPH), mostró muy poca variación, lo cual confirmó que éste representa un buen estándar interno para el estudio de expresión de genes. En la amplificación por PCR del cDNA y el templado interno, se lograron bandas muy intensas y bien definidas en amplificaciones simultáneas, lo cual valida el aspecto cuantitativo del método (Dukas, *et al.*, 1993).

Efecto de la Inoculación con Sephadex DEAE Sobre la Expresión de HDL-BGBP, α -Amilasa y α -Glucosidasa

Expresión de HDL-BGBP

Las concentraciones de las bandas producidas en el RT-PCR, fueron cuantificadas por densitometría (píxeles). La expresión del mRNA de la HDL-BGBP en los camarones inoculados con Sephadex DEAE fue estadísticamente diferente comparado con el control ($P > 0.05$). La media de la intensidad de la banda fue de 889.7 y 32 145.65 para los camarones control y tratados respectivamente, correspondiendo a una acumulación de 36 veces en el mRNA de la HDL-BGBP por efecto de la inoculación con Sephadex DEAE (Figura 9, panel A). Cuando se normalizó este dato respecto a las intensidades de L8 utilizada como control constituido, las medias fueron de 0.589 y 0.7644 para el control y el tratamiento (Figura 9B), respectivamente, así la diferencia se reduce a 13X, indicando un efecto general de transcripción que se reflejó en los niveles de L8 (Fig 9B).

A pesar de la gran desviación estándar, en particular de los camarones tratados, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría ser una indicación de la variabilidad individual de los camarones. Si en particular se elimina un camarón que presentó los valores mas diferentes, las desviaciones estándar se reducen significativamente, como se muestra en la figura 9C, pero se mantiene la diferencia estadística.

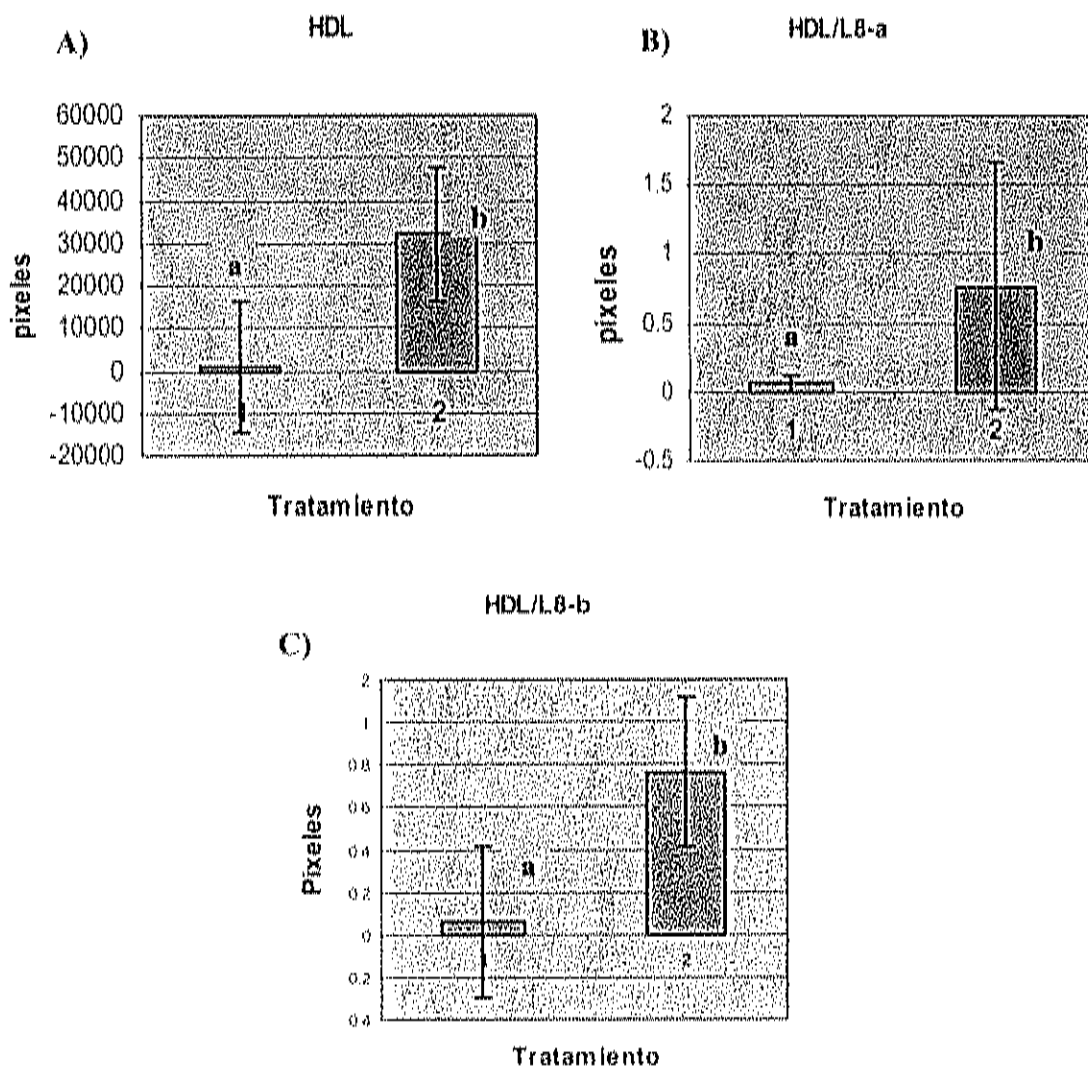


Figura 7. Niveles del mRNA de la HDL-BGBP en hepatopáncreas de camarón blanco. Tratamiento 1, inoculado con SIC (control) y tratamiento 2, inoculado con Sephadex DEAE. A) Intensidades netas de HDL-BGBP; B) relación de las intensidades netas de HDL-BGBP normalizado con L8 (HDL-BGBP/L8), C) relación de HDL-BGBP/L8 excluyendo un camarón. Letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas.

La acumulación del mRNA (13X) de la HDL-BGBP por efecto de la inoculación con Sephadex DEAE, indica un reconocimiento de "material no-propio", relacionado aparentemente con la función de BGBP. En particular, el cambio en la expresión del mensje de HDL-BGBP podría ser la respuesta a los β -glucanos que forman la Sephadex DEAE, aunque no es posible descartar el efecto del DEAE. Cedano-Thomas (2000) demostró inducción de expresión de genes en hemocitos en respuesta a la inoculación con Sephadex conteniendo DEAE, CM (carboximetil) y sin carga. Los resultados reportan patrones diferentes de acuerdo al tipo de brazo unido a Sephadex y donde los diversos y abundantes de respuesta fueron producidos por la inoculación con partículas cargadas, por lo que se propone que la carga tiene efecto en la inducción. Sin embargo, en este trabajo solo se evaluó Shepadex DEAE y en diferente tejido, por lo que se ignora hasta el momento si el hepatopáncreas podría responder de forma diferente a las cargas de los compuestos con los que se inocula o reta al camarón.

El gen de la HDL-BGBP del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) se expresa en hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias, pero no en hemocitos, y la mayor expresión ocurre en hepatopáncreas (Romo Figueroa *et al.*, 2003 enviado). Como esta proteína reconoce glucanos, la respuesta a Sephadex DEAE en este estudio parece ser similar a lo reportado para la LGBP por infección viral (Roux, *et al.*, 2002), argumentando el rol en el sistema de reconocimiento de material "no-propio".

Otras proteínas reconocedoras de beta glucanos aparentemente distintas a la HDL-BGBP se han reportado en varios crustáceos. En el langostino *P. leniusculus*, la proteína unidora de lipopolisacáridos y beta-1,3-glucanos (LGBP) de hemocitos tiene regiones similares a la proteína unidora de bacterias Gram (-) así como a las 1,3-glucanasas (Lee, *et al.*, 2000), pero no se tiene evidencia que sea una lipoproteína y es de menor tamaño. También en el camarón tigre *P. monodon* se ha encontrado la proteína que une beta 1,3-glucanos (GBP), pero es mucho mas pequeña que la HDL-BGBP (31 kDa) y es sintetizada en hemocitos.

En camarones del Pacífico Mexicano también se han encontrado este tipo de proteínas de reconocimiento. La LGBP de camarón azul (*Penaeus stylirostris*), es inducida en la infección por el virus de la mancha blanca WSV, por lo que se sugirió que la LGBP es una proteína inducible en la fase aguda y que juega un papel crítico no solamente en patogénesis causadas por bacterias y hongos, sino también por virus (Roux, *et al.*, 2002).

La glándula digestiva es también un sitio de almacenamiento de lípidos que son utilizados en crecimiento, maduración y reproducción, como fuente de energía para formar membranas celulares y para sintetizar hormonas; también en camarones silvestres y cultivados se han encontrado diferencias en concentración y distribución de los lípidos, sugiriendo que se debe al tipo de alimento que consumen y probablemente relacionado con las concentraciones circulantes de las lipoproteínas (revisado en: Yepiz-Plascencia, 2000). Además, los lípidos son utilizados como principal fuente de energía durante el periodo de ayuno previo a la muda (Barclay, *et al.*, 1983). La HDL es una de las lipoproteínas involucradas en el transporte de lípidos, además de participar activamente en el sistema de defensa de invertebrados, tal como lo describe Yepiz-Plascencia, *et al.*, (1998a) en *Penaeus vannamei*; y Hall, *et al.*, (1995) en el langostino *P. leniusculus* en donde fue descrita por primera vez y Komatsu & Ando, (1998) en el cangrejo de arena *Ibacus ciliatus*. Aunque hasta el momento no existen reportes de inducción del mensaje de la HDL-LGBP de crustáceos por lípidos dietarios, lo cual resultaría muy interesante, el cambio de su expresión por el efecto de glucanos demostrando la importancia de esta proteína en el sistema de defensa y que es un gen inducible.

Recientemente se demostró en larvas de palomilla de la cera *Galleria mellonella*, que la inmunoestimulación del insecto con bacterias induce cambios en la composición lipídica de las lipoproteínas de la hemolinfa (Dettloff, *et al.*, 2001). Después de las primeras cuatro horas de la inmunoestimulación, una parte de las lipoproteínas larvales de alta densidad (HDLp) se convierten a lipoproteínas de baja densidad (LDLp). Este fue el primer reporte en insectos de la activación directa del metabolismo de los lípidos y las reacciones inmunes. No obstante, los detalles de los mecanismos que regulan la estimulación inmune y su efecto en el metabolismo de lípidos se desconocen.

Para la formación de la LDLp, la proteína realiza una reasociación lipídica después de la infección bacteriana, por lo que Dettloff, *et al.*, (2001), concluyen que el proceso de respuesta a la inoculación con bacterias requiere el transporte de lípidos para obtener energía, permitiendo la formación de la LDLp. Esta lipoproteína puede actuar entonces como un estimulador, activando a los hemocitos y a su vez induciendo el sistema de defensa del insecto concomitante con la movilización de los lípidos para la formación de las LDLp. Si el metabolismo de lípidos y el sistema inmune están relacionados en este mecanismo, ambos pueden influenciarse uno a otro (Dettloff, *et al.*, 2001).

Expresión de α -Amilasa y α -glucosidasa

De forma similar a la HDL-BGIP, se estudió el efecto de la inoculación con Sephadex DEAE en la expresión de la enzima α -amilasa. La media de la intensidad de las bandas de amilasa fue de 7,041 y 12,665, correspondiente a 1.8X más alto en los tratados con DEAE que para el control (Fig. 10A), sin embargo al normalizar los valores en referencia a L8, las diferencias desaparecen con medias de 0.2449 y 0.2141 (Fig. 10B), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Es notorio también que aunque las desviaciones estándar son altas, en general son menos extremas las diferencias.

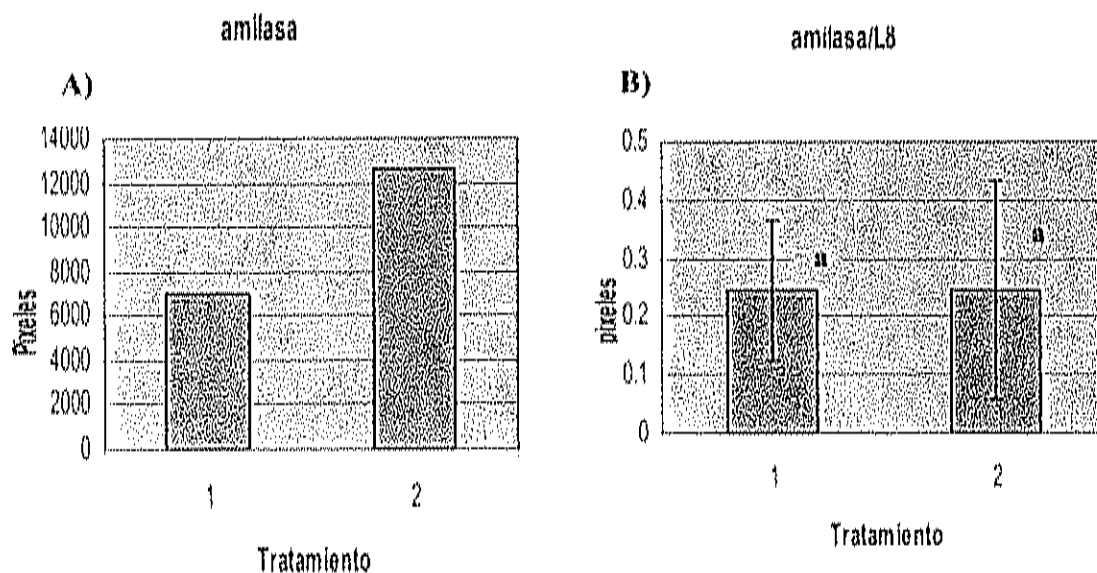


Figura 8. Concentración del mRNA del gen de α -amilasa en hepatopáncreas de camarón blanco. A) Intensidades netas de las bandas de RT-PCR y B) datos normalizados contra L8 (amilasa/L8). Tratamiento 1, control inoculado con SIC; tratamiento 2, camarones inoculados con Sephadex DEAE.

El análisis de la expresión de α -glucosidasa indica que al igual que en α -amilasa, aparentemente hay un aumento de la concentración del mRNA en los camarones inoculados con Sephadex DEAE con medias con diferencias de 3 veces. Sin embargo, la normalización con respecto a L8 indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Fig 11, panels A y B, respectivamente). Como se muestra en la figura, las desviaciones estándar son mas altas en los organismos inoculados con Sephadex DEAE, sugiriendo de la misma forma que en los casos anteriores hay mas diferencias individuales en la respuesta al material "no propio", aunque la media de los valores normalizados de los organismos inoculados con respecto a los controles inoculados es 1.5 veces mas alta.

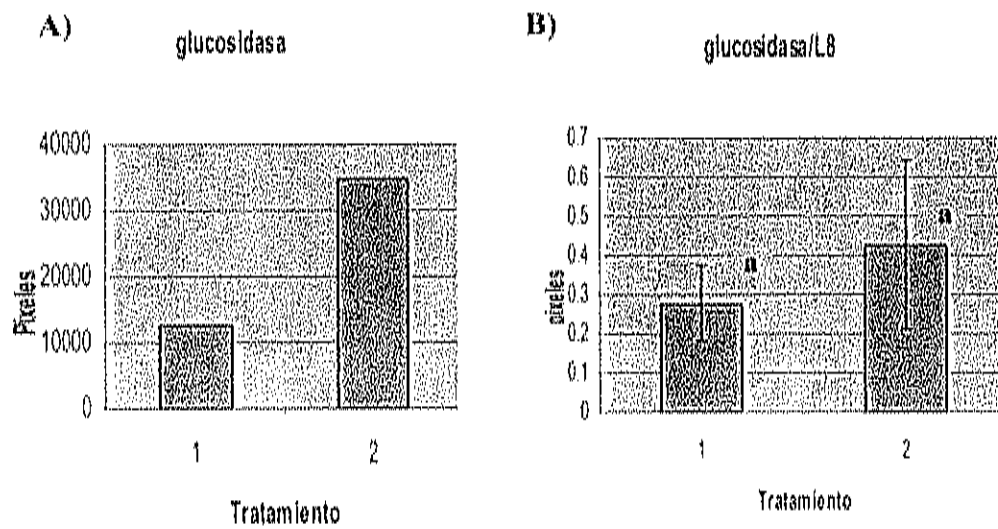


Figura 9. Concentración del mRNA del gen de α -glucosidasa en hepatopáncreas de camarón blanco. A) Intensidades netas de las bandas de RT-PCR y B) datos normalizados contra L8 (glucosidas/L8). Tratamiento 1, control inoculado con SIC; tratamiento 2, camarones inoculados con Sephadex DEAE.

El hepatopáncreas de los decápodos es un órgano de vital importancia involucrado en diversas actividades metabólicas, entre las cuáles se encuentran la síntesis y secreción de enzimas digestivas (proteasas, lipasas y carbohidrasas) y la absorción de nutrientes. La función de este órgano también se ha relacionado con la excreción, ciclo de muda y metabolismo de lípidos y carbohidratos. Por lo menos algunas de estas funciones son controladas neuroendócrinamente (Gibson y Barker, 1979; Rosas, *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos indican que las glicohidrolasas digestivas no se modifica su expresión genética son con la inoculación de Sephadex DEAE, sin embargo, sería interesante investigar si al inocularlos con α -glucanos se modificaría su expresión genética.

La α -amilasa del camarón *Penaeus vannamei*, es una de las carbohidrasas producidas por el hepatopáncreas y está asociada con las funciones digestivas de este tejido. Existen dos formas activas (a y b) con pesos moleculares de alrededor de 30 kDa (Van Wormhoudt, *et al.*, 1995), comparado con 55 kDa de α -amilasas de otros orígenes (Keller *et al.*, 1971). Estas isoenzimas presentan importantes variaciones durante el crecimiento (Van Wormhoudt y Sellos, 1980), el desarrollo larval (Van Wormhoudt, 1973), los ciclos de intermuda (Van Wormhoudt, 1974-1983) y en diferentes estados de nutrición (Le Moullac, 1994). Además, se conoce que las hormonas, metabolitos y temperatura influyen enormemente en la actividad de esta enzima (Van Wormhoudt & Sellos, 1980). Una represión de la expresión de la isoforma (a) se reportó en experimentos dietarios en las cuales la concentración de caseína fue aumentada (Van Wormhoudt, *et al.*, 1996),

Por su parte, la α -glucosidasa, es una glucosil-hidrolasa que juega un papel muy importante en los pasos finales de la digestión del almidón (Whitaker, 1972). Esta enzima es miembro de un grupo de enzimas con especificidad directa hacia la exohidrólisis de uniones α -1-4 glucosídicas que rompe rápidamente a los oligosacáridos, en contraste con los polisacáridos los cuales son hidrolizados más lentamente o de forma parcial. Las α -glucosidasas se han encontrado en microorganismos, plantas y animales, además hay

reportes de varias estructuras primarias completas. Sin embargo, existe poca información en crustáceos. Estas glucosidasas se localizan en diferentes compartimientos celulares incluyendo el lisosomal (Jeffrey, *et al.*, 1970), ancladas en el borde de la membrana intestinal o secretadas en el caso de las enzimas de microorganismos (Shanta, *et al.*, 1993). Al igual que α -amilasa, el ANOVA de α -glucosidasa no detectó diferencias estadísticamente significativas en tratamiento con respecto al control de estos organismos ($P > 0.05$).

En experimentos anteriores se encontró que la inoculación con partículas inertes (Sephadex DEAE) produjo cambios en la expresión de genes de hemocitos en *P. californiensis*. Este efecto fue evaluado por RT-PCR utilizando tres diferentes oligonucleótidos arbitrarios A1, A3 y A5, donde se observó un aumento en la expresión de mRNAs al amplificarlo con el oligonucleótido A5 inoculados con esta partícula cargada positivamente pero se desconoce aún la identidad de los genes inducidos (Cedano-Thomas, 2000). En este trabajo tampoco se normalizó la expresión respecto a un gen constitutivo, por lo que también se ignora si el efecto fue gen-específico o general en la transcripción.

Expresión del Gen de la Proteína Ribosomal L8 Comparado con los Genes de HDL-BGBP, α -Amilasa y α -Glucosidasa

Para la normalización de los niveles de los mRNAs estudiados, se incluyó en el estudio la amplificación del mRNA de la proteína ribosomal L8. En los casos de α -amilasa y α -glucosidasa, la evaluación se realizó de forma simultánea con L8. Aunque se usaron las mismas concentraciones de cDNA, los resultados indican una ligera variación que puede ser atribuida a efectos generales en la transcripción (Fig. 12A), pero también parecen existir efectos por la co-amplificación cuando se comparan los resultados de la evaluación de diferentes genes con la misma muestra (Fig. 12B), a las variaciones entre reacciones de PCR por el manejo de las soluciones y el error experimental.

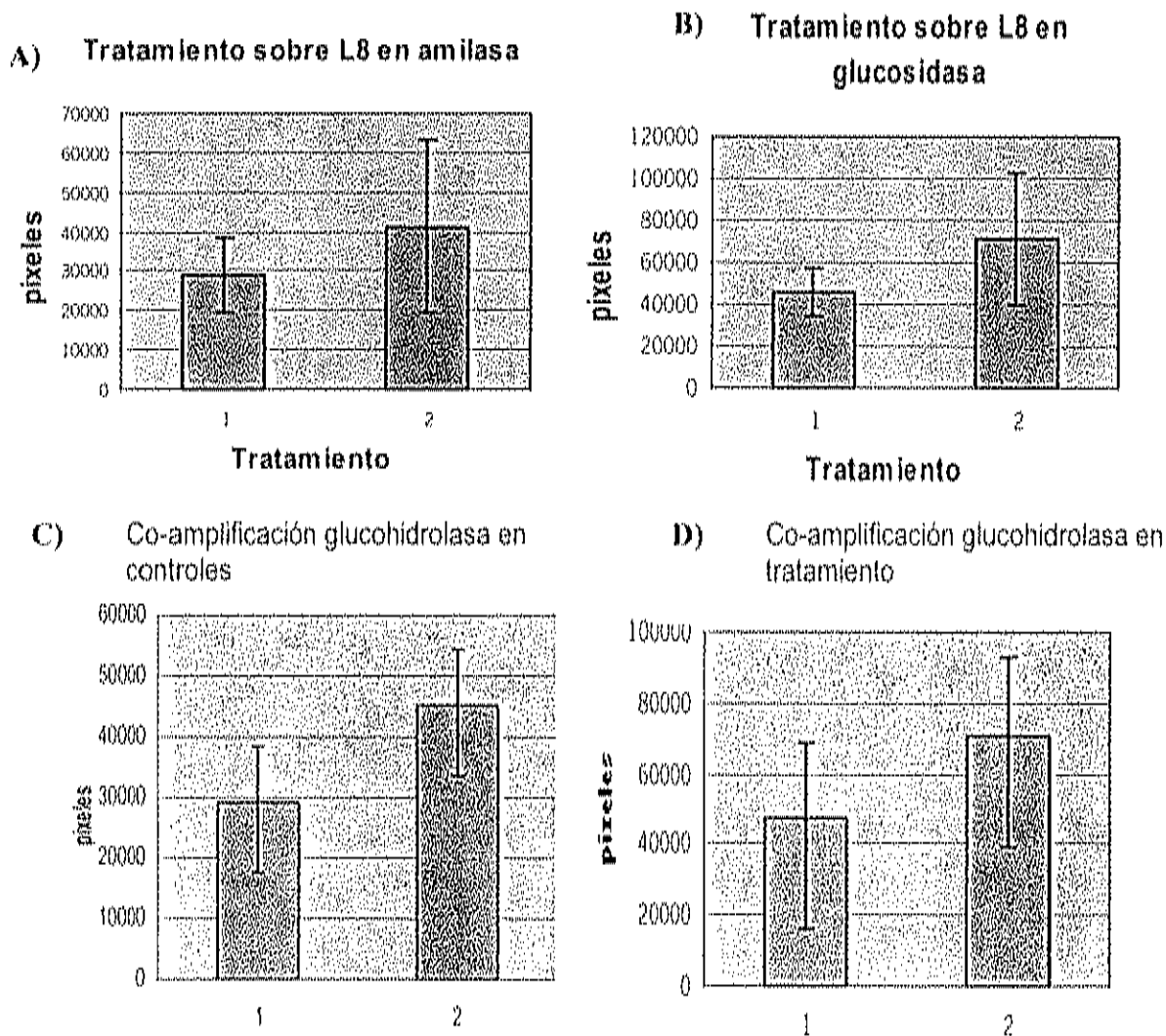


Figura 10. Niveles de L8 (gen constitutivo) en camarones inoculados y efecto de la co-amplificación. Panels A y B, efecto del tratamiento sobre L8. 1 son camarones control y 2, camarones inoculados con Sephadex DEAE. Panel C y D, glucosidrolasa 1= α -amilasa y 2= α -glucosidasa.

Sánchez-Paz, *et al.*, (2003), en el hepatopáncreas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) reporta un incremento de la concentración del mRNA de tripsina muy marcado después de las 24 h de ayuno, seguido por una disminución comparados con camarones que

alimentados. Estos reportes sugieren regulación a nivel transcripcional de la tripsina de hepatopáncreas por efecto de la alimentación. Estos cambios significativos observados en la concentración de mRNA de tripsina sugieren un posible mecanismos de regulación a nivel transcripcional como respuesta a estímulos externos (como el ayuno) e internos (como el estadio de muda) en el hepatopáncreas.

Los resultados obtenidos por Sánchez-Paz, *et al.*, (2003), coinciden con los estudios realizados por Muhlia-Almazán *et al.*, (2003), donde se estudió el efecto de la concentración de proteína dietaria sobre la actividad y nivel del mRNA de tripsina en el hepatopáncreas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Los camarones alimentados con 15, 30 y 50% de proteína presentan diferencias en la actividad de tripsina y quimotripsina y en el nivel del mRNA de tripsina. Los camarones alimentados con 30% de proteína mostraron las mas altas actividades de tripsina y quimotripsina, así como un nivel mas alto del mRNA de tripsina que en los otros dos niveles, sin embargo, la magnitud de cambio sugiere que la transcripción máxima de mRNA fue con la alimentación del 30% de proteína y después empieza a decaer independientemente del aumento de la cantidad de la proteína dietaria, sugiriendo que la expresión de los genes de tripsina es regulada transcripcionalmente. Por lo tanto, existen evidencias de regulación transcripcional en hepatopáncreas, resultando en la inducción o represión de genes en respuesta a la alimentación, al estadio de desarrollo y a la presencia de virus.

Las proteínas ribosomales como L8 se han considerado genes constitutivos, es decir los niveles de sus mRNA se mantienen de forma constante. Cambios en ellos denotan cambios transcripcionales generales en el tejido. A pesar de las grandes desviaciones estándar, los resultados obtenidos muestran una inducción estadísticamente significativa solo en el caso de la HDL-BGBP, y solo una ligera tendencia a aumentar en los genes de α -amilasa y α -glucosidasa. Esto podría estar relacionado con la identidad de las partículas de Sephadex DEAE inoculadas que están compuestas por β -glucanos, por lo tanto no son digeridos por carbohidrasas que actúan sobre α -glucanos y sugiere que el

reconocimiento de la proteína por el glucano es capaz de distinguir el tipo de enlace glicosídico.

De los miles de genes presente en un eucariote, en una célula determinada, y en un tiempo dado, quizás solamente se exprese un 15% de ellos, siguiendo la vía gen DNA→mRNA→proteína. La regulación de la expresión ocurre en forma temporal y espacial diferencial, lo cuál da origen y especializa a los diferentes tejidos y órganos, siendo esto la base de los mecanismos de control. La comparación de la expresión de los genes en diferentes tipos de células brinda la información necesaria para analizar los procesos biológicos que controlan la vida (Liang y Pardee, 1992). Los genes que son expresados diferencialmente, tanto en tiempo como en espacio, son la base del proceso que lleva a una simple célula, a través del proceso del desarrollo embrionario, a dar origen a organismos con una extraordinaria variedad de tipos celulares (Blumberg & Izpisua-Belmonte, 1999).

De aquí es muy importante el estudio de mRNAs específicos, especialmente aquellos que están presentes en un bajo número de copias presentes en una mezcla de células normales, así como también el análisis de inducción del mRNA en respuesta a un estímulo externo (drogas, hormonas, infección por virus o bacterias) o cualquier cambio con una variedad de condiciones como estrés, temperatura, ayuno, etc (Giulietti, *et al.*, 2001)

Sin embargo, a pesar de que la PCR es un proceso de amplificación exponencial, la alta eficiencia de la PCR puede amplificar pequeñas diferencias en cada ciclo de la reacción y traducirse a grandes diferencias en la obtención del producto final amplificado. Estas pequeñas variaciones que afectan la cuantificación del mensaje, ocurre con mayor frecuencia en las reacciones que son preparadas con mezclas de RNAs o en tubos separados, aún cuando los parámetros de la reacción sean controlados al 100%. Para monitorear esta variabilidad de tubo a tubo y lograr una cuantificación lo más precisa posible se utilizó a la proteína ribosomal L8, gen que se expresa constitutivamente y funciona como un buen control interno según lo reportado por Vanden-Heuvel, (1998).

En un estudio de expresión diferencial del mRNA de tripsina realizado por Sánchez-Paz *et al.*, (2003) reporta un incremento en la concentración del mRNA de tripsina muy marcado después de las 24 h de ayuno, seguido por una disminución comparados con camarones que si fueron alimentados. Para este estudio se utilizaron dos genes constitutivos, la β -actina y el 16S rRNA como estándares de expresión y recomienda que se utilicen con extremo cuidado puesto que su expresión esta fuertemente influenciada por la fisiología del organismo. En ese reporte se demostró también la influencia de la muda sobre la expresión de actina en camarón blanco y una influencia también sobre la expresión de un gen mitocondrial, 16S rRNA de en *P. vannamei*, indicando también la influencia de los estados fisiológicos sobre el genoma mitocondrial.

El análisis estadístico (ANOVA) y la utilización de la proteína ribosomal L8 del presente trabajo en los genes de HDB-BGBP, α -amilasa y α -glucosidasa muestran que si hay ligeras diferencias en cuanto a la concentración de la proteína ribosomal por efecto de la inoculación de la partícula inerte. El hecho de que genes que se consideran constitutivos han sido descritos como regulados ha sido reportado con anterioridad por varios autores. Siebert (1999) menciona que son pocos los genes que son expresados de manera estrictamente constitutiva, incluyendo el gen de la β -actina; mientras que Schmittgen y Zakrajsek (2000), en un trabajo sobre el efecto del tratamiento experimental en la expresión de genes constitutivos, recomiendan una estricta validación de la expresión constitutiva.

CONCLUSIONES

- 1) La inoculación de camarones con Sephadex DEAE aumentó la expresión del gen de HDL-BGBP en el hepatopáncreas.
- 2) No se encontraron cambios estadísticamente significativos en la concentración de mRNA de α -amilasa y α -glucosidasa, sin embargo, se sugiere un ligero aumento general de transcripción por la presencia de material "no-propio".
- 3) La expresión de L8 presentó un ligero aumento, indicadora de cambios generales en la transcripción.
- 4) La metodología empleada para la cuantificación de los mensajes de HDL-BGBP, α -amilasa y α -glucosidasa de camarón es adecuada aunque laboriosa de acuerdo al número de genes evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, G., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**: 403-410.
- Barclay, M.C., Dall, W. & Smith, D. M. (1983). Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **68**: 229-244.
- Boer, P. M. & Hickey, D. A. (1986). The α -amylase gene in *Drosophila melanogaster*: nucleotide sequence, gene structure and expression. *Nucleic Acids Research*. **14**: 8399-8411.
- Blumberg, B. & Izpisua-Belmonte, J. C. (1999). Subtractive hybridization and construction of cDNA libraries. *Methods in Molecular Biology*. **97**: 555-574.
- Cedano-Thomas, Y. (2000). Diferencias en la expresión por inoculación de partículas abióticas en camarón café (*Penaeus californiensis*). Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. 64.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Tapio-Palva, E., Iwanaga, S. & Söderhäll, K. (1994). Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *Journal of Biological Chemistry*. **269**: 29462-29467.
- Chomczynsky, P. & Sachi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. **162**: 156-159.
- Cosbert, J. 1998. Las enzimas de la buena mesa, tecnología enzimática aplicada en la panificación. 66-86.
- Dall, W. & Moriarty, D. J. (1983). Functional aspects of nutrition and digestion. En: *The Biology of Crustacea*. Mantel, L. H., ed. Academic Press New York. 215-261.
- Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C. & Weisner, A. (2001). Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell Tissue Research*. **306**: 449-458.
- Dukas, K., Sarfati, P., Vaysse, N. & Pradayrol, L. (1993). Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. **215**: 66-72.
- Dynal. (1995). Biomagnetic techniques in molecular biology. Second ed. Dynal Lit. Ser. 35-52.
- Fourney, R. M., Miyakoshi, J., Day III, R. S. & Paterson, M.C. (1988). Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus*. **10**: 5-7.

- García-Bañuelos, M. L. (1997). Localización del sitio de síntesis de la apo-HDL plasmática de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C, Hermosillo, Sonora. 98.
- Gibson, R., & Barker, P. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology*. **17**: 285-346.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valcke, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, Ch. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. **25**: 386-401.
- Gollas-Galván, T., García-Bañuelos, M. L., Vargas-Albores, F. & Yepiz-Plascencia, G. (1999). Detección del sitio de síntesis de una lipoproteína de hemolinfa de camarón. Memorias III Congreso de Ciencias Alimentarias y Biotecnología., Hermosillo, Sonora.
- Grossman, G. L. & James, A. A. (1993). The salivary gland of the vector mosquito *Aedes aegypti* expresses a novel member of the amylase gene family. *Insect Molecular Biology*. **1**: 223-232.
- Hall, M., Van Heusden, M. C. & Söderhäll, K. (1995). Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **216**: 939-946.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. & Vargas-Albores, F. (2000). El sistema de activación de la profenoloxidasas de crustáceos: un modelo de reconocimiento y defensa de los invertebrados. *Ciencia*. **51**: 21.
- Hwee-Tan, S., Degnan, B. M. & Lehnert, S. A. (2000). The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. *Marine Biotechnology*. **2**: 126-135.
- Innis, M. A. & Gelfand, D. H. (1990). Optimization PCRs. En: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, ed. San Diego, CA, USA., Academic Press, Inc. pp 1-12.
- Jean, S., Bideau, Ch., Bellon, L., Halimi, G., De Méo, M., Orsière, T., Duménil, G., Bergé-Lefranc, J. & Botta, A. (2001). The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365-nm UVA: study by cDNA arrays and real-time quantitative RT-PCR. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1552**: 89-96.
- Jeffray, P. L., Brown, D. H. & Brown, B. I. (1970). Studies of lysosomal alpha-glucosidase: purification and properties of the rat liver enzyme. *Biochemistry*. **9**: 1403-1415.
- Keller, P., Kaufman, D. L., Allan, B. J. & Williams, B. L. (1971). Isoenzymes of human parotid α -amylases. *Biochemistry*. **10**: 4867-4874.

- Lanz, H., Hernández, S., Garrido-Guerrero, E., Tsutsumi, V. & Aréchiga, H. (1993). Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental and Comparative Immunology*. **17**: 399-406.
- Le Chevalier, P., Sellos, D. & Van Wormhoudt, A. (2000). Molecular cloning of a cDNA encoding alpha-glycosidase in the digestive gland of the shrimp, *Litopenaus vannamei*. *Cell Molecular Life Sci.* **57**: 1135-1143.
- Laemmli, U K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lee, S. Y., Wang, R. & Söderhäll, K. (2000). A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*. **275**: 1337-1343.
- Lehrach, H. & Diamond, D. (1977). RNA molecular weight determinations by electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*. **16**: 4743.
- Lewin, B. (1997). *Genes VI*. Oxford University Press. New York, NY, USA., Pp. 1260.
- Liang P. & Pardee, A B. (1992). Differential display: A general protocol. En: *Differential display methods and protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press. 3-13.
- Lightner, D. V. (1983). Diseases of cultured penaeid shrimp. En: *Crustacean aquaculture Vol I*. (J. P. McVey and J. R. Moore) Florida. 289-320.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D. & Inwood, M. J. H. (1988). *Métodos de Laboratorio*. 2 ed. Tomo 2. Edit. Interamericana. México, D.F.
- Ma, C. & Kanost, M. R. (2000). A β 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *Journal of Biological Chemistry*. **275**: 7505-7514.
- Mathews, C. K. & Van Holde, K. E. (1995). *Biochemistry*, 2a. edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D. K. & Rodwell, V. W. (1999). *Bioquímica de Harper*. 15a edición. Manual Moderno. 1050.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F. L., Sánchez-Paz, A. J., Yepiz-Plascencia, G. & Peregrino-Uriarte, A. B. (2003). Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. (Enviado).
- Muta, T. & Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. **8**: 41-47.
- Nicoletti, A. & Sassy-Prigent, C. (1996). An alternative quantitative polymerase chain reaction method. *Analytical Biochemistry*. **236**: 229-241.

- Ochiai, M. & Ashida, M. (1988). Purification of a β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biological Chemistry*. **263**: 12056-12062.
- Ochiai, M. & Ashida, M. (2000). A pattern-recognition protein for β -1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of β -1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*. **275**: 4995-5002.
- Ondarza, N. R. (1993). *Biología Molecular. Antes y después de la doble hélice*. México, DF., siglo veintiuno editores, 201.
- Osmondj, J. G. & Stark, J. R. (1996). In vitro carbohydrate digestibility tests in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. **139**: 315-328.
- Padilla-Sánchez, M. (1999). Fragmentos de los genes mitocondriales de rRNA de los camarones *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis* y *Litopenaeus stylirostris*. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Hermosillo, Sonora., Universidad de Sonora. 75.
- Purves, W. K., Orians, G. H. & Heller, H. C. (1991). *Life, The Science of Biology*. 3ra ed. ED W. H. Freeman and Company Sinauer Associates, INC. USA. 1145.
- Resch-Sedlmeier, G. & Sedlmeier, D. (1999). Release of digestive from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **123B**: 187-192.
- Romo-Figueroa, M. G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Söderhäll, K. & Yepiz-Plascencia, G. (2003). Molecular cloning of the high-density lipoprotein- β -glucan binding protein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure (Enviado).
- Romo-Figueroa, M.G. (2003). Caracterización del cDNA y expresión del gen de la HDL-BGBP del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. 89.
- Rosas, C., Bolognaro-Crevenna, A., Sánchez, A., Gaxiola, G., Soto, L., & Escobar, E. (1995). Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biological Bulletin*. **189**: 168-174.
- Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R. & Dhar, A. K. (2002). The lipopolysaccharide and B-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus- infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*. **76**: 7140-7149.
- Ruiz-Verdugo, L. M., García-Bañuelos, M., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. & Yepiz-Plascencia, G. (1997). Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **118B**: 91-96.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlía-Almazán, A., Hernández-Saavedra, N. Y. & Yepiz-Plascencia, G. (2003). Differential expresión of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 4158. (Enviado).
- Shanta, K. M., Decort, S. & Verachtert, M. (1993). Localization and characterization of alpha-glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. *Applied of Environmental Microbiology*. 63: 2352-2358.
- Söderhäll, K., Rögener, W., Söderhäll, I., Newton, R. P. & Ratcliffe, N. A. (1988). The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1,3-glucan. *Insect Biochemistry*. 18: 323-330.
- Söderhäll, K., Aspán, A. & Duvic, B. (1990). The proPO system and associated proteins —role in cellular communication in arthropods. *Research Immunology*. 141: 896-907.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. & Johansson, M. W. (1994). The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Analytical Academic Science*. 712: 155-161.
- Sritunyalueksana, K., Lee, S. Y. & Söderhäll, K. (2002). A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 237-245.
- Stratakis, E., Fragkiadakis, G. & Carpelli-Moustaízi, E. (1992). Characterization of a non sex-specific lipoprotein from hemolymph of fresh water crab, *Potamon potamius*. *Biological Chemistry*. 373: 665-674.
- Tang, K. F. & Lightner, D. V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*. 44: 79-85.
- Trudel, J. & Asselin, A. (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 178: 362-366.
- Vanden Heuvel, J. P. (1998). *Analysis of Gene Expresión, PCR protocols in Molecular Toxicology*. Vanden Heuvel, J. P. CRC Press LLC. 41-98.
- Van Wormhoudt, A. (1974). Variations of the level of the digestive enzymes during the intermolt cycle of *Palaemon serratus*: influence of the season and effect of eyestalks ablation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 49A: 701-719.

- Van Wormhoudt, A. & Sellos, D. (1980). Aspects biochimiques de la croissance: acides nucleiques et enzymes digestives chez *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda). *Oceanology Acta*. **3**: 97-105.
- Van Wormhoudt, A. (1983). Variations immunoquantitatives de l' α -amylase au cours du cycle d'intermue à différentes saisons chez *Palaemon serratus*. *Marine Biology* **74**: 127-132.
- Van Wormhoudt, A., Bourreau, G. & Le Moullac, G. (1995). Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda: electrophoretic and immunological studies. *Biochemistry System Ecology*. **23**: 139-149.
- Van Wormhoudt, A. & Sellos, D. (1996). Cloning and sequencing analysis of three cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei*: Evolutionary aspects. (Crustacea Decapoda). *Journal Molecular Evolution*. **42**: 543-551.
- Van Wormhoudt, A., Le Moullac, G., Klein, B. & Sellos, D. (1996). Adjustment of the expression of digestive enzymes to casein level in food in *Penaeus vannamei*. *Br Journal Nutrition*. **55** (in press).
- Vargas, A. F., Guzmán, M. M. & Ochoa, J. L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **106A**: 299-303.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. & Söderhäll, K. (1996). A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Developmental of Comparative Immunology*. **20**: 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. & Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **116B**: 453-458.
- Vargas-Albores, F. & Yepiz-Plascencia, G. (2000). Betaglucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. **191**: 13-21.
- Wallace, A. J. (1997). Combined single strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis. En: *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*. (G. R. Taylor, ed) Boca Raton, FA, USA., CRC Press, Inc. Pp: 79-94.
- Walker, N. J. (2001). Real-time and quantitative PCR: Applications to mechanism-based toxicology. *Biochemistry Molecular Toxicology*. **15**: 121-127.
- Whitaker, J. R. (1972). *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. USA.636.
- Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R. & Higuera-Ciajara, I. (1995). A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white

- shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **111B**: 181-187.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L. M. & Romo-Figueroa, G. (1998). Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **121B**: 309-314.
- Yepiz-Plascencia, G., Vallejo-Cohen, S. & Valenzuela-Cornejo, P. (1998). Distribution of silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*, Belows and Perring (homoptera: aleyrodidae) in Sonora, México. *Southwestern Entomologist*. **23**: 83-88.
- Yepiz-Plascencia, G. (2000). Manual de Prácticas. Técnicas Básicas de Biología Molecular, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Yepiz-Plascencia, G., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F. & García-Bañuelos, M. L. (2000a). Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Marine Biotechnology*. **2**: 485-492.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F. & Higuera-Ciapara, I. (2000b). Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*. **191**: 177-189.