



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE SERIN PROTEINASAS Y SUS  
INHIBIDORES EN LOS HEMOCITOS DEL CAMARÓN  
BLANCO *Litopenaeus vannamei* EN RESPUESTA AL  
LIPOPOLISACÁRIDO O A *Vibrio parahaemolyticus***

---

Por:

**Melissa Camberos Solano**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Melissa Camberos Solano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



---

Dr. Francisco Vargas Albores  
Director de Tesis

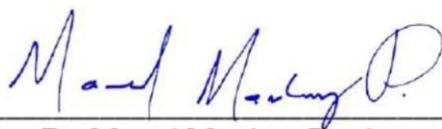
---

Dra. Teresa Gollas Galván (†)  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. José Reyes González Galaviz  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Marcel Martínez Porchas  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Perfil de Expresión de Serin-proteinasas y sus Inhibidores en los Hemocitos del Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*) en Respuesta al Lipopolisacárido O a *Vibrio parahaemolyticus*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Melissa Camberos Solano, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por proporcionar las instalaciones haciendo posible realizar mis estudios de maestría y por el apoyo económico otorgado durante el quinto y sexto semestre para concluir este grado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el proyecto 84398 “Estructura y Organización de Genes de Proteínas Antimicrobianas del Camarón” otorgado al Dr. Francisco Vargas Albores.

Al Instituto Tecnológico de Sonora por proveer a los organismos utilizados en el proyecto y prestarnos sus instalaciones para realizar las pruebas.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por otorgar los microorganismos utilizados, así como prestarnos material e instalaciones para diferentes procedimientos realizados en este estudio.

A mi director de tesis, el Dr. Francisco Vargas Albores, por su apoyo, guía y aportación a mi crecimiento académico.

A mis sinodales, el Dr. Marcel Martínez Porchas, la Dra. Teresa Gollas Galván (†) y al Dr. José Reyes González Galaviz por sus aportaciones tanto de material, revisiones, y apoyo en todo el proceso, así como mi crecimiento académico.

Al Dr. Jorge Hernández López, al Dr. Daniel Coronado Molina y al Dr. Ramón Casillas Hernández, por su apoyo de material, equipo y aportación al estudio durante diferentes etapas del experimento. A mis compañeros de laboratorio Miguel (†), Glen, Gil, Azucena, Enrique, Leo y Jannel, por todo

lo compartido dentro y fuera de las instalaciones.

A mis amigos Jannel, Leo, Michel, Hector, Daniel, Carlos, Josep, Jorge y Omar por los buenos momentos que compartimos en el transcurso de posgrado y que seguiremos compartiendo.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en esta etapa y por siempre motivarme a esforzarme. Los amo.

A mis hermanos, por todo su apoyo y amor a distancia. Los amo.

A Martín por ser mi compañero en esta etapa, su apoyo incondicional tanto en lo académico como emocional en cada dificultad que se me presentó. Te amo.

## DEDICATORIA

*A mis padres, Alma Leticia y Jesús Manuel*

*A mis hermanos, Andrea y Emmanuel*

*A mi novio, Martín*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	16
2.1. Mecanismo de Reconocimiento .....	16
2.2. Respuesta Inmune Celular .....	16
2.2.1. Fagocitosis.....	17
2.2.2. Apoptosis.....	17
2.2.3. Encapsulación.....	18
2.2.4. Nodulación .....	18
2.3. Respuesta Inmune Humoral.....	19
2.3.1. Péptidos Antimicrobianos .....	19
2.3.2. Cascada de Coagulación .....	19
2.3.3. Sistema Profenoloxidasa .....	20
2.4. Proteinasas e Inhibidores de Proteinasas .....	21
2.4.1. Serin Proteinasas.....	21
2.4.2. Inhibidores de SP.....	23
2.4.2.1. SERPIN.....	23
2.4.2.2. KPI.....	24
2.5. Lipopolisacárido.....	25
2.5.1. LPS en Bacterias Gram Negativas.....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	29
4.1. Objetivo General .....	29
4.2. Objetivos Específicos .....	29
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
5.1. Búsqueda de Primers .....	30
5.2. Bioensayo .....	30
5.3. Preparación de Inóculos .....	31
5.4. Inoculación de Tratamientos.....	31

## CONTENIDO (continuación)

5.5. Extracción de Hemolinfa.....	31
5.6. Extracción de ARN Total .....	32
5.7. Síntesis de ADN complementario.....	33
5.8. Análisis Cuantitativo de PCR Tiempo Real .....	33
5.9. Análisis Estadístico .....	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
6.1. Búsqueda y Selección de Primers .....	35
6.2. Bioensayo .....	38
6.3. Concentración y Pureza del ARN .....	38
6.4. Digestión del ADN Genómico.....	41
6.5. Optimización de Condiciones de Primers con PCR Punto Final.....	42
6.6. Expresión Relativa de Serin Proteinasa e Inhibidores .....	44
6.6.1. Expresión Relativa de PPAAE .....	44
6.6.2. Expresión Relativa de PPAF .....	47
6.6.3. Expresión Relativa de SERPIN .....	50
6.6.4. Expresión Relativa de KPI.....	52
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Primers reportados para los genes de interés.....	37
<b>2</b>	Primers seleccionados para qPCR.....	40
<b>3</b>	Muestras de RNA cuantificadas por espectrofotometría.....	41
<b>4</b>	Temperatura de alineación (Ta) óptima para cada primer.....	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Integridad de ARN de los tratamientos de las 0 hasta las 12 h.....	40
<b>2</b>	Integridad de ARN de los tratamientos a las horas 24 y 48.....	41
<b>3</b>	Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio de la digestión del ADN genómico..	42
<b>4</b>	Prueba de primers de los genes KPI, PPAE1 y SERPIN.....	43
<b>5</b>	Prueba del primer del gen PPAF.....	44
<b>6</b>	Nivel de expresión relativa de PPAE en hemocitos.....	47
<b>7</b>	Nivel de expresión relativa de PPAF en hemocitos.....	50
<b>8</b>	Nivel de expresión relativa de SERPIN en hemocitos.....	52
<b>9</b>	Nivel de expresión relativa de KPI en hemocitos.....	54

## RESUMEN

México es uno de los principales productores de camarón a nivel mundial, siendo el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) la especie con los mejores rendimientos; sin embargo, ha habido descensos en la producción por la aparición de diversas enfermedades, lo cual despierta el interés por investigar la inmunología del camarón. Se ha demostrado que la respuesta inmune puede ser activada utilizando lisados de patógenos o sus componentes estructurales, como el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas. Una de las vías de respuesta más importantes es la melanización, la cual requiere la activación de serin proteinasas (SP) que finalmente activan la enzima fenoloxidasa. Del mismo modo se expresan inhibidores que controlan la cascada de SP, ya que pueden generar intermedios citotóxicos y daño celular. En este trabajo se busca cuantificar la expresión de SP y de sus inhibidores cuando se inocula LPS y *Vibrio parahaemolyticus* en *L. vannamei*. Primeramente, se realizó una búsqueda y selección de los oligonucleótidos de los genes de SP e inhibidores. Con el fin de observar el cambio en los niveles de expresión en los genes, se realizó un bioensayo con camarones de peso entre 12 – 14 g usando como tratamientos LPS, *V. parahaemolyticus* y un control. Se hicieron extracciones de hemolinfa a las 0, 1.5, 3, 6, 12, 24 y 48 horas post inoculación (hpi); posteriormente, se realizó la extracción de ARN, y se llevó a cabo la síntesis del cDNA. La cinética de expresión se determinó por PCR tiempo real. Se seleccionaron primers para medir la expresión relativa de las SP PPAE y PPAF, y los inhibidores SERPIN (SERine Proteinase INhibitor) y KPI (Kazal Proteinase Inhibitors). Se utilizó como gen de referencia  $\beta$ -Actina. El gen PPAE aumentó su expresión a las 24 hpi, PPAF a las 12, 24 y 48 hpi, el inhibidor SERPIN a las 12 y 24 hpi, mientras que el inhibidor KPI a las 24 y 48 hpi. Con los resultados obtenidos se puede sugerir que los genes estudiados podrían tener su función en la etapa tardía de la infección y la posible participación de otras SP e inhibidores en la etapa temprana de la infección. La expresión fue similar en ambos tratamientos.

**Palabras clave:** Expresión génica, inhibidores, *Litopenaeus vannamei*, serin proteinasas, sistema profenoloxidasa.

## ABSTRACT

Worldwide, Mexico is one of the largest producers of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), the species with the best performance. However, production is frequently affected by diseases. The use of antibiotics in open systems is not effective and has a high impact on the ecosystem. For this reason, knowledge and manipulation of the immune system have been considered as a suitable alternative. The immune response of invertebrates can be activated using cell lysates or structural components of their bacterial cell wall, such as lipopolysaccharide (LPS). The prophenoloxidase activation system, which produces phenoloxidase (PO), is an essential response pathway in the immune response of shrimp, where several serine proteinases (SP) participate. PO is the enzyme responsible for melanization, and other cytotoxic compounds that help eliminate the pathogen are produced during the process. However, to avoid tissue damage, SP must be efficiently controlled by inhibitors. The main objective of this work was to observe the expression profiles of SP and its inhibitors after inoculating a complete bacterium (*Vibrio parahaemolyticus*) and LPS to shrimp. A bioassay was performed with organisms between 12-14 g, using LPS, *V. parahaemolyticus*, and control as treatments. For each treatment, 6 organisms were placed in 20 L aquariums. Hemolymph samples were collected at 0, 1.5, 3, 6, 12, 24, and 48 h post-inoculation (hpi), from which the RNA was purified and synthesized the cDNA. Expression levels were determined by qPCR. First, the primers for the proteases PPAE and PPAF, and the inhibitors SERPIN (SERin proteinase inhibitor) and KPI (Kazal proteinase inhibitors) were selected. B-actin was used as the reference gene. PPAE showed an increase in expression at 24 hpi, and PPAF showed the increase at 12, 24, and 48 hpi, while the inhibitor SERPIN showed an increase in expression at 12 and 24 hpi and KPI at 24 and 48 hpi. These results suggest that these genes are activated in the late stage of the immune response. However, no difference was observed in the expression pattern when using the whole bacterium or only the surface component, LPS.

**Key words:** gene expression, inhibitors, *Litopenaeus vannamei*, serine proteinase, prophenoloxidase system.

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una de las más importantes alternativas para atender la creciente demanda de alimentos y se ha convertido en el sector de mayor crecimiento en el mundo. El camarón blanco (*L. vannamei*) es la especie más cultivada en el país, debido a que produce los mejores rendimientos de crecimiento y tiene buena tolerancia a las condiciones ambientales. Esta especie se distribuye de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México, hasta Tumbes en Perú, en aguas con temperatura generalmente superiores a 20 °C durante todo el año. Estos organismos toleran salinidades de 2 a 40 unidades prácticas de salinidad (ups), con un óptimo de 35 ups (Briggs, 2019). El cultivo de camarón en México tiene ganancias de aproximadamente 711 millones de dólares anualmente (Esparza-Leal *et al.*, 2012) y ha posicionado al país como uno de los principales exportadores de camarón a los Estados Unidos, superando los 350 millones de dólares, que representa el 42% de las exportaciones de productos marinos (Muniesa *et al.*, 2017). El cultivo camarónico se realiza principalmente en los estados del Noroeste de México, donde la actividad registra la mayor producción; tan sólo en 2008 rebasó el 60% de la producción nacional total de camarón, pesquera y acuícola. Solamente en el estado de Sonora se produjeron aproximadamente 65,000 toneladas en el año 2018 (SAGARHPA, 2017).

A pesar de su crecimiento, factores bióticos como las enfermedades se han convertido en un problema que afecta el desarrollo de la acuicultura del camarón (Flegel, 2019). Pérdidas de cultivo de camarón son provocadas por bacterias, principalmente del género *Vibrio*, que pueden ocasionar infecciones severas (Santiago *et al.*, 2009). Tanto en 2010 como en 2011, la producción de camarón del Estado de Sonora reportó descensos del 39.3% y del 50% respectivamente, en proporción al año 2009, donde la producción fue de 81,422.8 toneladas. Este declive se debió a la presencia del virus de la mancha blanca (WSSV) y de enfermedades bacterianas como la necrosis aguda hepatopancreática (INAPESCA, 2018).

La necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, Acute hepatopancreatic necrosis disease) es una enfermedad provocada por una cepa patogénica de *V. parahaemolyticus* (Mejías *et al.*, 2017), la cual coloniza el estómago de los camarones y libera dos toxinas con capacidad proteolítica llamadas Pir A y Pir B. Estas toxinas se acumulan y afectan el hepatopáncreas, ocasionando desprendimientos celulares masivos acompañados de necrosis (Han *et al.*, 2015). La AHPND

puede causar grandes pérdidas a la industria; como la ocasionada en los estados mexicanos de Nayarit, Sinaloa y Sonora, en 2013, donde la producción tuvo una caída del 65% (Nunan *et al.*, 2014).

En general, *Vibrio* es el género bacteriano más comúnmente asociado a las infecciones en camarón y, como ha sido reportado, la causa de pérdidas económicas abundantes en diversos países. Estas bacterias pueden afectar al camarón en todas las fases de desarrollo cuando las condiciones de manejo y la calidad del agua de cultivo son inapropiados. La infección afecta sus propiedades organolépticas, y llega a causar una mortalidad del 100% transcurridas las 24 horas desde el inicio del brote infeccioso. *Vibrio parahaemolyticus* es, posiblemente, una de las especies bacterianas que más afecta al camarón (Suárez *et al.*, 2015).

Como respuesta a este problema los antibióticos han resultado ser poco eficaces, ya que deben usarse en grandes cantidades porque su eficacia se ve comprometida por factores ambientales como radiación solar, salinidad y pH. El uso indiscriminado de antibióticos favorece la generación de bacterias resistentes y la eliminación de bacterias benéficas, limitando su competencia con microorganismos patógenos y generando efectos adversos sobre el medio ambiente (Su *et al.*, 2011); por lo que, se ha buscado tener un mejor conocimiento del sistema inmune del camarón para encontrar mejores alternativas para el control de las enfermedades en los cultivos. Aunque los primeros reportes del sistema inmune del camarón inician en los 90's, el actual impacto que tienen las enfermedades en el cultivo del camarón marino ha intensificado las investigaciones sobre la inmunología del mismo (Hou *et al.*, 2013, Maralit *et al.*, 2018, Qiu *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2014, Zeng *et al.*, 2013, Zhan *et al.*, 2015).

Como respuesta a este problema los antibióticos han resultado ser poco eficaces, ya que deben usarse en grandes cantidades porque su eficacia se ve comprometida por factores ambientales como radiación solar, salinidad y pH. El uso indiscriminado de antibióticos favorece la generación de bacterias resistentes y la eliminación de bacterias benéficas, limitando su competencia con microorganismos patógenos y generando efectos adversos sobre el medio ambiente (Su *et al.*, 2011).

El estudio del sistema inmunológico se destaca como una fuente de conocimiento de gran importancia para conocer de manera más profunda los mecanismos de activación y componentes del sistema inmune. Además, ayuda a determinar el grado de susceptibilidad y resistencia del animal a microorganismos patógenos (Flegel, 2019).

Para combatir patógenos invasores, los invertebrados cuentan con respuestas celulares y humorales innatas. Se ha visto que estas pueden ser activadas por inmunoestimulantes que provienen de lisados de patógenos o sus componentes estructurales (PAMPs, Pathogen associated molecular patterns) como  $\beta$ -glucano, peptidoglicano (PGN) y LPS (Apines-Amar *et al.*, 2015). El reconocimiento se realiza a través de proteínas llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR, Pattern recognition receptor). La activación de esta respuesta implica la producción de proteínas inmunes como los péptidos antimicrobianos (AMP), así como las proteinasas y sus inhibidores que están asociados a la cascada de coagulación y melanización (Smith *et al.*, 2015, Tassanakajon *et al.*, 2018, Tassanakajon *et al.*, 2013).

Una de las principales respuestas inmunes es el sistema de activación de la profenoloxidasas (proPO: pro Phenol Oxidase) en donde, después del reconocimiento de los PAMPs como el LPS por parte de los PRRs, varias SP generan la activación final de la enzima fenoloxidasas (PO: Phenol Oxidase), la cual es responsable de la oxidación de fenoles para la síntesis de melanina (Tassanakajon *et al.*, 2018) y producción de radicales libres de oxígeno (ROS, Reactive oxygen species). Debido a que se generan proteinasas activas y ROS capaces de dañar tanto a los patógenos como al tejido del hospedador, este proceso debe estar estrictamente regulado (Tang, 2009). Por lo tanto, inhibidores de SP, como SERPIN y KPI, tienen un papel vital en el control de los pasos de proteólisis del sistema proPO (Jearaphunt *et al.*, 2015).

La inoculación de LPS provoca la activación de la PO y del sistema inmune de *L. vannamei* (Chen *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2014, Xian *et al.*, 2009) y de *Penaeus monodon*, donde también se observó un aumento significativo de la producción de ROS (Xian *et al.* 2016). Además, en algunas investigaciones se ha observado que la inoculación de LPS en *L. vannamei*, aumentó la expresión de los genes antibacterianos como proPO, ALF (anti-lipopolysacchride factor), Toll e Imd. Estos estudios han demostrado que el LPS de bacterias Gram negativas es capaz de activar varios componentes de la respuesta inmune en peneidos. Sin embargo, la variación de la expresión de SP y sus inhibidores no ha sido estudiada en *L. vannamei*. En este trabajo se busca evaluar las diferencias en la expresión de SP y sus inhibidores después de la inoculación con LPS o *V. parahaemolyticus* en camarón blanco.

## 2. ANTECEDENTES

En organismos invertebrados el sistema inmune innato se encarga del reconocimiento y eliminación de componentes extraños dentro del hospedero como virus, bacterias y hongos. En el camarón se ha demostrado que la respuesta inmune inicia por el reconocimiento de los PAMPs, por parte de los PRRs (Li *et al.*, 2013).

### 2.1. Mecanismo de Reconocimiento

Los PAMPs se encuentran en la pared celular de los microbios y son esenciales para su supervivencia. Estos suelen ser polisacáridos y glicoproteínas, como el LPS de las bacterias Gram negativas, el PGN de las bacterias Gram positivas, y glucanos de células fúngicas (Jensen *et al.*, 2012). El reconocimiento de los PAMPs por parte de los PRRs conduce a la activación del sistema inmune innato a través de la liberación de componentes humorales y celulares mediados por los hemocitos circulantes (Tassanakajon *et al.*, 2013).

En invertebrados, se han descrito varios grupos de PRR; por ejemplo, en el camarón hay proteínas de unión a  $\beta$ -1,3-glucano y lipopolisacáridos (LGBP, Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3- glucan binding protein), y lectinas de tipo C. La unión de LPS o  $\beta$ -1,3 glucano a LGBP, conduce a la expresión de AMP, activación del sistema proPO y proteínas inmunes para la defensa contra la infección (Romo-Figueroa *et al.*, 2004, Tassanakajon *et al.*, 2018, Vargas-Albores *et al.*, 1997, Vargas-Albores *et al.*, 2000).

### 2.2. Respuesta Inmune Celular

Hay tres tipos de hemocitos en los camarones que son hemocitos hialinos, semigranulares (HSG) o de gránulos pequeños y granulares o de gránulos grandes (HG) (Johansson *et al.*, 2000).

Los hemocitos están involucradas en las respuestas celulares, incluyendo la apoptosis, la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación de agentes extraños (Xu *et al.*, 2014).

### **2.2.1. Fagocitosis**

La fagocitosis es un proceso empleado por las células para ingerir micropartículas, incluidos los patógenos microbianos y los desechos celulares de las células apoptóticas y necróticas. El proceso comienza con el reconocimiento a través de receptores que dan inicio a una cascada de señalización que promueve la fagocitosis, remodelando los lípidos en la membrana celular y el citoesqueleto de actina para extender la membrana celular alrededor de la partícula (Freeman *et al.*, 2014). Los receptores fagocíticos también se involucran en un orden secuencial para completar la formación del fagosoma (Ostrowski *et al.*, 2016). Una vez que la partícula es llevada al interior del fagosoma temprano, esta vacuola se fusiona con otras vesículas para formar un fagosoma intermediario (Guido *et al.*, 2015). La formación de un fagosoma intermediario es un proceso que implica la fusión de vesículas endocíticas y la fusión de vesículas secretoras, lo que da como resultado la remodelación de la membrana y la acidificación progresiva del fagosoma. Al fusionarse con los lisosomas y cambiar su membrana y las características interiores, el fagosoma intermediario se convierte en una vacuola microbicida, el fagolisosoma a través de un proceso denominado “maduración del fagolisosoma”. Posteriormente, con el medio ácido e hidrolítico, los patógenos fagocitados son destruidos por el pH bajo, hidrólisis y radicales libres (Levin *et al.*, 2016).

### **2.2.2. Apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo fisiológico responsable de eliminar células anormales, dañadas y/o innecesarias (Kurokawa *et al.*, 2009). Durante el desarrollo, las células mueren de forma programada mediante la apoptosis, con el fin de regular la forma y función de los tejidos u órganos. Los principales ejecutores de la apoptosis son miembros de la familia de cisteín proteinasas,

conocidas como caspasas, que escinden las proteínas entre los residuos de cisteína y ácido aspártico (Nirmala *et al.*, 2020).

Intracelularmente, los factores de estrés inducen la apoptosis. Las mitocondrias son mediadores vitales de muchos programas apoptóticos mediante los cuales los estimulantes tóxicos, el agotamiento del factor de crecimiento, el daño del ADN y ROS interrumpen el transporte de electrones, la producción de ATP y la permeabilidad mitocondrial, lo que finalmente provoca la liberación de proteínas de señalización de la muerte celular en el citosol (Tait *et al.*, 2010). La apoptosis es considerada una respuesta celular inmune innata para limitar la replicación viral y eliminar la infección viral del organismo (Xu *et al.*, 2014).

### **2.2.3. Encapsulación**

La encapsulación es un tipo de respuesta multicelular con la función de eliminar partículas o agentes extraños en el organismo, que no pueden ser destruidos por los mecanismos humorales. (Söderhäll *et al.*, 1992). La encapsulación se refiere a la unión de hemocitos a objetivos más grandes, como parásitos, protozoos y nematodos. Después de unirse a su objetivo, los hemocitos forman una cápsula multicapa alrededor del invasor, que finalmente se acompaña de melanización. Dentro de la cápsula, el invasor muere por los radicales libres citotóxicos ROS y RNS (Reactive nitrogen species) producidos localmente, o por asfixia (Satyavathi *et al.*, 2014).

### **2.2.4. Nodulación**

En los nódulos los agentes extraños son aprisionados por varias capas de hemocitos, formando pequeñas cápsulas desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden y se filtran en la masa bacteriana intentando fagocitarla. El evento de nodulación requiere moléculas de reconocimiento que interactúen tanto con los hemocitos como con los microorganismos invasores. Tras la infección, los hemocitos muestran un cambio en la morfología y el comportamiento,

transformándose, de células que circulan libremente a células adherentes que tienden a formar agregados. El resultado final es la formación del nódulo donde los microorganismos quedan atrapados por varias capas de hemocitos y es melanizado, debido a una elevada actividad de la PO (Satyavathi *et al.*, 2014, Sideri *et al.*, 2008).

## 2.3. Respuesta Inmune Humoral

Las respuestas humorales están mediadas por macromoléculas que son secretadas en la hemolinfa. Estas respuestas están conformadas por la síntesis de varias proteínas, incluyendo AMPs circulantes (Flegel *et al.*, 2011), pero también enzimas involucradas en cascadas como el sistema de activación de proPO y el de coagulación de la hemolinfa del camarón .

### 2.3.1. Péptidos Antimicrobianos

Los AMPs, son productos de la respuesta inmune y desempeñan funciones importantes en la eliminación directa los patógenos infectados (Bachère, 2003). Conforman un grupo diverso de moléculas efectoras que son utilizadas para prevenir o combatir una infección microbiana. La actividad de los AMP inicia en la membrana citoplasmática de los patógenos siendo esta su vía de entrada. Estos pueden ser expresados de forma constitutiva o de forma inducida, y proveen medios de defensas rápidos y efectivos. En la mayoría de los casos estos péptidos son expresados y liberados rápidamente en el caso de una infección. Algunos de los principales efectores son las peneidinas, crustinas y ALFs (Tassanakajon *et al.*, 2013).

### 2.3.2. Cascada de Coagulación

La coagulación de la hemolinfa también ha sido considerada parte del sistema de defensa de los

crustáceos, ya que previene la fuga de hemolinfa de los sitios de lesión y la diseminación de agentes invasores por todo el cuerpo. Se ha demostrado que la polimerización de proteínas coagulables por las transglutaminasas constituye la coagulación de la hemolinfa en crustáceos (Montaño-Pérez *et al.*, 1999). Las transglutaminasas promueven la reticulación de coagulina con antígenos de superficie de hemocitos llamados proxinas y puede facilitar la formación de una barrera fisiológica para los patógenos invasores (Liu *et al.*, 2007).

### **2.3.3. Sistema Profenoloxidasa**

La compleja cascada de melanización requiere la combinación de hemocitos circulantes y varias proteínas asociadas del sistema de activación de la proPO. Es uno de los sistemas de defensa más potentes en los invertebrados y es responsable de la cicatrización de heridas, el atrapamiento de parásitos y la eliminación de microbios (Tassanakajon *et al.*, 2018). Esta cascada desempeña un papel importante como un sistema de reconocimiento de lo no propio, que participa en las respuestas inmunes innatas mediante el acompañamiento de las respuestas celulares a través de la atracción de hemocitos e induciendo la fagocitosis, la melanización, la producción de reactantes citotóxicos, la encapsulación de partículas y la formación de nódulos (Amparyup *et al.*, 2013a, Vargas-Albores, 1995).

La activación del sistema proPO requiere identificación microbiana, seguida de la activación de una cascada de serin proteinasas de dominio clip (clip-SP). En esta cascada, la enzima activadora de proPO (PPAE) funciona como una proteinasa terminal que específicamente escinde y activa el zimógeno proPO para generar PO. La enzima PO activa oxida los fenoles a quinonas para la producción de melanina y otros intermedios citotóxicos para encapsular y eliminar patógenos invasores (Sangsuriya *et al.*, 2016).

La melanina es un pigmento marrón oscuro con propiedades antibacterianas que inhiben antígenos. Este pigmento es depositado en el área de infección provocado por el patógeno, alrededor de la encapsulación y en los nódulos. Durante la activación del sistema proPO, los intermedios reactivos subsiguientes, como las sustancias de tipo quinona, ROS o RNS, que poseen actividad citotóxica hacia los microorganismos, se producen y restringen la invasión de patógenos microbianos en la

cavidad del cuerpo del huésped y ayudan en la curación de heridas (Amparyup *et al.*, 2013a).

Se denominan proteinasas activadoras de profenoloxidasa o PPAE a las proteinasas tipo serina que catalizan la proteólisis de proPO a PO activa. Existen mecanismos de control para la regulación de la PPAE, los cuales son inhibidores de SP (Wang *et al.*, 2004).

## 2.4. Proteinasas e Inhibidores de Proteinatas

Las proteinasas y sus inhibidores están presentes en todos los organismos vivos y desempeñan funciones cruciales en diversos procesos biológicos y fisiológicos. En los camarones, se han reportado como parte del sistema inmunológico (Amparyup *et al.*, 2013b), donde participan en varias cascadas proteolíticas clave del sistema inmunitario innato, cumpliendo funciones relacionadas con la apoptosis, la coagulación y la melanización (Amparyup *et al.*, 2013a).

Los inhibidores de proteinasas, por otro lado, regulan con precisión el sistema proPO para evitar la activación excesiva de la cascada, evitando así el daño consiguiente al tejido del huésped, ya que las quinonas y otros intermedios reactivos producidos por las reacciones de melanización son citotóxicos y nocivos para las células huésped (Sangsuriya *et al.*, 2016). Además, dichos inhibidores también intervienen en la inhibición y eliminación de las proteinasas de los microorganismos invasores.

### 2.4.1. Serin Proteinatas

Las SP reciben este nombre ya que tienen un aminoácido serina (Ser) en el sitio activo que es el que comienza el proceso de catálisis y se caracterizan por la presencia de una tríada catalítica característica (Ser, His, Asp) (Amparyup *et al.*, 2013a). Estas proteinasas presentan diversas funciones fisiológicas como la digestión, coagulación sanguínea, desarrollo embrionario y la inmunidad (Amparyup *et al.*, 2010).

Una de las principales vías donde ejercen acción las proteinasas e inhibidores en los camarones es

en el sistema proPO. La activación de la cascada proPO requiere de pasos proteolíticos de las SP. Estas enzimas generalmente se sintetizan como zimógenos y se almacenan en vesículas o gránulos a partir de los cuales se liberan y se convierten en una enzima activa por escisión proteolítica. A través de estas interacciones proteína - proteína específicas, zimógenos de SP pueden formar una ruta de cascada en la que una proteinasa anterior activa el zimógeno siguiente para llevar a cabo una reacción (Charoensapsri *et al.*, 2011, Gettins, 2002).

Las Clip-SP pertenecen a la familia SP, se sintetizan como zimógenos inactivos que consisten en un dominio de clip N terminal y un dominio de SP catalítico C terminal. Los dominios de clips, de 30-65 residuos de largo, incluyen seis residuos de cisteína altamente conservados que forman tres enlaces disulfuro y están conectados al dominio SP por un enlace disulfuro después de la activación proteolítica (Jang *et al.*, 2008). También se han descritos los Clip-SP homólogos (Clip-SPHs), los cuales son similares en la secuencia, pero el residuo de serina en la tríada catalítica es sustituido por glicina. Por lo tanto, los Clip-SPHs no poseen actividad proteolítica, pero están implicados en las interacciones proteína-proteína modulando la actividad de la PPAE, y son conocidos como factores activadores de la profenoloxidasas (PPAF). En *L. vannamei* se ha estudiado la expresión de un PPAF en ensayos de silenciamiento de inhibidores de serin proteinasa (Liu *et al.*, 2014, Ponprateep *et al.*, 2017).

El Clip-SP terminal de las cascadas proteolíticas del sistema proPO que convierte los proPO en PO se denomina PPAE (Amparyup *et al.*, 2013a). El PPAE de camarón peneido se clonó por primera vez en *P. monodon* y se nombró PmPPAE1 (Charoensapsri *et al.*, 2009). Posteriormente, se identificó un segundo PPAE (PmPPAE2), éste expresado en hemocitos y con aparente función en el sistema inmune al aumentar la expresión después de la infección por *V. harveyi* (Charoensapsri *et al.*, 2011). Varios Clip-SP se han identificado a partir de una variedad de especies de camarón, incluidas *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fenneropenaeus indicus* y *L. vannamei* (Amparyup *et al.*, 2013b, Jimenez-Vega *et al.*, 2009, Jiménez-Vega *et al.*, 2005b, Khorattanakulchai *et al.*, 2017, Ren *et al.*, 2009). En el camarón blanco *L. vannamei*, se identificó la enzima PPAE1 (Jang *et al.*, 2008) y posteriormente, se aisló una segunda enzima (PPAE2), ambas se identificaron en hemocitos y su expresión fue alterada tras un desafío con la bacteria Gram negativa *V. harveyi* (Pang *et al.*, 2014).

En el camarón blanco *L. vannamei*, se han identificado dos enzimas activadoras de la profenoloxidasas nombradas PPAE1 y PPAE2 (Jang *et al.*, 2011, Pang *et al.*, 2014). Las PPAE1 en

crustáceos tienen un péptido conservado en el extremo del carbono antes del dominio clip y el péptido está unido a la región de serin proteinasa mediante un enlace disulfuro. Este péptido muestra una fuerte capacidad antibacteriana y, por tanto, se considera que la PPAE1 desempeña un papel funcional en la inmunidad de los crustáceos (Wang *et al.*, 2001). La PPAE1 en *L. vannamei* fue identificada en hemocitos y su expresión fue alterada en respuesta a la bacteria Gram negativa *V. harveyi* (Jang *et al.*, 2011).

## **2.4.2. Inhibidores de SP**

Cualquier respuesta del sistema inmune requiere de un estricto control de los efectores generados en el momento de la infección, ya que pueden ser tóxicos y causan daños a las células y tejido circundantes, como las cascadas proteolíticas que una vez activadas, conducen a una respuesta celular específica (Charoensapsri *et al.*, 2014). Un ejemplo es el sistema proPO, donde los productos de reacción de melanina en exceso como productos intermedios de quinona tóxicos y altamente reactivos, pueden provocar la muerte de las células del hospedero (Tassanakajon *et al.*, 2018).

Para mantener una función adecuada, la mayoría de los organismos sintetizan un conjunto de inhibidores de proteinasas cuya función es prevenir proteólisis no deseada y daño al tejido. Siendo que las SP juegan un papel fundamental en las cascadas de señalización inmune del camarón, sus inhibidores juegan un papel fundamental en su regulación. En los camarones peneidos, se han identificado familias de inhibidores de SP relacionadas con el sistema inmune. Este trabajo se centra en dos de ellas: los inhibidores SERPIN y KPI (Tassanakajon *et al.*, 2013).

2.4.2.1. SERPIN. Estas proteínas conforman una familia de inhibidores altamente conservados estructuralmente que actúan como sustratos tipo suicida. Están involucradas en diversas funciones biológicas, como la coagulación y la respuesta inmune mediante la inhibición de SP (Meekins *et al.*, 2017).

Generalmente son proteínas de 350 a 400 aminoácidos con un peso molecular de 40 a 60 kDa, y

comparten un plegamiento canónico de ocho o nueve hélices  $\alpha$ , núcleo central de tres hojas  $\beta$  y un bucle central reactivo (RCL: Reactive Central Loop). El RCL en el lado carboxilo terminal, contiene un enlace escindible que reside entre los residuos de aminoácidos P1 y P1', que puede unirse y es hidrolizado por la proteinasa blanco. El residuo P1 determina la especificidad objetivo de la inhibición (Huntington, 2011). Cuando el enlace escindible sufre ataques de la proteinasa blanco, se induce un gran cambio conformacional y una parte del RCL se inserta en una hoja  $\beta$  de la proteinasa, resultando en la inactivación de la enzima (Meekins *et al.*, 2017).

Los estudios sobre SERPIN en invertebrados han aumentado mucho, especialmente en los últimos años. En insectos, se ha informado que tienen actividad inhibitoria contra serin o cisteín proteinasas (Chu *et al.*, 2015, De Gregorio *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2017, Suwanchaichinda *et al.*, 2013, Tang *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2018, Zou *et al.*, 2005). En el camarón tigre *P. monodon* SERPIN 8 y SERPIN 3 actúan como regulador negativo en la activación de las proPOs (Somnuk *et al.*, 2012, Wetsaphan *et al.*, 2013). Además, en el camarón blanco *L. vannamei*, se ha informado que SERPIN B3, SERPIN, SERPIN 3, SERPIN 7 y SERPIN 8 tienen funciones inhibitorias en la activación del sistema proPO (Liu *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2017a, Liu *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2017b).

Liu *et al.* (2014) identificaron el gen del inhibidor LvSERPIN en *L. vannamei*, que codifica una proteína de 415 aminoácidos con un peso molecular teórico de 46.639 kDa. Se midió la expresión en hepatopáncreas, ojos, branquias, estómago, intestino, corazón, músculo, nervio, testículo y hemocitos; siendo ésta más alta en branquias y hemocitos. Además, realizaron un desafío con *V. anguillarum*, en donde la expresión aumento a las 6 hpi y disminuyo a las 12 hpi. Para ratificar su participación en la respuesta inmune del camarón, utilizaron ARN de interferencia mediada por dsRNA. El silenciamiento de LvSERPIN *in vivo* condujo a un aumento significativo de dos genes Clip-SP, los cuales son esenciales en la regulación de la cascada de activación de proPO (PPAE1 y PPAF) y el gen proPO tras la exposición a *V. anguillarum*.

2.4.2.2. KPI. Estos inhibidores cumplen diferentes funciones biológicas, se han asociado a la respuesta inmune como controladores de procesos proteolíticos de enzimas SP y están involucradas en funciones digestivas, de defensa y anticoagulantes (Martínez-Porchas *et al.*, 2018, van Hoef *et al.*, 2013). Los KPI, contienen uno o más dominios Kazal, los cuales actúan como un análogo de

sustrato y se une competitivamente a las proteinasas para formar un complejo inhibidor-proteinasas relativamente estable. El residuo de aminoácido P1 en el bucle del sitio reactivo y los residuos de aminoácidos en otras posiciones de contacto dictan la potencia de la unión, así como la especificidad del KPI a su proteinasas. Debido a la existencia de más de un dominio Kazal en cada KPI, se predice que una proteína puede inhibir más de una proteinasas (Rimphanitchayakit *et al.*, 2010). Característicamente, estos dominios tienen aproximadamente 50 aminoácidos conservados que incluyen seis residuos de cisteína con los que se forman tres puentes disulfuro entre las cisteínas 1-5, 2-4 y 3-6, lo que le da una forma tridimensional característica (Krowarsch *et al.*, 2003). Los dominios de Kazal inhiben las proteinasas por un mecanismo similar a un sustrato y la especificidad del dominio está típicamente dictada por el aminoácido que ocupa la posición P1, ubicada invariablemente en dos aminoácidos después de la segunda cisteína del dominio (Rimphanitchayakit y Tassanakajon, 2010).

La primera secuencia de una KPI de invertebrado fue reportada en hemocitos de *L. vannamei*, con una longitud de 1,32 kb y codifica una proteína de 24 kDa. Se detectaron cuatro dominios Kazal de 43–46 aminoácidos. Los niveles de ARNm de KPI en *L. vannamei* se modificaron después de la inyección de *V. alginolyticus*, estos disminuyeron a las 24 horas lo que sugiere que poseen una función en la respuesta inmune (Jiménez-Vega *et al.*, 2005a). Una segunda secuencia de KPI fue identificada en *L. vannamei* (KPI2) con una longitud completa de 975 pb y codifica para una proteína de 24.4 kDa con cuatro dominios Kazal. Los niveles de ARNm de KPI2 fueron altamente estimulados después de la inyección con *V. alginolyticus*, lo que sugiere su participación en el sistema inmune (Vargas-Albores *et al.*, 2012).

## 2.5. Lipopolisacárido

El LPS es una endotoxina altamente inmunogénica que se encuentra abundantemente en la pared celular de las bacterias Gram negativas. Contribuye a la integridad de la membrana externa y desempeña un papel importante en la interacción patógeno-hospedero a través de la activación del sistema inmunitario (Whitfield *et al.*, 2014). Se compone de tres partes: un lípido hidrófobo llamado lípido A, una cadena de polisacárido de núcleo hidrófilo, llamado *core* o región R, y una

cadena lateral de polisacárido hidrófilo llamado antígeno O (Aldapa-Vega *et al.*, 2016, Bäckhed *et al.*, 2003, Mayer *et al.*, 1985).

El lípido A contiene la región hidrofóbica de anclaje, la cual está insertada en la membrana externa, y es la región biológicamente activa responsable de las propiedades tóxicas de la molécula. Está formado por un disacárido de D-glucosamina con seis residuos de ácidos grasos y dos grupos fosfato. Los ácidos grasos por lo general son ácido caproico, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico (Romero *et al.*, 2010). La región R consta de una cadena corta de azúcares asociados a la inmunogenicidad del LPS. Su secuencia y su modo de enlace determinan la especificidad serológica de O de las respectivas cepas. Se divide en una región interna y una externa. La parte interna está compuesta por el azúcar ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO) que se encuentra unido directamente al lípido A y un número variable de L-glicero-D-mano-heptosas. En general, ambos azúcares pueden estar sustituidos con grupos fosfatos, pirofosfato, sulfato y/o etanolamina. El núcleo externo está compuesto por un número variable de hexosas (Rivera *et al.*, 1989).

El antígeno O es la región más externa del LPS, por lo que es el blanco principal del sistema inmune del hospedero. Esta región está formada por unidades repetidas de oligosacáridos que exhiben una diversidad estructural específica de la cepa. Pueden consistir en una cadena con una secuencia repetida de unidades de trisacárido o pentasacárido lineal, o bien pueden ser polímeros de oligosacáridos ramificados de cuatro a seis azúcares (Aldapa-Vega *et al.*, 2016, Mayer *et al.*, 1985).

### **2.5.1. LPS en Bacterias Gram Negativas**

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por una envoltura que contiene dos membranas: una membrana interna que rodea los componentes citoplasmáticos y una membrana externa que separa la célula de su entorno. Estas dos membranas rodean un compartimiento celular acuoso denominado periplasma que contiene PGN. La membrana interna es una bicapa de fosfolípidos, que es permeable a los compuestos lipofílicos. En la membrana externa se encuentra el LPS, siendo uno de los componentes predominantes. Desempeña funciones estructurales y de interacción patógeno-hospedero (Bertani *et al.*, 2018, Dong *et al.*, 2017).

El LPS es reconocido por la proteína LGBP, la cual activa el sistema proPO, que al activarse se

desencadena una cascada proteolítica que produce estrés oxidativo y causa apoptosis celular en los hemocitos del camarón (Xian *et al.*, 2013, Xian *et al.*, 2016). El LPS se ha utilizado como un estimulante de la respuesta inmune en el camarón y se ha demostrado que mejora la supervivencia después de la exposición a *V. harveyi* (Rungrassamee *et al.*, 2013).

### **3. HIPÓTESIS**

El LPS es capaz de inducir la expresión de serin proteinasas y sus inhibidores en hemocitos de camarón blanco (*L. vannamei*), con la misma intensidad, sin importar si se inocula como bacteria completa o en forma pura.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Detectar las diferencias o similitudes de los patrones de expresión de proteinasas tipo serina y de sus inhibidores en hemocitos de camarón blanco (*L. vannamei*), cuando se inocula lipopolisacárido aislado o la bacteria completa (*V. parahaemolyticus*).

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Recopilar secuencias de ADN similares a serin proteinasa y sus inhibidores del camarón blanco (*L. vannamei*) y seleccionar primers reportados en la literatura o diseñar nuevos con base a su secuencia conservada.
2. Determinar la expresión de las serin proteinasas y sus inhibidores en *L. vannamei*, a diferentes tiempos, post-inoculación de lipopolisacárido y *V. parahaemolyticus*.
3. Establecer la cinética de expresión y correlación funcional.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Búsqueda de Primers

Se realizó una búsqueda de secuencias de primers reportados en la literatura para SP y sus inhibidores tipo KPI y SERPIN de *L. vannamei*. Posteriormente, fueron alineados a su secuencia de referencia usando el programa UGENE. La primera selección se realizó con base en los siguientes criterios: tamaño de iniciadores entre 20-24 bases, sin ambigüedades y que produjera un amplicón de 140-220 bases. Finalmente se realizó la selección de primers.

### 5.2. Bioensayo

El cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) se llevó a cabo en el área de Acuicultura del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), ubicado en Ciudad Obregón, Sonora. Posteriormente, los organismos se transportaron al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), ubicado en Hermosillo, Sonora. Previo al desafío los organismos se aclimataron por siete días en dos tinajas con capacidad de 1200 L, con alimentación al 10 % (*p/p*) cada 12 h, aireación constante, recambio de agua, una temperatura de 22- 24 °C, oxígeno disuelto de 6 mg/mL, salinidad 34-36 ups y pH de 7. Se alimentaron los organismos con el alimento comercial ARY Agroindustrial al 4% de la biomasa en seco separado en dos porciones por día. El bioensayo consistió en tres tratamientos por duplicado: un grupo control inoculado con solución salina para camarón (SSS, Shrimp Salt Solution) (Vargas-Albores *et al.*, 1993); un grupo inoculado con LPS de *Escherichia coli* 055:B5 y otro inoculado con *V. parahaemolyticus*. Se utilizaron 36 camarones de 12 - 14 g, repartidos equitativamente en seis tinajas de 20 L por cada tratamiento.

### 5.3. Preparación de Inóculos

La cepa de *V. parahaemolyticus*, fue obtenida del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Esta fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) tomando 100 µL del inóculo inicial e incubando a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 24 horas en una incubadora MaxQ 4450 Shaker (Thermo Scientific). La densidad óptica (DO<sub>600</sub>) fue determinada en un espectrofotómetro BioPhotometer Modelo 6131 (Eppendorf) y ajustada por dilución a 0.5. El conteo de unidades formadoras de colonias (ufc) se realizó por plaqueo en agar LB usando diluciones ajustadas. Finalmente, los inóculos fueron centrifugados a 5000g por 10 min para eliminar el medio de cultivo, el pellet fue resuspendido en SSS, al volumen inicial y se calentó a 100°C durante 30 minutos (Hou *et al.*, 2013).

El LPS de *Escherichia coli* 055:B5 liofilizado (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua DEPC a una concentración de 5 mg/ml. Antes de su uso esta solución se llevó a una concentración final de 2 mg/ml en SSS (Duan *et al.*, 2018).

### 5.4. Inoculación de Tratamientos

La inoculación de cada camarón, seleccionado al azar, se realizó en el tercer segmento abdominal usando una jeringa estéril de plástico de 1.0 mL. Los grupos experimentales fueron inoculados en su totalidad con las soluciones correspondientes de cada tratamiento: 50 µL de inóculo de *V. parahaemolyticus* a una concentración aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL, 50 µL de la solución de LPS y 50 µL de SSS, respectivamente (Duan *et al.*, 2018).

### 5.5. Extracción de Hemolinfa

Para extraer la hemolinfa, los camarones fueron tomados aleatoriamente y, de la base del pleópodo

del primer segmento abdominal se extrajeron 300  $\mu$ L hemolinfa con una jeringa estéril de 1 mL que contenía 300  $\mu$ L de solución anticoagulante fría (450 mM NaCl, 10 mN KCl, 10 mM EDTA·Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, cloruro de sodio 4.2 mg/mL, pH 7.5) (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Por cada tratamiento (Bacteria, LPS, SSS) y tiempo (0, 1.5, 3, 6, 12, 24 y 48 h post inoculación) se extrajo la hemolinfa de cinco camarones, dando en total 95 organismos. Cada muestra se colocó en un microtubo Eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo en hielo a 10 °C para el transporte al laboratorio de CIAD, Hermosillo, para su análisis.

### 5.6. Extracción de ARN Total

Las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 800 g por 10 min a 4°C, el plasma fue eliminado y las células resuspendidas en 50  $\mu$ L de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ L de reactivo TRIzol y todas las muestras de cada tiempo (5 muestras) fueron mezcladas en un solo *pool*, agitando en un vórtex Standard Mini (VWR Scientific). La mezcla de células fue incubada a temperatura ambiente (15° a 30°C) por 5 min y almacenada en hielo para ser transportadas a CIAD, Hermosillo. La extracción del ARN se realizó con el agente TRIzol (Invitrogen, 2020) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cantidad y calidad de RNA fue determinada por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm en un equipo NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). La integridad del RNA, fue verificada por electroforesis a voltaje constante (50 V) por 45 minutos en gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio (0.001  $\mu$ g/ $\mu$ L). DNA Ladder de 2 kb (Invitrogen) fue utilizado como referencia de peso molecular. La eliminación del ADN genómico (ADNg) se realizó preparando una mezcla de reacción con 1  $\mu$ g de la muestra de ARN, 1  $\mu$ L la enzima DNasa I (1 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl), y ajustando a un volumen final de 10  $\mu$ L con agua DEPC. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, y se agregó 1  $\mu$ L EDTA (25mM), y finalmente se incubó a 65°C por 10 minutos (Invitrogen, 2002).

La ausencia de ADNg se comprobó mediante PCR punto final usando el gen  $\beta$ -actina como referencia, utilizando el kit 2x iProof High-Fidelity Master Mix siguiendo las indicaciones del

fabricante (Bio-Rad, 2000a). Se observó el producto de amplificación en geles de agarosa al 2%. Las condiciones de la reacción fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, 45 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 s y alineación a 60°C por 30 s (Ananda *et al.*, 2017).

### 5.7. Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit SuperScript IV First-Strand Synthesis System. Se preparó el mix de reacción que contiene: 1 µL de ARN muestra, 1 µL de primer oligo (dT)<sub>20</sub> (50 µM), 1 µL de 10mM dNTP Mix y agua DEPC a un volumen final de reacción de 13 µL. Después se incubó a 65 °C por 5 minutos. Las muestras se colocaron en hielo por 1 min. Después se agregaron 4 µL de Buffer 5X First-Strand (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de RNase OUT y 1 µL de SuperScript IV. Se prosiguió a incubar a 50 °C por 10 minutos, después a 80 °C por 10 minutos, se agregó 1 µL de RNase H y finalmente se incubó a 37 °C por 30 minutos (Invitrogen, 2019). Las incubaciones se realizaron en incubadora Modelo 5420 (VWR Scientific Products).

### 5.8. Análisis Cuantitativo de PCR Tiempo Real

Previo a los ensayos de PCR en tiempo real, se realizó una estandarización de las condiciones siguiendo lo recomendado por el protocolo Platinum Taq DNA Polymerase y con base a las temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>) de cada primer. La expresión relativa en respuesta a la inoculación de *V. parahaemolyticus* y LPS de las SP e inhibidores PPAE, PPAF, SERPIN. KPI, en *L. vannamei* se determinó utilizando como control interno el gen β-actina (LvActin).

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, 2000b). Las reacciones se realizaron en el termociclador LightCycler 480 Instrument II (Roche).

Las condiciones para las reacciones se basaron en lo recomendado por el kit. Se tomó la Ta con

base a reacciones de prueba, realizadas en PCR punto final. Las condiciones de reacción para el primer LvActin, KPI y SERPIN fueron 35 ciclos con desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, desnaturalización a 95°C por 15 segundos, y una alineación a 62°C por 30 segundos. Para el gen PPAE1 y PPAF las condiciones fueron 35 ciclos con desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, desnaturalización a 95°C por 15 segundos, y una alineación a 60°C por 30 s. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los niveles de expresión relativa fueron calculados utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ .

### 5.9. Análisis Estadístico

La expresión relativa de cada gen es reportada como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). Así mismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando un índice de significancia de  $p < 0.05$ . Y finalmente se realizó un análisis de comparación múltiple de variables mediante la técnica de Tukey para las muestras que mostraban diferencias significativas. Para estos análisis se utilizó el software NCSS 12.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Búsqueda y Selección de Primers

Los primers son secuencias nucleotídicas que flanquean y delimitan la región que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño debe oscilar entre 15-25 pares de bases y la cantidad de guanina-citosina no debe ser mayor del 55% de la secuencia (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Se realizó la búsqueda de primers reportados en artículos en donde trabajaron con SP y sus inhibidores en el camarón blanco *L. vannamei*. Se encontraron 19 artículos donde secuencias de interés eran reportadas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Compilación de secuencias de primers reportadas en literatura de ADN de serin proteinasas y sus inhibidores del camarón blanco (*L. vannamei*).

Primer	Secuencia (5'-3')	No. Acceso GenBank	Referencia
LvAct	Fw: CCACGAGACCACCTACAAC Rv: AGCGAGGGCAGTGATTTC	AF300705	(Ananda <i>et al.</i> , 2017)
LvAct	Fw: TAGGTGGTCTCGTGGATGCC Rv: GAGACCTTCAACACCCCGC	AF300705	(Vargas-Albores y Villalpando, 2012)
LvAct	Fw: CACGAGACCACCTACAACCTCCATC Rv: TCCTGCTTGCTGATCCACATCTG	-	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
LvAct	Fw: GAACCTCTCGTTGCCGATGGTG Rv: GAAGCTGTGCTACGTGGCTCTG	-	(Ponprateep <i>et al.</i> , 2017)
LvPPAE1	Fw: CACGGGCAACAGGAGAAAC Rv: CGGCAGATTTGGAATGAGGA	JX644452	(Liu <i>et al.</i> , 2014, Ponprateep <i>et al.</i> , 2017)
LvPPAE1	Fw: AGTTCCTACGACACGACCACCTA Rv: TCGACGTTGAAGTTGGTGCTT	JX644452	(Jang <i>et al.</i> , 2011, Pang <i>et al.</i> , 2014)
LvPPAE2	Fw: GTTGTGCCTCGAACGTAA Rv: TTGCTGGTGGGCGTTATAGTT	JX644453	(Pang <i>et al.</i> , 2014)
LvPPAE2	Fw: TTCCTTGGGTGGCTGCTTT Rv: TGTTCCCGAGACGGATTAC	JX644453	(Liu <i>et al.</i> , 2017a, Liu <i>et al.</i> , 2017b)
LvPPAF	Fw: GCAAGAGGAACTCGCAAGGCTTC Rv: CGGCTGTGAGAACGATGGATGGA	JX644454	(Liu <i>et al.</i> , 2014, Ponprateep <i>et al.</i> , 2017)

LvSP1	Fw: GTGGCGTGGCGTGGATAGT Rv: GGACAAAGCAGGTAGCCTCTTG	JX644456	(Liu <i>et al.</i> , 2017a, Liu <i>et al.</i> , 2017b)
LvSP1	Fw: TCAGGTGGCCCCCTTGGT Rv: CAGGACCGTAGGAGACAATGC	JX644456	(Pang <i>et al.</i> , 2014)
LvSP	Fw: ACGTTCTCACGACTGGTCACAC Rv: TATGTAAGGCGCGTTCGTTCTC	AY368151	(Okumura, 2007)
LvSerp	Fw: TTCTACGCTACGTCTCAGAACAGC Rv: CCTCAGTGGGAAGGAAAACAA	KC529336	(Liu <i>et al.</i> , 2014, Ponprateep <i>et al.</i> , 2017)
LvSerp3	Fw: TGGCTAAGGCAGATTTGTATGAG Rv: GCCTCACTGCCCTTTTCATTA	KM280385	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
LvSerp7	Fw: TCGGCGTTCATCATCGCTTAC Rv: GGCGTTGTTGCTGGTTTGG	KF442979	(Liu <i>et al.</i> , 2017a, Liu <i>et al.</i> , 2015)
LvSerp8	Fw: CCGTGCATATCCGAATTACTCAA Rv: GCACCATCAGGGCGTTTCTC	KU853046	(Liu <i>et al.</i> , 2017b)
LvSerpB3	Fw: CCGTGCATATCCGAATTACTCAA Rv: GCACCATCAGGGCGTTTCTC	KT824638	(Liu <i>et al.</i> , 2017a)
LvKaz1	Fw: CAGTCTCTGGCTACGGGAAG Rv: CTTGCACTTTGCAATCTCG	AY544986	(Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 2005a)
LvKaz2	Fw: GTTCTCTTGGTGGTGGCTG Rv: GTTAATATCCCTCTTGATGG	JQ000001	(Vargas-Albores y Villalpando, 2012)

LvAct:  $\beta$ -Actina; LvPPAE1: Enzima activadora de la profenoloxidasa 1; LvPPAE2: Enzima activadora de la profenoloxidasa 2; LvPPAF: Factor activador de la profenoloxidasa; LvSP1: Serin proteinasa 1; LvSP: Serin proteinasa; LvSerp: SERPIN; LvSerp3: SERPIN 3; LvSerp7: SERPIN 7; LvSerp8: SERPIN 8; LvSerpB3: SERPIN B3; LvKaz1: Kazal 1; LvKaz2: Kazal 2.

Las secuencias fueron alineadas con la secuencia de referencia reportada para cada primer en busca de incoherencias, usando el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Las secuencias que presentaron ambigüedades fueron descartadas.

En el artículo publicado por Pang *et al.* (2014), están reportados primers para PPAE2 (Enzima activadora de la profenoloxidasa 2; número de acceso JX644453) con las secuencias Fw: GTTGTGCCTCGAACGTAA y Rv: TTGCTGGTGGGCGTTATAGTT. Sin embargo, al hacer el alineamiento, se observó que la secuencia sentido no se encontraba en la secuencia del gen correspondiente, por lo que fue descartada y se utilizó la secuencia reportada por Liu *et al.* (2017b). El gen SERPIN B3 (número de acceso: KT824638) reportado por Liu *et al.* (2017a), indica que las secuencias Fw: CCGTGCATATCCGAATTACTCAA y Rv: GCACCATCAGGGCGTTTCTC son los primers para realizar RT-PCR. Sin embargo, ambas secuencias no pudieron ser localizadas en la secuencia de la proteína.

Por otra parte, Ponprateep *et al.* (2017) reportó los primers Fw: GAACCTCTCGTTGCCGATGGTG y Rv: GAAGCTGTGCTACGTGGCTCTG para amplificar  $\beta$ -Actina . Desafortunadamente, no reportó el número de acceso para la secuencia de referencia para los primers, por lo que se probó con la secuencia con el número de acceso AF300705. Sin embargo, el primer reverso no se encontró en la secuencia AF300705, mientras que el primer FW se encontró como antisentido. La secuencia reportada como antisentido, no estaba en la secuencia probada.

Para la selección de los primers se consideraron los siguientes criterios: (i) Oligonucleótidos con tamaño de 20-24 nucleótidos, ya que el número de pares de bases del primer es esencial para disminuir la posibilidad de formación de hibridaciones secundarias, por lo que se buscó que tuvieran una longitud recomendable de alrededor de 18 pares de bases (Abd-Elsalam, 2004). (ii) Contenido de enlaces guanina-citosina entre 40-60% debido a que produce un aumento en T<sub>m</sub>, esta última no debe variar más de 5°C entre los primers. (iii) Que no exista ambigüedades en las alineaciones de los primers a su secuencia de origen. (iv) Disminuir la posibilidad de estructuras secundarias por complementariedad (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los primers seleccionados (Cuadro 2) para SP, con actividad en el sistema proPO en *L. vannamei*, fueron una enzima activadora de la proPO reportada como PPAE1 (Jang *et al.*, 2011) y un factor activador de la proPO llamado PPAF (Ponprateep *et al.*, 2017). También se seleccionaron dos inhibidores de SP con aparente participación en el sistema proPO llamados KPI y SERPIN, ambos con expresión en hemocitos (Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 2005a, Liu *et al.*, 2014).

**Cuadro 2:** Secuencias seleccionadas de primers de serin proteinasas e inhibidores de serin proteinasas de camarón blanco (*L. vannamei*).

Primer	Secuencia (5'-3')	No. Acceso	Referencia
LvActin	Fw: CCACGAGACCACCTACAAC Rv: AGCGAGGGCAGTGATTTC	AF300705	(Ananda <i>et al.</i> , 2017) (Liu <i>et al.</i> , 2014,
LvPPAE1	Fw: CACGGGCAACAGGAGAAAC Rv: CGGCAGATTTGGAATGAGGA	JX644452	Ponprateep <i>et al.</i> , 2017)
LvPPAF	Fw: GCAAGAGGAACTCGCAAGGCTTC Rv: CGGCTGTGAGAACGATGGATGGA	JX644454	(Liu <i>et al.</i> , 2014,

LvSERPIN	Fw: TTCTACGCTACGTCTCAGAACAGC Rv: CCTCAGTGGGAAGGAAAACAA	KC529336	Ponprateep <i>et al.</i> , 2017) (Liu <i>et al.</i> , 2014, Ponprateep <i>et al.</i> , 2017) (Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 2005a)
LvKPI	Fw: CAGTCTCTGGCTACGGGAAG Rv: CTTGCACTTTGCAATCTCG	AY544986	

LvAct:  $\beta$ -Actina; LvPPAE1: Enzima activadora de la profenoloxidasa 1; LvPPAF: Factor activador de la profenoloxidasa; LvSerp: SERPIN; LvKaz: KPI; No. Acceso: Número de Acceso de Secuencia de Referencia en GenBank.

## 6.2. Bioensayo

El bioensayo consistió en dos tratamientos donde *V. parahaemolyticus* y LPS fueron inoculados; el grupo control fue inoculado con SSS. En el transcurso del bioensayo no se observó mortalidad, lo que sugiere que se tuvo un buen manejo de los organismos. A cada organismo inoculado se le extrajo hemolinfa con una jeringa conteniendo anticoagulante, el cual es necesario para prevenir la lisis celular, la degranulación y la coagulación durante el manejo de la hemolinfa (Vargas-Albores *et al.*, 1993). El anticoagulante utilizado fue SSS (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.3), que es una formulación que se ajusta a los parámetros biológicos de fuerza iónica, pH y osmolalidad de la hemolinfa de los peneidos, evitando problemas como la precipitación de proteínas (Vargas-Albores *et al.*, 1993).

## 6.3. Concentración y Pureza del ARN

En estudios de expresión de genes es necesario conocer la cantidad y calidad del ARN con el que se va a trabajar, por lo que es necesario medir concentración, pureza e integridad del ARN (Fleige *et al.*, 2006). Una de las técnicas más utilizada en la actualidad para cumplir con estas condiciones es el método del TRIzol.

El reactivo TRIzol es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina que facilitan la extracción de ARN y mantiene su integridad, por la inhibición de la actividad de ARNasa mientras que altera la célula y disuelve los componentes celulares en la homogenización de la muestra. Después, al agregar cloroformo se separa en una de las fases el ARN total y se precipita con isopropanol (Chomczynski *et al.*, 1987). Se ha comprobado que este reactivo mantiene la calidad del ARN eficientemente (Kang *et al.*, 2011).

En el cuadro 3, se presentan los resultados obtenidos de concentración y pureza del ARN de cada tratamiento y tiempo. Como se puede observar el rendimiento de RNA estuvo entre 275 y 1002 µg/ml, mientras que el valor del principal indicador de pureza,  $A_{280nm}/260nm$ , fue mayor de 1.8 en la mayoría de los casos.

**Cuadro 3.** Muestras de RNA cuantificadas utilizando espectrofotometría.

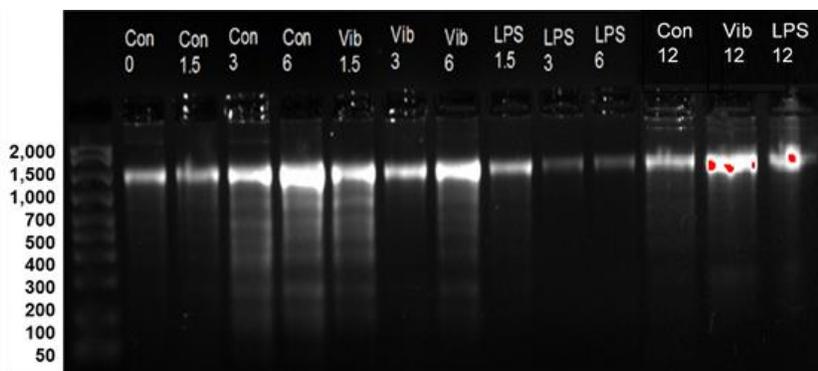
Muestra	Horas post-inducción	Abs a 260/280	Concentración (µg/ml)
Control	0	1.89	485.1
	1.5	1.73	804.6
	3	1.79	732.7
	6	1.87	1016
	12	1.74	746.5
	24	1.81	631.4
	48	2.02	420.8
	1.5	1.87	467
LPS	3	1.81	323.7
	6	1.76	275.1
	12	1.66	677.7
	24	1.85	852.5
	48	1.66	909.2
	1.5	1.94	553.1
VP	3	1.87	435.4
	6	1.85	590.2
	12	1.76	770.8
	24	1.96	428.8
	48	1.96	1002.5

VP: *V. parahaemolyticus*; LPS: lipopolisacárido; hpi: horas post-infección. Cada medida fue realizada por duplicado.

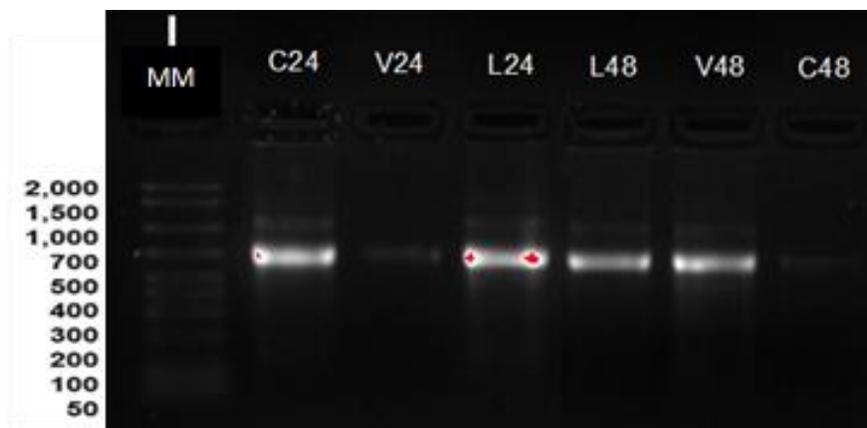
Una relación cercana a 1.8 se considera un indicador aceptable de ARN de buena calidad, ya que la confiabilidad del PCR cuantitativo para detectar con precisión los cambios de la expresión génica puede verse afectado por ARN degradado (Fleige y Pfaffl, 2006). Se observó una relación de 260/280 menor a 1.8, esto pudo ser debido a que el método de TRIzol puede dejar residuos proteicos o guanidina disminuyendo la pureza. Debido a que durante la degradación del ARN, los ARN ribosómicos disminuyen de tamaño, lo que conduce a una mayor acumulación de componentes de bajo peso molecular (Kuang *et al.*, 2018). Se ha demostrado que a partir de 1.7 se tiene la suficiente calidad para estudios de PCR. A pesar de no observar precipitado de ARN en todas las muestras, se obtuvo una concentración y pureza adecuada de ARN.

Se ha demostrado que las muestras moderadamente degradadas aún conducen a un perfil de expresión razonable con la suficiente calidad para estudios de PCR (Fleige y Pfaffl, 2006). A pesar de no observar precipitado de ARN en todas las muestras, se obtuvo una concentración y pureza adecuada de ARN.

Para observar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras, tiñendo con bromuro de etidio. La extracción del ARN se realizó de una manera adecuada, ya que en la electroforesis se puede observar la fracción 18 S del ARN ribosomal como se presenta en las Figuras 1 y 2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kuang *et al.* (2018).



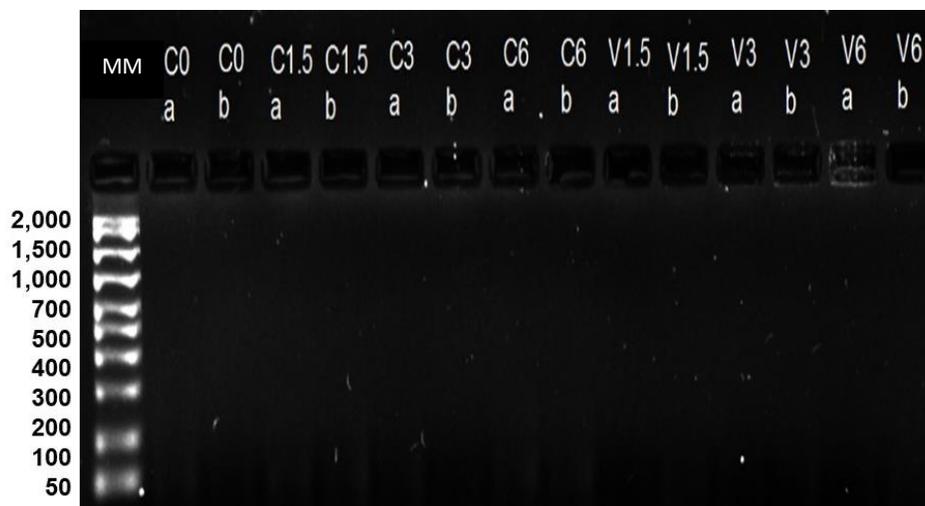
**Figura 1.** Integridad de ARN de los tratamientos de las 0 hasta las 12 h. Gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio de muestras de ARN total de hemocitos de camarón. MM: Marcador de peso molecular. Con 0: control a las 0 horas; Con 1.5: Control a las 1.5 horas; Con 3: control a las 3 horas; Con 6: control a las 6 horas; Vib 1.5: *V. parahaemolyticus* a las 1.5 horas; Vib 3: *V. parahaemolyticus* a las 3 horas; Vib 6: *V. parahaemolyticus* a las 6 horas; LPS 1.5: lipopolisacárido a las 1.5 horas; LPS 3: lipopolisacárido a las 3 horas; LPS 6: lipopolisacárido a las 6 horas; Con 12: control a las 12 horas; Vib 12: *V. parahaemolyticus* a las 12 horas; LPS 12: lipopolisacárido a las 12 horas.



**Figura 2.** Integridad de ARN de los tratamientos a las horas 24 y 48. Gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio de muestras de ARN total de hemocitos de camarón. MM: Marcador de peso molecular. C24: control a las 24 horas; V24: *V. parahaemolyticus* a las 24 horas; L24: lipopolisacárido a las 24 horas; C48: control a las 48 horas; V48: *V. parahaemolyticus* a las 48 horas; L48: lipopolisacárido a las 48 horas.

#### 6.4. Digestión del ADN Genómico

Se utilizó DNAsa para la eliminación de ADN contaminante en las preparaciones de ARN total. La DNAsa es una endonucleasa que digiere ADN monocatenario y bicatenario, actúa hidrolizando los enlaces fosfodiéster (Anderson, 1981). La amplificación del ADN genómico podría interferir con el análisis de la expresión génica, por lo que es necesario realizar un paso de eliminación del ADN genómico (Fleige y Pfaffl, 2006). Para corroborar los resultados, se realizó un PCR punto final del gen constitutivo  $\beta$ -Actina. Los productos de amplificación se observaron en gel de agarosa al 2%. En la Figura 3, es posible observar algunas muestras en donde no se observa ninguna banda, lo que confirma la eliminación del ADN genómico. Una vez finalizada la digestión, se prosigue a la síntesis de ADN complementario (ADNc).



**Figura 3.** Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio de la digestión del ADN genómico. MM: marcador de peso molecular. Las letras a y b representan duplicados de cada muestra. C0: control a las 0 horas; C1.5: control a las 1.5 horas; C3: control a las 3 horas; C6: control a las 6 horas; Vib 1.5: *V. parahaemolyticus* a las 1.5 horas; Vib 3: *V. parahaemolyticus* a las 3 horas; Vib 6: *V. parahaemolyticus* a las 6 horas.

#### 6.5. Optimización de Condiciones de Primers con PCR Punto Final

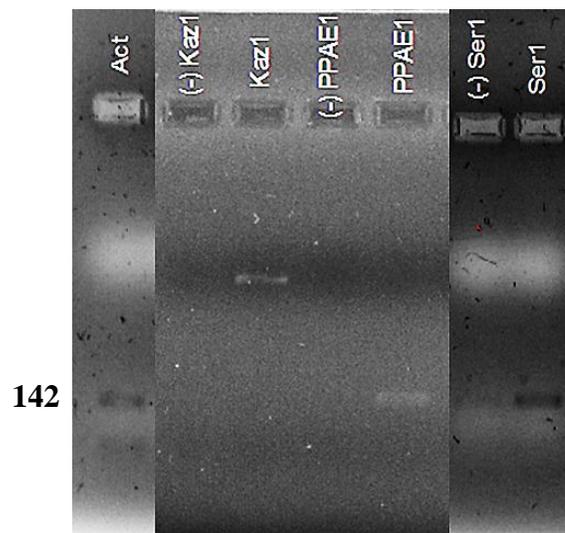
Se realizó una prueba a los primers con las condiciones reportadas a continuación para comprobar la amplificación de estos por PCR. Se utilizó el kit Platinum Taq DNA Polymerase para realizar las reacciones. Los resultados fueron comprobados por electroforesis en gel de agarosa. Se probaron diferentes temperaturas de alineaciones para cada juego de primers buscando la óptima. Las temperaturas de alineación utilizadas para cada juego de primers se presentan en el Cuadro 4. Las reacciones se llevaron a cabo en termociclador modelo MINI3220 (LongGene). Las condiciones utilizadas fueron una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min; siguiendo de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación específica para cada juego de primers por 30 s, y extensión a 72°C por 1 min; con una extensión final a 72°C por 5 min.

Las condiciones amplifican correctamente a los genes de interés (Fig. 4 y 5) lo cual indica que la optimización en base a la temperatura de alineación fue adecuada, este parámetro es importante ya que una  $T_m$  recomendable es entre 56-62°C, si la  $T_m$  es baja, los cebadores pueden ser menos eficientes, y una  $T_m$  alta puede ocasionar que el cebador con la  $T_m$  más baja no funcione (Dieffenbach *et al.*, 1993).

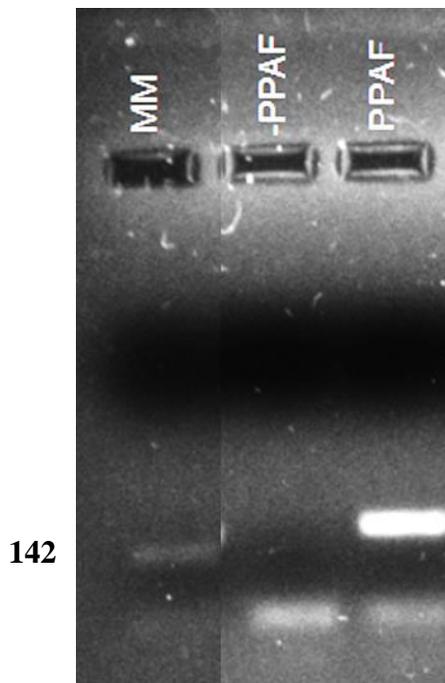
**Cuadro 4:** Ta óptima para cada primer

Primer	Ta óptima (C°)
LvActin	62
LvPPAE1	60
LvPPAF	60
LvKPI	62
LvSERPIN	62

LvActin,  $\beta$ -Actina; LvPPAE1, Enzima activadora de la profenoloxidasa; LvPPAF, Factor activador de la profenoloxidasa; LvKPI, Inhibidor tipo Kazal; Lv SERPIN, Inhibidor de serin proteinasa. Oligonucleótidos utilizados.



**Figura 4.** Prueba de primers de los genes KPI, PPAE1 y SERPIN. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio de muestras de ADNc en donde se probaron los primers. Signo (-) indica control negativo. Kaz1: KPI; PPAE1: Enzima activadora de la profenoloxidasa; Ser1: SERPIN; Se utiliza  $\beta$ -actina como marcador de peso molecular.



**Figura 5.** Prueba del primer PPAF. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio de muestras de ADNc en donde se probó el primer para PPAF: Factor activador de la profenoloxidasa; MM: Se utiliza  $\beta$ -actina como marcador de peso molecular. Signo (-) indica control negativo.

## 6.6. Expresión Relativa de Serin Proteinasa e Inhibidores

El sistema proPO es una parte importante del sistema inmunológico en los camarones peneidos, al generar melanina y compuestos de oxígeno reactivo, se eliminan los patógenos que invaden al organismo (Amparyup *et al.*, 2013a, Söderhäll *et al.*, 1998). Este mecanismo funciona a través de SP e inhibidores que permiten que se desencadene la respuesta inmune.

Con el fin de observar y comparar los cambios en la expresión de SP y sus inhibidores, organismos fueron inoculados con LPS de *E. coli* y con células inactivas de *V. parahaemolyticus*.

### 6.6.1. Expresión Relativa de PPAE

La PPAE es una proteinasa que tiene un papel importante la cascada de activación de la PO en los

artrópodos ya que es la responsable de hidrolizar el zimógeno proPO para generar PO (Amparyup *et al.*, 2013a, Pang *et al.*, 2014). Los resultados de expresión de PPAE1 pueden observarse en la Figura 6. Se observó que la expresión se mantuvo a un nivel basal hasta las 24 hpi donde aumentó su expresión; esta mostró un comportamiento similar en respuesta a *V. parahaemolyticus* donde también aumento a las 24 hpi. Sin embargo, el nivel de expresión en el tratamiento con *V. parahaemolyticus* fue seis veces mayor en comparación a los organismos expuestos al LPS. Posteriormente, ambos tratamientos vuelven a su nivel basal a las 48 hpi. Esto difiere con lo reportado por Jang *et al.* (2011) donde, al inocular *V. harveyi*, se observó una supresión de PPAE1 de las 2 a las 48 horas.

Por otra parte, se ha reportado una PPAE2 en *L. vannamei* que después del desafío con *V. harveyi* su expresión aumentó significativamente a las 4 y a las 24 hpi (Pang *et al.*, 2014), mostrando un comportamiento similar a lo reportado en el presente estudio.

Los estudios de expresión de SP e inhibidores después de la exposición a LPS en crustáceos son escasos. Sun *et al.* (2015) reportaron una SP en *Scylla paramamosain* nombrada Sp-cSP, donde la transcripción de este gen aumenta en los hemocitos después de los desafíos con *V. parahaemolyticus* y LPS. A las 6 y 96 hpi el tratamiento con LPS presentó aumentos de expresión significativa en comparación con el control. El tratamiento con *V. parahaemolyticus* aumentó a las 12 y 48 hpi, mientras que a las 24 y 96 hpi la expresión fue suprimida.

En el intestino de *L. vannamei*, el gen proPO aumentó significativamente a las 12 hpi después de la inyección con LPS y se reguló negativamente a las 72 hpi. Este aumento en la actividad de PO se ha reportado en otros trabajos, por ejemplo, se reportó que al inocular LPS, la actividad PO aumentó significativamente a las 6 hpi (Duan *et al.*, 2018). De igual manera, Okumura (2007) reportó que en *L. vannamei* los niveles de expresión del gen SP y proPO en hemocitos no cambiaron de forma significativa después de inoculación de LPS. Por otra parte, los resultados en este trabajo mostraron que los genes de reconocimiento de patrones LGBP y lectina aumentan a las 48 y 12 hpi respectivamente, y disminuyen a los 72 hpi.

Por otra parte, Amparyup *et al.* (2013b) identificaron una SP tipo clip en *P. monodon* nombrada como PmClipSP2, los niveles de transcripción de PmClipSP2 en hemocitos desafiados con *V. harveyi* revelaron un aumento de la expresión a las 3 hpi, entre las 6 y 12 hpi la expresión disminuyó hasta los niveles de expresión basal. Sin embargo, entre las 24 y 48 hpi los niveles de expresión disminuyeron significativamente en comparación con el control. Esto sugiere una fuerte regulación

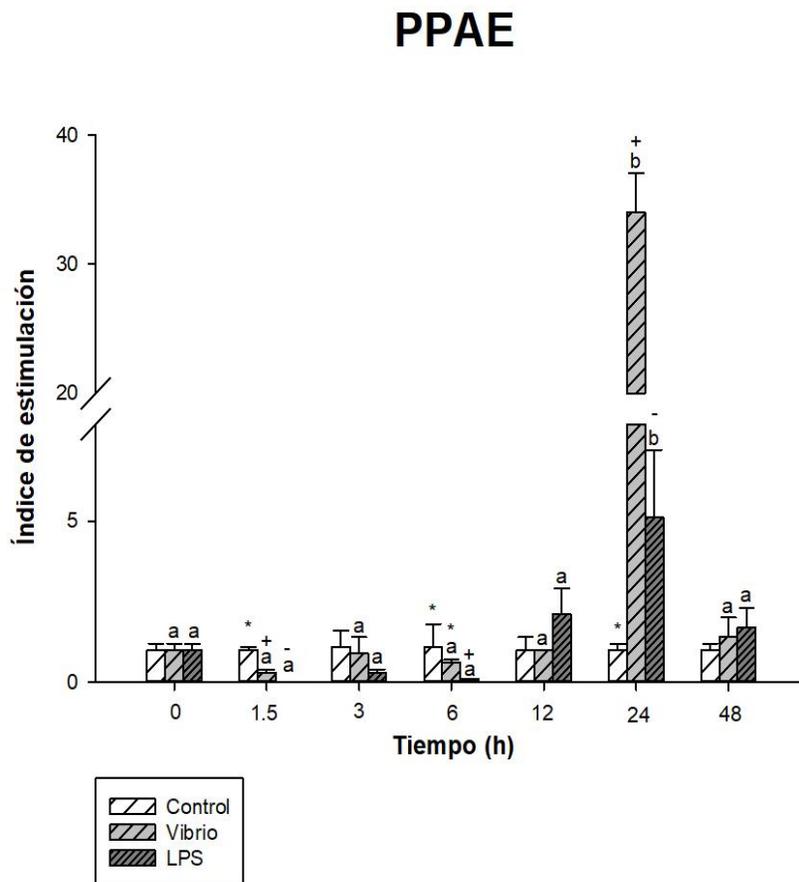
a la baja después de la infección (Amparyup *et al.*, 2013b), a diferencia de lo obtenido en este estudio. La diferencia obtenida podría atribuirse a que probablemente PmClipSP2 es una de las primeras proteinasas que comienzan el proceso de cascada proteolítica que terminan con la última proteinasa que es PPAE, por lo que puede observarse un aumento de expresión a las 3 hpi de PmClipSP2 y disminución de la expresión a las 24 hpi, mientras que en este estudio PPAE aumento la expresión a las 24 hpi.

En este estudio, se reporta la estimulación de PPAE después de la exposición a *V. parahaemolyticus* y LPS. La expresión al inocular el patógeno completo *V. parahaemolyticus* fue mayor que al inocular el compuesto aislado LPS que es reconocido por el organismo. El LPS es el principal componente responsable de la virulencia de las bacterias Gram negativas, por lo que este compuesto aislado podría generar una respuesta similar al de una bacteria completa. Sin embargo, otros componentes de las bacterias Gram negativas tienen propiedades inflamatorias en vertebrados como las porinas y las lipoproteínas (Heumann *et al.*, 2002). Por lo que la diferencia en la expresión de PPAE1 en *V. parahaemolyticus* y LPS podría deberse al posible reconocimiento de otros componentes de *V. parahaemolyticus*.

PPAE además de activar a PO funciona directamente en la eliminación de bacterias, debido a que también posee actividad antibacteriana, lo que supondría un nivel de expresión más alto (Pang *et al.*, 2014). El aumento en la expresión a las 24 hpi del gen PPAE, sugiere la participación de esta enzima en la etapa tardía de infección, además de contribuir a la cicatrización física de la herida (Pang *et al.*, 2014). PPAE actúa también atacando directamente el patógeno, además de su participación en la activación de la proPO. En un estudio donde se midió la expresión de PPAE1 y PPAE2, se observó que tienen un efecto compensatorio entre sí, es decir, que cuando los niveles de transcripción de un gen bajan, los del gen complementario aumentan para mantener regulados los niveles de proPO (Pang *et al.*, 2014).

Las proteínas necesarias para la activación del sistema proPO se encuentran en los gránulos de los hemocitos. Al activarse, el sistema inmune los hemocitos se degranulan y liberan las enzimas necesarias para la síntesis de melanina (van de Braak, 2002). En un estudio realizado por Xian *et al.* (2017) reportaron el efecto del LPS en las poblaciones de hemocitos en *P. monodon*, encontraron que las proporciones de hemocitos semigranulares (HSG) y los hemocitos granulares (HG) se vieron reducidas de las 3 a las 36 h y de las 3 a las 12 h respectivamente. Recuperaron su nivel inicial a las 48 y 24 h respectivamente. La pérdida de estas poblaciones de hemocitos es

atribuida al proceso de degranulación producido por el LPS con el fin de liberar el sistema proPO. Esto podría indicarnos que el aumento de la expresión a las 24 hpi, podría deberse a que en la etapa temprana de la infección, enzimas como la PPAE1 es liberada y utilizada en la cascada; por lo que la expresión de PPAE1 pudo haber aumentado para generar más transcrito y recuperar lo almacenado y continuar con la defensa del organismo mediante las respuestas inmunes.



**Figura 6.** Nivel de expresión relativa de PPAE en hemocitos después de la exposición a *V. parahaemolyticus* y LPS. El cambio en la expresión de veces se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia.

#### 6.6.2. Expresión Relativa de PPAF

Los PPAF son factores activadores de la proPO, como las SPHs que participan en los pasos de la

cascada proteolítica profenoloxidasa. Los SPHs son proteínas similares a las SP que contienen uno o más dominios clip en el extremo N terminal y un dominio similar a SP en el extremo C terminal; la diferencia entre las proteinasas es que en la triada catalítica contienen el aminoácido glicina en vez de serina y, por lo tanto, los SPHs carecen de actividad proteolítica (Amparyup *et al.*, 2013a). Hasta el momento no hay reportes de la expresión del gen PPAF en *L. vannamei* por exposición a un patógeno. En este trabajo se estudió el PPAF que es un SPH que modificó su nivel de expresión después de la exposición a *V. parahaemolyticus*, como puede observarse en la Figura 7. La expresión se mantuvo a un nivel basal, hasta las 12 horas se mostró un cambio en este comportamiento aumentando la expresión en ambos tratamientos. El nivel de expresión continuó aumentando a las 24 hpi para el tratamiento con *V. parahaemolyticus* y el tratamiento con LPS volvió a su nivel basal. A las 48 hpi hubo un segundo pico de expresión en el tratamiento con LPS, mientras que el tratamiento con *V. parahaemolyticus* mantuvo su expresión.

Estos resultados son comparables con los reportados por Amparyup *et al.* (2007), quienes determinaron la expresión de un factor activador de la proPO nombrado PmMasSPH en hemocitos de *P. monodon* inyectados con *V. harveyi*. La expresión disminuyó significativamente a las 3 y 12 hpi, después el nivel de expresión aumentó a las 24 y 48 hpi, siendo la mayor expresión a las 24 hpi. Coincidiendo con lo reportado en este estudio tras el aumento de expresión a las 24 hpi para el tratamiento con *V. parahaemolyticus*. Una SPH en *F. chinensis* nombrada como FcMas en hemocitos se reguló negativamente de 2 a 12 hpi después de la exposición a *V. anguillarum*, a las 24 hpi la expresión aumentó sin llegar al estado basal (Ren *et al.*, 2011).

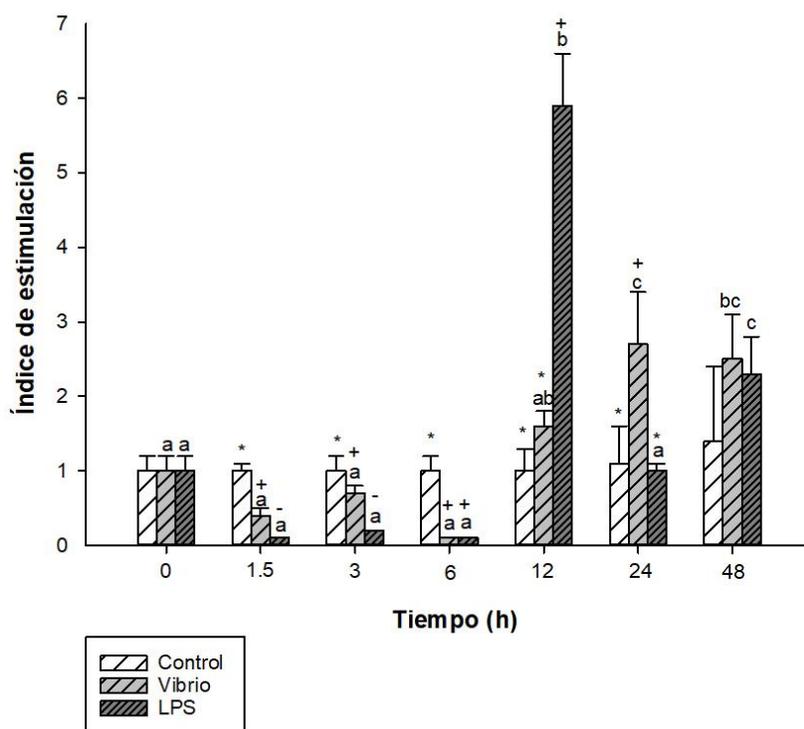
En un estudio donde se trabajó con microARN, se encontró que la actividad de PPAF2 aumentó los niveles de expresión de manera significativa después de la infección con *V. parahaemolyticus* en los hemocitos de *L. vannamei*, a su vez, la supresión del gen PPAF2 por RNAi provocó una disminución en la actividad fenoloxidasa. Esto sugiere que PPAF2 de *L. vannamei* está involucrada directamente en la vía de activación de proPO (Boonchuen *et al.*, 2021).

En *L. vannamei* existen otros reportes donde se ha evaluado la expresión de PPAF al silenciar genes inhibidores. Ponprateep *et al.* (2017) observaron que al silenciar el gen Alfa-2-Macroglobulina, un inhibidor de alto espectro, mediante ARN de interferencia, la expresión del gen PPAF aumenta significativamente. Por otra parte Liu *et al.* (2014) reportaron que suprimir la expresión del gen LvSERPIN, provocó un aumento en la expresión de PPAF en respuesta a infección por *V. anguillarum*. En insectos, varios estudios han demostrado la necesidad de SPH para la activación

de proPO al mejorar la escisión de proPO a PO activa por las PPAE (Gupta *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2002, Piao *et al.*, 2005).

Puede observarse la mayor expresión para el tratamiento con *V. parahaemolyticus* a las 24 hpi y 48 hpi, y para el tratamiento con LPS a las 12 y 48 hpi. El comportamiento fue similar al haber dos picos de expresión para ambos tratamientos. El gen PPAF podría tener su función mayormente en el período tardío de la infección. Como se mencionó anteriormente, los componentes de la cascada proPO se encuentran almacenados en los hemocitos granulados (van de Braak, 2002). El aumento de la expresión en la etapa tardía de la infección podría deberse a que al inicio de la infección, los hemocitos se degranulan, liberando PPAF almacenados y participan en la activación de la cascada proPO, al llegar a la etapa tardía de la infección se transcribe el gen PPAF para continuar su participación en la cascada. Dada la substitución del residuo Ser en el sitio activo, se sugiere que los SPHs no poseen actividad catalítica debido a esta modificación, pero podrían estar involucradas en la mediación las interacciones proteína-proteína, y modulación la actividad catalítica de otras enzimas de la cascada de activación de proPO (Ma *et al.*, 2014).

## PPAF



**Figura 7.** Nivel de expresión relativa de PPAF en hemocitos después de la exposición a *V. parahaemolyticus* y LPS. El cambio en la expresión de veces se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Las literales simbolizan diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a diferentes horas y los símbolos representan diferencias significativas entre diferentes tratamientos a la misma hora ( $p < 0.05$ ).

### 6.6.3. Expresión Relativa de SERPIN

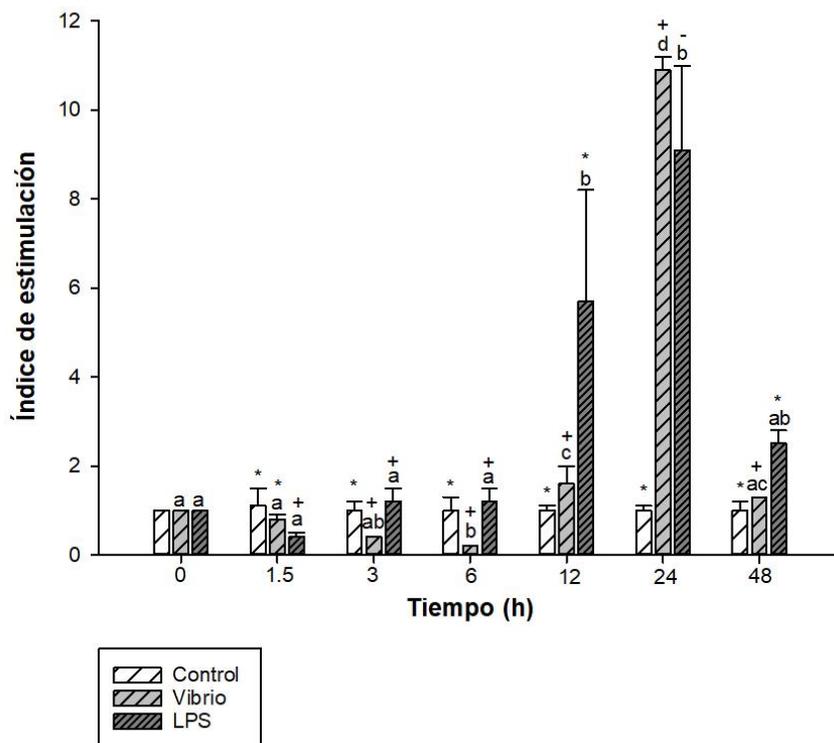
El inhibidor SERPIN actúa como un regulador del sistema proPO (Liu *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2017b, Somnuk *et al.*, 2012, Wetsaphan *et al.*, 2013). Estos inhibidores forman un complejo estable con su proteínasa diana, inactivándola; de esta manera se controla el daño celular que sería causado por la cascada proteolítica (Meekins *et al.*, 2017, Whisstock *et al.*, 2006).

En *L. vannamei* LvSERPIN, LvSERPIN3, LvSERPIN7 y LvSERPIN8 tienen funciones inhibitorias en el sistema de activación de proPO (Apitanyasai *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2017b).

Después de la exposición a *V. parahaemolyticus*, la expresión del inhibidor SERPIN, aumentó significativamente transcurridas las 12 y 24 hpi en comparación con el grupo control, posteriormente disminuyó a las 48 hpi (Fig. 8). El tratamiento con LPS reveló un comportamiento similar, al aumentar significativamente a las 12 hpi y 24 hpi. Los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos por Liu *et al.* (2014), que al medir la expresión del gen SERPIN en *L. vannamei* en presencia de *V. anguillarum*, mostró un aumento significativo a las 6 hpi y 12 hpi. Por otra parte Somnuk *et al.* (2012) reportaron comportamiento similar en la expresión de PmSERPIN8 en *P. monodon*, tras la exposición a *V. harveyi* en hemocitos, la expresión de PmSERPIN8 aumentó significativamente a las 24 hpi en comparación al control y disminuyó a las 48 hpi volviendo al estado basal.

Se ha reportado la expresión de diferentes SERPIN en hemocitos en respuesta a bacterias Gram negativas en *L. vannamei*. LvSERPIN7 presentó aumento de la expresión a las 2, 24 y 48 hpi de *V. anguillarum* (Liu *et al.*, 2015), mientras que LvSERPIN3 después del desafío con *V. anguillarum* presentó aumento en la expresión a las 2 hpi (Liu *et al.*, 2016). La expresión de este inhibidor SERPIN en el grupo inoculado con LPS mostró un comportamiento similar al tratamiento con *V. parahaemolyticus*, lo cual demuestra que la expresión de SP y sus inhibidores muestra un comportamiento similar en respuesta a la inoculación de un patógeno completo o una de sus partes. Estos resultados sugieren que la mayor actividad inhibitoria de SERPIN contra las SP se da en la etapa tardía de la infección. Una baja expresión de SERPIN, podría indicar que se encontraban en mayor expresión SP encargadas de activar el sistema proPO, como puede observarse en la expresión de dichos genes. En el sistema de activación de proPO, las serpinas intervienen en la prevención de la activación prematura y excesiva de la cascada de melanización (Cerenius *et al.*, 2008). El aumento en la expresión de SERPIN en la fase tardía de la infección, puede atribuirse a su papel como freno de la cascada de proteinasas para evitar el daño celular al hospedero. Los resultados podrían sugerir que SERPIN podría desempeñar un papel importante en el sistema regulador inmunológico del camarón.

## SERPIN



**Figura 8.** Nivel de expresión relativa de SERPIN en hemocitos después de la exposición a *V. parahaemolyticus* y LPS. El cambio en la expresión de veces se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Las literales simbolizan diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a diferentes horas y los símbolos representan diferencias significativas entre diferentes tratamientos a la misma hora ( $p < 0.05$ ).

### 6.6.4. Expresión Relativa de KPI

Los inhibidores de la familia KPI participan de forma similar en la regulación de proteinasas, en la coagulación y la activación del sistema proPO (Krowarsch *et al.*, 2003).

El inhibidor KPI presentó cambios en la expresión tras la inoculación con *V. parahaemolyticus* y LPS. Los niveles de transcrito aumentaron significativamente a las 24 hpi y 48 hpi (Fig. 9). Estos resultados discrepan por lo reportado por Jiménez-Vega y Vargas-Albores (2005a) al inocular *V. alginolyticus* y obtener una disminución en la expresión de KPI a las 24 hpi. Se ha reportado otro inhibidor KPI en *L. vannamei* nombrado KPI 2 por Vargas-Albores y Villalpando (2012) quienes

al inocular *V. alginolyticus* reportaron que la expresión fue altamente estimulada a las 6 hpi y la expresión fue disminuyendo casi al nivel basal a las 24 hpi. Estos resultados difieren a los obtenidos con KPI en este trabajo. La diferencia en la expresión entre los KPI reportados en *L. vannamei*, pueden indicar mecanismos o función diferente en las etapas de infección, que pudieran incluir factores de transcripción diferentes (Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 2005a, Vargas-Albores y Villalpando, 2012).

En *P. monodon* se identificó un inhibidor nombrado PmMIP, la expresión en branquias fue determinada después de ser inyectado con *V. harveyi*. La transcripción de PmMIP se redujo significativamente a las 24 hpi y volvió a su expresión basal a las 48 hpi (Noothuan *et al.*, 2017).

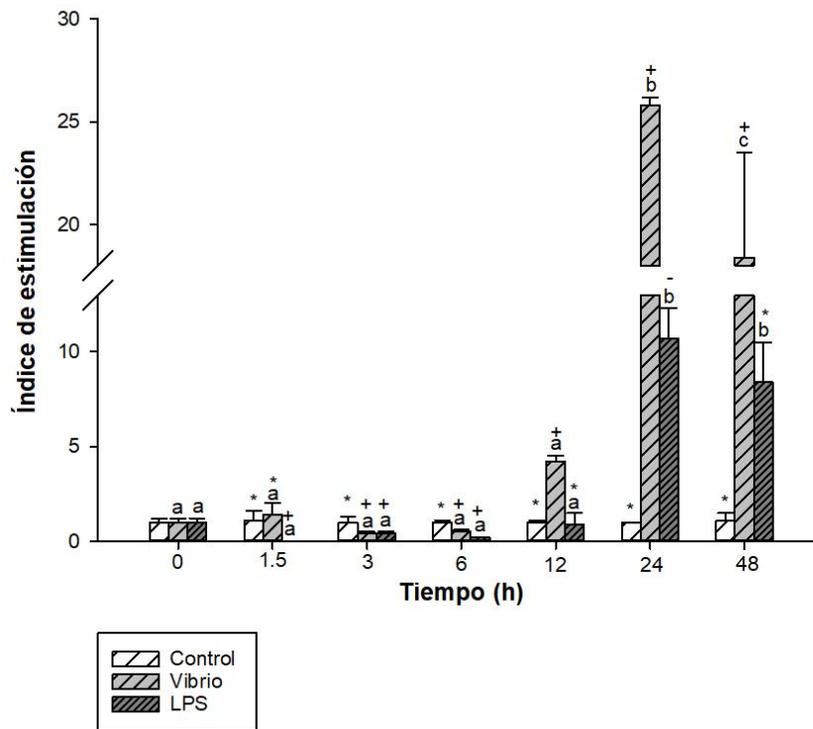
Se ha reportado la expresión de KPI en otros crustáceos como es el ejemplo de los cangrejos. En *Procambarus clarkii*, se identificó un KPI nombrado hpPcSPI4 después del desafío con *V. anguillarum*, en donde su expresión aumentó a las 12 y 24 hpi, coincidiendo con lo reportado por este estudio con el gen KPI al obtener aumento de expresión en la etapa tardía de la infección (Li *et al.*, 2010). Por otra parte Wang *et al.* (2012) reportaron un KPI nombrado PtKPI en *Portunus trituberculatus* que su expresión aumentó a las 4 hpi después de la exposición a *V. alginolyticus*.

En hígado de *Sebastes schlegelii* la expresión de un inhibidor KPI nombrado SsKSPI después del desafío con LPS se elevó significativamente de 3 hpi a 24 hpi. La vía de señalización de activación de KPI por LPS aún no se ha definido claramente (Kwon *et al.*, 2018).

Estos resultados obtenidos podrían sugerir la actividad inhibitoria de KPI sobre las SP en la etapa tardía de la infección. Además, ambos tratamientos presentaron aumento de expresión a las 24 y 48 hpi, lo que podría sugerir respuesta similar al inocular la bacteria completa o el compuesto aislado. Como se mencionó anteriormente, la diferencia en el aumento de expresión entre *V. parahaemolyticus* y LPS, fue aproximadamente el doble. Esto puede deberse al reconocimiento de la bacteria por otros componentes como las porinas y las lipoproteínas (Heumann y Roger, 2002). El comportamiento entre ambos tratamientos fue similar, en *V. parahaemolyticus* la expresión presentó un aumento mayor.

El aumento de la expresión de KPI a las 24 y 48 hpi puede deberse al requerimiento de mayor síntesis de los KPI en la etapa tardía de la infección para regular la cascada proPO y evitar el daño celular al hospedero. Los resultados podrían sugerir que KPI podría desempeñar un papel importante en el sistema regulador inmunológico del camarón.

## KPI



**Figura 9.** Nivel de expresión relativa de KPI en hemocitos después de la exposición a *V. parahaemolyticus* y LPS. El cambio en la expresión de veces se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Las literales simbolizan diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a diferentes horas y los símbolos representan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos a la misma hora ( $p < 0.05$ ).

## 7. CONCLUSIONES

El sistema proPO es una parte importante del sistema inmune en los crustáceos. Este sistema es estimulado por moléculas extrañas (antígenos) que pueden ser inertes o componentes de patógenos. El sistema inmune en invertebrados puede ser estimulado por inoculación de *Vibrio* inactivado y por LPS aislado, un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas. Como respuesta a la inoculación, se activa una cascada de SP que culmina con la conversión de la proPO inactiva a PO activa. La PO es la enzima responsable de la oxidación de fenoles que llevan a la melanización, un mecanismo de defensa característico del camarón. La identificación y caracterización de los genes involucrados en el sistema proPO es esencial para comprender la inmunidad del camarón.

Con los resultados obtenidos se puede sugerir la mayor participación de los genes en estudio en la etapa tardía de la infección después de la inoculación de la bacteria completa atenuada o el componente aislado. El inhibidor KPI podría aumentar su expresión para inhibir la activación de PPAAE en esa etapa de infección. Mientras que SERPIN podría inhibir otras SP. El aumento de la expresión de PPAAE y PPAF en la etapa tardía de la infección podría sugerir la participación de otras PPAAE y PPAF que activan proPO.

En este trabajo se observó que la expresión de SP e inhibidores en respuesta a la inoculación de LPS o *V. parahaemolyticus* presenta un comportamiento similar a lo largo del tiempo, en los hemocitos de camarón blanco, *L. vannamei*; lo que indica que la estimulación del sistema inmune utilizando moléculas antigénicas de patógenos genera una respuesta similar al contacto con el organismo completo.

## **8. RECOMENDACIONES**

Esta información podría complementarse si se cuantifica la expresión de PPAE2, de inhibidores SERPIN, SERPIN 3, SERPIN 7, SERPIN 8 y KPI 2 al inocular LPS, ya que en literatura se cuantificó la expresión después de la inoculación de una bacteria Gram negativa. Además, podría realizarse conteo de hemocitos para confirmar si el aumento de la expresión de los genes PPAE, PPAF, SERPIN y KPI en la etapa tardía de la infección es por la producción de hemocitos. Por otra parte sería interesante evaluar el LPS como inmunoestimulante, se podría realizar un desafío con diferentes concentraciones de LPS, para observar si es posible estimular aún más el sistema inmune del camarón y que conlleva esta estimulación frente a un patógeno.

## 9. REFERENCIAS

- Abd-Elsalam K. 2004. MINIREVIEW - Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. African Journal of Biotechnology (ISSN: 1684-5315) Vol 2 Num 52.
- Aldapa-Vega G., Pastelin-Palacios R., Isibasi A., Moreno-Eutimio M., Constantino L.-M. 2016. Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. Revista Alergia México 63:293.
- Amparyup P., Charoensapsri W., Tassanakajon A. 2013a. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. Fish & Shellfish Immunology 34:990-1001.
- Amparyup P., Jitvaropas R., Pulsook N., Tassanakajon A. 2007. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 22:535-546.
- Amparyup P., Promrungreang K., Charoensapsri W., Sutthangkul J., Tassanakajon A. 2013b. A serine proteinase PmClipSP2 contributes to prophenoloxidase system and plays a protective role in shrimp defense by scavenging lipopolysaccharide. Developmental and Comparative Immunology 41:597-607.
- Amparyup P., Wiriyaukaradecha K., Charoensapsri W., Tassanakajon A. 2010. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. Developmental & Comparative Immunology 34:168-176.
- Ananda R., Sridhar R., Balachandran C., Palanisammi A., Ramesh S., Nagarajan K. 2017. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 67:368-381.
- Anderson S. 1981. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. Nucleic acids research 9:3015-3027.
- Apines-Amar M., Amar E. 2015. Use of immunostimulants in shrimp culture: An update. Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines:45-71.
- Apitanyasai K., Chang C.C., Ng T.H., Ng Y.S., Liou J.H., Lo C.F., Lin S.S., Wang H.C. 2020. *Penaeus vannamei* serine proteinase inhibitor 7 (LvSerp7) acts as an immune brake by regulating the proPO system in AHPND-affected shrimp. Developmental and Comparative Immunology 106:103600.
- Bäckhed F., Normark S., Schweda E.K.H., Oscarson S., Richter-Dahlfors A. 2003. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. Microbes and Infection 5:1057-1063.
- Bachère E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. Aquaculture 227:427-438.
- Bertani B., Ruiz N. 2018. Function and biogenesis of lipopolysaccharides. EcoSal Plus 8:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.

- Bio-Rad. 2000a. iProof High-Fidelity PCR Master Mix. Bio-Rad Laboratories.
- Bio-Rad. 2000b. iQ SYBR Green Supermix Bio-Rad Laboratories.
- Boonchuen, P., Jaree, P., Somboonviwat, K., Somboonviwat, K. 2021. Regulation of shrimp prophenoloxidase activating system by lva-miR-4850 during bacterial infection. *Scientific Reports* 11: 3821.
- Briggs M. 2019. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado.
- Cerenius L., Lee BL., Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunology* 29:263-71.
- Charoensapsri W., Amparyup P., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. 2009. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Developmental & Comparative Immunology* 33:811-820.
- Charoensapsri W., Amparyup P., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. 2011. PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Developmental & Comparative Immunology* 35:115-124.
- Charoensapsri W., Amparyup P., Suriyachan C., Tassanakajon A. 2014. Melanization reaction products of shrimp display antimicrobial properties against their major bacterial and fungal pathogens. *Developmental & Comparative Immunology* 47:150-159.
- Chen Y.-Y., Chen J.-C., Kuo Y.-H., Lin Y.-C., Chang Y.-H., Gong H.-Y., Huang C.-L. 2016. Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 55:144-151.
- Chen Y.-Y., Chen J.-C., Lin Y.-C., Kitikiew S., Li H.-F., Bai J.-C., Tseng K.-C., Lin B.-W., Liu P.-C., Shi Y.-Z., Kuo Y.-H., Chang Y.-H. 2014. Endogenous molecules induced by a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) elicit innate immunity in shrimp. *PLoS ONE* 9:e115232-e115232.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
- Chu Y., Zhou F., Liu Y., Hong F., Wang G., An C. 2015. *Ostrinia furnacalis* serpin-3 regulates melanization cascade by inhibiting a prophenoloxidase-activating protease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 61:53-61.
- De Gregorio E., Han S.J., Lee W.J., Baek M.J., Osaki T., Kawabata S., Lee B.L., Iwanaga S., Lemaitre B., Brey P.T. 2002. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Developmental Cell* 3:581-592.
- Dieffenbach C.W., Lowe T.M., Dveksler G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3:S30-S37.
- Dong H., Tang X., Zhang Z., Dong C. 2017. Structural insight into lipopolysaccharide transport from the Gram-negative bacterial inner membrane to the outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862:1461-1467.

- Duan Y., Wang Y., Zhang J., Liu Q., Ding X. 2018. Morphologic, digestive enzymes and immunological responses of intestine from *Litopenaeus vannamei* after lipopolysaccharide injection. *Journal of Invertebrate Pathology* 153:186-194.
- Esparza-Leal H., Magallón-Barajas F., Pérez-Enriquez R., Casillas-Hernández R., Cabanillas-Ramos J., Valenzuela-Quiñónez W. 2012. Región endémica y regímenes de infección con el virus del síndrome de mancha blanca (wssv) en las ganjas camaronícolas del noroeste de México. *Ra Ximhai* 8:117-129.
- Flegel T.W. 2019. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 50:249-266.
- Flegel T.W., Sritunyalucksana K. 2011. Shrimp molecular responses to viral pathogens. *Marine Biotechnology* 13:587-607.
- Fleige S., Pfaffl M.W. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27:126-139.
- Freeman S., Grinstein S. 2014. Phagocytosis: Receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews* 262.
- Gettins P.G.W. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews* 102:4751-4804.
- Guido D., Demareux N., Nunes P. 2015. Junctate boosts phagocytosis by recruiting endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> stores near phagosomes. *Journal of Cell Science* 128:4074.
- Gupta S., Wang Y., Jiang H. 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35:241-248.
- Han J., Tang K., Lightner D. 2015. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 115:245-251.
- Heumann D., Roger T. 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* 323:59-72.
- Hou F., Wang X., Qian Z., Liu Q., Liu Y., He S., Mi X., Bai C., Sun C., Liu X. 2013. Identification and functional studies of Akirin, a potential positive nuclear factor of NF-κB signaling pathways in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 41:703-714.
- Huntington J.A. 2011. Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9:26-34.
- INAPESCA. 2018. Acuicultura camarón blanco del Pacífico.
- Invitrogen. 2002. Deoxyribonuclease I, amplification grade. Thermo Fisher Scientific.
- Invitrogen. 2019. SuperScript IV First-Strand Synthesis System. Thermo Fisher Scientific.
- Invitrogen. 2020. TRIzol reagent total RNA isolation reagent. Thermo Fisher Scientific.
- Jang I.-H., Nam H.-J., Lee W.-J. 2008. CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB Rep* 41:102-107.

- Jang I.-K., Pang Z., Yu J., Kim S.-K., Seo H.-C., Cho Y.-R. 2011. Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Immunology* 12:70.
- Jearaphunt M., Amparyup P., Sangsuriya P., Charoensapsri W., Senapin S., Tassanakajon A. 2015. Shrimp serine proteinase homologues PmMasSPH-1 and -2 play a role in the activation of the prophenoloxidase system. *PLoS ONE* 10:e0121073.
- Jensen S., Thomsen A.R. 2012. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *Journal of Virology* 86:2900.
- Jimenez-Vega F., Requena C.L.V., Briones D.M., Vargas-Albores F. 2009. A serine proteinase homologue of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *New Biotechnology* 25:S364.
- Jiménez-Vega F., Vargas-Albores F. 2005a. A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 29:385-391.
- Jiménez-Vega F., Vargas-Albores F., Söderhäll K. 2005b. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 18:101-108.
- Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K., Söderhäll K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191:45-52.
- Kang J.-E., Hwang S.-H., Lee J.H., Park D.Y., Kim H.-H. 2011. Effects of RBC removal and TRIzol of peripheral blood samples on RNA stability. *Clinica Chimica Acta* 412:1883-1885.
- Khorattanakulchai N., Amparyup P., Tassanakajon A. 2017. Binding of PmClipSP2 to microbial cell wall components and activation of the proPO-activating system in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 77:38-45.
- Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F., Otlewski J. 2003. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60:2427-2444.
- Kuang J., Yan X., Genders A.J., Granata C., Bishop D.J. 2018. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE* 13:e0196438-e0196438.
- Kurokawa M., Kornbluth S. 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138:838-854.
- Kwon H., Yang H., Lee S., Nilojan J., Bathige S.D.N.K., Nam B.H., Wan Q., Lee J. 2018. Characterization of a Kazal-type serine protease inhibitor from black rockfish *Sebastes schlegelii* and its possible role in hepatic immune response. *Fish and Shellfish Immunology* 74:485-490.
- Lee K.Y., Zhang R., Kim M.S., Park J.W., Park H.Y., Kawabata S.-i., Lee B.L. 2002. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca<sup>2+</sup> in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry* 269:4375-4383.
- Levin R., Grinstein S., Canton J. 2016. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological Reviews* 273:156-179.
- Li B., Yu H.Z., Ye C.J., Ma Y., Li X., Fan T., Chen F.S., Xu J.P. 2017. *Bombyx mori* Serpin6 regulates prophenoloxidase activity and the expression of antimicrobial proteins. *Gene* 610:64-70.

- Li F., Xiang J. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental & Comparative Immunology* 39:11-26.
- Li X.C., Zhang R.R., Sun R.R., Lan J.F., Zhao X.F., Wang J.X. 2010. Three Kazal-type serine proteinase inhibitors from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and the characterization, function analysis of hcPcSPI2. *Fish and Shellfish Immunology* 28:942-951.
- Liu Y.-C., Li F.-H., Wang B., Dong B., Zhang Q.-L., Luan W., Zhang X.-J., Xiang J.-H. 2007. A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 22:576-588.
- Liu Y., Hou F., He S., Qian Z., Wang X., Mao A., Sun C., Liu X. 2014. Identification, characterization and functional analysis of a serine protease inhibitor (Lvserpin) from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 43:35-46.
- Liu Y., Hou F., Liu X. 2017a. Characterization and expression analysis of serpinB3, the first clade B serine protease inhibitor in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 72:103-111.
- Liu Y., Hou F., Wang X., Liu X. 2015. Recombinant expression and characterization of a serine protease inhibitor (Lvserpin7) from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 42:256-263.
- Liu Y., Liu T., Hou F., Wang X., Liu X. 2016. Lvserpin3 is involved in shrimp innate immunity via the inhibition of bacterial proteases and proteases involved in prophenoloxidase system. *Fish & Shellfish Immunology* 48:128-135.
- Liu Y., Sun Y., Wang Q., Hou F., Liu X. 2017b. Identification and functional characterizations of serpin8, a potential prophenoloxidase-activating protease inhibitor in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 60:492-501.
- Ma, T. H. T., Benzie, J. A. H., He, J.-G., Sun, C.-B., Chan, S. F. 2014. PmPPAF is a prophenoloxidase activating factor involved in innate immunity response of the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 44:163-172.
- Maralit B.A., Jaree P., Boonchuen P., Tassanakajon A., Somboonwivat K. 2018. Differentially expressed genes in hemocytes of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VPAHPND) and VPAHPND toxin. *Fish & Shellfish Immunology* 81:284-296.
- Martínez-Porchas M., Villalpando-Canchola E., Vargas-Albores F. 2018. Beyond the primary structure of Kazal domains in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 38:156-165.
- Mayer H., Tharanathan R.N., Weckesser J. 1985. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. Pages 157-207 in Bergan T, ed. *Methods in Microbiology*, vol. 18 Academic Press.
- Meekins D.A., Kanost M.R., Michel K. 2017. Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 62:105-119.
- Mejías A.V., Peña N., Caro L.F. 2017. Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revision de la

enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana* 28:735-745.

- Montaño-Pérez K., Yepiz-Plascencia G., Higuera-Ciapara I., Vargas-Albores F. 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 122:381-387.
- Muniesa A., Mardones F.O., Chávez M.C., Montoya L., Cabanillas J.A., de Blas I., Martínez-López B. 2017. Spatial epidemiology and risk factor analysis of white spot disease in the shrimp farming industry of Sinaloa, Mexico, from 2005 to 2011. *Transboundary and Emerging Diseases* 64:1510-1518.
- Nirmala J.G., Lopus M. 2020. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology* 36:145-164.
- Noothuan N., Amparyup P., Tassanakajon A. 2017. Melanization inhibition protein of *Penaeus monodon* acts as a negative regulator of the prophenoloxidase-activating system. *Developmental and Comparative Immunology* 72:97-102.
- Nunan L., Lightner D., Pantoja C., Gomez-Jimenez S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in México. *Diseases of Aquatic Organisms* 111:81-86.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., team t.U. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28:1166-1167.
- Okumura T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 22:68-76.
- Ostrowski P., Grinstein S., Freeman S. 2016. Diffusion barriers, mechanical forces, and the biophysics of phagocytosis. *Developmental Cell* 38:135-146.
- Pang Z., Kim S.-K., Yu J., Jang I.-k. 2014. Distinct regulation patterns of the two prophenoloxidase activating enzymes corresponding to bacteria challenge and their compensatory over expression feature in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology* 39:158-167.
- Piao S., Song Y.-L., Kim J.H., Park S.Y., Park J.W., Lee B.L., Oh B.-H., Ha N.-C. 2005. Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *The EMBO journal* 24:4404-4414.
- Ponprateep S., Vatanavicharn T., Lo C.F., Tassanakajon A., Rimphanitchayakit V. 2017. Alpha-2-macroglobulin is a modulator of prophenoloxidase system in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 62:68-74.
- Qiu W., Zhang S., Chen Y.-G., Wang P.-H., Xu X.-P., Li C.-z., Chen Y.-H., Fan W.-Z., Yan H., Weng S.-P., FrancisChan S., He J.-G. 2014. *Litopenaeus vannamei* NF- $\kappa$ B is required for WSSV replication. *Developmental & Comparative Immunology* 45:156-162.
- Ren Q., Xu Z.L., Wang X.W., Zhao X.F., Wang J.X. 2009. Clip domain serine protease and its homolog respond to *Vibrio* challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 26:787-798.
- Ren Q., Zhao X.F., Wang J.X. 2011. Identification of three different types of serine proteases (one SP and two SPHs) in Chinese white shrimp. *Fish and Shellfish Immunology* 30:456-466.

- Rimphanitchayakit V., Tassanakajon A. 2010. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Developmental & Comparative Immunology* 34:377-386.
- Rivera M., McGroarty E.J. 1989. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 171:2244-2248.
- Romero H., Clara S., Iregui C. 2010. El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*.
- Romo-Figueroa M.a.G., Vargas-Requena C., Sotelo-Mundo R.R., Vargas-Albores F., Higuera-Ciajara I., Söderhäll K., Yepiz-Plascencia G. 2004. Molecular cloning of a  $\beta$ -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Developmental & Comparative Immunology* 28:713-726.
- Rungrasamee W., Maibunkaew S., Karoonuthaisiri N., Jiravanichpaisal P. 2013. Application of bacterial lipopolysaccharide to improve survival of the black tiger shrimp after *Vibrio harveyi* exposure. *Developmental & Comparative Immunology* 41:257-262.
- SAGARHPA. 2017. Informe de logros y avances del programa sectorial de mediano plazo de agricultura, ganadería, recursos hidráulicos, pesca y acuicultura
- Sangsuriya P., Charoensapsri W., Chomwong S., Senapin S., Tassanakajon A., Amparyup P. 2016. A shrimp pacifastin light chain-like inhibitor: Molecular identification and role in the control of the prophenoloxidase system. *Developmental & Comparative Immunology* 54:32-45.
- Santiago M.L., Espinosa A., Bermúdez M.d.C. 2009. Use of antibiotics in culture shrimp. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 40:22-32.
- Satyavathi V.V., Minz A., Nagaraju J. 2014. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cellular Signalling* 26:1753-1763.
- Sideri M., Tsakas S., Markoutsas E., Lampropoulou M., Marmaras V.J. 2008. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology* 123:528-537.
- Smith V.J., Dyrinda E.A. 2015. Antimicrobial proteins: From old proteins, new tricks. *Molecular Immunology* 68:383-398.
- Söderhäll K., Cerenius L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2:3-23.
- Söderhäll K., Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28.
- Somnuk S., Tassanakajon A., Rimphanitchayakit V. 2012. Gene expression and characterization of a serine proteinase inhibitor PmSERPIN8 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 33:332-341.
- Su H.C., Ying G.G., Tao R., Zhang R.Q., Fogarty L.R., Kolpin D.W. 2011. Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from integrated fish farms in South China. *Journal of Environmental Monitoring* 13:3229-3236.
- Suárez M.G., Medina Z., Montiel M., Ibarra J., Salcedo A. 2015. *Vibrio* spp. Distribution in water and sediment from ponds producing *Litopenaeus vannamei* shrimp cultured with water from lake of Maracaibo Venezuela. *Revista científica de veterinaria* 25:293-299.

- Sun W., Li Z., Wang S., Wan W., Wang S., Wen X., Zheng H., Zhang Y., Li S. 2015. Identification of a novel clip domain serine proteinase (Sp-cSP) and its roles in innate immune system of mud crab *Scylla paramamosain*. *Fish and Shellfish Immunology* 47:15-27.
- Suwanchaichinda C., Ochieng R., Zhuang S., Kanost M.R. 2013. *Manduca sexta* serpin-7, a putative regulator of hemolymph prophenoloxidase activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:555-561.
- Tait S.W.G., Green D.R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11:621-632.
- Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2:70-78.
- Tang H. 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly* 3:105-111.
- Tang H., Kambris Z., Lemaitre B., Hashimoto C. 2008. A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*. *Developmental Cell* 15:617-626.
- Tassanakajon A., Rimphanitchayakit V., Visetnan S., Amparyup P., Somboonwiwat K., Charoensapsri W., Tang S. 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental & Comparative Immunology* 80:81-93.
- Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Supungul P., Tang S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 34:954-967.
- van de Braak, C. B. T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) (Tesis doctoral). Wageningen University. Wageningen, Países Bajos.
- van Hoef V., Breugelmanns B., Spit J., Simonet G., Zels S., Vanden Broeck J. 2013. Phylogenetic distribution of protease inhibitors of the Kazal-family within the Arthropoda. *Peptides* 41:59-65.
- Vargas-Albores F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *Marine Biotechnology* 3:153-156.
- Vargas-Albores F., Guzmán M.-A., Ochoa J.-L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 106:299-303.
- Vargas-Albores F., Jiménez-Vega F., Yepiz-Plascencia G.M. 1997. Purification and Comparison of  $\beta$ -1,3-Glucan Binding Protein From White Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 116:453-458.
- Vargas-Albores F., Villalpando E. 2012. A new type of Kazal proteinase inhibitor related to shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 33:134-137.
- Vargas-Albores F., Yepiz-Plascencia G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191:13-21.
- Wang R., Lee S.Y., Cerenius L., Söderhäll K. 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry* 268:895-902.
- Wang S., Cui Z., Liu Y., Li Q., Song C. 2012. The first kazal-type serine proteinase inhibitor in the swimming crab *Portunus trituberculatus* involved in immune response to bacteria and

fungi. *Aquaculture* 356-357:55-60.

- Wang Y., Jiang H. 2004. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:387-395.
- Wetsaphan N., Rimphanitchayakit V., Tassanakajon A., Somboonwiwat K. 2013. PmSERPIN3 from black tiger shrimp *Penaeus monodon* is capable of controlling the proPO system. *Developmental & Comparative Immunology* 41:110-119.
- Whisstock J.C., Bottomley S.P. 2006. Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. *Current Opinion in Structural Biology* 16:761-768.
- Whitfield C., Trent M.S. 2014. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 83:99-128.
- Xian J.-A., Miao Y.-T., Li B., Guo H., Wang A.-L. 2013. Apoptosis of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 164:301-306.
- Xian J.-A., Wang A.-L., Tian J.-X., Huang J.-W., Ye C.-X., Wang W.-N., Sun R.-Y. 2009. Morphologic, physiological and immunological changes of haemocytes from *Litopenaeus vannamei* treated by lipopolysaccharide. *Aquaculture* 298:139-145.
- Xian J.-A., Zhang X.-X., Guo H., Wang D.-M., Wang A.-L. 2016. Cellular responses of the tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes after lipopolysaccharide injection. *Fish & Shellfish Immunology* 54:385-390.
- Xian, J.-A., Zhang, X.-X., Wang, D.-M., Li, J.-T., Zheng, P.-H., & Lu, Y.-P. 2017. Various cellular responses of different shrimp haemocyte subpopulations to lipopolysaccharide stimulation. *Fish & Shellfish Immunology* 69:195–199.
- Xu D., Liu W., Alvarez A., Huang T. 2014. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. *Developmental & Comparative Immunology* 47:287-297.
- Yang F., Wang Y., Sumathipala N., Cao X., Kanost M.R., Jiang H. 2018. *Manduca sexta* serpin-12 controls the prophenoloxidase activation system in larval hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 99:27-36.
- Zeng D., Chen X., Xie D., Zhao Y., Yang C., Li Y., Ma N., Peng M., Yang Q., Liao Z., Wang H., Chen X. 2013. Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas in response to Taura syndrome Virus (TSV) experimental infection. *PLoS ONE* 8:e57515.
- Zhan W., He L., Wei X., Wang X., Tang X. 2015. An anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* participates in the immune defense against WSSV and *Vibrio anguillarum*. *Journal of Crustacean Biology* 35:670-675.
- Zou Z., Jiang H. 2005. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *Journal of Biological Chemistry* 280:14341-14348.