



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

“LAS CATEPSINAS LISOSOMALES COMO PARTE DEL
SISTEMA DE DEFENSA DEL CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus vannamei.”

POR:

GEORGIA MARÍA GONZALEZ MEZA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

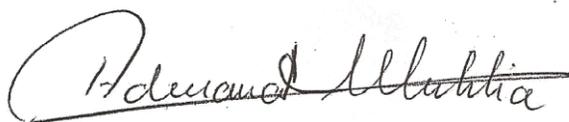
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Octubre, 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Georgia María González Meza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



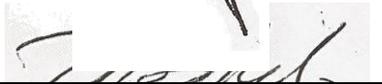
Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Directora de tesis



Dr. Fernando Luis García Carreño
Asesor



Dr. Arturo Sánchez Paz
Asesor

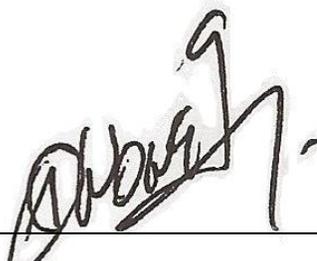


Dr. Rogerio Sotelo Mundo
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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 del autor, 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 del Director 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 de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto con clave 177954 titulado: “Las proteasas acidas digestivas e intracelulares de Crustáceos” y de una beca para estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo económico al proyecto llevado y por la beca otorgada.

Al CIAD, en especial a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal por todas las facilidades brindadas.

A la Doctora Adriana Muhlia, por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por todo el apoyo, la ayuda, los consejos y la amistad que me brindo.

A cada uno de los miembros del comité de tesis: Dr. Fernando Garcia Carreño, Dr. Arturo Sanchez Paz y al Dr. Rogerio Sotelo Mundo por su interés y disponibilidad.

Al técnico Sandra Araujo, por su apoyo técnico y por estar siempre al pendiente de mí y por brindarme su amistad.

A la Ing. Biotecnóloga Ofelia Méndez por su apoyo técnico en el objetivo 1 de esta tesis.

A la Técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro, M. en C. Tania Enríquez y M. en C. Fernando Mendoza del CIBNOR por su apoyo técnico y la instrucción de las técnicas y realización de bionsayo.

A mis padres Jorge González y Santa Meza, por siempre apoyarme en todo, sin negarme nada dando por hecho su gran confianza en mí, por educarme bien y hacer que llegue a esta etapa de mi vida.

A mi hermana Irma González, por brindarme todas las formas de apoyo que puedan existir.

A mis amigos en general, siguen siendo de gran ayuda para que en los tiempos difíciles las cosas no sea vean tan negras.

A todas las personas que me ayudaron aún en lo más mínimo en estos dos años para que yo saliera adelante y me realizara como maestra en ciencias, gracias por su simpatía y cariño.

Y por supuesto a Dios que sin Él, no hubiera conocido a todas las personas antes mencionadas.

DEDICATORIA

*A Dios que me ha enseñado y guiado a ayudar a los
demás.*

*A mis padres, a mis hermanas y a esas personitas
especiales que nunca me han abandonado, todo lo que
hago es por y para ustedes.*

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. El Cultivo de Camarón y WSSV.....	4
2.2. Biología del Camarón.....	6
2.3. Enzimas Proteolíticas.....	8
2.3.1. Cisteína Proteasas.....	10
2.3.2. La Catepsina B.....	11
2.3.3. La Catepsina L.....	13
2.4. Participación de las Proteasas en el Sistema Inmune del Camarón.....	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivo General.....	20
5.2. Objetivos Específicos.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1. Bioensayo de Infección con WSSV.....	21
6.2. Preparación del Inóculo WSSV y Ensayo de Infección.....	21
6.3. Confirmación de la Infección y Evaluación de la Carga Viral de WSSV.....	23
6.4. Cuantificación del ARNm de Catepsina B y L del Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
6.5. Ensayo de la Actividad de Cisteína Proteasas.....	26
6.6. Detección de la Actividad de la Catepsina B y L en Gel.....	28
6.7. Análisis Estadísticos.....	29
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31

CONTENIDO (Continuación)

7.1. Cuantificación Viral.....	31
7.2. Efecto de la Infección del WSSV en la Expresión Génica de la Catepsina B del Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	33
7.3. Efecto de la Infección del WSSV en la Expresión Génica de la Catepsina L del Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	37
7.4. Evaluación de la Actividad de Cisteína Proteasas en Glándula Digestiva y Branquias del Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	42
7.4.1. Condiciones de pH Óptimas para Evaluar la Actividad Enzimática de Catepsina B.....	42
7.4.2. Actividad de Cisteína Proteasas del Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> Infectado con WSSV.....	43
7.5. Identificación de Cisteín Proteasas en la Glándula Digestiva y branquias...	50
VIII. CONCLUSIÓN.....	57
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	58

LISTA DE FIGURAS

1	Camarón infectado por WSSV (FAO, 2000).....	5
2	Camarón peneido (FAO, 2006).....	7
3	Expresión de ARN mensajero de la catepsina B en seis tejidos diferentes del camarón.....	13
4	Número de copias por ng de ADN de WSSV en los hemocitos de camarones inoculados con el virus en tiempos post-infección.....	32
5	Comparación de los rangos dinámicos de la catepsina B y L8.....	33
6	Expresión relativa del gen de la catepsina B en la glándula digestiva del camarón en respuesta a la infección del WSSV.....	34
7	Expresión relativa del gen de la catepsina B en las branquias del camarón en respuesta a la infección del WSSV.....	35
8	Comparación de los rangos dinámicos de la catepsina L y L8.....	38
9	Expresión relativa del gen de la catepsina L en la glándula digestiva del camarón en respuesta a la infección del WSSV.....	39
10	Expresión relativa del gen de la catepsina L en las branquias del camarón en respuesta a la infección del WSSV.....	40
11	Unidades de fluorescencia producida por la hidrólisis del sustrato fluorogénico Z-Arg-Arg-AMC a diferentes pHs.....	43
12	Actividad de catepsina B en la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i> en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 6.0.....	44

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

13	Actividad de catepsina B en las branquias de <i>L. vannamei</i> en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 6.0.....	45
14	Actividad de proteasas en la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i> en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 8.0.....	47
15	Actividad de proteasas en las branquias de <i>L. vannamei</i> en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 8.0.....	48
16	Identificación de cisteína proteasas en glándula digestiva.....	51
17	Identificación de cisteína proteasas en branquias.....	52
18	Identificación de cisteína proteasas en glándula digestiva utilizando el sustrato Z-Arg-Arg-AMC.....	53

LISTA DE TABLAS

1	Diferencias y semejanzas entre catepsina B y catepsina L.....	17
2	Características de las sondas TaqMan® utilizadas en la evaluación de la expresión génica de las catepsinas B y L.....	25
3	Especificidad de las catepsinas B y L por sustratos fluorogénicos específicos.....	49

RESUMEN

Las catepsinas B y L son cisteína proteasas recientemente descritas en crustáceos. Estas enzimas se caracterizan por hidrolizar proteínas de patógenos en el sistema lisosomal de mamíferos. En el camarón *Litopenaeus vannamei* se sabe que además de tener participación en la glándula digestiva, estas incrementan su expresión génica a causa de infección por bacterias tipo *Vibrio spp.* Debido a la necesidad de generar conocimiento acerca de la respuesta inmune del camarón, cuya sobrevivencia en condiciones de cultivo se ha visto afectada por la presencia de patógenos como el Virus del síndrome la mancha blanca (WSSV), se hace imperativo el estudio de las catepsinas y su función biológica en esta especie. El objetivo de esta investigación es evaluar los cambios en los niveles de ARNm de las catepsinas B y L y medir su actividad enzimática en la glándula digestiva y branquias del camarón *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV para establecer su posible participación en la respuesta inmune. En organismos experimentalmente infectados con WSSV, se detectaron cambios en la expresión relativa de las catepsinas B y L en comparación con camarones sanos. En la glándula digestiva de los camarones infectados no se detectó la expresión de ambos genes a las 0-3 horas post-infección (hpi), sin embargo, a las 24 y 42 hpi la cantidad de ARNm de ambos genes se incrementó significativamente, lo que sugiere una respuesta innata temprana. En branquias se detectó un incremento en la expresión de ambos genes tras la inoculación, pudiendo deberse a una respuesta innata inmediata. En cuanto a la evaluación de la actividad enzimática de ambas catepsinas, en organismos infectados, se detectó un incremento a partir de la 1 hpi que se mantuvo hasta las 12 hpi, el cual comenzó a disminuir a las 24 hpi, alcanzando su nivel más bajo a las 42 hpi. Este resultado sugiere una respuesta innata temprana ante la infección, en donde las enzimas ya existentes en el lisosoma incrementan su actividad en presencia del patógeno.

Palabras claves: actividad enzimática, catepsina B, catepsina L, cisteína proteasas, expresión de genes, *Litopenaeus vannamei*, respuesta inmune.

ABSTRACT

Cathepsins B and L are cysteine proteases recently described in crustaceans. Both enzymes catalyze the hydrolysis of pathogen proteins in the lysosomal system of mammals. In the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, these enzymes are known to be involved in the food protein digestion; however, their genes expression has been found to increase during an infection caused by the bacterium *Vibrio spp.* Due to the ever increasing need for scientific knowledge about the immune response of shrimp, whose survival in culture conditions has been severely affected by the presence of pathogens such as the white spot syndrome virus (WSSV), it becomes essential to better understand cathepsins biological function in shrimp. The aim of this study was to evaluate the relative amounts of cathepsin B and L mRNA, and the enzyme activity in the digestive gland and gills of WSSV infected shrimp to evaluate the possible role of cysteine proteases in the innate immune response of shrimp. Changes were detected in the relative gene expression of both cathepsin B and L, between control and infected organisms. A decrease on the amount of transcripts of both genes was observed in the digestive gland at 0-3 hours post-infection (hpi); however, its expression was increased at 24 and 42 hpi, which might suggest that both enzymes may have a potential role on the immune system of shrimp. In addition, an immediate over-expression of both enzymes was detected on gills after inoculation, suggesting an innate immune response. An early increase in the activity of cysteine proteases at 1, 3 and 12 hpi with WSSV was detected, whereas at 24 and 42 hpi the activity of both enzymes decreased significantly. These results suggest an early innate immune response of shrimp to viral infection, where existing in the lysosome enzymes increase their activity in the presence of the pathogen.

Keywords: Cathepsin B, cathepsin L, cysteine proteases, enzyme activity, gene expression, immunity, *Litopenaeus vannamei*.

I. INTRODUCCIÓN

La pesca y el cultivo de camarón representan una parte de la producción de alimentos en el mundo para consumo humano. Sin embargo, en los últimos años la producción de camarón de cultivo a nivel mundial se ha visto afectado notablemente por la presencia de patógenos que han provocado un incremento en las tasas de mortalidad (Sánchez-Paz et al., 2012). Las granjas camaronícolas en la región noroeste de México han sido también afectadas por la presencia de estos patógenos. De manera particular, el Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) ocasionó tan sólo en el 2011, pérdidas aproximadas de 7,500 empleos directos y 150 millones de dólares en la costa del municipio de Hermosillo, Sonora (COSAES, 2012).

El WSSV es el patógeno que causa una de las enfermedades más letales en el camarón. Debido a su impacto, se han realizado importantes esfuerzos por parte de la comunidad científica que se ven reflejados en un incremento sustancial en el número de investigaciones científicas acerca de este virus. No obstante, la información existente sobre la biología del camarón como hospedero de este patógeno es aún escasa.

Cuando el camarón sufre una enfermedad, se desencadena una respuesta inmune innata, que se refiere a la capacidad del organismo para detener la infección, se manifiesta en las primeras horas e incluye la participación de algunas enzimas. Este mecanismo y las enzimas que participan en él, ya han sido descritos en modelos animales como los vertebrados, pero en invertebrados aún no se conoce la identidad y función de todas las enzimas que

participan en la respuesta inmune innata (Athauda et al., 1991; Baldwin et al., 1993; Yamakami et al., 1995).

Desde los años sesenta a la fecha se sabe que en los mamíferos las enzimas proteolíticas actúan en diversos procesos, como en la digestión de alimentos, la inflamación, edemas y participando de forma importante en la respuesta inmune del organismo como en la presentación de antígenos (Tassaman et al., 1964; Gylling et al., 1966; Volanakis, 1998), como en procesos inflamatorios. Sin embargo, en los crustáceos las primeras investigaciones sobre las enzimas proteolíticas del camarón se realizaron en los años setenta. Los estudios describieron que estas enzimas son secretadas por la glándula digestiva ó hepatopáncreas de los decápodos, siendo también responsables de la hidrólisis de proteínas del alimento (Gibson y Barker, 1979).

De manera general, estas enzimas proteolíticas actúan en la degradación bioquímica de las proteínas del alimento por la hidrólisis de sus enlaces peptídicos (Kato, 1999). Así mismo, las proteasas operan en gran parte de los fenómenos biológicos del organismo, teniendo también participación en la respuesta inmune de algunos insectos, como los ácaros (Hamilton et al., 2003).

Entre las proteasas, las cisteína (tiol) proteasas han sido estudiadas debido a su participación en diversos aspectos fisiológicos como la renovación celular y la apoptosis de los mamíferos (Bond et al., 1987; Nicholson et al., 1995) y en el ciclo de vida de muchos parásitos (Robertson et al., 1997). En la familia de las cisteína proteasas se ubican enzimas lisosomales como las catepsina B, C y L. En los vertebrados existe un avance importante sobre las características estructurales y funcionales de estas enzimas y se ha reportado que participan en procesos como la respuesta inmune adaptativa e innata (Yamakami et al., 1995).

La información existente sobre estas enzimas en crustáceos, es muy escasa, a pesar de que se ha sugerido que la catepsina L participa en la respuesta inmune del camarón chino *Fenneropenaeus chinensis* (Ren et al., 2010). De

igual forma, la información sobre el papel de la catepsina B en la respuesta inmune del camarón es escasa.

Debido a todo lo anterior, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la infección con el Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en la expresión génica de las catepsinas B y L del camarón *Litopenaeus vannamei* y en la actividad de la catepsina B. Así, se podrá sugerir la participación de la enzima como una respuesta antiviral en el camarón.

II. ANTECEDENTES

2.1. El Cultivo de Camarón y WSSV

En los últimos diez años el cultivo de camarón ha sido una actividad productiva con un crecimiento sectorial de suma importancia a través de las exportaciones de productos pesqueros a nivel mundial. Así, el camarón se ha convertido en el producto pesquero y acuícola de exportación más valioso e importante para muchos países, en especial México, que se encuentra dentro de los seis principales exportadores (SAGARPA, 2010).

La camaronicultura en algunos estados mexicanos del Pacífico (Nayarit, Sinaloa y Sonora), es una industria importante para el desarrollo económico de la región noroeste (CONAPESCA, 2010). Desde principios de los años 90 en los cultivos de camarón, en especial de la especie *Litopenaeus vannamei* nativa de la región Noroeste del país hasta la costa norte de Perú, han aparecido enfermedades como el Virus de Taura y la bacteria del género *Vibrio spp* que han afectado de forma importante la producción de camarón.

De 1997 a 1999 hubo una recuperación en las producciones ya que no se presentaron problemas de enfermedades en los cultivos; sin embargo, en el año 2000 se detectó por vez primera el Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en México, lo que provocó mortalidades del 80 al 100% en la mayoría de las granjas. Esto causó serios estragos en la economía de la industria, se

limitó la producción y expansión de la camaronicultura y se afectó el consumo del camarón en varias regiones del país (Anaya, 2005).

El WSSV infecta principalmente a los decápodos y causa alta mortalidad en camarones (Oidtmann y Stentiford, 2011). Bajo ciertas condiciones, el virus provoca la aparición de manchas blancas características en el caparazón, apéndices y en el exoesqueleto de los individuos infectados (Figura 1), sin embargo, esto no es un signo clínico útil para el diagnóstico de la enfermedad, ya que en algunos países estas manchas nunca han sido observadas, y en otros casos, ciertos patógenos provocan la aparición de manchas muy similares. Recientes estudios han demostrado que el WSSV cuenta con estrategias que le permiten evadir las respuestas de defensa del camarón (Sánchez-Paz et al., 2012).



Figura 1. Camarón afectado por WSSV (FAO, 2000).

El WSSV es un virus en forma de bacilar, no ocluido, envuelto y compuesto por ADN de doble cadena circular. Debido a estas características, y a algunas diferencias con otros virus, al WSSV se le ha ubicado taxonómicamente como miembros de la familia *Nimaviridae*, dentro del género *Whispovirus* (Lo et al., 2012).

La transmisión del virus se produce principalmente por la cohabitación con animales infectados, por ingestión de tejidos infectados o por contacto con agua que contiene partículas infecciosas de WSSV (Chang et al., 1998; Lo et al., 1999). Se ha sugerido que la forma de entrada del virus al organismo ocurre a través de las branquias. Las branquias son el sitio de la formación de nódulos de hemocitos durante la inyección de partículas extrañas y la acumulación de bacterias viables durante la infección (Burgents et al., 2005).

Se sabe que el WSSV afecta principalmente al tejido hematopoyético, que es donde se sintetizan los hemocitos, células características responsables de la respuesta inmune innata del camarón (Chang et al., 1998; Lo et al., 1999). La infección viral afecta la función del epitelio cuticular y del tejido nervioso, conectivo, muscular y linfático. El camarón muestra un comportamiento letárgico y una mortalidad típicamente acumulativa que alcanza el 100% entre 7 y 7 días después de la infección (Sánchez-Paz, 2010).

A partir de los estudios realizados por Pan et al., (2005) y Wang et al., (2012) se sabe que los genes de enzimas como las cisteína proteasas se sobreexpresan en la glándula digestiva del camarón por estimulación de la infección por el WSSV; ambos estudios concluyen que probablemente estas enzimas participan en la respuesta antiviral de los camarones *Penaeus japonicus* y *Fenneropenaeus chinensis*, respectivamente.

2.2. Biología del Camarón

La historia de vida de los *peneidos* está marcada por variaciones importantes en la morfología, fisiología y comportamiento. A lo largo de su ciclo de vida, estos organismos sufren cambios ontogénicos acompañados de cambios significativos en las tasas metabólicas y en la actividad de las enzimas que se

localizan en la glándula digestiva (Lemos et al., 2000). La glándula digestiva es un órgano que comprende gran parte del cefalotórax (Figura 2), y lleva a cabo de manera combinada varias de las funciones del hígado, el páncreas, el intestino y otros órganos en los vertebrados (Caceci et al., 1988).

El funcionamiento de la glándula digestiva es importante en la digestión de los alimentos así como para la salud, el crecimiento y la supervivencia del camarón. Incluso, este órgano se ha utilizado para la evaluación del estado de salud y bienestar del organismo, y ha probado ser un buen modelo para el estudio de la digestión de los alimentos y la secreción celular en los crustáceos (Loizzi, 1971; Caceci et al., 1988).

La función principal de la glándula digestiva es la digestión del alimento ingerido, con la absorción subsecuente de nutrientes, almacenaje de lípidos, la síntesis y la secreción de una batería de enzimas proteasas, lipasas y amilasas entre otras (Muhlia-Almazán et al., 2008; Rojo et al., 2010).

El epitelio de la glándula digestiva tiene una monocapa de 5 diferentes tipos de células distribuidas a lo largo de los túbulos: las células E, R, F, B y M. Se ha encontrado que en las células F se sintetizan enzimas digestivas, se cree que estas células maduran a células B para llevar a cabo la secreción de manera holócrina. Los productos de la hidrólisis enzimática son absorbidos por las células R, que participan en el almacenamiento e incorporación de los nutrientes (Mikami y Takashima, 2000).

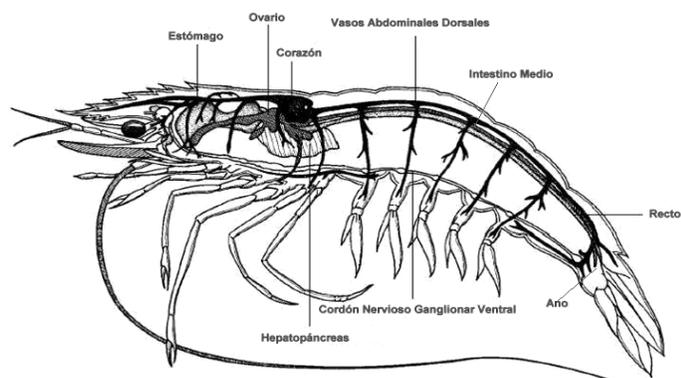


Figura 2. Camarón peneido (FAO, 2006).

La glándula digestiva del camarón está relacionada con el sistema inmune, pues en este órgano se encuentran células fagocíticas que realizan su función como una reacción de defensa celular (Caiwen, 2007). En 1987, Johnson describió que en los crustáceos decápodos, la fagocitosis es la eliminación de materiales extraños del hemocele, donde se involucran varias clases de células ubicadas en las branquias y en la glándula digestiva. La fagocitosis constituye la primera línea de defensa inmune cuando un patógeno atraviesa la primera barrera de defensa que constituye la cutícula (Söderhall y Cerenius, 1992).

Debido a lo anterior, se hace necesario realizar estudios que involucren estos tejidos, las branquias y la glándula digestiva del camarón, y las enzimas relacionadas con la respuesta inmune, para poder incrementar el conocimiento acerca de su relación con el sistema de defensa del organismo frente a una infección de un virus o de una bacteria.

2.3. Enzimas Proteolíticas

Una enzima es una molécula proteica capaz de catalizar reacciones bioquímicas específicas (Madigan et al., 1999). Estas moléculas catalizan reacciones muy específicas por lo que se dividen en seis clases principales de acuerdo a la comisión de enzimas (EC, enzyme commission) (Lehninger, 1993).

Las enzimas proteolíticas, también llamadas proteasas, pertenecen al grupo 3 de las hidrolasas, ya que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas o péptidos con la descomposición de una molécula de agua (Barret, 2001). La mayoría de estas enzimas se sintetizan en forma de zimógeno de mayor peso molecular, que posteriormente es activado por proteólisis limitada debido a diversos factores y uno de ellos es el cambio de acidificación del pH (Barret, 1980).

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual las enzimas proteolíticas hidrolizan una proteína, se pueden clasificar en dos grandes grupos: peptidasas (exopeptidasas) y proteasas (endopeptidasas). Las primeras actúan sobre los enlaces peptídicos terminales de la cadena de una proteína, basándose en su sitio de acción sobre el amino o el carboxilo terminal son amino- o carboxipeptidasas, y generan tri-, dipéptidos y aminoácidos libres. Las proteasas son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína produciendo polipéptidos y se clasifican de acuerdo con la identidad del residuo catalítico. Así pueden ser: serino-, aspártico-, metalo- y cisteína- proteasas (Hartley, 1960; García-Carreño, 1991; Sajid y McKerrow, 2002).

Entre las enzimas proteolíticas, la tripsina y quimotripsina, que pertenecen a las serino proteasas, han sido las más estudiadas en invertebrados acuáticos. Se han publicado reportes sobre su participación en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, coagulación de la hemolinfa, activación de los antimicrobianos, síntesis de péptidos y producción de melanina (Soderhall y Cerenius, 1992; Vargas y Yépez, 1998; Krem-Di 2002), la respuesta inmune, la transducción de señales, la activación de hormonas, la inflamación y la digestión de las proteínas del alimento (O'Connell et al., 2006).

Además de la tripsina y la quimotripsina, se han reportado otras enzimas que participan en el proceso digestivo y están sintetizadas en la glándula digestiva de los crustáceos. Algunas son elastasa, colagenasa, aminopeptidasa y carboxipeptidasa, así como proteasas lisosomales como las catepsinas D, C, L y B (Boulay et al., 1996; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003; Rojo et al., 2010; Stephens et al., 2012; García-Carreño et al., 2014) que pertenecen a las aspártico y a las cisteína proteasas, siendo estas últimas las menos estudiadas en los invertebrados marinos.

2.3.1. Cisteína Proteasas

Las cisteína proteasas (EC 3.4.22.X) están presentes en casi todos los seres vivos jugando un papel central en varios procesos biológicos que incluyen reacciones fisiológicas y patológicas. Estas enzimas han sido aisladas de diferentes fuentes biológicas como bacterias, plantas y animales (Drenth et al., 1962; Bromme-Kaletka, 2002; Sajid y Mckerrow, 2002). La cisteína proteasa más estudiada es la papaína, cuya estructura y mecanismo de acción es conocido a detalle (Mitchel et al., 1970). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de proteínas con diferentes especificidades ya que se considera que desempeñan un papel importante en la hidrólisis intracelular y extracelular de proteínas (Katunuma y Kominami, 1989).

Las cisteína proteasas, enzimas relacionadas con la papaína, tienen actividad óptima a pH ácido, cerca de 4.0. Tienen dos dominios, nombrados L (left) y R (right) de acuerdo a su orientación. Las cisteína proteasas que han sido purificadas contienen un enlace disulfuro que conecta a ambos dominios, también llamados cadenas ligera y pesada. El sitio activo se extiende a lo largo de la interfase de dichos dominios, tiene forma de V y está conformado por un residuo de cisteína y otro de histidina (Turk et al., 2000).

Las cisteína proteasas se pueden clasificar en diferentes familias. Dependiendo de sus características moleculares y de la especificidad por el sitio de hidrólisis de la cadena polipeptídica, se reconocen cinco clanes: CA, CB, CC, CD y CE. Los clanes más estudiados son el clan CA, que incluyen la papaína y las catepsinas L, B, C, S, y H (Barret y Rawlings 2001; Cristofolletti et al., 2005), y CD incluyen legumainas, caspasas, separasas, gingipainas y clostripainas (León et al., 2004).

Las enzimas del clan CA como las catepsinas B y L, se diferencian de acuerdo a su estructura primaria, estando maduras estas dos enzimas son muy

similares, pero las regiones de los péptidos señal muestran poca similitud y diferente tamaño (Sajid y Mckerrow, 2002). Por ejemplo, en los mamíferos la catepsina L tienen un péptido señal de 100 residuos de aminoácidos y en la catepsina B es de 60 residuos (Turk et al., 2000).

Las cisteína proteasas como las catepsinas B, C, H, y L se encuentran dentro de los lisosomas que son organelos celulares, que de forma particular en las células del sistema inmune, participan como parte de la respuesta innata de los organismos (Murphy et al., 2008). Estos organelos contienen gránulos en donde se localizan este grupo de enzimas tipo papaínas (Kirschke et al., 1997).

2.3.2. La Catepsina B

La catepsina B (EC 3.4.22.1) es una cisteína proteasa expresada en todas las células, ha sido la más estudiada en vertebrados y tiene dos funciones, como endopeptidasa y como dipeptidil-carboxipeptidasa (McGrath, 1999). Esta enzima es miembro de la familia de las proteasas tipo papaína y de la superfamilia de peptidasas C1 (Dalton et al., 1996; Sajid y McKerrow, 2002).

La catepsina B se ha caracterizado por hidrolizar proteínas y péptidos de agentes patógenos en el sistema lisosomal de mamíferos sometidos a procesos patológicos, o en estadios fisiológicos (incluyendo inflamación y apoptosis), sugiriendo su participación en la respuesta inmune innata (Frosch et al., 1999).

Algunos estudios sobre los parásitos *Taenia solium* y *T. saginata* del cerdo (Zimic et al., 2007) y el nemátodo *Necator americanus* del humano (Duffy et al., 2006) han establecido la importancia de la catepsina B en la supervivencia de estos organismos. Se confirmó que la enzima interviene en la función digestiva de los parásitos, debido a que tiene capacidad de degradar los tejidos del

hospedero y para digerir sangre (hemoglobina) (Cunningham et al., 2010; Franta et al., 2010).

El primer reporte de la catepsina B en crustáceos fue la estructura primaria de la enzima en el camarón nórdico *Pandalus borealis* reportada por Aoki et al., (2003). De este estudio se confirmó que la enzima tiene un péptido señal en el extremo amino terminal de 15 aminoácidos seguido de un pro-péptido de 60 y una proteína activa de alrededor de 253 aminoácidos; la proteína activa fue descrita con función digestiva en la hidrólisis de la proteína del alimento.

En otras especies de decápodos como el camarón blanco *L. vannamei*, se conoce poco acerca de la participación de la catepsina B como enzima digestiva (Stephens et al., 2012). Esta enzima hidroliza la proteína del alimento, ya que se ha reportado que el ARN mensajero se sintetiza en la glándula digestiva de varias especies como el camarón del norte *Pandalus borealis* (Aoki et al., 2003), en el camarón chino *Fenneropenaeus chinensis* (Wang et al., 2012) y en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Lo anterior sugiere que en los crustáceos, este tipo de enzimas pueden participar en la digestión intracelular y que después pudieran ser secretadas para funcionar como proteasas extracelulares (Stephens et al., 2012).

En 2012, Stephens et al., también reportaron la expresión del ARN mensajero de la catepsina B en el camarón *Litopenaeus vannamei* sano en diferentes órganos (Figura 3). Estos autores observaron que donde se encontró mayor cantidad de transcritos son la glándula digestiva, los hemocitos y las branquias, estando estos dos últimos, relacionados con la respuesta inmune del camarón y con la vía de entrada de los patógenos al organismo (Raa, 1996). Sin embargo, en dicho estudio, sólo los órganos relacionados con la digestión mostraron actividad de la enzima. La glándula digestiva mostró una actividad específica de 666.95 ± 96.53 U/ μ g de proteína y el intestino de 63.29 ± 13.7 U/ μ g, mientras que la actividad en las branquias y hemocitos fue >18 U/ μ g.

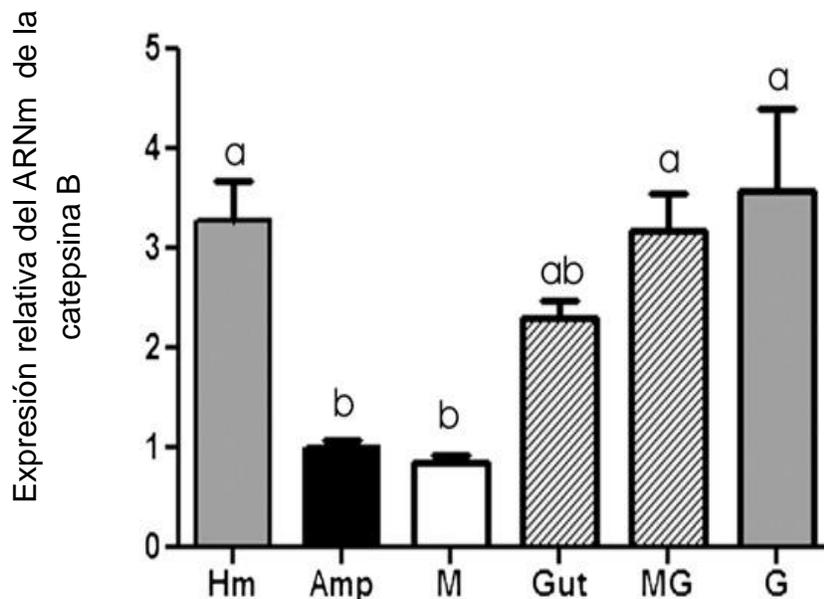


Figura 3. Expresión de ARN mensajero de catepsina B, en seis tejidos diferentes del camarón. (Hm) hemocitos, (M) músculo, (Amp) ampolla terminal, (Gut) intestino, (MG) glándula digestiva, y (G) branquias (Stephens et al., 2012).

Posteriormente, Reng et al., (2013) reportaron que en el abulón *Haliotis discus hannai* y la catepsina B se sobreexpresa en presencia de *Vibrio anguillarum* y tras la exposición a lipopolisacáridos bacterianos (LPS, *Escherichia coli*). Resultados similares se han reportado en el pez *Paralichthys olivaceus*, donde la catepsina B se sobreexpresó por exposición al ácido poliinosínico-policitidílico, que actúa como inmunoestimulante, sugiriendo un posible papel de la enzima en la respuesta inmune antibacteriana y antiviral (Zhang et al., 2009).

2.3.3. La Catepsina L

De acuerdo a Nishimura y Kato (1992), la catepsina L (EC 3.4.22.15) se sintetiza como un precursor inactivo, translocado al retículo endoplásmico, y luego se dirige a los lisosomas, por lo que se ha considerado como una proteasa lisosomal que actúa en el metabolismo intracelular de proteínas no

deseadas (Hu y Leung, 2007). Al igual que otras enzimas lisosomales, como la catepsina B, la actividad de la catepsina L tiene un pH óptimo en medios ligeramente ácidos y es inestable en condiciones ligeramente alcalinas (Barrett y Kirschke, 1981).

La localización y distribución heterogénea de la catepsina L en las células dentro del mismo tejido sugiere que su expresión se regula de acuerdo a la especialización celular (Uchiyama et al., 1994). Además, estudios como el de Olbricht et al., en 1986 y Delaria et al., en 1994 revelan resultados que confirman que es una enzima clave en procesos patológicos y en carcinomas en los vertebrados.

Son escasos los reportes sobre la catepsina L en invertebrados aunque aparentemente esta enzima tiene una función meramente digestiva de alimentos. En muchos parásitos hematófagos la enzima se secreta fuera de las células para la degradación de hemoglobina para su propia nutrición (Sajid y McKerrow, 2002). Así, un estudio le ha atribuido la misma función a la catepsina L del jugo gastrointestinal de la langosta americana *Homarus americanus* donde se sugiere que la enzima puede ser secretada de las células de la glándula digestiva y digerir los alimentos extracelularmente (Laycock et al., 1989).

La estructura primaria de la catepsina L del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* fue reportada por primera vez por Le Boulay et al., (1996). El análisis de su secuencia demostró que la enzima cuenta con un péptido señal de 15 aminoácidos (aa) seguidos por un pro-péptido de 93 aa y una proteína activa putativa de 218 residuos, dando así una cadena polipeptídica de 326 aa.

Un estudio reciente sugiere que la catepsina L del camarón *Metapenaeus ensis* tiene como función principal la digestión de la proteína de los alimentos; sin embargo, el ARNm de la enzima también se encontró en el núcleo de ovocitos, lo que sugiere que esta enzima puede tener también un papel fisiológico específico en dichas células (Hu y Leung, 2007). De acuerdo a estos autores, este hecho sugiere que la enzima no solamente tiene un papel digestivo, debido

a la detección ubicua de la catepsina L en varios tipos celulares, pero remarcando que el nivel de expresión en la glándula digestiva es significativamente mayor en comparación con otros órganos y tejidos del organismo (Hu y Leung, 2004).

Según Le Boulay et al. (1996), en el camarón blanco *L. vannamei*, la catepsina L de la glándula digestiva puede participar en el ciclo de intermuda del organismo debido al incremento del ARNm en periodos de muda, aparte de ser una enzima digestiva, debido a que se mostraron aumentos en el ARNm y en la actividad de esta en periodos de post-muda.

En 2007, Zhao et al., reportaron que en la especie *L. vannamei*, los organismos resistentes a la infección con el WSSV mostraron un incremento en la expresión del gen de catepsina L en la glándula digestiva, lo cual no sucedió en organismos controles. Así, se sugiere que la presencia del patógeno tiene como efecto en algunos organismos, la activación del sistema inmune del camarón, el cual incluye a la enzima catepsina L.

A pesar de que el ARNm de la catepsina L se ha detectado en varios tejidos del camarón y otras especies de crustáceos (Li et al., 2010), a la fecha no existen reportes sobre la evaluación de su expresión en branquias de camarón, por lo que se desconoce si la enzima desempeña algún papel en el sistema de defensa de esta especie frente a la infección viral.

2.4. Participación de las Proteasas en el Sistema Inmune del Camarón

En los crustáceos, las primeras enzimas en describirse fueron del tipo serino proteasas y se consideraron como enzimas digestivas (Gates y Travis, 1969). Fue hasta el año 2000, cuando Jiang y Kanost describieron un grupo de serino proteasas como la quimotripsina y tripsina en varias especies de artrópodos,

que juegan un papel importante en la defensa. Más recientemente, Piti et al., (2010), demostraron que este grupo de serino proteasas se sobreexpresan en hemocitos del camarón tigre *Penaeus monodon*, a las 3 h posteriores de haberlo infectado experimentalmente con la bacteria *V. Harveyi*. La posible participación de estas enzimas en el sistema inmune se reafirmó ya que al eliminar los genes de las enzimas con dominios “clip”, se observó un aumento en el número de bacterias viables en la hemolinfa.

Recientemente se ha reportado una lista de moléculas que parecen estar relacionadas con el sistema inmune del camarón, a través de estudios de proteómica y microarreglos. Entre estas moléculas se incluyen péptidos antimicrobianos, serino- y cisteína- proteasas como las catepsinas A, C, D, L y B, fenoloxidasas, enzimas oxidativas, proteínas de coagulación y otros factores humorales (Anchalee et al., 2013; Tassanakajon et al., 2013).

En 2010 Ren et al., reportaron que la expresión génica de dos cisteína proteasas, catepsina L y legumain, de la glándula digestiva del camarón *F. chinensis*, se incrementó como respuesta a infecciones bacteriana y viral. Lo anterior, sugiere que ambas enzimas pueden desempeñar un papel en la inmunidad innata del camarón. De acuerdo con lo anterior, estudios sobre el transcriptoma del camarón blanco han reportado a las catepsinas como proteínas cuyos transcritos están identificados “con funciones inmunes probables” mediante el análisis de librerías genómicas sustractivas de organismos infectados con WSSV (Pan et al., 2004; Robalino et al., 2008).

Ambas enzimas, catepsina B y L, representan las únicas cisteína- proteasas reportadas hasta la fecha en la glándula digestiva del camarón, las cuales presentan semejanzas y diferencias entre sí como muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Diferencias y semejanzas entre catepsina B y catepsina L.

Catepsina B	Catepsina L	Referencias
Semejanzas		
Enzimas lisosomales tipo papaína		Kirschke et al., 1995; Turk et al., 2000
Endopeptidasas		McGrath, 1999
Enzimas digestivas en decápodos		Aoki et al., 2003; Le Boulay et al., 1996
Expresadas en glándula digestiva y branquias en decápodos		Stephens et al., 2012; Ren et al., 2010
Hidrolizan el sustrato fluorogénico: Z-Arg-Arg-AMC		http://enzyme.expasy.org/EC/3.4.22.15
Sobre expresadas en hemocitos de camarón por infección de virus y bacterias.		Robalino et al., 2008; Tassanakajon et al., 2013
Diferencias		
Endopeptidasa y dipeptidil	Solo endopeptidasa	McGrath, 1999
26.9 kDa	24.18 kDa	Stephens et al., 2012; Le Boulay et al., 1996
pH óptimo 6.0	pH óptimo 7.0 – 8.0	Aoki et al., 2003; Arockiaraj et al., 2013
Afín a enlaces Arg-Arg	Afín a enlaces Phe-Arg	Barrett, 1980; Barrett- Kirschke, 1981
Menor actividad en sustratos proteicos	Mayor actividad en sustratos proteicos	http://enzyme.expasy.org/EC/3.4.22.15
Mayor hidrólisis: Z-ARG-ARG	Menor hidrólisis: Z-ARG-ARG	http://enzyme.expasy.org/EC/3.4.22.15

A partir de los antecedentes antes mencionados en este trabajo se desprenden varias preguntas respecto a estas enzimas, siendo las principales: ¿La catepsina L se expresa en las branquias del camarón blanco, como en otras especies de crustáceos? ¿Existe un cambio en la expresión génica y en la actividad de las catepsinas B y L del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado con el Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)? ¿En qué tejido desempeñan las catepsinas un papel más importante? ¿Existen diferentes respuestas en los tejidos de acuerdo a su función? ¿Es posible identificar a las catepsinas B y L en el extracto proteico de la glándula digestiva y de las branquias del camarón blanco, a pesar de sus múltiples semejanzas?

Debido a que el camarón no cuenta con un sistema inmune adaptativo, su sistema de defensa depende de un mecanismo de respuesta innato para resistir la invasión de patógenos (Gross et al., 2001). La comprensión de la participación de las catepsinas en la respuesta a la infección podrá aportar información útil en un futuro para el control de las enfermedades infecciosas en los camarones.

III. JUSTIFICACIÓN

Con base en lo anterior, este trabajo propone al camarón blanco *Litopenaeus vannamei* como un modelo de estudio para determinar la posible participación de las cisteína proteasas catepsina B y L como parte de la respuesta antiviral del organismo.

Debido a la importancia en la generación de conocimiento acerca de la respuesta inmune del camarón, cuya sobrevivencia en condiciones de cultivo se ha visto afectada severamente por la presencia de diversos patógenos, como el Virus del síndrome de la mancha blanca, alrededor del mundo, se hace imperativo el avance en el estudio de las catepsinas y su función biológica en el camarón.

IV. HIPÓTESIS

Si el Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) promueve cambios significativos en la concentración del ARNm y en la actividad de las catepsinas B y L del camarón blanco, entonces estas enzimas podrán considerarse parte de la respuesta inmune del camarón tanto en las branquias, como en la glándula digestiva.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar los cambios en la abundancia relativa de transcritos que codifican las catepsinas B y L, así como la actividad enzimática de cisteína proteasas de glándula digestiva y branquias del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado con el Virus del síndrome de la mancha blanca.

5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar cambios en la abundancia relativa de transcritos que codifican las catepsinas B y L en glándula digestiva y branquias de camarones sanos e infectados con WSSV.
2. Determinar el efecto de la infección con el Virus del síndrome de la mancha blanca en la actividad de cisteína proteasas y de la catepsina B en camarones sanos e infectados.
3. Identificar las cisteína proteasas por electroforesis y la actividad de la misma a través de un zimograma.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Bioensayo de Infección con WSSV

El bioensayo para este estudio se llevó a cabo en las instalaciones del CIBNOR, campus Hermosillo en el laboratorio de Sanidad Acuícola con el apoyo del Dr. Arturo Sánchez Paz, como se describe a continuación.

6.2. Preparación del Inóculo WSSV y Ensayo de Infección

El inóculo a utilizar fue preparado a partir de tejido infectado de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei* de acuerdo al método descrito por Escobedo-Bonilla et al., (2005). El tejido utilizado se obtuvo de un organismo infectado con WSSV y diagnosticado como positivo usando el IQ REAL™ WSSV Quantitative System (GeneReach Biotechnology, Corp).

Para la preparación del inóculo se utilizaron 6 g de músculo abdominal de camarón y se homogenizaron en buffer PBS estéril, pH 7,4 (1:10 w/v) y fue clarificado por centrifugación a 3,000 x g durante 20 min a 4° C. El sobrenadante fue removido y centrifugado por segunda vez a 15,000 x g durante 20 min. Posteriormente, el sobrenadante se recuperó y se filtró usando una membrana de 0.45 µm (Millipore®). El filtrado obtenido se utilizó como inóculo infectivo.

Los organismos utilizados para el bioensayo de infección fueron juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* que se obtuvieron en la costa de Hermosillo, Sonora y fueron transportados a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., campus Hermosillo.

Un total de 108 camarones con un peso promedio de 1.25 ± 0.14 g fueron distribuidos al azar en 12 tanques de plástico con una capacidad de 30 L. El agua marina se mantuvo en condiciones controladas en una salinidad de 34 ppt, a 28 ± 1 °C, y en aireación constante. Los parámetros del agua se midieron diariamente. Los organismos se aclimataron durante 8 días a estas condiciones de laboratorio y fueron alimentados con un alimento comercial con un contenido de 35% de proteína (Camaronina, México) con una ración diaria de 3% de la biomasa total por tanque.

Al final del periodo de aclimatación, un total de 54 organismos fueron inyectados intramuscularmente en el tercer segmento dorsal con 100 μ L del inóculo de WSSV (conteniendo 1.4×10^6 copias/ μ L). Por su parte, el grupo control (54 organismos) fue inyectado con un homogenado de tejido previamente confirmado como libre de virus por PCR, dicho homogenado fue preparado usando la metodología mencionada previamente.

Después de la inyección, los dos grupos fueron muestreados a las 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 42 horas post-inyección (hpi). La glándula digestiva y las branquias de cada organismo se disectaron y congelaron en nitrógeno líquido, y posteriormente se almacenaron a -80° C. En cada muestreo se colectó hemolinfa del seno ventral de cada organismo con una jeringa de 1 mL que contenía 200 μ L de solución anticoagulante fría (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA- Na_2 10Mm, Hepes 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/Kg) (Vargas-Albores et al., 1993). Posteriormente, los hemocitos fueron recuperados por centrifugación a $600 \times g$ durante 10 min a 4° C y almacenados hasta su uso para evaluar la carga viral.

6.3. Confirmación de la Infección y Evaluación de la Carga Viral de WSSV

El ADN de cada muestra se aisló a partir de los hemocitos de los camarones inyectados para la detección del Virus del síndrome de la mancha blanca usando el kit GeneClean spin (MP biomedical) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La detección del WSSV fue siguiendo el método reportado por Sánchez-Paz et al., (2012). Brevemente, el ADN extraído de las muestras de hemocitos se utilizó para cuantificar la carga viral midiendo el número de copias de ADN viral usando el IQ REALTM WSSV Quantitative System (GeneReach Biotechnology, Corp) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

Previamente se construyó una curva estándar para detectar el número de copias del gen de la proteína VP28 del WSSV en el ADN aislado de los hemocitos de los camarones. Se utilizaron 6 diluciones 1:10 (v/v) de un purificado de ADN positivo del virus, con una concentración de 6 ng/μL y una relación de 260/280 de 2.38 y teniendo 3.94×10^{10} copias del virus. A partir de la ecuación lineal que se obtuvo se calculó la eficiencia de la reacción usando la fórmula:

$$E=10^{-1/\text{pendiente}} - 1 \quad (1)$$

Posteriormente se calculó el número de copias de cada muestra incluyéndose controles positivos y negativos libres de templado. Para esto el ADN extraído de los hemocitos se utilizó como templado para amplificar el fragmento de la proteína VP28 de la cápside del WSSV, usando cebadores específicos y siguiendo el protocolo siguiente: en cada reacción se usaron 50 ng de ADN y las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95°C, 30 s a 95°C, 30 s a 61°C, 30 s a 72°C (30 ciclos) y una extensión de 5 min a 72°C. Las reacciones de PCR fueron por triplicado con un volumen final de 14 μL.

6.4. Cuantificación del ARNm de Catepsina B y L del Camarón *Litopenaeus vannamei*

La cantidad relativa de transcritos (ARNm) de la catepsina B y L de la glándula digestiva y las branquias fue evaluada usando la técnica qRT-PCR. A partir de los tejidos muestreados durante el bioensayo de infección, se aisló el ARN total utilizando el reactivo TRIzol® reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante basada en la metodología establecida por Chomczynski y Sacchi (1987). La concentración del ARN total aislado de las branquias y la glándula digestiva se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop y cada muestra fue tratada para la eliminación de ADN contaminante utilizando DNAsa I (Sigma; 1 U/ 1 µg de ARN, a 25°C por 15 min) según las instrucciones del fabricante.

Para la confirmación de ausencia de ADN en las muestras tratadas, se realizó una PCR, utilizando Taq Master Mix Kit (Qiagen®, USA), cada reacción incluyó: 12.5 µL de la mezcla 2X, 2.5 µL de colorante, 1 µL de cada uno de los cebadores específicos de tripsina (Sánchez-Paz et al., 2003) 20 µM, 150 ng de ARN total tratado y agua hasta un volumen final de 25 µL por reacción. Las condiciones de amplificación fueron: 95° C por 3 min (1 ciclo); 95°C por 45 s, 50° C por 1 min y 72° C por 2 min (35 ciclos) y una extensión final a 72° C por 10 min. La amplificación se realizó en un termociclador DNA Engine® Peltier Cyler (Bio-Rad, USA).

Los cambios en la concentración del ARNm de las catepsinas B y L cuya secuencia nucleotídica ya se encuentra depositada en bases de datos (GenBank GU571199; GenBank CAA68066) en glándula digestiva y branquias de camarones infectados por WSSV fueron cuantificados por PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems, USA). Se utilizó el gen de la proteína ribosomal L8 como gen de referencia (GenBank DQ316258).

Se utilizaron sondas TaqMan® específicas (Tabla 1) para cada uno de los genes, diseñadas y provenientes por el distribuidor Applied Biosystems. La síntesis del ADN complementario (ADNc) y la amplificación por PCR del mismo se llevó a cabo utilizando una mezcla OneStep Brilliant II QRT-PCR Master Mix Kit (Agilent, USA). Cada una de las muestras de ARN total del ensayo de infección fue amplificada por triplicado y cada una de las reacciones de amplificación incluyó: 10 µL de la mezcla 2x OneStep, 1 µL de sonda TaqMan (20 x) (Tabla 2), 0.8 µL de enzima RT/RNase block enzyme mixture, 150 ng de ARN libre de genómico y agua libre de pirógenos hasta alcanzar un volumen final de 20 µL.

En cada corrida final para cada gen se incluyeron controles sin templado para confirmar la ausencia de ADN contaminante. Las condiciones de amplificación fueron: 50° C por 30 min, 95° C por 15 min, seguido por 45 ciclos a 95° C por 15 s a y 60°C por 1 min después de cada ciclo de amplificación.

Tabla 2. Características de las sondas TaqMan® utilizadas en la evaluación de la expresión génica de la catepsina B y L.

Gen	Oligonucleótido Sentido(5'-3')	Oligonucleótido Antisentido (3'-5'')	Secuencia de la Sonda (5'-3')
Cat B	GCGAAGAGAATGGTACTCCCTATTG	GTCACCCAGTCGGTGTTTC	CTGTGTGCCAATTCAT
Cat L	TCTACCATGACGGCGTGTACTA	CCGTGGTCCAGCATCGT	ACGAGCAGCCCTCCTC
L8	ATTTGCAACCTTGAGGAGAAGACT	TGGGCAATGACCTGAGCATAAT	ATCCACGGGCAATACG

*Las sondas Taqman® fueron marcadas con FAM, como fluoróforo reportero y NFQ como opacante (IDT technologies).

Para cada muestra amplificada se determinó el valor de C_q , que se define como el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento significativo

de la fluorescencia en una determinada muestra, con respecto a la señal de base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas templado (Bustin, 2000).

Los datos fueron analizados usando el método del $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Livak y Schmittgen, 2001) usando el valor C_q y la eficiencia de amplificación del PCR. Previo a la corrida final, fue necesario evaluar la eficiencia de las reacciones de PCR de cada gen y el rango dinámico a través de la construcción de una curva estándar que tuvo como templado una dilución serial 1:5 del ARN total. Las eficiencias de la PCR fueron calculadas usando la fórmula:

$$E=10^{[-1/pendiente]} - 1 \quad (2)$$

para calcular el cambio en la concentración del ARNm de catepsina B y L en organismos infectados por WSSV, se analizaron los datos usando la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = 2^{-(Cq_{Cat} - Cq_{L8}) \text{ infectados} - (Cq_{Cat} - Cq_{L8}) \text{ controles}} \quad (3)$$

en donde C_{qCat} es el promedio del C_q de las muestras amplificadas con las sonda de catepsina B o catepsina L. C_{qL8} , es el promedio del C_q del gen de referencia, ambos evaluados al tiempo control y en los diferentes tiempos de infección.

6.5. Ensayo de Actividad de Cisteína Proteasas

A partir de las muestras del bioensayo de infección con WSSV se evaluó la actividad proteolítica de las catepsinas en la glándula digestiva y branquias del camarón. Para obtener el extracto enzimático, las glándulas digestivas fueron homogenizadas individualmente en 1 mL de agua destilada y los homogenados se centrifugaron a 10,000 por 5 min $\times g$ y 4° C, el sobrenadante, o extracto

enzimático, se almacenó a -20°C hasta su uso. Los extractos enzimáticos de las muestras de branquias se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo, sin embargo, debido a la escasa cantidad de tejido disponible de cada organismo individual, fue necesario hacer un pool de cada tiempo post-inoculación para lograr la cantidad suficiente de proteína para ser evaluada.

Se determinó el contenido de proteína total soluble de cada extracto enzimático usando el método del BCA (ácido bicinconínico), siguiendo las instrucciones del kit BCA protein assay (Thermoscientific). Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar para la construcción de una curva estándar.

La actividad enzimática de las cisteína proteasas (EC 3.4.22.1) se determinó utilizando un sustrato fluorogénico específico para catepsina B (Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride, SIGMA®). Se preparó una solución stock 100 mM disuelto en DMSO según lo reportado por Stephens et al., (2012). Se construyó una curva de calibración a pH 6 utilizando cantidades conocidas del fluorocromo AMC (7-amino-4-methoxycoumarin) y graficando las unidades de fluorescencia vs los picomoles de AMC. La actividad específica de las cisteína proteasa se expresa en μmoles de MCA liberados/min/ml de proteína. Una unidad de actividad se define como la liberación de 1 μmol de MCA por min por mL proteína.

En una descripción breve, el ensayo se realizó en microplacas oscuras de 96 pozos a 25°C , cada pozo incluyó 10 μL de extracto enzimático (10 μg de proteína), 70 μL de solución amortiguadora que contenía acetato de sodio 100 mM, EDTA 1.5 mM y DTT mM a pH 6. La reacción se inició agregando 20 μL del sustrato fluorogénico a una concentración final de 10 μM . La tasa de hidrólisis fue registrada en un fluorómetro Biotek Synergy HT-I siguiendo el incremento de la fluorescencia en unidades arbitrarias (RFUs). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 350 y 460 nm, respectivamente.

En un ensayo preliminar se evaluó la fluorescencia del AMC en presencia de los extractos a diferentes pH en un rango de 3 a 8, para determinar el pH óptimo de

la enzima. Posteriormente, se decidió evaluar todos los extractos enzimáticos a pH 6, debido a que fue el pH en el que se detectó mayor fluorescencia de los extractos de camarón evaluados, y se construyó una curva de calibración como se describió previamente.

6.6. Detección de la Actividad de la Catepsina B y L en Gel

Con el fin de observar la composición del patrón proteico de la glándula digestiva y branquias del camarón blanco infectado con el virus e identificar la catepsina B y L, las proteínas de cada extracto enzimático fueron separadas, inmovilizadas y visualizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), usando geles al 12 % para glándula digestiva y 15% para branquias acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970).

En cada gel se cargaron 10 µg de proteína con buffer muestra 1:1 (v/v) que contiene azul de bromofenol al 0.5%, trizma base 125 mM, glicerol al 20% y SDS al 10 %, se corrieron en un buffer cámara con una composición de trizma base 25 mM, glicina 192 mM y 0.1% SDS al 0.1%, a un voltaje de 15 mA. Después de la electroforesis cada gel se tiñó con azul de Coomassie por toda la noche y luego se transfirió a una solución desteñidora que contenía 50% de agua destilada, 40% de metanol grado reactivo y 10% de ácido acético por 2 h. Posteriormente, los geles se visualizaron en el fotodocumentador BIO-RAD® Gel Doc™ EZ Imager.

Para determinar, la actividad proteolítica del extracto de la glándula digestiva y de las branquias, se corrió un gel como se describió anteriormente y se sumergió en el sustrato.

La actividad de las proteasas fue monitoreada a pH 6.0 usando como sustrato caseína al 2% diluida en Tris-HCl 50 mM como se describe a continuación: se

pesaron 0.788 g de Tris-HCl y se llevaron a un volumen de 100 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6.0, se procedió a calentar la solución sin superar los 60° C y después se colocaron 2 g de caseína poniéndose en agitación inmediata, se procedió ajustar el pH a 6.0 con NaOH 5.0 M. El gel fue incubado por 30 min en el sustrato a 4° C y después por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó en agua para eliminar los residuos de sustrato y finalmente el gel fue sumergido en solución de tinte de azul de Coomassie por toda la noche y desteñido por dos horas en la solución desteñidora.

Por otra parte, para la evaluar la actividad específica de catepsina Ben gel se realizó la electroforesis descrita anteriormente y una vez finalizada la separación de las proteínas, el gel se lavó 30 min en Tritón X-100 al 2.5%, después se sumergió por 5 min en buffer de reacción (acetato de sodio 100 mM, EDTA 2mM, DTT 2 mM y Tritón X-100 al 0.05%, pH 6.0) y 10 µM de sustrato específico para catepsina B Z-Arg-Arg-AMC. El gel fue revelado bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador BIO-RAD® Gel Doc™ EZ Imager.

6.7. Análisis Estadístico

Para evaluar las diferencias entre los tratamientos se evaluó la distribución normal de los datos y la homogeneidad de varianzas con las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente. Al cumplirse ambos requisitos, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas. Para determinar las diferencias entre los resultados de expresión génica se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y para determinar las diferencias entre medias se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y Duncan. Para evaluar el efecto de infección y del tiempo fue necesario realizar un ANOVA de dos vías en donde el factor variable 1 fue el tiempo post-infección y el factor variable 2

fue el tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software NCSS. La significancia estadística fue de 95% ($p \leq 0.05$; Zar, 1984).

VII. RESULTADOS y DISCUSION

7.1. Cuantificación Viral

La infección del camarón con el inóculo de WSSV (con una carga viral de 1.4×10^6 copias) fue confirmada por qPCR tiempo real como se muestra en la figura 4. Por otra parte, se diagnosticó que los camarones a los que se les inyectó solución salina y (controles) estaban libres de WSSV.

El ADN que codifica la proteína VP28 del WSSV, la más abundante de la cápside del virus (Leu et al., 2009) y que desempeña un papel crítico durante la fase temprana de la infección como proteína de unión (Van Hulst et al., 2000), se detectó en hemocitos de los camarones infectados.

Durante el curso de la infección se observó un incremento exponencial en el número de copias/ng de ADN a partir de las 6 hpi, pasando de 17285.44 a 97248.55 a las 12 hpi (Figura 4). Después, hubo un decremento importante en el número de copias. Este hecho puede ser resultado de una reducción en el número de hemocitos granulares y semi-granulares al transcurrir el proceso de infección del virus. De acuerdo al estudio de Henning et al., (1998) el virus WSSV es responsable de una disminución significativa en el número de células del plasma a consecuencia del proceso apoptótico inducido por la infección.

Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con lo reportado por Jeswin et al., (2013) donde se observa que el número de hemocitos del camarón tigre *Penaeus monodon* se reduce durante el curso de la replicación

de WSSV a lo largo del tiempo. Como en el estudio actual, a las 12 hpi, se encontró el máximo número de copias del virus, mientras que a las 24 hpi hubo un decremento en el número de copias de WSSV.

Otros autores como Montes de Oca (2001) también han reportado el inicio de la apoptosis en hemocitos de camarón infectado con WSSV a las 24 hpi. Este resultado concuerda con Maldonado (2003) quien registró un decremento en el número de hemocitos semi-granulares después de las 24 hpi de los camarones con WSSV como se puede observar en este estudio.

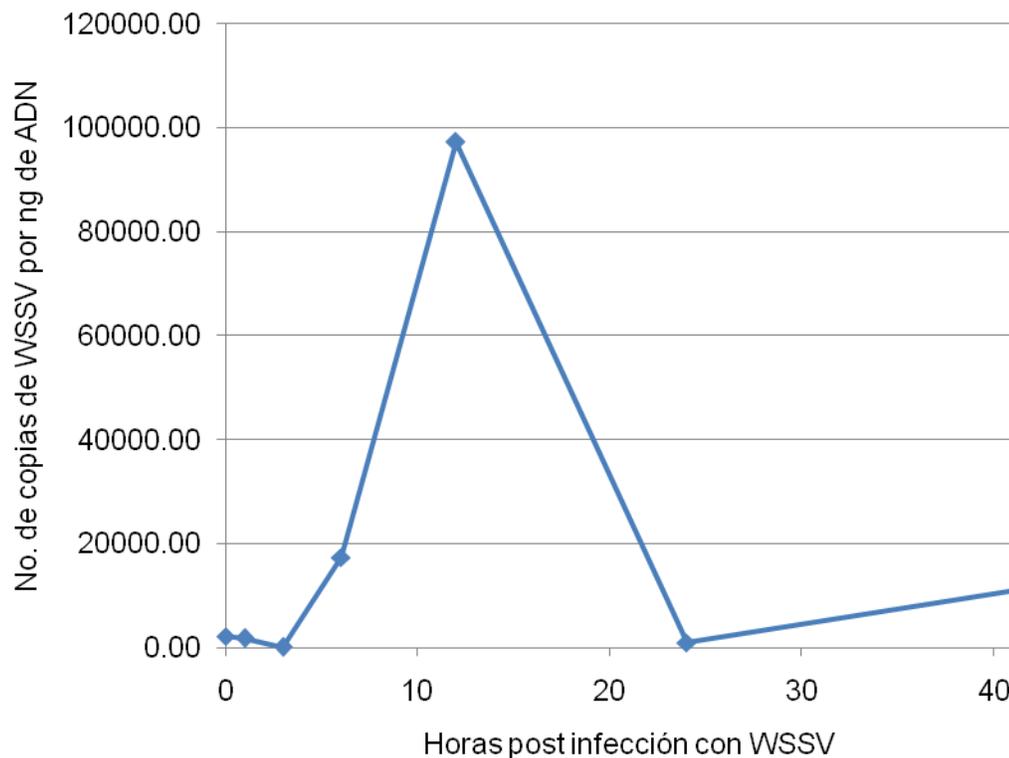


Figura 4. Número de copias por ng de ADN de WSSV en los hemocitos de camarones inoculados con el virus en tiempos post-infección.

7.2. Efecto de la Infección del WSSV en la Expresión Génica de la Catepsina B del Camarón *Litopenaeus vannamei*

Una vez confirmada la infección con el WSSV se realizó la cuantificación de la abundancia relativa de los transcritos que codifican tanto la catepsina B como la proteína ribosomal L8 en muestras de glándula digestiva y branquias infectadas con WSSV y sus respectivos controles. Para determinar las eficiencias de amplificación de las reacciones de PCR, se evaluaron los rangos dinámicos para cada par de oligonucleótidos (Figura 5) y se obtuvo el ajuste a un modelo lineal por regresión, incluyendo el valor de la R^2 y la pendiente. Basados en estos resultados se calculó la eficiencia de la amplificación por PCR de cada producto específico, siendo para la catepsina B del 98% y para L8 de 99% y para, cumpliéndose así el supuesto establecido por Livak y Schmittgen (2001) para el análisis de los resultados por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (que evalúa los cambios relativos en la expresión de genes de muestras bajo alguna condición o tratamiento).

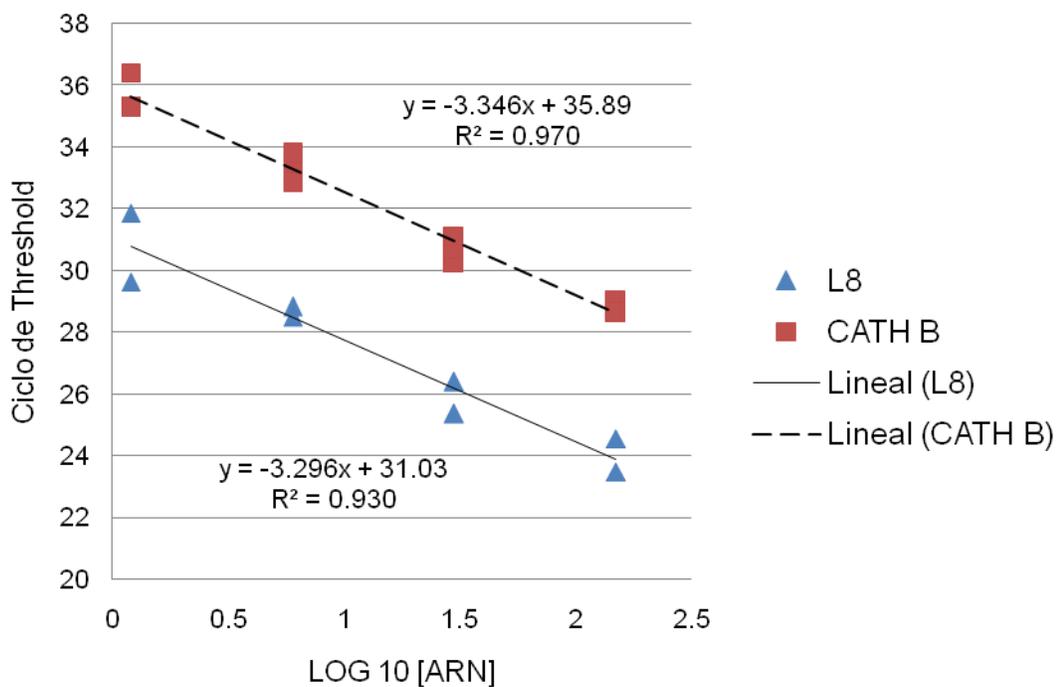


Figura 5. Comparación de los rangos dinámicos de catepsina B y L8.

Los resultados obtenidos mostraron que en la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei* se detectaron cambios significativos en la expresión relativa del gen de la catepsina B por efecto de la infección con el WSSV ($p < 0.05$; Figura 6). En la fase inicial de la infección (0, 1 y 3 hpi) se detectó una disminución en la abundancia de transcritos del gen de la catepsina B; sin embargo, posteriormente se observó un incremento gradual en la cantidad de transcritos, alcanzando un incremento máximo a las 24 hpi de 10 veces en organismos infectados de respecto al grupo control. Estos cambios en la cantidad del ARNm sugieren una respuesta a nivel transcripcional, que se manifiesta 12 h después del máximo valor en el número de copias virales de WSSV.

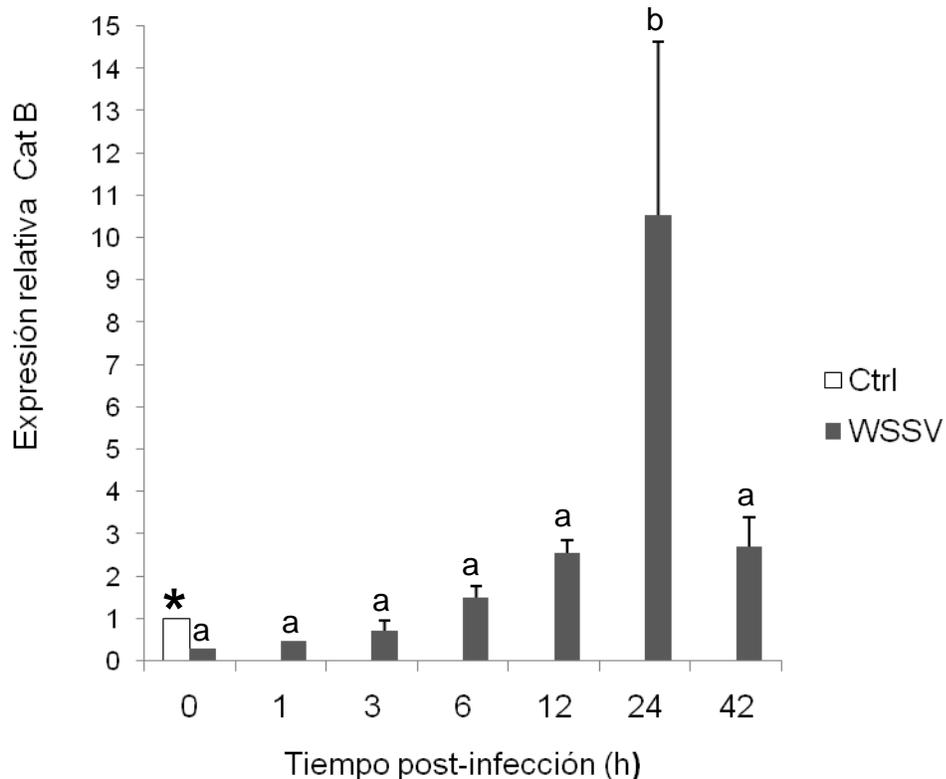


Figura 6. Expresión relativa del gen de la catepsina B en la glándula digestiva del camarón en respuesta a la infección del WSSV. Los valores indican la media \pm error estándar. * indica diferencias entre control e infectados. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

En estudios previos se ha señalado el efecto de la infección del WSSV en la expresión de enzimas proteolíticas lisosomales. Li et al., (2013) reportaron la sobreexpresión de la catepsina B en glándula digestiva del camarón blanco chino, *Fenneropenaeus chinensis*, después de 6 hpi, mientras que en esta misma especie Wang et al., (2012), reportaron que la catepsina C, que también es una cisteína proteasa lisosomal, responde a la presencia del virus incrementando la expresión relativa del gen en la glándula digestiva a las 24 hpi, de acuerdo a lo que se detectó en este estudio.

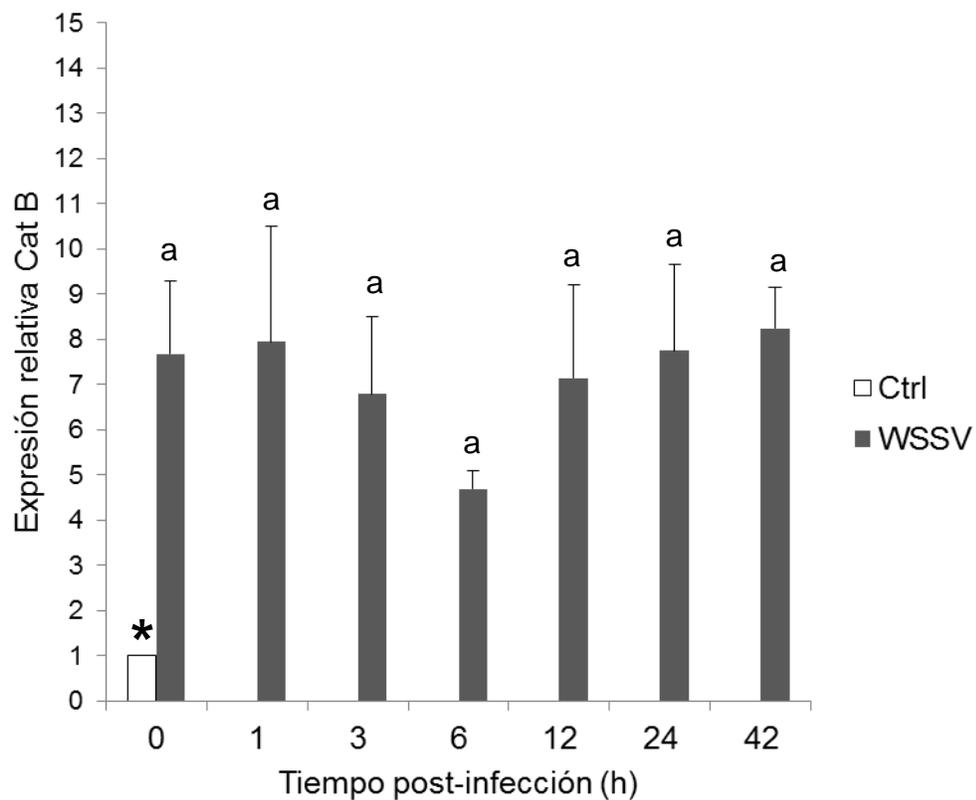


Figura 7. Expresión relativa del gen de la catepsina B en las branquias del camarón en respuesta a la infección del WSSV. Los valores indican la media \pm error estándar. * Indica diferencias entre control e infectados. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el efecto del WSSV en las branquias de *Litopenaeus vannamei*, no mostraron cambios significativos en los niveles de ARNm del gen de la catepsina B durante el transcurso de la infección ($p > 0.05$; Figura 7). Sin embargo, si se observó un incremento significativo respecto a los camarones control no infectados, detectándose una sobreexpresión del gen hasta 7 veces mayor ($p < 0.05$), este resultado sugiere que existe un efecto inmediato de la presencia del virus WSSV en la expresión relativa del gen de la catepsina B en las branquias del camarón, diferente a lo observado en el hepatopáncreas.

De acuerdo a los resultados de Li et al., (2013) durante la infección con WSSV el camarón *Fenneropenaeus chinensis* responde disminuyendo la expresión relativa del gen de la catepsina B en las branquias a las 6 hpi, manteniéndose relativamente estable desde las 6 hasta las 24 hpi. Sin embargo, a las 48 hpi hay un incremento en la expresión del gen de la catepsina, siguiendo el mismo patrón de comportamiento en los niveles del ARNm que se observó en este estudio.

En este estudio se observó que la abundancia relativa de transcritos de la catepsina B en branquias es mayor que en glándula digestiva, lo cual concuerda con los resultados reportados por Stephens et al., (2012). Sin embargo, los patrones de expresión del gen de la catepsina B en ambos tejidos mostraron diferentes respuestas a lo largo de la infección con WSSV. Así se sugiere que la presencia del virus provoca un efecto tejido-específico en la cantidad de ARNm de la catepsina B, tanto en glándula digestiva como en branquias, pero con tiempos y patrones de respuesta diferentes,

Estudios previos han demostrado que tanto las branquias, como la glándula digestiva son tejidos relacionados con la función inmune. En 2001, Gross et al., reportaron una serie de ESTs (acrónimo del inglés expressed sequence tag) expresados diferencialmente en tejidos sanos e infectados de dos especies de camarón *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus*. Entre las secuencias reportadas tanto en branquias como en la glándula digestiva se encontraron lectinas y

enzimas como la profenoloxidasa, que participan en la respuesta inmune. Más recientemente, Tassanakajon et al., 2013 demostraron que las branquias, además de estar profusamente irrigadas por hemocitos que contienen almacenadas en sus gránulos moléculas de respuesta inmune, se encuentran expresadas enzimas como las lisozimas, tiorredoxinas y crustinas que también forman parte de la respuesta inmune de los crustáceos.

Además de la catepsina B, otras proteasas como la catepsina L, han sido reportadas como moléculas con una participación importante en la respuesta inmune, llevando a cabo funciones necesarias para apoyar las actividades fisiológicas en la glándula digestiva y branquias. Se sabe que la superfamilia de las catepsinas ha estado implicada en el proceso inmune a través de la degradación de componentes bacterianos y virales de organismos tanto vertebrados como invertebrados (Pongsomboon et al., 2008; Robalino et al., 2007).

Así, siendo la catepsina L otra de las cisteína proteasas lisosomales ya reportadas en el camarón, se evaluó la expresión del gen para determinar su respuesta frente al reto viral.

7.3. Efecto de la Infección del WSSV en la Expresión Génica de la Catepsina L del Camarón *Litopenaeus vannamei*

Para la cuantificación de la expresión relativa del gen de la catepsina L en las muestras de glándula digestiva y branquias se evaluó y comparó la eficiencia de amplificación del producto de catepsina L con el gen de referencia L8 (previamente evaluado). Se construyó el rango dinámico para el par de oligonucleótidos de la catepsina L y se obtuvo por regresión a un modelo lineal, los datos de ajuste (R^2), y la pendiente (Figura 8).

El valor calculado de la eficiencia de amplificación de L8 fuero de 99% y para la catepsina L de 90%, cumpliéndose así el supuesto establecido por Livak y Schmittgen (2001).

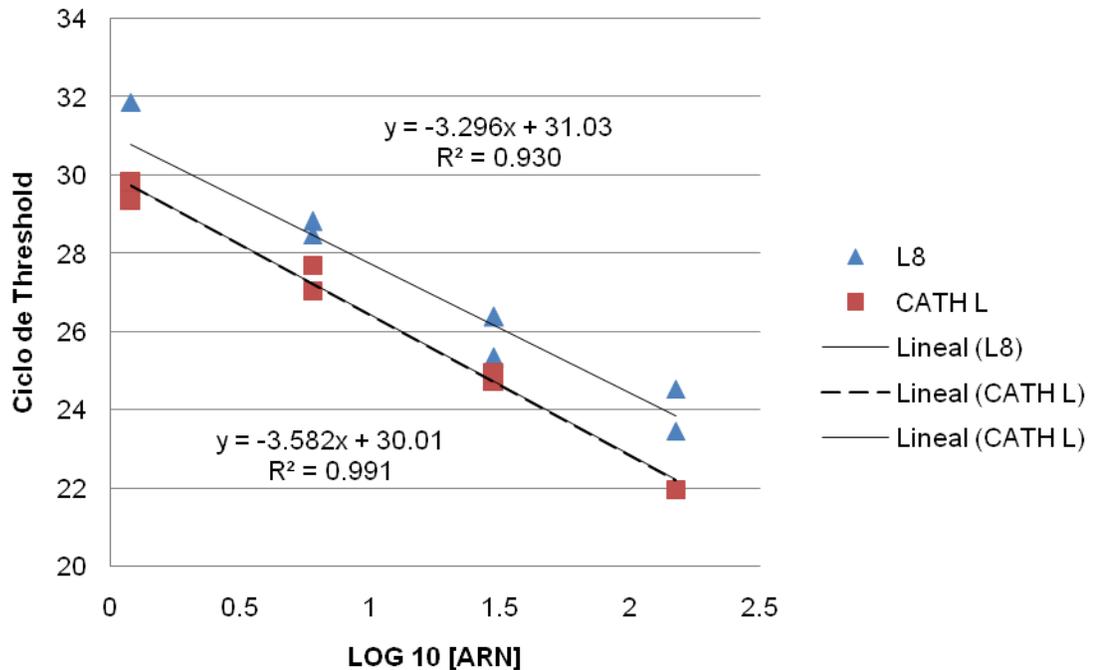


Figura 8. Comparación de los rangos dinámicos de catepsina L y L8

En la glándula digestiva de *L. vannamei* se detectó un cambio significativo inicial por efecto de la infección en el tiempo 0 respecto al grupo control, en donde la expresión del gen de la catepsina L se redujo a la mitad. También, se detectó un cambio significativo durante el transcurso de la infección con WSSV ($p < 0.05$; Figura 9). Este incremento se observó después de 42 hpi, mientras que posteriormente la expresión del gen se mantuvo estable. Estos cambios en la cantidad del ARNm de la catepsina L sugieren una respuesta retardada a nivel transcripcional ante la infección del WSSV en la glándula digestiva, con un patrón de cambio similar al observado en la catepsina B en el mismo tejido.

Este resultado concuerda con el trabajo de Robalino et al., (2008) quienes encontraron que la catepsina L se sobreexpresa en glándula digestiva,

branquias y hemocitos al infectar al camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con el WSSV, sugiriendo que el gen de la enzima puede tener funciones inmunes.

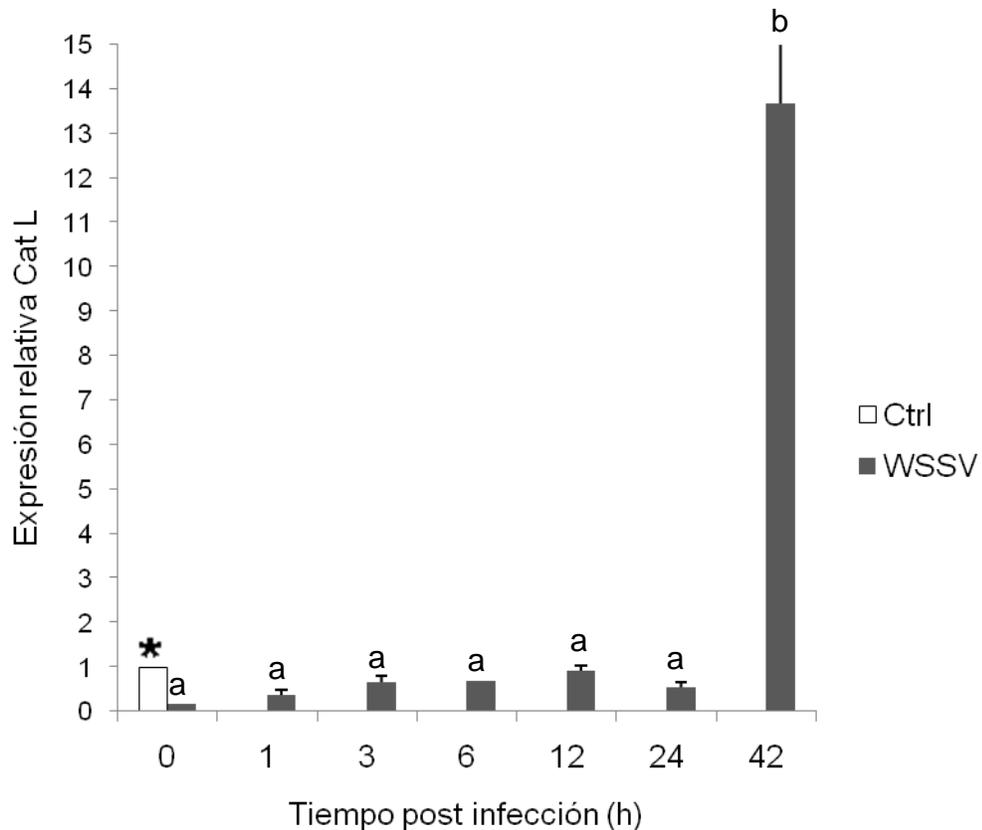


Figura 9. Expresión relativa del gen de la catepsina L en la glándula digestiva del camarón en respuesta a la infección del WSSV. Los valores indican la media \pm error estándar. * indica diferencias entre control e infectados. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

Este patrón de comportamiento de la expresión de catepsina L concuerda con los resultados de Ren et al., (2010), donde se observó que la expresión del gen de la catepsina L en la glándula digestiva del camarón chino *Fenneropenaeus vannamei* infectado con WSSV, mostró un incremento significativo por efecto de la infección.

Por otra parte, en las branquias de *L. vannamei* se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de la catepsina L entre los organismos control y los infectados desde el inicio de la infección ($p < 0.05$; Figura 10). También, se detectó un cambio significativo durante el transcurso de la infección, encontrándose los valores máximos a las 24 y 42 hpi ($p < 0.05$; Figura 10).

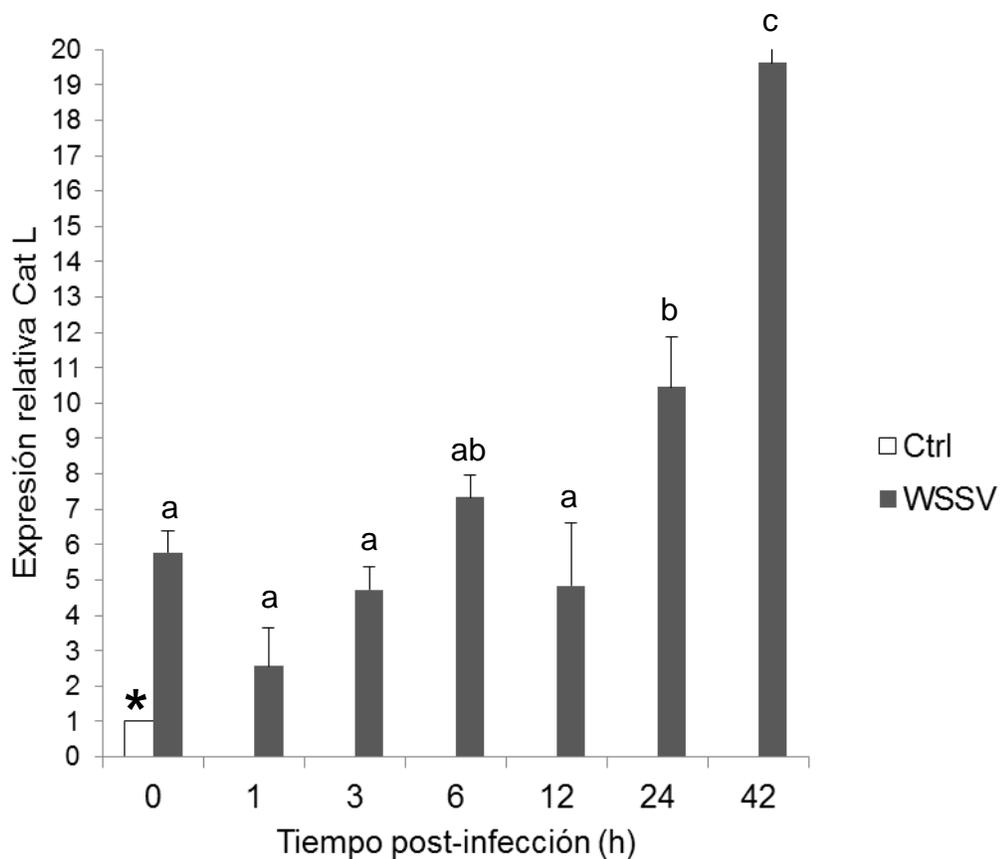


Figura 10. Expresión relativa del gen de la catepsina L en las branquias del camarón en respuesta a la infección del WSSV. Los valores indican la media \pm error estándar. * indica diferencias entre control e infectados. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

Recientemente se reportó que los niveles de expresión del gen de la catepsina L en hepatopáncreas del camarón *F. chinensis* infectado con WSSV, se incrementaron significativamente a las 12 hpi, y que a las 24 hpi su expresión disminuyó lo que sugiere que la catepsina L podría participar en reacciones inmunes anti-WSSV (Ren et al., 2010).

Es este estudio se observó que la infección con WSSV promovió la sobreexpresión de transcritos de las dos cisteína proteasas evaluadas en diferentes tiempos post-infección. De manera particular cabe resaltarse que los patrones de expresión por tejido mostraron diferencias consistentes, pues en ambas enzimas la presencia del virus en la glándula digestiva promovió una represión temprana del gen, misma que fue incrementando gradualmente a lo largo de la infección y alcanzando un pico máximo de expresión entre las 24 y 42 hpi.

Por su parte, la presencia del virus en las branquias provocó una sobreexpresión temprana (6 a 8 veces mayor) de los transcritos de las catepsinas B y L respecto al grupo control, valores que se mantuvieron ó incrementaron a lo largo de la infección.

En la naturaleza existen ejemplos múltiples de estas diferencias en la expresión génica de las enzimas de acuerdo a la función del tejido que se evalúa. En el caso particular de los crustáceos, en la glándula digestiva ambas enzimas Catepsina B y L, han sido reportadas también como enzimas digestivas (Stephens et al., 2012; Le Boulay *et al.*, 1996), lo cual pudiera explicarlas diferencias en la expresión génica de ambas enzimas entre los dos tejidos.

7.4. Evaluación de la Actividad de Cisteína Proteasas en la Glándula Digestiva y Branquias del Camarón *Litopenaeus vannamei*

7.4.1. Condiciones de pH Óptimas Para Evaluar la Actividad Enzimática de Catepsina B.

Como parte de un ensayo preliminar y para determinar el pH óptimo para medir la actividad de la catepsina B del camarón, se evaluó la hidrólisis del sustrato fluorogénico específico para esta enzima (Z-Arg-Arg-AMC), utilizando un extracto enzimático control y se midió la hidrólisis en un rango de pH de 3 a 8. La mayor hidrólisis del sustrato fluorogénico específico se obtuvo entre los pHs del 6.0 al 8.0 (Figura 11). Este resultado concuerda con estudios previos que reportan que las cisteína proteasas se caracterizan por trabajar a un pH levemente ácido (Aoki et al., 2003).

Este resultado también concuerda con lo reportado por Reng et al., (2013) quienes midieron la actividad de la catepsina B del abulón *Haliotis discus hannai* a pHs distintos, siendo el pH 6.0 el óptimo para la enzima. Por el contrario, Oliveira et al., (2014) evaluaron la actividad de la catepsina B en el parásito *Trypanosoma congolense* utilizando el mismo sustrato fluorogénico., y se reportó que el pH óptimo para la actividad de la enzima es 8.0.

Por otra parte, Arockiaraj et al., (2013) publicaron un trabajo sobre la catepsina L del langostino *Macrobrachium rosenbergii* en el que se realizó un ensayo para conocer el pH óptimo para la actividad de la enzima y reportaron que rango óptimo de 7.5 a 8.0 utilizando un sustrato fluorogénico específico Z-Phe-Arg-AFC.

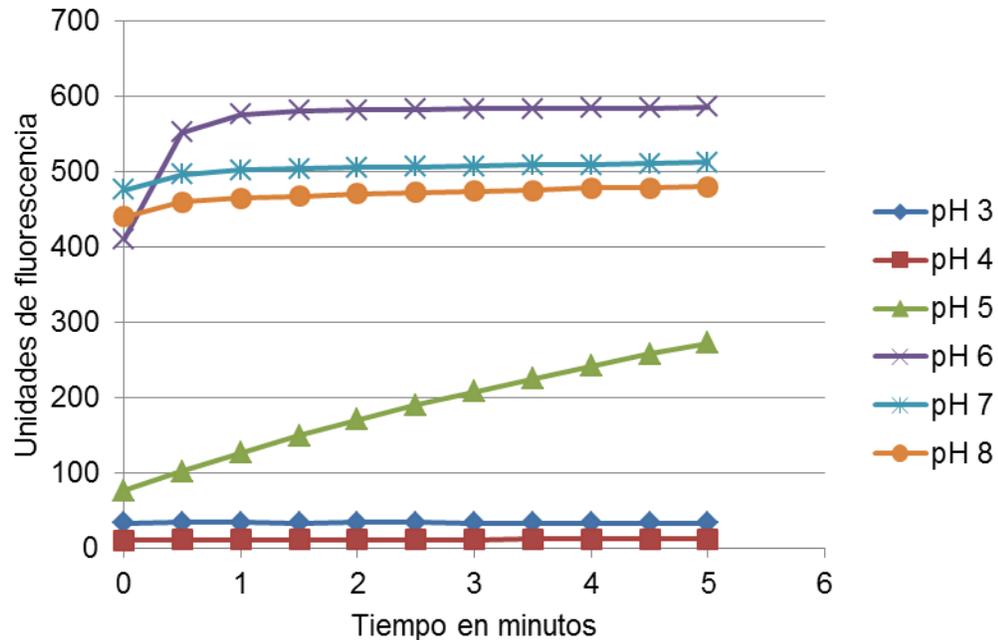


Figura 11. Unidades de fluorescencia producida por la hidrólisis del sustrato fluorogénico Z-Arg-Arg-AMC (en buffer de acetato de sodio 50 Mm) a diferentes pHs. Cada punto representa la media de tres determinaciones independientes.

7.4.2. Actividad de Cisteína Proteasas del Camarón *Litopenaeus vannamei* Infectado con WSSV.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se evaluó la actividad de las enzimas en estudio a pH 6 y 8. Los resultados de la actividad de los extractos enzimáticos de los camarones control e infectados utilizando el sustrato específico de la catepsina B en la glándula digestiva y branquias a pH 6 se muestran en las figura12 y 13, respectivamente. Los resultados muestran actividades específicas hasta dos órdenes de magnitud mayores en la glándula digestiva control que en las branquias control en donde se encontraron actividades promedio mínimas de 0.06 μmol liberados del fluoróforo por mL de

proteína. Estos valores coinciden con lo reportado por Stephens et al., (2012) en los mismos tejidos de la especie en estudio.

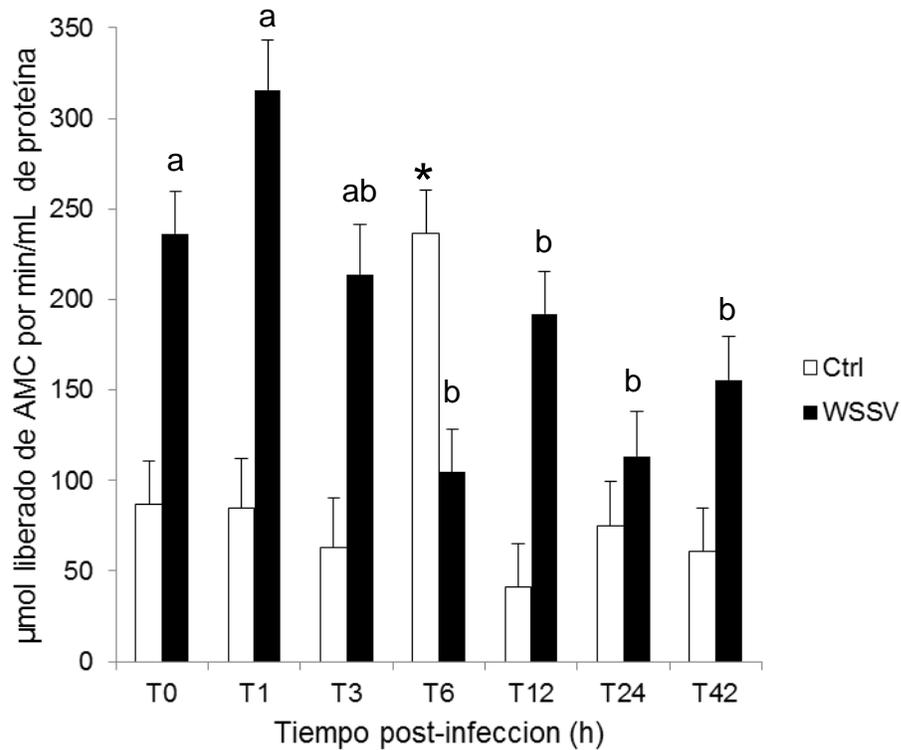


Figura 12. Actividad de catepsina B en la glándula digestiva de *L. vannamei* en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 6. Los resultados representan el valor de la media \pm error estándar.* indica diferencias entre controles en diferentes tiempos. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

La actividad de la catepsina B en glándula digestiva varió durante el transcurso de la infección con WSSV. La actividad de la enzima aumentó en los tiempos 0, 1 y 3 hpi teniendo diferencias significativas respecto a los tiempos posteriores, seguido por una disminución de actividad a las 6 hpi ($p < 0.05$). Los controles se mostraron similares exceptuando a las 6 hpi, donde se registró una actividad casi 3 veces mayor que el promedio control, esto pudiera explicarse con relación a la alta cantidad de proteína que contenía el extracto enzimático en

ese tiempo de muestreo, probablemente asociada con las diferencias individuales entre los organismos experimentales.

El incremento de la actividad de catepsina B en los primeros tiempos de infección no guarda relación con los resultados de la expresión génica de la enzima en la glándula digestiva (Figura 6), estos resultados sugieren que la respuesta temprana observada en la actividad puede ser producto de la activación de los zimógenos de la enzima ya existentes en la célula, mientras que la respuesta transcripcional se refleja de manera significativa hasta la etapa temprana de la infección.

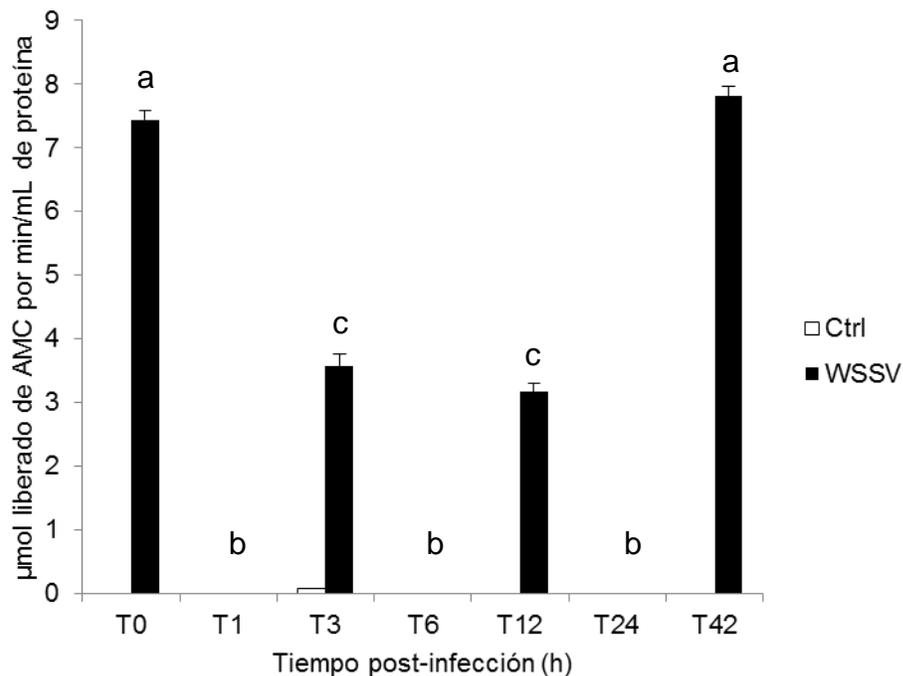


Figura 13. Actividad de catepsina B en las branquias de *L. vannamei* en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 6. Los resultados representan el valor de la media \pm error estándar. * indica diferencias entre controles en diferentes tiempos. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la figura 13, las diferencias en la actividad de catepsina B en las branquias, entre el grupo control (cuyos valores son mínimos) y el grupo infectado alcanzó valores hasta dos órdenes de magnitud mayores en los organismos infectados ($p < 0.05$).

Los resultados muestran un comportamiento semejante al observado en la glándula digestiva pero en órdenes de magnitud menores, en donde la respuesta inmediata a la infección se refleja justo al inicio del ensayo (tiempo 0) con un incremento significativo de la actividad y una baja considerable a las 1, 3, 6, 12 y 24 hpi, llegando en algunos casos a niveles casi imperceptibles, justo como sucede en el grupo control, en los mismos tiempos post-infección.

Lo anterior sugiere que la catepsina B al cumplir dos funciones en la glándula digestiva, como enzima lisosomal y enzima digestiva, muestra mayor actividad que en las branquias, en donde poco se sabe de la función de la enzima. Estudios anteriores han confirmado la función digestiva extracelular de la catepsina B en artrópodos y en distintas especies de camarones hidrolizando la proteína del alimento consumido (Aoki et al., 2003; Prabhakar et al., 2007; Sojka et al., 2008).

Por otro lado, Stephens et al. (2012), sugieren que la catepsina B al ser una enzima lisosomal hidroliza proteína intracelularmente, hecho que se confirmó a través del registro de actividad en tejidos no relacionados con la digestión del alimento como las branquias.

La actividad de esta enzima fue mayor en los camarones infectados que en los controles tanto en la glándula digestiva como en las branquias. Se sabe que la respuesta inmune innata, se manifiesta a las primeras horas post infección (Murphy, 2011), así los incrementos de actividad registrados a las primeras horas de infección sugieren la participación de la enzima en la inmunidad innata del camarón, teniendo en cuenta que estas son respuestas a nivel post-traduccionales relacionadas con la activación de zimógenos de las catepsinas que

se encontraban en la glándula digestiva, mientras que la respuesta transcripcional fue retardada en los dos tejidos y en las dos enzimas evaluadas.

De manera adicional se evaluó la actividad de los extractos a pH 8.0, que se encontró también entre los valores de pH óptimos para la hidrólisis del sustrato fluorogénico (ver figura 5) y poder comparar los patrones de actividad con los registrados a pH 6.0 (Figuras 14 y 15).

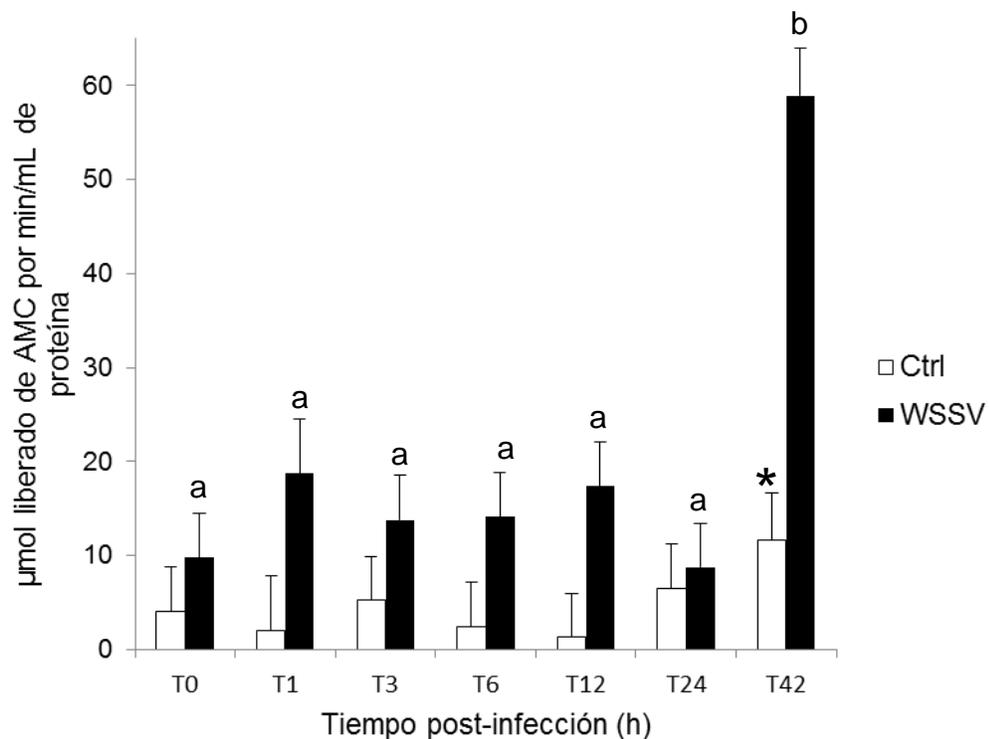


Figura 14. Actividad de proteasas en la glándula digestiva de *L. vannamei* en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 8.0.* indica diferencias entre controles en diferentes tiempos. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

La actividad registrada en la glándula digestiva a un pH de 8.0 (Figura 14), se mantiene sin diferencias significativas entre controles ($p > 0.05$) mientras que en los camarones infectados se puede apreciar que desde las 0 hasta las 24 hpi,

se mantiene la actividad sin diferencias estadísticas y es hasta las 42 hpi donde se incrementa la actividad significativamente de las enzimas proteolíticas ($p < 0.05$).

En el extracto enzimático de las branquias del camarón a pH 8.0 no se encontraron diferencias entre los organismos control, sin embargo si hubo cambios significativos por efecto de la infección y a lo largo de la misma ($p < 0.05$; Figura 15).

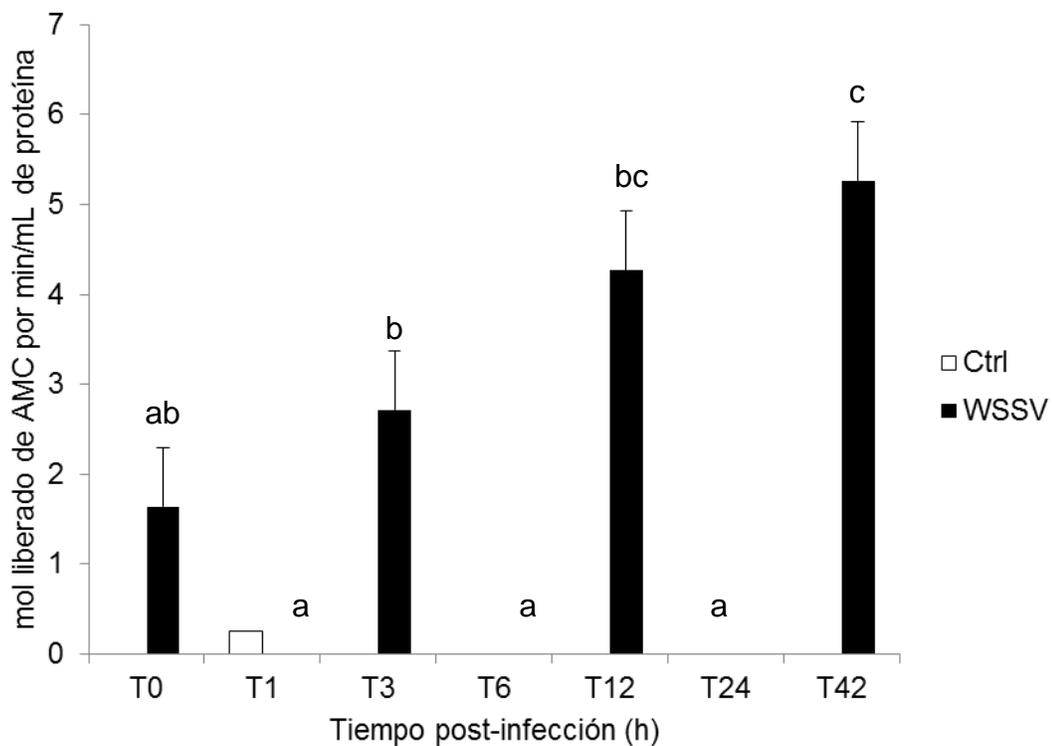


Figura 15. Actividad de proteasas en las branquias de *L. vannamei* en diferentes tiempos post-infección con WSSV a pH 8. Los resultados representan el valor de la media \pm error estándar. * indica diferencias entre controles en diferentes tiempos. Letras itálicas distintas denotan diferencias entre los tiempos de infección ($p < 0.05$).

Para poder explicar estos resultados se realizó una búsqueda de estudios previos para determinar la especificidad de las enzimas por el sustrato fluorogénico utilizado en este estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Especificidad de las catepsinas B y L por sustratos fluorogénicos específicos.

Enzima	Especie	Substrato	pH	Bibliografía
Catepsina B	<i>Mus musculus</i>	Z-Phe-Arg-AMC	-----	Tiware et al., 1991
Catepsina B		Z-Arg-Arg-AMC		
Catepsina B	<i>Pandalus Borealis</i> (hp)	Z-Phe-Arg-AMC	-----	Aoki et al., 2003
Catepsina B		Z-Arg-Arg-AMC		
Catepsina B	<i>Hypophthalmichthysm.</i> (hp)	Z-Arg-Arg-AMC	pH 6.0	Huan et al., 2008
Catepsina B	<i>Cyprinus carpio</i> (hp)	Z-Phe-Arg-AMC	pH 6.0	Yokogawa et al., 2007
Catepsina B		Z-Arg-Arg-AMC		
Catepsina B	<i>Antheraea pernyi</i> (ovario)	Z-Phe-Arg-AMC	pH 5.5	Zhao et al., 1996
Catepsina B		Z-Arg-Arg-AMC		
Catepsina B	<i>Schistosoma Mansonii</i>	Z-Phe-Arg-AMC	pH 5.5	Ghoneim et al., 1995
Catepsina B		Z-Arg-Arg-AMC		
Catepsina B	<i>Homo sapiens</i> (tumor)	Z-Phe-Arg-AMC	-----	Werle et al., 1995
Catepsina L		Z-Phe-Arg-AMC		
Catepsina L	<i>Stichopus japonicus</i>	Z-Arg-Arg-AMC	pH 5.5	Zhou et al., 2014,
Catepsina L	<i>Scomber scombrus</i>	Z-Arg-Arg-AMC	pH 6.0	Lee et al., 1996

Basados en la información analizada, se sugiere que existe la posibilidad de que más de una enzima sea capaz de hidrolizar el sustrato fluorogénico específico para la catepsina B como lo muestra el estudio recientemente publicado por Zhou et al., (2014) quienes evaluaron la actividad de la catepsina L con el sustrato específico para catepsina B en *Stichopus japonicus*.

Considerando los resultados de este estudio, se sugiere que la actividad evaluada a pH 6.0, pudiera reflejar no sólo la actividad de la catepsina B, sino también de la catepsina L del camarón que es capaz de hidrolizar el sustrato a pH ligeramente ácido; mientras que los resultados observados de actividad a pH 8.0, podrían ser reflejo de la actividad de otras enzimas proteolíticas que se

encuentran en el extracto enzimático de la glándula digestiva del camarón como las serino proteasas, principalmente las isotripsinas, cuya especificidad por el sustrato está dirigida a residuos básicos como Arg y Lys, mismos que se encuentran en el sustrato fluorogénico utilizado en este estudio (Wenzhe et al., 2005).

7.5. Identificación de Cisteína Proteasas en la Glándula Digestiva y Branquias

Para la identificación de las catepsinas en la glándula digestiva y las branquias del camarón *Litopenaeus vannamei*, se utilizó el extracto enzimático de los dos tejidos y se separaron las proteínas de cada uno en geles de poliacrilamida al 15%, con un grosor de 0.75 mm para la glándula digestiva y 1.5 mm para branquias.

Los resultados de la Figura 16 muestran un patrón de proteínas típico de la glándula digestiva del camarón blanco (Navarrete del Toro et al., 2011) y el patrón de bandas con actividad proteolítica usando caseína como sustrato. Se detectaron las bandas cercanas al peso molecular deducido para la catepsina B de ~26.9 kDa según Stephens et al., (2012), y para la catepsina L de 24.18 kDa según Boulay et al., (1997). También, se observaron bandas que corresponden a proteasas de la clase serino como las tripsinas y quimotripsinas (~20 kDa y ~30, respectivamente), que sirvieron como referencia en los dos diferentes tejidos para la localización de las catepsinas.

En la figura 16 se observa la movilidad de la catepsina B en el patrón electroforético (las flechas de color negro sugieren la posible localización de la catepsina B), la cual podría ubicarse por debajo de la quimotripsina de bajo peso molecular (~24 kDa; Hernández et al., 1997). En el área del zimograma que abarca los carriles 4 y 5 se pueden observar flechas de color blanco, que marcan las bandas con actividad a pH 6.0 que también coinciden con el tamaño

esperado de las catepsinas B y L. Debido a la reducida diferencia entre los pesos esperados de ambas enzimas podría suponerse que ambas proteínas se localizan muy cerca una de otra en ambos geles.

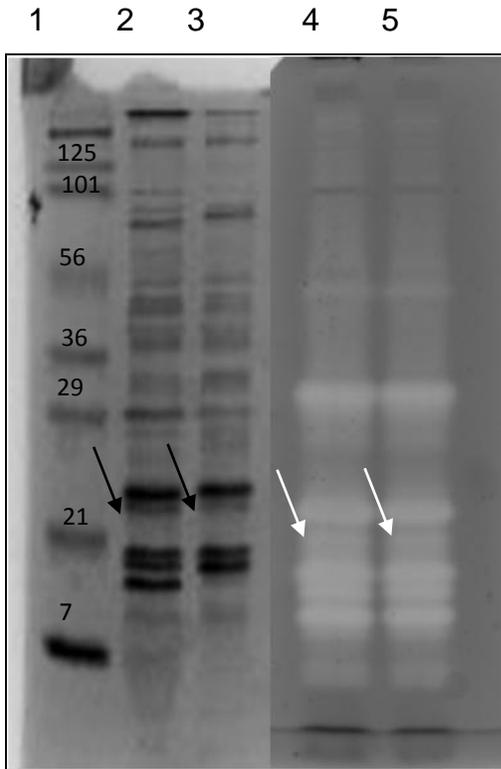


Figura 16. Identificación de cisteína proteasas de la glándula digestiva del camarón. SDS-PAGE 15% y zimograma a pH 6.0. Línea 1-Marcador molecular (kDa). Líneas 2 y 3- Patrón proteico de la glándula digestiva de camarones infectados con WSSV. Líneas 4 y 5- Actividad proteolítica total de glándula digestiva infectadas con WSSV. Las flechas blancas y negras indican la sugerida banda de la catepsina B.

Por otro lado, en los geles del patrón proteico y zimograma de las branquias (Figura17) se observaron diferentes patrones entre el extracto enzimático de organismos control e infectados. En los carriles 1 y 2 se observan flechas negras marcando a las proteínas con actividad de enzimas proteolíticas también encontradas en el zimograma, carriles 4 y 5, indicando las bandas con flechas blancas.

En los carriles 1 y 2 se observó que los extractos enzimáticos de camarones infectados muestran una menor concentración de proteína que la que contienen los extractos de camarones sanos. Esto concuerda con los resultados del zimograma, en donde se observaron repetidamente solo 2 bandas con actividad de proteasas en los camarones infectados con el virus, mientras que en los camarones control se detectaron hasta 5 bandas de actividad. Las flechas rojas indican las posibles bandas ya sea de patrón y de actividad de catepsinas lisosomales.

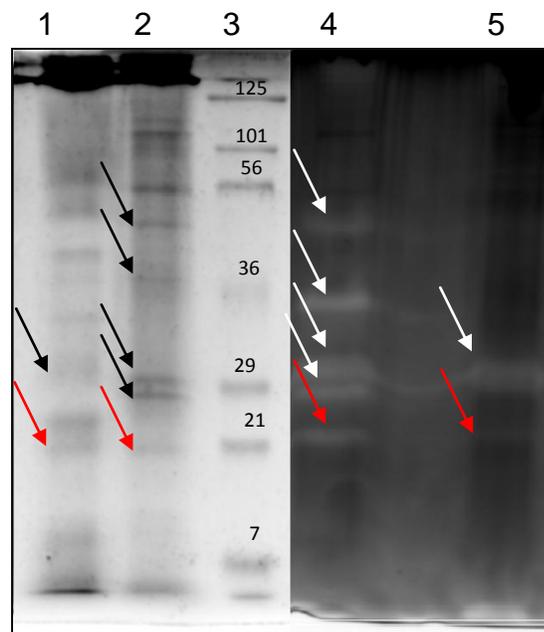


Figura 17. Identificación de cisteína proteasas en las branquias del camarón. SDS-PAGE 15% y zimograma a pH 6.0. Línea 1- Patrón proteico de las branquias infectadas con WSSV. Línea 2- Patrón proteico de las branquias control. Línea 3- marcador de masa molecular (kDa). Línea 4- Actividad proteolítica de las branquias control. Línea 5- Actividad proteolítica total de las branquias infectadas con WSSV. Las flechas negras indican las bandas del patrón de proteínas y las blancas indican las bandas de actividad proteolítica los tejidos. Las flechas rojas indican la posible banda de catepsinas lisosomales.

Se realizó también un zimograma con sustrato fluorogénico específico (Z-Arg-Arg-AMC) para revelar la actividad de la catepsina B y L en la glándula

digestiva. Como se puede apreciar en la figura 18, en los 4 carriles se cargaron los extractos enzimáticos de la glándula digestiva de camarones con una concentración de proteína de 10 µg cada uno. Se puede observar la hidrólisis del sustrato específico en las bandas de proteasas correspondientes con el peso de las isotripsinas señaladas con las flechas de color blanco, mientras que las flechas de color rojo marcan una sola una banda de actividad que podría corresponder a la catepsina B, a la catepsina L o a ambas debido a la similitud de sus pesos moleculares y al pH en que este zimograma se realizó.

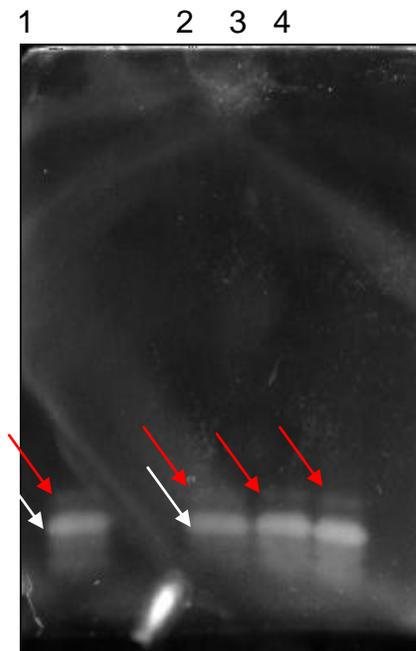


Figura 18. Identificación de cisteína proteasas en la glándula digestiva del camarón utilizando el sustrato Z-Arg-Arg-AMC. SDS-PAGE 15% y zimograma a pH 6.0. Las flechas blancas indican las bandas actividad de las isotripsinas y las rojas indican las bandas de actividad de catepsinas B ó L. Todos los carriles contienen el mismo extracto enzimático de glándula digestiva del camarón.

Estudios previos han demostrado que algunas serino proteasas como las isotripsinas del camarón con pesos moleculares de 22.0, 20.7 y 19.4 kDa respectivamente, tienen especificidad por aminoácidos básicos como Arg y Lys

y su actividad óptima se alcanza a pH entre 7.0 y 8.0 (Sainz et al., 2004). A pesar de lo anterior el zimograma se realizó a pH 6.0 encontrándose actividad en las bandas correspondientes a las isotripsinas, lo que sugiere que el sustrato específico para la catepsina B no sólo es hidrolizado por la enzima, sino que además la catepsina L y las isotripsinas de la glándula digestiva se encuentran activas en las condiciones evaluadas y tienen la capacidad de hidrolizar el sustrato. Sin embargo, se recomienda continuar con los estudios utilizando diferentes sustratos fluorogénicos específicos y enzimas aisladas para concluir acerca de la especificidad de cada una.

Así, de acuerdo a lo observado en este estudio y retomando las preguntas científicas planteadas previamente se sugiere que además de la catepsina B, la catepsina L es también una cisteína proteasa lisosomal importante en los tejidos del camarón y además de expresarse en la glándula digestiva también se encuentra en las branquias de *Litopenaeus vannamei* así como en otras especies de crustáceos (Arockiaraj et al., 2013), y que la función de ambas enzimas guarda relación con la respuesta inmune.

En este estudio se observaron respuestas significativas a la presencia del virus tanto en la expresión génica de las catepsinas B y L, como en la actividad de las mismas en diferentes tiempos. Es importante recordar que en los vertebrados la respuesta inmune innata consta de dos fases: la fase innata inmediata (0-4 hpi), y la fase innata temprana (4-96 hpi). La primera incluye el reconocimiento no específico del antígeno y la remoción del agente infeccioso por enzimas y péptidos antimicrobianos, la fase innata temprana por su parte incluye la presencia de células efectoras que reconocen moléculas típicas de un patógeno y ajenas al hospedero, activándose una serie de diferentes mecanismos para eliminar la infección (Murphy, 2011). En el camarón estas dos fases de la infección se han confirmado por la presencia de péptidos antimicrobianos y PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) (Ji et al., 2009).

Los resultados de este estudio muestran diferentes respuestas en el tiempo, la actividad de las enzimas mostro una respuesta inmediata entre las 0 y 3 hpi, siendo en todos los casos los valores de los infectados significativamente mayores que los controles. Por su parte, la expresión génica mostro una respuesta temprana a la infección, mostrando los valores más altos en la expresión de ambas catepsinas entre las 24 y 42 hpi, periodo que corresponde con la fase innata temprana de la respuesta inmune.

Se sabe que en los mamíferos tanto la catepsina L como la B, tienen funciones intracelulares como la presentación de antígenos procesados proteolíticamente, el recambio de proteínas, y la apoptosis llevando a cabo esta actividad dentro de un lisosoma en donde una característica importante es el pH en el que estas enzimas actúan (pH 4.5-5.0). Por otra parte la principal función extracelular de estas enzimas se relaciona con la degradación de proteínas foráneas, ya sea provenientes del alimentos o de agentes patógenos: estas enzimas también pueden participar en las cascadas proteolíticas que amplifican la capacidad hidrolítica extracelular (Dickinson, 2002). Se sabe que el pH de la glándula digestiva de *L. vannamei* tiene un pH de 5.7 lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (Navarrete del Toro et al., 2011). Así, las diferencias observadas en los resultados de ambos tejidos, pueden explicarse de acuerdo a la función de cada uno como se mencionó previamente.

Se puede observar que en la glándula digestiva hay mayor actividad de cisteína proteasas que en branquias, esto concuerda con que las catepsinas en crustáceos, cumplen una principal función como digestivas, y la glándula digestiva es el órgano que cumple con la función de digestión absorción y almacenamiento de nutrientes (Brock y Main, 1995) del alimento consumido por el camarón. Las branquias por otra parte mostraron menos actividad ya que su función principal es proveer oxígeno al organismo, además de participar en la osmoregulación y excreción, pero sin omitir que también cumplen función de fagocitosis, lo que implica la endocitosis de partículas sólidas que entran a la célula, en este caso podrían ser virus o bacterias.

Uno de los problemas detectados en este estudio fue la especificidad de las enzimas en estudio por el sustrato fluorogénico utilizado, pues de acuerdo a lo encontrado ambas catepsinas podrían hidrolizar el mismo sustrato a pH 6.0, mientras que la evaluación a pH 8.0 confirmó el hecho de que también las serino proteasas son capaces de hidrolizar este sustrato. Este hecho tiene implicaciones importantes en la interpretación de los resultados, por lo que se sugiere en un futuro, purificar y caracterizar las enzimas catepsinas B y L, de manera individual. Por otra parte, será necesario el diseño y síntesis de un sustrato que de forma diferencial permita evaluar la actividad de ambas catepsinas por separado.

Así debe recalcarse la importancia del uso de técnicas moleculares que en este estudio permitieron evaluar ambas catepsinas de manera individual a pesar de las semejanzas entre ellas, el uso de anticuerpos para cada enzima, sería también una herramienta alternativa que permitiría a través de técnicas de inmunodetección y ELISA, evaluar la cantidad de proteína presente de cada enzima en los tejidos del camarón.

VIII. CONCLUSIÓN

- Las catepsinas lisosomales B y L de camarón blanco, participan en la respuesta inmune frente a la infección con WSSV, incrementando la actividad de las enzimas en la fase innata inmediata de la respuesta, mientras que la expresión génica de ambas enzimas se incrementó durante la fase innata temprana (24-42 hpi).
- Existen diferencias entre la cantidad de transcritos y la actividad de las catepsinas por tejido, lo cual se atribuye a las diferentes funciones de cada tejido en el organismo.
- El sustrato Z-Arg-Arg-AMC, utilizado específicamente para la actividad de la catepsina B en estudios anteriores, es hidrolizado por otras enzimas proteolíticas como la catepsina L y las serino proteasas como las isotripsinas, por lo que se recomienda el diseño y la síntesis de nuevos sustratos que permitan evaluar la actividad específica de cada enzima.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Anchalee T., Kunlaya S., Premruethai S. y Sureerat T. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 4: 954-967.
- Anaya R.R. 2005. Cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en sistema cerrado a alta densidad. Tesis de Maestría. CICESE. p. 65.
- Aoki H., Ahsan M. y Watabe S. 2003. Molecular cloning and characterization of cathepsin B from the hepatopancreas of northern shrimp *Pandalus borealis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 6: 681-694.
- Arockiaraja J., Gnanamb A., Muthukrishnanc D., Thirumalaid M., Pasupuletid M. y Miltonc J., Kasie M. 2013. *Macrobrachium rosenbergii* cathepsin L: Molecular characterization and gene expression in response to viral and bacterial infections. *Microbiol.* 168: 569-579
- Athauda S., Takahashi X., Ichinose M. y Takahashi K. 1991. Proteolytic activity and cleavage specificity of cathepsin E at the physiological pH as examined towards the B chain of oxidaze inulin. *FEBS Lett.* 2: 53-56.
- Baldwin E. T., Gulnik S., Hosur M., Sodwer R.C., Cachau R.E., Collins J., Silva A.M. y Erickson J.W. 1993. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lisosomal targeting and drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 14: 6796-6800.
- Barrett A. 1980a. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methycoumar ylamide substrates. *Biochem. J.* 187: 909-912.

- Barrett A. 1980b. Introduction: the classification of proteinases. Ciba Found. Symp. 75: 1-13.
- Barrett A. y Kirschke H. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. Method Enzymol. 80: 535-561.
- Barrett A. 1998. Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. En: Barrett A.J., N.D. Rawlings y J.F. Woessner. Handbook of proteolytic enzyme. Academic Press. San Diego. 37-50.
- Barrett A. y Rawlings N. 2002. Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol. Chem. 7: 27-33.
- Berger C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102-110.
- Bond J.S. y Butler P.E. 1987. Intracellular proteases. Annu. Rev. Biochem. 56: 333-64.
- Brock J. y Main K. 1995. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 242.
- Bromme D. y Kaleta J. 2002. Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. Curr. Pharm. Des. 8: 1639-58.
- Burgents J.E., Louis E., Burnett E., Stabb V., y Burnett K. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific with shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 29: 681-691.
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25: 169-193.

- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Van Desompele, J., y Wittwer, T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55: 611-622.
- Caceci, T., Neck K. y Lewis D. 1988. Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 68: 323-337.
- Caiwen Li y JeVrey D. 2007. Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *J. Invertebr. Pathol.* 94: 48-55.
- Chang P.S., Chen H.C. y Wang Y.C., 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture.* 164: 233-242.
- Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annu Biochem.* 162: 156-159.
- CONAPESCA. 2010. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Recuperado el día 16 de Mayo de 2013, de SIAP con cifras del Anuario Estadístico 2010 de la CONAPESCA.
- COSAES. 2012. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora. Recuperado el 13 de Abril de 2013, de <http://www.cosaes.com/>.
- Cristofolletti P. T., Ribeiro A. F. y Terra W.R. 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemistry to chemical localization and function. *Insect Biochem Mol Biol.* 35: 883-901.
- Cunningham E., McCarthy E., Copley L., Jackson D., Johnson D., Dalton J.P. y Mulcahy G. 2010. Characterization of cathepsin B-like cysteine protease of *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture.* 310: 38-42.

- Dalton J.P., Clough K.A., Jones M.K. y Brindley P.J. 1996.Characterization of the cathepsin like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. Infect. Immun. 64: 1328-1334.
- Delaria K., Fiorentino L., Wallace L., Tamburini P., Brownell E. y Muller D. 1994 Inhibition of cathepsin L-like cysteine proteases by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2b. J Biol Chem. 269: 25172-25177.
- Dickinson D. P. 2002. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissue in health and disease. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 13: 238-275.
- Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Swen H. M. y Wolthers B. G. 1962. Structure of papain. Nature. 5154: 929-932.
- Duffy M.S., Cevalco D.K., Zarlega D.S., Sukhumavasi W. y Appleton J. 2006. Cathepsin B homologue at the interface between a parasitic nematode and its intermediate host. Infect. Immun. 74: 1297-1304.
- Escobedo-Bonilla C., Wille M., Alday-Sanz V., Sorgeloos P., Pensaert M.B. y Nauwynck H.J. 2005. In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. Dis. Aquat. Organ. 66: 163-170.
- FAO. 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 13 de Abril de 2013, de <http://www.fao.org/>.
- FAO. 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 13 de Abril de 2013, de <http://www.fao.org/>.
- Franta Z., Frantova H., Konvickova J., Horn M., Sojka D., Mares M. y Kopacek P. 2010. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasit. Vectors. 3: 119.
- Frosch B., Berquin I., Emmert M., Moin K. y Sloane B. 1999. Molecular regulation membrane association and secretion of tumor cathepsin B. APMIS. 107:28–37.

- García-Carreño F. 1991. Proteases in Food Technology. *Biochem Educ.* 24: 150-153.
- García-Carreño F.L., Navarrete del Toro M.A., Muhlia-Almazán A. 2014. The role of lysosomal cysteine proteases in crustaceans immune response. *Invertebrate Surviv. J.* 11: 109-118.
- García E., Vicedo A., García J.C. y Saldaña A. 1988. Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad periodontal inflamatoria. *Revista Cubana de Estomatología versión On-line ISSN 1561-297X Rev. Cubana Estomatol.* 35: 2.
- Gates B.J. y Travis J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin, *Biochem J.* 8: 4483-4489.
- Ghoneim H. y Klinkert M. 1995. Biochemical properties of purified cathepsin B from *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 25: 1515-1519.
- Gibson y Baker P. 1979. The decapods hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol.* 197-204.
- Gross P.S., Bartlett T.C., Browdy C.L., Chapman R.W. y Warr G.W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol.* 25: 65-77.
- Gylling U., Rintala A. y Taipale S. 1966. The effect of a proteolytic enzyme combinate (bromelain) on the postoperative oedema by oral application. A clinical and experimental study. *Acta. Chir. Scand.* 131: 193-196.
- Hamilton K. A., Nisbet A. J., Lehane M. J., Taylor M. A. y Billingsley P. F. 2003. A physiological and biochemical model for digestion in the ectoparasitic mite, *Psoroptes ovis* (*Acari: Psoroptidae*). *Int. J. parasitol.* 33:773-785.
- Hartley B.S. 1960. "Proteolytic enzymes". *Biochemistry.* 29:45-72.

- Henning O., Itami M., Maeda M., Kondo Y., Natsukari y Takahashi Y. 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid-shaped DNA virus. *Fish Pathol.* 33: 389-393.
- Hernández P., Whitaker J. y García-Carreño F. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J. Food Biochem.* 21: 497-510.
- Hu, K.J., Leung, P.C., 2004. Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137: 21-33.
- Hu K.J., Leung P.C. 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 146: 69-80.
- Huan L., Lijun Y., Shuhong L., Nan Z. y Changwei M. 2008. Effects of endogenous cathepsins b and l on degradation of silver carp (*hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar proteins. *J. Muscle Foods.* 119: 25-139.
- Jeswin J., Anju A., Thomas P.C., Paulton M. P. y Vijayan K. K. 2013. Analysis of viral load between different tissues and rate of progression of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 1-10.
- Jiang H. y Kanost M. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 2: 95-105.
- Johnson P. 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytic cells of decapods crustaceans, with remarks on hemocytes. *Dev. Com. Immuno.* 11: 679-704.
- Kato G. J. 1999. Human genetic diseases of proteolysis. *Human mutation.* 13: 87-89.
- Katunuma N. y Eiki K. 1989. Regulation of Inhibitory Activity of Cysteine Proteinase Inhibitor (Cystatin β) by Glutathione Mediated Covalent Modification. *Glutathione Centennia.* 89-100.

- Kirschke H., Barrett A. y Rawlings N. D. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2: 1581-1643.
- Kirschke H., Clausen T., Göhrinh B., Günther D., Heucke E., Laube F., Löwe E., Neef H., Papesch H., Peinze S., Plehn G., Rebmann U., Rinne A., Rüdrieh R. y Weber E. 1997. Concentrations of lysosomal cystein proteases are decreased in renal cell carcinoma compared with normal kidney. *J. Cancer Res. Clinical Oncol.* 123: 402-406.
- Krem M. y Di Cera E. 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *TRENDS Biochem. Sci.* 2:67-73.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Laycock, M.C., MacKay, R.M., Fruscio, M.D., Gallant, J.W., 1991. Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*). *FEBS Lett.* 292: 115-120.
- Le Boulay C.L., Van A. y Sellos D. 1996. Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *J Comp Physiol B.* 166: 310-318.
- Lee J. J., Chen H. C. y Jiang S.T. 1996. Comparison of the Kinetics of Cathepsins B, L, L-like, and X from the Dorsal Muscle of Mackerel on the Hydrolysis of Methylcoumarylamide Substrates. *J. Agric. Food Chem.* 44: 774-778.
- Lehnert S. H. y Johnson S.E. 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of black tiger shrimp *Penaeus mondon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 163: 163-171.
- Lehninger L. 1993. *Principios de Bioquímica.* 2ª Edición. Editorial Omega. Barcelona. España. 196-237.

- Lemos D., Ezquerro J.M. y Garcia-Carreño F. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*. 186: 89-105.
- León-Félix J., Ortega-López J., Orozco-Solís R. y Arroyo R. 2004. Two novel asparaginyl endopeptidase-like cysteine proteinases from the protist *Trichomonas vaginalis*: their evolutionary relationship within the clan CD cysteine proteinases. *Gen*. 335: 25-35.
- Leu J.H., Yang F., Zhang X., Xu X., Kou G. H. y Lo C.F. 2009. In: Lesser known large dsDNA viruses. Edited by Van Etten J. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. 197-227.
- Li W.W., Jin X. K., He L., Jiang H., Gong Y., Xie Y. y Wang Q. 2010. Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of cathepsin L in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol*. 29: 1010- 1018.
- Li X., Meng X., Kong J., Luo K., Luan S. y Cao B. 2013. Molecular cloning and characterization of a cathepsin B gene from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*. 35: 1604-1612.
- Livak K.J. y Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Meth*. 4: 402-408.
- Lo C.F., Hsu H.C., Tsai M.F., Ho C.H., Peng S.E., Kou G.H. y Lightner D.V. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org*. 35: 175-185.
- Lo C.F., Aoki T., Bonami J.R., Flegel T., Leu, J.H., Lightner D.V., Stentiford G., Söderhäll K., Walker P.J., Wang H.C., Xun X., Yang F., Vlak J.M. Family Nimaviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz, E.J. 2012. *Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier–Academic Press. Amsterdam. 229-234.

- Loizzi R.F. 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z Zellforsch Mikrosk. Anat.* 113: 420-440.
- Madigan M., Martinko J. y Parker J. 1999. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall. 8ª edición. Madrid. 118-120, 151-158.
- Maldonado M. 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1,3 glucanos. Tesis de grado previa a la obtención del título de Magíster en Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 31.
- McGrath M.E. 1999. The lysosomal cysteine proteases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 181-204.
- Mikami S. y Takashima F. 2000. Functional morphology of digestive system. *Spiny Lobster: Fisheries and Culture*. Blackwell. USA. 601-610.
- Mitchel R.E., Chaiken I.M. y Simth E.L. 1970. The complete amino acid sequence of papain. *J. Biol. Chem.* 245: 3485-3492.
- Montes de Oca M. 2001. Parámetros inmunitarios en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*, en piscinas camaroneras infectadas con White Spot Syndrome Virus (WSSV). Tesis de grado, Universidad Técnica de Manabí, Escuela de Acuicultura, Puerto viejo, Ecuador.
- Muhlia-Almazán A. y García-Carreño F.L. 2003. Digestion Physiology and Proteolytic Enzymes of Crustacean Species of the Mexican Pacific Ocean. In: Henrickx, M. E. (Ed). *Contributions to the Study of the East Pacific Crustaceans*. 2: 77-91.
- Muhlia-Almazan A., Sánchez-Paz A. y Garcia-Carreño F.L., 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J. Com. Physiol. B.* 6: 655-672.
- Murphy K. Travers P. y Walport M. 2008. *Inmunobiología de JANAWAY*. 7 edition. McGraw. Chapter 2: 48.

- Navarrete del Toro M., García-Carreño F. y Córdova-Murueta J. 2011. Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture*. 317: 99-106.
- Nicholson D.W., A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillan, C.K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P.R. Griffin, M. Labeille, Y.A. Lazebnik, N.A. Munday, S.M. Raju, M.E. Smulson, T.-T. Yamin, V.L. Lu y D.K. Miller. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376: 37-43.
- Nishimura Y. y Kato K. 1992. Expression of mouse cathepsin L cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence that cathepsin L is sorted for targeting to yeast vacuole. *Arch Biochem Biophys*. 298: 318-324.
- O'connell A.R., Holohan C., Torriglia A., Lee B.F. y Stenson-Cox C. 2006. Characterization of a serine protease-mediated cell death program activated in human leukemia cells. *Exp. Cell Res*. 312: 27-39.
- Oidtmann, B., Stentiford, G. 2011. White Spot Syndrome Virus (WSSV) concentrations in crustacean tissues a review of data relevant to assess the risk associated with commodity trade. *Transbound. Emerg. Dis*. 58: 469-482.
- Olbricht C.J., Cannon J.K., Garg L.C. y Tisher C.C. 1986. Activities of cathepsins B and L in isolated nephron segments from proteinuric and nonproteinuric rats. *Am. J. Physiol*. 250: 1055-1062.
- Oliveira L., Débora N., Okamoto., Oliveira J., Kondo M. y Gouvea E. 2014. Analysis of peptidase activities of a cathepsin B-like (TcoCBc1) from *Trypanosoma congolense*. *BBA*. 1844: 1260-1267.
- Pan D., Nanhai H., Zhiyuan Y., Haipeng L. y Xun X. 2004. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental Comparative Immunol*. 29: 103-112.

- Piti A., Kriangpol W., Walaiporn C. y Anchalee T. 2010. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Developmental Comparative Immunol.* 34: 168-176
- Pongsoboon S., Wongpanya R. Tang S., Chalorsrikul A. y Anchalee T. 2008. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black shrimp, *Penaeus mondon*, and their implication in immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 485-493.
- Prabhakar S., Chen M.S., Elpidina E.N., Vinokurov K.S. y Smith C.M. 2007. Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Insect. Mol. Biol.* 16: 455-468.
- Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *R. Fis. Sci.* 4: 229-288.
- Ren, Q., Zhang, X.-W., Sun, Y.-D., Sun, S.-S., Zhou, J., Zhao, X.-F. y Wang, J.-X., 2010. Two cysteine proteinases respond to bacterial and WSSV challenge in Chinese white shrimp *Penaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 551-556.
- Reng Q., Xiao L., Yong-hua H. y Bo-guang S. 2013. Expression characterization and activity analysis of a cathepsin B from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 1376-1382.
- Repnik U., Stoka V., Turk V. y Turk B. 2012. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *BBA-Proteins. Proteomics.* 1824: 22-33.
- Robalino J., et al., 2008. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 10: 329.
- Robertson C., Coombs G., Noth M. y Mottram J. 1996. *Perspect. Drug Discov. Des.* ESCOM Science, Leiden. 6: 99.

- Rojo L., Muhlia-Almazan A., Saborowski R. y Garcia-Carreño F. 2010. Aspartic Cathepsin D endopeptidase contributes to extracellular digestion in clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. Mar. Biotechnol. 12: 696-707.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Peca y Alimentación. Recuperado el 16 de Mayo de 2013, de <http://www.siap.gob.mx/>.
- Sainz J.C., García-Carreño F.L. y Hernández-Cortés P. 2004. *Penaeus vannamei* isotrypsins: Purification and characterization. Comp. Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 138:155-62.
- Sajid M. y McKerrow J.H. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol. 120:1-21.
- Sánchez-Paz A., García Carreño F., Muhlia-Almazán A., Hernández-Saavedra N. y Yepiz-Plascencia G. 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the White shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 292: 1-17.
- Sánchez-Paz A., Sotelo-Mundo R. y Muhlia-Almazán A. 2012. The Challenges of Developing a Treatment that fully Protects Shrimp against WSSV Infection: a perspective. In: Advances in Zoology Research. (Ed). Jenkins, O.P. NOVA Science Publishers. 1: 1-30.
- Stephens A., Rojo L., Araujo-Bernal S., Garcia-Carreño F. y Muhlia-Almazan A. 2012. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. Comp. Biochem. Physiol B. 161: 32-40.
- Soderhall K. y Cerenius L. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish Dis. 3-23.
- Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdusek O. y Caffrey C. 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals and evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit. Vectors. 1: 7-21.

- Tassman G., Zafran J. y Zayon G. 1964. Evaluation of a plant proteolytic enzyme for the control of inflammation and pain. *J. Dent. Med.* 19: 73-77.
- Tassanakajon A., Somboonwiwat k., Supungul P. y Tang S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 954-967.
- Turk B. E., Turk D. y Turk V. 2000. Lysosomal cysteine protease: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta.* 2: 98-111.
- Uchiyama Y., Waguri S., Sato N., Watanabe T., Ishidoh K. y Kominami E. 1994. Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteases, cathepsins B, H, and L and their biological roles. *Acta Histochem Cytochem.* 27: 287-308.
- Van Hulten M.C.W., Westenberg M., Goodall S.D. y Vlak J.M. 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology.* 266: 227-236.
- Vargas-Albores F., Guzmán-Murillo M.A. y Ochoa J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp Biochem Physiol*; 106: 299-303.
- Vargas, F. y Yépez G. 1998. Shrimp Immunity. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol*, 5: 195-210.
- Volanakis J.E. 1998. Overview of the complement system. In: *The human complement system in health and disease*. Volanakis, J.E. and Frank, M.M. (Eds.), New York: Marcel Dekker, Inc. 9-32.
- Wang S., Li-Jie S., Ning L., An-Jing C., Xiao-Fan Z. y Jin-Xing W. 2012 Involvement of *Fenneropenaeus chinensis* Cathepsin C in antiviral immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 3: 821-828.

- Werle B., Ebert W., Klein y Spiess E. 1995. Assessment of Cathepsin L activity by use of the inhibitor CA-074 compared to cathepsin B activity in human lung tumor tissue. *Biol. Chem.* 376: 157-164.
- Wenzhe M., Tang C. y Lai L. 2005. Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion-Controlled Dynamic Correlation as a Determinant. *Biophys J.* 89: 1183–1193.
- Yamakami K., Hamajima F., Akao S. y Tadamuka T. 1995. Purification and characterization of acid cystein protease from metacarcariae of the mammalian trematode parasite *Paragonimus westermani*. *J. Biochem.* 125: 1137-1143.
- Zar J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. 2. Englewood Cliffs, N.J. 718.
- Zhang FT, Zhang YB, Chen YD, Zhu R, Dong CW, Li YY. 2008. Expressional induction of *Paralichthys olivaceus* cathepsin B gene in response to virus, poly I: C and lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 54-29.
- Zhao Z.Y., Yin Z.X., Weng S.P., Guan H.J., Li S.D. y Xing K. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 520-534.
- Zhou D.Y., Chang X.N., Bao S.S., Song L., Zhu B.W., Dong Y. Z. y Li D..M. 2014. Purification and partial characterization of cathepsin L like proteinase from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its tissue distribution in body wall. *Food Chem.* 158: 192-199.
- Zimic M.J., Infantes J., López C., Velasquez J., Farfan M., Pajuelo M. y Sheen P. 2007. Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *J. Parasitol.* 93: 727-724.