

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Diseño de Técnicas para la Cuantificación de Moléculas Plasmáticas de Camarón

Por:

Jorge Hernández López

Tesis aprobada por la Dirección de Tecnología de alimentos de Origen Animal
como requisito para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Hermosillo, sonora

Diciembre del 2001

APROBACIÓN

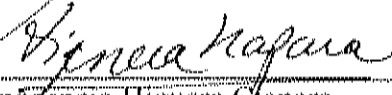
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Maestro en Ciencias Jorge Hernández López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



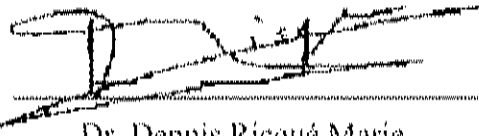
Dr. Francisco Vargas Albores



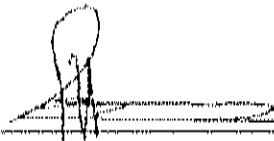
Dra. Gloria Yepiz Plascencia



Dr. Inocencio Higuera Chapara



Dr. Dennis Riequé Marie



Dr. Alfonso Maeda Martínez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD).

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



Dr. Moencio Higuera Ciapara

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Marina de la
Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de
Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

A g r a d e c i m i e n t o s

A Dios por permitirme llegar hasta este feliz momento.

Al Centro de Investigaciones Biológicas (CIBNOR) por confiar en mi y apoyarme durante todo mi Doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por darme el honor de integrarme a su postgrado.

A CONACYT por la beca que me permitió subsistir durante mi postgrado.

Al Dr. Mario Martínez y al Dr. Inocencio Higuera por su invaluable apoyo.

A La Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA) por su apoyo incondicional, de manera muy especial al Dr. Ramon Pacheco.

Al laboratorio de Biotecnología Marina por soportarme durante tanto tiempo.

A mi grandísimo gurú y asesor Paco (compadre quisquín) por darme todo lo que ahora soy en la ciencia y por permitirme hacer, con libertad, todo lo que quise pero siempre conduciéndome por el camino correcto.

A mis asesores, Doctores. Francisco Vargas, Gloria Yepiz, Inocencio Higuera, Denis Ricque y Alfonso Maeda por darme su tiempo y enseñanzas.

A mis Padres por haber hecho posible mi existencia y por alentarme siempre para mi superación académica.

A mis hermanos por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A mi Familia Tere, Jorge, Itzi Elisa y Bebé, por quererme tanto y estar conmigo por lo que soy y no por lo que les pueda dar.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología quienes siempre me apoyaron y echaron porras durante todo mi doctorado.

A mis compadres Gloria y Paco por creer en mi y por darme su apoyo incondicional.

A Gerardo (Henry) por estar siempre pendiente de mi evolución, aun estando tan lejos.

A Marina Ezquerria (marinita) por su amistad desinteresada.

Al personal del CIBNOR Unidad Guaymas, en especial al Dr. Marco Linné y al M. C. Marco Porchas por apoyarme, sobre todo en la parte final de mi doctorado.

A Eloisa, Adrián y Adriancillo, por su desinteresada amistad.

D e d i c a t o r i a

A la memoria de un gran hombre que siempre supo salir adelante aun de las situaciones más difíciles y ser un excelente jefe de familia. Mi Padre: Juan Hernández Navarrete.

A mi madre Socorro López Reyes quien está siempre en el momento justo y en el lugar preciso. Gracias por tu amor y protección incondicional madre.

A mis hermanos Juan Manuel, Ofelia, David, Pablo, Felipe, Guillermo, Guadalupe y Martha por su gran amor y por creer en mí.

A mi esposa Teresa Gollas, por ser mi amor, mi cómplice y todo, por celebrar mis triunfos, compartir mis tristezas y por darme la fuerza necesaria para llegar hasta la meta.

A mis hijos, Jorge, Izi Elisa y Bebé quienes son mi gran amor y mi motivo de superación.

A mis extraordinarios compadres Francisco y Gloria quienes siempre son un soporte tanto profesional como emocional no solo para mí sino para mi familia. Gracias por permitirnos ser parte de Ustedes.

A mis amigos Flor, Claudia, Enrique (villita), Alba y Rogerio, mis hermanos académicos.

A Henry por aceptarme siempre como un hermano.

Al Dr. Klimek y a la Dra. Alaye por creer siempre en mí.

A mis terruños Pátzcuaro y Hermosillo, fuentes de inspiración.

A todas aquellas personas que de alguna manera me acompañaron en el camino hacia mi superación.

CONTENIDO

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
COMPONENTES METABÓLICOS DE CRUSTÁCEOS	10
SISTEMA DE DEFENSA DE INVERTEBRADOS.....	14
SISTEMA DE DEFENSA DE CAMARÓN.....	17
RESPUESTA CELULAR	19
RESPUESTA HUMORAL	20
JUSTIFICACIÓN.....	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
OBTENCIÓN DE HEMOLINFA	28
CUENTA TOTAL DE HEMOCITOS	29
SEPARACIÓN DEL PLASMA Y LISADO DE HEMOCITOS	29
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LISADO DE HEMOCITOS	29
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN PLASMA DE CAMARÓN.....	30
CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN PLASMA DE CAMARÓN.....	30
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (FO).....	30
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLOXIDASA TOTAL (proFO + FO).....	31
PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS (BGBP Y CP)	31
TÉCNICA DE ELISA	32
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE α_2 MACROGLOBULINA (α_2M).....	32
AISLAMIENTO DE RNA DE HEMOCITOS DE CAMARÓN.....	33
AISLAMIENTO DE MRNA, TÉCNICA DE POLI A'RNA	33
AISLAMIENTO DE MRNA DIRECTO (MRNA DIRECT™ KIT, DYNAL BIOTECH).....	34
OBTENCIÓN DE CDNA	35

TÉCNICA DE RT-PCR	35
ELECTROFORESIS DE RNA EN AGAROSA 1%.....	36
ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN PAGE.....	37
TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA PARA DNA EN GELES DE ACRILAMIDA.....	37
ACTIVIDAD DE LISOZIMA	38
INOCULACIÓN DE PARTÍCULAS INERTES EN CAMARÓN	39
INOCULACIÓN DE <i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i>	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN HEMOLINFA	41
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS.....	44
TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS.....	48
ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA	60
ACTIVIDAD DE ALFA2MACROGLOBULINA ($\alpha 2M$).....	66
DETECCIÓN DE LISOZIMA EN CAMARÓN	70
DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE LISOZIMA EN CAMARÓN.....	73
BIOENSAYOS.....	76
INOCULACIÓN DE PARTÍCULAS	79
INOCULACIÓN DE BACTERIAS.....	83
CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFÍA.....	90

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: PROTEÍNAS DE RESPUESTA INMUNE DE CAMARÓN.....	25
TABLA 2: VOLÚMENES DE REACTIVOS PARA RT-PCR.....	36
TABLA 3: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN HEMOLINFA DE CAMARÓN.....	44
TABLA 4: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN HEMOLINFA DE CAMARÓN.....	46
TABLA 5: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL EN HEMOLINFA DE CAMARÓN.....	47
TABLA 6: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ACILGLICÉRIDOS EN HEMOLINFA DE CAMARÓN.....	47
TABLA 7: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LACTATO EN HEMOLINFA DE CAMARÓN.....	48
TABLA 8: TÉCNICA PARA CUANTIFICAR BGBP O CP EN PLASMA DE CAMARÓN.....	56
TABLA 9: ESPECIFICIDAD DE ANTI-BGBP Y ANTI-CP EN PRUEBAS DE ELISA.....	57
TABLA 10: RESULTADOS OBSERVADOS CON EL USO DE PLACAS CON ANTÍGENO PRE-ADSORBIDO.....	58
TABLA 11: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICAR DE BGBP O CP EN PLASMA DE CAMARÓN, UTILIZANDO EL KIT DISEÑADO EN ESTE TRABAJO.....	60
TABLA 13: INFLUENCIA DEL DILUYENTE EN LA LIBERACIÓN DEL SISTEMA PROFO DE HEMOCITOS DE CAMARÓN.....	63
TABLA 14: INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON TRIPSINA SOBRE LA CONVERSIÓN DE PROFO EN FO.....	64
TABLA 15: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FO TOTAL EN PLASMA DE CAMARÓN, UTILIZANDO EL KIT DISEÑADO EN ESTE TRABAJO.....	64
TABLA 16: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICAR DE FO EN PLASMA DE CAMARÓN, UTILIZANDO EL KIT DISEÑADO EN ESTE TRABAJO.....	65

TABLA 17: TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE $\alpha 2M$ EN PLASMA DE CAMARÓN.....	67
TABLA 18: TÉCNICA PARA CUANTIFICAR $\alpha 2M$ EN PLASMA DE CAMARÓN UTILIZANDO EL KIT GENERADO EN ESTE TRABAJO.....	70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: TIPOS DE HEMOCITOS EN CAMARÓN.....	20
FIGURA 2: ESQUEMA DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA $\alpha 2M$	23
FIGURA 3: REPRESENTACIÓN ESQUEMATICA DEL SISTEMA INMUNE DE CAMARÓN.	24
FIGURA 4: CURVA PATRÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	42
FIGURA 5: CORRELACIÓN ENTRE EL USO DE SOLUCIÓN SALINA 0.15 M O SIC- EDTA COMO DILUYENTE EN LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS.. ...	45
FIGURA 6: TIPOS DIFERENTES DE SISTEMAS DE ELISA	50
FIGURA 7: CURVAS DE TITULACIÓN DE ANTÍGENO.(β GBP Y CP).....	52
FIGURA 8: COMPARACIÓN DE 4 BLOQUEADORES PARA LA PRUEBA DE ELISA..	53
FIGURA 9. CURVA PATRÓN DE BGBP Y CP DE CAMARÓN, REALIZADA POR ELISA TIPO COMPETENCIA O INHIBICIÓN.....	55
FIGURA 10: KIT DISEÑADO PARA LA DETERMINACIÓN DE BGBP.....	59
FIGURA 11: KIT DISEÑADO PARA DETERMINACIÓN DE PO.....	65
FIGURA 12: INFLUENCIA DEL DILUYENTE EN LA PRUEBA DE $\alpha 2M$	68
FIGURA 13: INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE MUESTRA EN LA ACTIVIDAD DE $\alpha 2M$ DE CAMARÓN..	69
FIGURA 14: FRAGMENTO OBTENIDO POR PCR DE cDNA DE HEMOCITOS Y HEPATOPÁNCREAS DE CAMARONES APARENTEMENTE SANOS.....	72
FIGURA 15: PRUEBA DE LISOZIMA POR DIFUSIÓN SIMPLE EN AGAR..	74
FIGURA 16: DETERMINACIÓN DEL PICO MÁXIMO DE ABSORBANCIA DEL COLORANTE PARA LA PRUEBA DE LISOZIMA EN MEDIO LIQUIDO.....	75
FIGURA 17: PRUEBA DE LISOZIMA POR LISIS DE <i>M. LUTEUS</i> TEÑIDOS.	76
FIGURA 18: INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN ALIMENTICIA CON ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS (UFA) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS EN HEMOLINFA DE CAMARONES CULTIVADOS	77

FIGURA 19: CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS EN PLASMA DE CAMARONES CULTIVADOS COMERCIALMENTE Y ALIMENTADOS CON DOS TIPOS DE ALIMENTO.	78
FIGURA 20: CUENTA TOTAL DE HEMOCITOS EN CAMARONES INOCULADOS CON PARTÍCULAS INERTES.	80
FIGURA 21: CONCENTRACIÓN DE BGBP EN PLASMA DE CAMARONES INOCULADOS CON PARTÍCULAS INERTES.	80
FIGURA 22: EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN HEMOCITOS DE CAMARÓN.	81
FIGURA 23: AMPLIFICACIÓN DE cDNA DE LISOZIMA.	82
FIGURA 24: CUENTA TOTAL DE HEMOCITOS DE CAMARONES INOCULADOS CON <i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i>	83
FIGURA 25: EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS MUERTAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLOXIDASA TOTAL EN HEMOLINFA DE CAMARÓN.	84
FIGURA 26: EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE α 2M EN PLASMA DE CAMARÓN.	85
FIGURA 27: DETECCIÓN DEL mRNA DE LISOZIMA POR RT-PCR EN HEMOCITOS DE CAMARONES INOCULADOS CON <i>VIBRIO PARAHEMOLYTICUS</i>	86

RESUMEN

Aunque en general no se conoce el significado fisiológico de las variaciones que pudieran tener los componentes de la hemolinfa, la búsqueda de marcadores de salud y su interpretación deben ser consideradas para el establecimiento de medidas preventivas que puedan ofrecer mayor porcentaje de seguridad, no solo para el control de las infecciones que afectan a los camarones, sino para el medio ambiente. Aunque los avances en el campo del diagnóstico preventivo han sido modestos, la implementación de métodos bioquímicos, enzimáticos y de inmunodetección, así como el uso de nuevas herramientas como las basadas en RAPD, RT-PCR y PCR cuantitativo parecen ser una buena alternativa. En este trabajo se estandarizaron las condiciones y se diseñaron métodos para medir metabolitos, actividades y concentración de proteínas involucradas en el sistema de defensa del camarón, generándose kits que pueden ser usados tanto en laboratorios de investigación como en granjas acuícolas. Estos métodos, que involucran técnicas enzimáticas, colorimétricas, inmunodetección y técnicas de biología molecular, fueron una herramienta eficiente para la medición de la respuesta inmune en animales sometidos a diferentes condiciones.

Los métodos propuestos en este trabajo presentan ventajas como alta sensibilidad, bajo costo y rapidez. La evaluación de glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos y proteína total se realizó en hemolinfa completa, lo que permitió reducir, de manera significativa, el tiempo de los análisis y generó la posibilidad de realizar estas mediciones en laboratorios donde no se cuente con

una centrifuga. Por otro lado, el diseño de métodos en microplaca permitió medir, al mismo tiempo, moléculas como proteína que se une a beta glucanos (BGBP), profenoloxidasa (proFO), fenoloxidasa (FO), proteína de coagulación (CP) y alfa2 macroglobulina (α 2M), cuya evaluación combinada puede servir para tener una vista integral del estado inmune del camarón debido a que representan los tres pasos de la respuesta inmune: reconocimiento, acción y control. Debido a que BGBP y CP de camarón son idénticas a la HDL y VHDL, respectivamente, los métodos diseñados en este trabajo también permiten evaluar estas lipoproteínas.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, la industria camaronera ha tenido un rápido desarrollo. Sin embargo, enfrenta grandes problemas debido a la presencia de enfermedades en los cultivos. Las enfermedades bacterianas son frecuentes (Sano y Fukuda, 1987; Karunasagar y cols., 1994; Lavilla-Pitogo y cols., 1998) y aunque generalmente no son graves, llegan a impactar fuertemente la camaronicultura (Karunasagar y cols., 1994; Lightner, 1996; Lavilla-Pitogo y cols., 1998). Estas enfermedades pueden controlarse con agentes desinfectantes (formol, cloro, etc.) y/o antibióticos con lo que se puede reducir la dimensión de la epizootia (Baticados y cols., 1990; Shariff y cols., 2001) pero generalmente son poco efectivos, resultan costosos e impactan seriamente el ambiente.

Por otro lado, las enfermedades producidas por virus tienen un claro impacto negativo en la industria (Lightner, 1996; Lotz, 1997), llegando a producir pérdida total en una granja o en una zona y disminuir significativamente la producción de un país. Hasta la fecha no existen tratamientos correctivos para las enfermedades virales. Por ello, una alternativa viable es el diagnóstico preventivo haciendo uso de marcadores de salud intrínsecos (número de hemocitos, proteína total, proteínas específicas, etc.) y extrínsecos (cuenta bacteriana, nutrientes, etc.) que permitan detectar de manera temprana la presencia y/o el riesgo de enfermedades.

Actualmente se ha intensificado la búsqueda de marcadores de salud, esperando encontrar medidas y herramientas profilácticas alternativas que permitan reducir la diseminación y las consecuencias de la infección. Además se busca que estos métodos sean sensibles, precisos y con capacidad predictiva (Dias, 2000), enfocados a determinar el estado inmune y fisiológico de los camarones mediante la cuantificación de

células, metabolitos y proteínas plasmáticas específicas involucradas en la respuesta inmune, más que a determinar la presencia del patógeno a través de cultivos de las bacterias u hongos causantes. Por lo que se ha propuesto que la investigación del sistema de defensa de camarón se enfoque al desarrollo de ensayos para evaluar y monitorear el estado inmune de los camarones (Bacheré, 2000).

Finalmente, los estudios sobre la caracterización de moléculas activas involucradas en el sistema inmune y los mecanismos de activación y represión de los genes, pueden servir para proponer algún método para estimular el sistema inmune de una manera controlada y específica.

En los últimos años, los estudios en el campo de la inmunología de crustáceos, han generado expectativas de controlar las enfermedades a través de la manipulación del sistema inmune. Sin embargo, la carencia de indicadores para medir el estado de defensa de los crustáceos puede ser un problema serio (Sritunyalucksana y cols., 1999). En este sentido, se han realizado estudios relacionados con parámetros celulares y humorales de crustáceos como indicadores de condición inmune de camarones, con la intención de desarrollar criterios para la selección de organismos resistentes a patógenos, inmunomodulación y mejoramiento sanitario de los organismos en cultivo (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Componentes Metabólicos de Crustáceos

En los invertebrados existe poca información sobre el significado clínico de modificaciones en los componentes del torrente circulatorio o hemolinfa. Sin embargo, en camarón, se ha propuesto que la determinación de algunos iones, metabolitos y proteínas plasmáticas específicas sería de ayuda para evaluar el estado de salud o detectar

cambios fisiológicos (Vargas-Albores y cols., 1991). La medición de metabolitos plasmáticos como glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato y proteína total, ha sido considerada como una medida del estado nutricional de los camarones (Cuzon y cols., 1980; Ferraris y cols., 1986; Chan y cols., 1988; Chen y cols., 1994; Stuck y cols., 1996; Hall y Van, 1998).

Aunque en camarón no se han realizado estudios para conocer cuantos tipos de proteínas se encuentran en la hemolinfa, la concentración total de proteína ha resultado ser un buen parámetro como indicador de deficiencia nutricional producida por ayuno (Cuzon y cols., 1980; Ferraris y cols., 1986; Akiyama y cols., 1989; Stuck y cols., 1996). La concentración de proteínas también ha sido usada como indicador del estado fisiológico de organismos bajo ciertos estados de desarrollo como muda (Ferraris y cols., 1986; Chan y cols., 1988) y vitelogénesis (Shafir y cols., 1992), pero condiciones extremas como altas concentraciones de amonio (Chen y Cheng, 1995) o ablación del pedúnculo ocular (Quackenbush, 1989), producen disminución en la concentración plasmática de proteína total.

La glucosa, al igual que en los mamíferos (Ganong, 1982), es el carbohidrato más abundante en el plasma de los invertebrado y su concentración está relacionada con la tasa metabólica, pero su concentración es más baja que en humanos (1-1.2 mg/ml) y raramente sobrepasa los 0.2 mg/ml (Urich, 1994). Aunque su concentración puede variar en condiciones fisiológicas como la muda (Urich, 1994), la glucosa en hemolinfa ha sido propuesta como un indicador del estado nutricional (Hall y Van, 1998) o de estrés en diferentes condiciones como hipoxia, (Santos y Keller, 1993; Schmitt y Santos, 1993; Anderson y cols., 1994; Hall y Van, 1998), manejo (Racotta y Palacios, 1998), Ayuno (Cuzon y cols., 1980) y exposición a pesticidas (Reddy y Rao, 1991).

El principal producto final del metabolismo anaeróbico de la glucosa es el lactato (Thorpe y cols., 1995). De forma general en todos los crustáceos, el lactato se acumula en el músculo y la hemolinfa como resultado al estrés por anoxia y emersión (Tyler y Taylor, 1988; Santos y Keller, 1993; Schmitt y Santos, 1993; Anderson y cols., 1994; Zou y cols., 1996; Sartoris y Poertner, 1997), manejo (Spotts y Lutz, 1981), anaerobiosis (Ellis y Morris, 1995) y exposición a insecticidas (Reddy y Rao, 1991). En algunas ocasiones se ha observado que el lactato tarda hasta 40 h en regresar a sus niveles normales, después de ser expuesto a un periodo de anoxia (Anderson y cols., 1994).

En los crustáceos, los lípidos son componentes esenciales para mantener la integridad fisiológica y estructural de la membrana celular (Chapelle, 1986). El colesterol en crustáceos es precursor de hormonas esteroideas y en la membrana celular tiene funciones estructurales, de permeabilidad y transporte (Aguirre, 1990). Este metabolito no puede ser sintetizado por el camarón y debe ser suministrado en la dieta (Akiyama y cols., 1989; Teshima y cols., 1989) y se ha usado como indicador del estado nutricional debido a que los niveles de colesterol en camarón se elevan al suministrarles dietas con suplementos alimenticios (Shiau y Chou, 1994).

Por su parte, los acilglicéridos también juegan un papel importante en la fisiología del camarón como componentes de la membrana celular por lo que el aporte adecuado de acilglicéridos es importante en el crecimiento y reproducción. Los acilglicéridos se almacenan en el hepatopáncreas y funcionan como fuente de energía durante el ayuno (Jeackel y cols., 1991; Stuck y cols., 1996) y las reservas se agotan rápidamente en animales con alimentación deficiente (Stuck y cols., 1996). Aunque presentan variaciones estacionales en relación con sexo, al estado de madurez gonadal y a factores ecológicos (calidad del

alimento y temperatura) (Jeackel y cols., 1991), la medición de su concentración ha sido usada como indicador del estado nutricional.

Varias técnicas han sido descritas para la medición de estos parámetros. Estas técnicas, diseñadas para uso en clínica humana, han evolucionado en los últimos 20 años de manera que en la actualidad se cuenta con kits comerciales basados en reacciones enzimáticas directas o secuenciales, que involucran más de una enzima. El fundamento de la técnica se indica en el instructivo de cada kit pero de manera resumida se presenta a continuación:

a) Glucosa: La glucosa es oxidada por Glucosa oxidasa (GOD) liberando peróxido de hidrógeno; éste reacciona con fenol y 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (POD) generando un color rojo violeta de antipirilquinonimina que es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

b) Lactato: El ácido láctico es convertido a piruvato y peróxido de hidrógeno por lactato oxidasa. La peroxidasa cataliza la condensación oxidativa del precursor cromogénico en presencia de peróxido de hidrógeno y forma un color con una absorbancia máxima a 540 nm. El incremento en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de lactato en la muestra.

c) Acilglicéridos: Los mono, di y triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente con lipasas para formar glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol formado es convertido por la glicerol cinasa en glicerol-3-fosfato que en presencia de oxígeno es transformado por la glicerol fosfato oxidasa en dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido formado reacciona con 2-clorofenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa formando un compuesto colorido que presenta un máximo de absorbancia a 540 nm.

d) Colesterol: El colesterol y sus ésteres se liberan de las lipoproteínas con detergentes. La colesterol oxidasa hidroliza los ésteres liberando el colesterol que es oxidado para producir hidroxicolesterol y peróxido de hidrógeno. El peróxido formado reacciona con 4-aminoantipirina y fenol formando una quinona colorida que presenta una absorbancia máxima a 492 nm.

Sistema de Defensa de Invertebrados

El número total de especies animales existentes en el mundo es de aproximadamente 2 millones y los invertebrados constituyen más del 95% con una gran variedad de organismos que van desde protozoarios unicelulares hasta los más complejos como equinodermos y protocordados. La capacidad para reconocer materiales extraños ha sido estudiada en un número limitado de especies de invertebrados y actualmente se acepta que como consecuencia de los mecanismos de reconocimiento, estos organismos pueden protegerse contra patógenos utilizando reacciones de defensa celular como fagocitosis y encapsulamiento (Ratcliffe y cols., 1991; Battistella y cols., 1996; Johansson y cols., 2000). Sin embargo, los mecanismos moleculares de estos procesos apenas están siendo entendidos.

Los invertebrados carecen de anticuerpos y aparentemente no tienen una respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, ellos tienen proteínas con dominios parecidos a las inmunoglobulinas como las hemolinas (Sun y cols., 1990; Ladendorff y Kanost, 1991; Kanost y cols., 1994; Bettencourt y cols., 1997; Shin y cols., 1998; Johansson, 1999). En artrópodos (insectos, crustáceos y quelicerados), algunas reacciones han sido descritas en detalle. Por ejemplo, en el cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*), las reacciones de coagulación consisten en una

cascada de serin-proteinasas que finalizan en la polimerización de una proteína coagulable. Esta cascada de proteinasas es activada por cantidades extremadamente pequeñas de polisacáridos microbianos, representando un poderoso sistema de reconocimiento (Tanaka y cols., 1991; Roth y Levin, 1992; Muta y cols., 1993; Roth y Tobias, 1993; Muta y Iwanaga, 1996). Esta cascada está controlada por inhibidores de proteinasas, las cuales han sido purificadas y se ha demostrado su participación en el control de la coagulación (Donovan y Laue, 1991; Tanaka y cols., 1993; Miura y cols., 1994; Miura y cols., 1995; Kanost, 1999).

Las proteinasas involucradas en la coagulación de *Limulus* no tienen homología con las proteinasas del sistema de la coagulación de los mamíferos. Sin embargo, algunas presentan regiones o dominios evolutivamente relacionadas con el sistema del complemento (Muta y cols., 1991; Armstrong y cols., 1998; Armstrong y Quigley, 1999).

A diferencia de *L. polyphemus*, el proceso de coagulación en crustáceos (Tait, 1911; Martin y cols., 1991) es iniciado por una transglutaminasa almacenada en las células sanguíneas y no parece haber procesos proteolíticos involucrados. La proteína de coagulación de crustáceos es un homodímero de 400 kDa (Martin y cols., 1991; Yeh y cols., 1998; Hall y cols., 1999; Montaña-Pérez y cols., 1999; Yeh y cols., 1999) que se encuentra presente en plasma y no tiene homología con el fibrinógeno y más bien se ha encontrado que pertenece a la superfamilia de las vitelogeninas (Hall y cols., 1999; Yeh y cols., 1999). Esto muestra que un proceso similar en dos especies de invertebrados relacionadas, es completamente diferente y enfatiza la gran variación molecular que puede existir entre los invertebrados.

Otra cascada de proteinasas involucrada en procesos de defensa de los invertebrados forma parte del sistema de activación de la

profenoloxidasa (proFO) (Schmidt y Theopold, 1991; Söderhäll y cols., 1994; Vargas-Albores, 1995; Gillespie y cols., 1997; Söderhäll y Cerenius, 1998; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998; Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000) el cual es responsable del reconocimiento de polisacáridos microbianos con una sensibilidad parecida a la del sistema de coagulación de *L. polyphemus*. El zimógeno, proFO, es activado por una proteólisis controlada por lo que los inhibidores de proteinasas son factores importantes de regulación para evitar la activación de este sistema cuando no es requerido (Hergenhahn y Söderhäll, 1985; Hergenhahn y cols., 1988; Johansson y Söderhäll, 1989; Aspán y cols., 1990; Kanost, 1999). El hecho de que el sistema proFO de insectos y crustáceos, así como la cascada de coagulación de *L. polyphemus* sean tan sensibles que bastan menos de 10 pg de lipopolisacárido microbiano para ser activados, indica que son eficientes para el reconocimiento de moléculas extrañas y componentes importantes en el repertorio de defensa de los artrópodos.

Hasta la fecha, 13 proFO de invertebrados han sido clonadas (Sritunyalucksana y cols., 1999). Las proFO de artrópodos son similares, carecen de un péptido señal y tienen dos sitios funcionales de unión a cobre (Sritunyalucksana y cols., 1999; Taft y cols., 2001).

Sistema de Defensa de Camarón

En los últimos 15 años ha habido un gran interés por estudiar el sistema inmune del camarón con resultados significativos. En general, los mecanismos de defensa inmune son activados como respuesta a la introducción de partículas ajenas, mediante un sistema de reconocimiento de lo propio y lo extraño.

En camarón, como en todos los crustáceos, no existen inmunoglobulinas como en los vertebrados pero poseen mecanismos de defensa que evitan el establecimiento y proliferación de patógenos. Debido a la falta de especificidad y, sobre todo, a la ausencia de una memoria inmunológica, esta respuesta es considerada como inmunidad innata e involucra componentes celulares y plasmáticos que juegan papeles esenciales en el establecimiento de una respuesta inmune.

La respuesta celular se manifiesta a través de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y citotoxicidad (Itami y cols., 1998; Chang y cols., 2000; Rengpipat y cols., 2000; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia., 2000), mientras que la respuesta humoral es llevada a cabo por aglutininas, enzimas, citoquininas y factores líticos (Vargas-Albores y cols., 1992; Vargas-Albores y cols., 1993; Hernández-López y cols., 1996; Marques y Barracco, 2000). Algunos componentes y/o actividades se encuentran integrados en sistemas o cascadas de reacciones, como es el caso del sistema de la coagulación y el sistema de activación de la profenoloxidasasa (proFO).

En camarón, como en otros invertebrados, frecuentemente se observa un oscurecimiento en la superficie corporal, donde se ha producido una lesión. Esta reacción de melanización se debe a la acción de una enzima llamada fenoloxidasasa (FO), la cual oxida fenoles, produciendo quinonas

(Sritunyaluksana y Söderhäll, 2000). Estas últimas, continúan su transformación por vía no enzimática hasta llegar a melanina. Tanto la melanina como sus intermediarios son importantes barreras de defensa, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Söderhäll, 1982). Además, durante la generación de los quinoides, se producen radicales libres oxidantes (radicales hidroxil y superóxido) que tienen una importante actividad antimicrobiana (Saul y Sugumaran, 1989). Por otro lado, durante la melanización se promueven reacciones biológicas que incluyen, el encapsulamiento, la fagocitosis y la nodulación (Ratner y Vinson, 1983; Zahedi y cols., 1992).

Uno de los componentes clave en la respuesta inmune de camarón es el sistema de activación de la proPO (Hernández-López y cols., 1996; Perazzolo y Barracco, 1997; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998), el cual involucra, en una primera etapa, proteínas plasmáticas de reconocimiento y que son capaces de unirse a compuestos microbianos como lipopolisacáridos (LPS) (Vargas-Albores y cols., 1993) o beta-glucanos (BG) (Vargas-Albores y cols., 1996; Vargas-Albores y cols., 1997; Vargas-Albores y G., 2000). Esta unión forma un complejo que puede ser reconocido por los hemocitos generándose una activación celular que concluye con la liberación de moléculas efectoras como la proPO, la transglutaminasa que es requerida para la coagulación, compuestos antibacterianos, lectinas, etc. (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998).

La proteólisis tiene un papel fundamental en la activación de moléculas efectoras como la proPO. Sin embargo, una vez activado el sistema, la actividad proteolítica debe ser bloqueada por inhibidores de proteinasas plasmáticos, como la $\alpha 2M$. En resumen, en camarón, como en otros animales, la respuesta inmune se lleva a cabo en tres procesos

perfectamente diferenciables: a) reconocimiento, b) liberación y activación de efectores y c) regulación.

Respuesta Celular

Los hemocitos son los responsables de la respuesta celular en camarón. Existen pocos estudios sobre los hemocitos de camarón en relación con su separación y/o clasificación y no son aplicables para análisis de rutina. Además, su origen y desarrollo ontogénico no han sido totalmente elucidados, lo que ha dificultado la clasificación de los hemocitos de crustáceos (Ratcliffe y cols., 1985; Hose y cols., 1990; Clare y Lumb, 1994).

Cada autor utiliza diferentes criterios y terminología por lo que la clasificación de hemocitos en crustáceos esta sujeta a discusión (Martin y Graves, 1985; Benjamin y James, 1987; Tsing y cols., 1989). Sin embargo, al igual que en otros crustáceos, las células de la hemolinfa del camarón, se han clasificado en tres poblaciones de hemocitos morfológicamente diferenciables: Células hialinas, células de gránulos pequeños y células de gránulos grandes (Vargas-Albores, 1992), las cuales pueden ser separadas por centrifugación en gradientes de Percoll (Vargas-Albores y cols., Submitted).

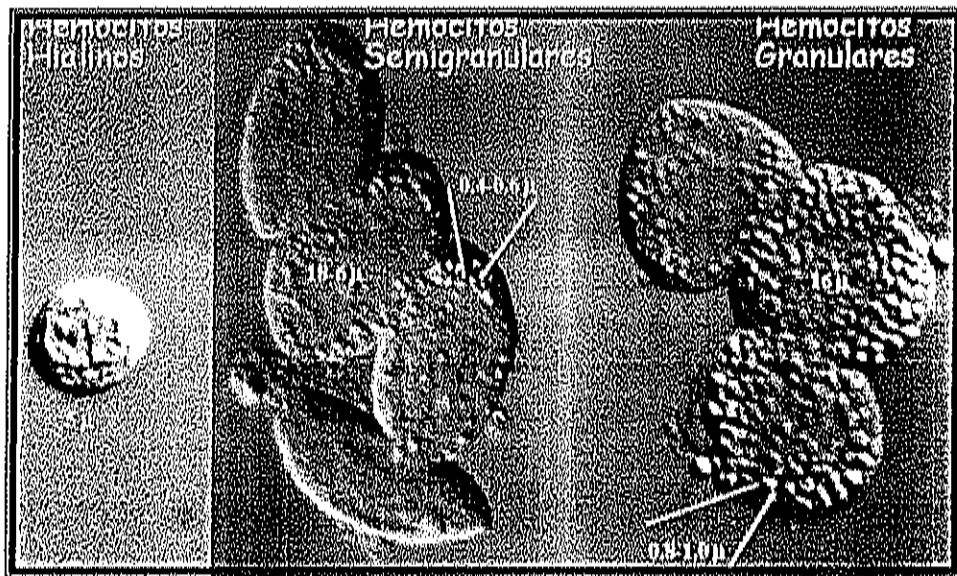


Figura 1: Tipos de hemocitos en hemolinfa de camarón, observados con microscopio compuesto a 40X y usando iluminación Köhler.

Debido a su alta susceptibilidad a cambios del medio ambiente, los hemocitos deben ser obtenidos con una solución anticoagulante diseñada con base a la composición iónica y osmótica de la hemolinfa del camarón (Vargas-Albores y Ochoa, 1992). Esta solución permite la recuperación de los hemocitos sin daño celular (Vargas-Albores y cols., 1993).

Respuesta Humoral

La respuesta humoral en camarón involucra proteínas de reconocimiento, actividades enzimáticas y moléculas antibacterianas. Dentro de las proteínas de respuesta inmediata o inmunidad innata reportadas en camarón se encuentran: factores hemolíticos (Guzmán-Murillo y cols., 1993), lectinas o aglutininas (Ratanapo y Chulavatnatol, 1990; Vargas-Albores y cols., 1992; Vargas-Albores y cols., 1993; Bacheré y cols., 1995; Maheswari y cols., 1997), proteínas

que se unen a beta glucanos (Vargas-Albores y cols., 1996; Vargas-Albores y cols., 1997) y péptidos antibacterianos (Destoumieux y cols., 1997). Además, cuando un patógeno entra en contacto con la hemolinfa del camarón se activan sistemas multiméricos como el sistema de coagulación que involucra una proteína de coagulación (CP) (Montaño-Pérez y cols., 1999; Yeh y cols., 1999), polimerizada por una transglutaminasa liberada de los hemocitos, y el sistema de activación de la proFC (Vargas-Albores y cols., 1993; Hernández-López y cols., 1996; Gollas-Galván y cols., 1997; Gollas-Galván y cols., 1999), dirigidos a aislar y eliminar el agente invasor.

Proteínas de Reconocimiento

En la hemolinfa del camarón se han detectado al menos dos proteínas de reconocimiento, una que se une a lipopolisacáridos (LPS) y otra que reconoce beta glucanos llamada BGBP por sus siglas en inglés (beta-glucan binding protein). La BGBP de camarón ha sido identificada como una proteína plasmática de 100 kDa que es idéntica a la proteína de alta densidad (HDL) aislada de plasma (Yepiz-Plascencia y cols., 1998). Por su parte la proteína que reconoce LPS se ha identificado como una lectina tetramérica con un peso molecular, en condiciones nativas, de 175 kDa, aglutina bacterias Gram negativas y actúa como opsonina estimulando fagocitosis (Vargas-Albores y cols., 1993; Vargas-Albores 1995)

Sistemas Efectores

El componente principal del sistema proFO en camarón es la enzima fenoloxidasa (FO), responsable de la melanización, que participa de manera importante en el proceso de reconocimiento y defensa y cuyo mecanismo de activación ha sido dilucidado (Hernández-López y cols., 1996).

Esta enzima se presenta en forma inactiva almacenada en gránulos citoplásmicos de las células sanguíneas del camarón (Vargas-Albores, 1995), una vez liberada la proFO es convertida en fenoloxidasa (FO) por acción de una proteinasa tipo serina que es dependiente de calcio (Gollas-Galván y cols., 1997). Tanto la proFO como la FO han sido caracterizadas bioquímicamente y se sabe que presentan un peso molecular de 114 y 107 kDa respectivamente (Gollas-Galván y cols., 1999).

Otra proteína que ha sido estudiada en camarón, es la responsable de la formación del coagulo en el proceso de coagulación. Hasta la fecha, se ha logrado dilucidar el mecanismo para este proceso y se sabe que la proteína tiene dos subunidades idénticas de 200 kDa y que en condiciones no reductoras su peso molecular es de 400 kDa (Montaño-Pérez y cols., 1999). Además se conoce su secuencia amino terminal y se ha demostrado es idéntica a la lipoproteína de muy alta densidad (VHDL) encontrada en el plasma de camarón (Yepiz-Plascencia y cols., 2001).

Regulación del Sistema Inmune

Los inhibidores de proteinasas plasmáticos participan de manera sustancial en la defensa por inactivación y eliminación de proteinasas que los patógenos utilizan como factor de virulencia. Además, estos inhibidores de proteinasas juegan un papel importante en los

procesos de defensa como la coagulación en *L. polyphemus* (Asokan y cols., 2000) y regulación de la activación del sistema proFO en invertebrados (Hergenbahn y Söderhäll, 1985; Hergenbahn y cols., 1988).

Una vez activado el sistema inmune éste realiza su función hasta que el estímulo desaparezca, por lo que debe ser controlado para evitar daños en los propios tejidos. En camarón, como en otros crustáceos, se ha detectado un inhibidor de proteinasas, con un peso molecular de 400 kDa (Gollas-Galván y cols., Enviado) y actividad parecida a la α 2macroglobulina (α 2M) de vertebrados que al parecer es regulador de la respuesta inmune.

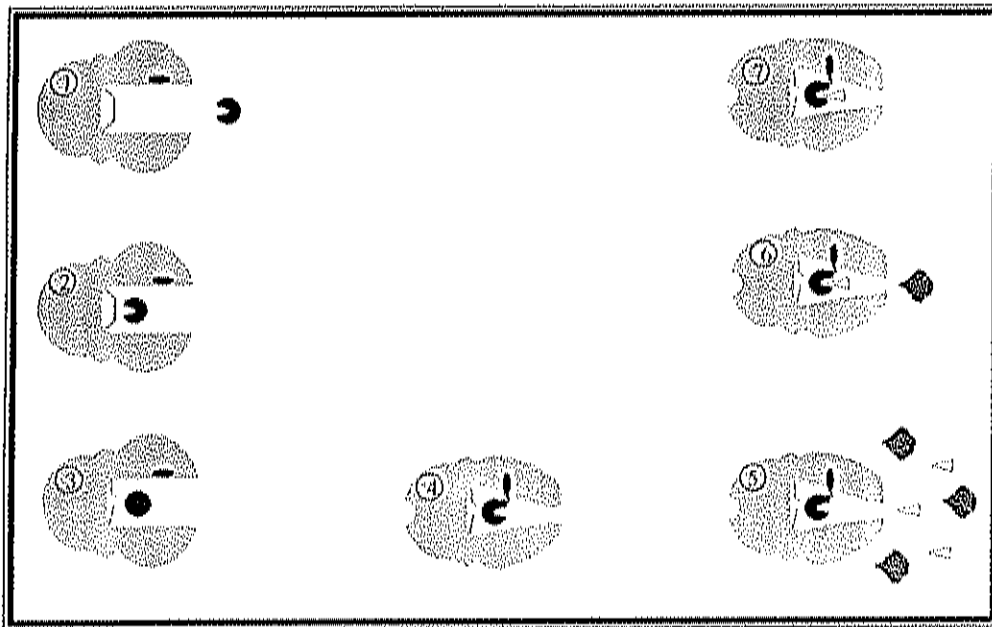


Figura 2: Esquema del mecanismo de acción de la α 2M. La proteínasa hidroliza la región "bite" (1, 2, 3) y se une a la α 2M por un enlace tiol en otra región de la molécula (4), este enlace produce un cambio conformacional de la molécula de α 2M pero no bloquea el sitio activo de la proteínasa atrapada. El cambio conformacional producido impide la interacción física de la proteínasa con sustratos de alto peso molecular (5) pero sustratos de peso molecular bajo si pueden ser hidrolizados (6, 7).

Los estudios realizados en crustáceos han permitido proponer un modelo de reacción inmune en donde compuestos de la superficie microbiana son reconocidos por moléculas plasmáticas o se unen directamente a los hemocitos, estimulando la liberación de moléculas que promueven la coagulación, melanización y destrucción directa de microorganismos, así como actividades celulares, incluyendo fagocitosis y encapsulación. Algunos de estos procesos involucran cascadas proteolíticas las cuales son reguladas por moléculas inhibitoras tales como la $\alpha 2M$.

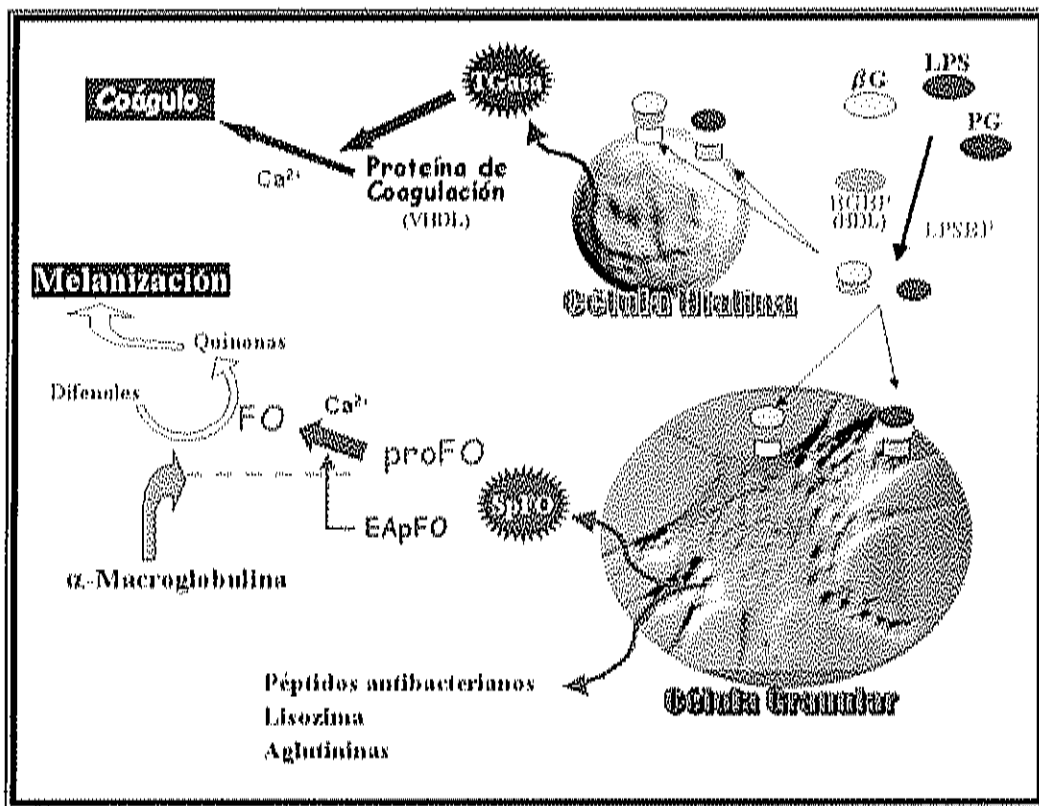


Figura 3: Representación esquemática del sistema inmune de camarón.

Tabla 1: Proteínas de respuesta inmune de camarón

Proteína	Peso Molecular (kDa) monómero	No. de Monómeros	Referencia
Proteína unidora de beta glucanos (BGBP)	100	1	(Vargas-Albores y cols., 1996; Vargas-Albores y cols., 1997)
Lectina unidora de LPS	175	4	(Vargas-Albores y cols., 1993); (Ratanapo y Chulavatnatol, 1990)
Proteína de Coagulación	200	2	(Montaño-Pérez y cols., 1999; Yeh y cols., 1999)
proFenoloxidasa/ Fenoloxidasa	114/107	1	(Gollas-Galván y cols., 1999; Sritunyalucksana y cols., 1999)
α 2-macroglobulina	210	2	(Gollas-Galván, Enviado)
Enzima Activadora de la proFenoloxidasa	36	1	(Gollas-Galván, En Preparación)
Lisozima	15.8	1	(Sotelo-Mundo y cols., Enviado)

Justificación

En la última década, la captura de camarón en México ha decrecido significativamente. Para satisfacer la creciente demanda de este crustáceo se ha acentuado el interés por optimizar la producción a través del cultivo. Sin embargo, para que el cultivo de camarón sea exitoso, se requieren resolver algunos problemas básicos. Uno de los principales problemas es el control de las altas mortalidades producidas por enfermedades durante el cultivo. Los tratamientos actuales son caros, presentan dificultades técnicas y afectan al medio ambiente.

La aparición de la enfermedad está relacionada al rompimiento del equilibrio entre el medio ambiente, la fisiología del hospedero y las estrategias invasivas del parásito. Sin embargo, para el caso del camarón y todas las especies acuáticas, el control de las condiciones del medio ambiente se dificulta por los volúmenes de agua empleados en los cultivos comerciales.

Por otra parte, los tratamientos contra los agentes causales, además de ser costosos y producir daños al medio ambiente, hasta ahora no han sido eficientes. Así, el conocimiento de las alteraciones fisiología del animal parece ser el camino más factible para controlar las enfermedades y, de ese modo, disminuir el riesgo de la inversión. Con base en lo anterior, una alternativa es el diagnóstico oportuno para prevenir y controlar las enfermedades del camarón, para ello se requieren métodos que permitan medir metabolitos, proteínas específicas plasmáticas y sus actividades con la sensibilidad necesaria para detectar variaciones en su concentración debidas a alteraciones fisiológicas.

Objetivo General

Adaptar y/o diseñar técnicas para medir las concentraciones de componentes plasmáticos (glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato y proteína total), así como algunas proteínas involucradas en el sistema de defensa del camarón (FO: fenoloxidasa, CP: proteína de coagulación o VHDL, BGBP: proteína que se une a beta glucanos o HDL y α 2M: alfa 2-macroglobulina). Adicionalmente se pretende buscar el mRNA de lisozima en hemocitos y hepatopáncreas de camarones inoculados con bacterias, utilizando la técnica de RT-PCR (transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa) y primers específicos.

Objetivos Específicos:

1. Adaptar métodos usados en clínica humana para medir la concentración de glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato y proteínas totales.
2. Desarrollar y evaluar el método de ELISA para la cuantificación de BGBP y CP en el plasma de camarón.
3. Desarrollar técnicas para la determinación de actividades enzimáticas asociadas a la respuesta inmune de camarón: FO (fenoloxidasa), proFO (profenoloxidasa) y lisozima.
4. Detectar la presencia de mRNA de lisozima en hemocitos y hepatopáncreas de camarón mediante la técnica de RT-PCR utilizando primers específicos.
5. Determinar modificaciones cualitativas y cuantitativas de componentes plasmáticos en camarón y/o en la expresión del gen de lisozima por inoculación de partículas inertes y bacterias.

Materiales y Métodos

Todos los materiales de plástico utilizados fueron adquiridos comercialmente libres de pirógenos o de calidad cultivo de tejidos. El material de vidrio se lavó y se trató con calor seco a 180°C en un horno (TAURUS plus) durante 4 horas para eliminar pirógenos. Los recipientes de plástico usados para preparación de reactivos fueron sumergidos durante 30 min. en una solución de E-toxa-clean al 1% (Sigma Chem. Co.), lavados con agua libre de pirógenos (agua inyectable PISA) y secados a 37°C. Todas las soluciones se prepararon con agua y reactivos libres de pirógenos.

Obtención de Hemolinfa

La hemolinfa fue extraída de la región ventral del camarón entre el último par de pereopodos y el primer par de pleópodos, en la siguiente relación: 1 volumen de hemolinfa en 2 volúmenes de anticoagulante, previamente enfriado. El anticoagulante se preparó disolviendo EDTA (10 mM) en solución isotónica para camarón (NaCl 450 mM; KCl 10 mM; HEPES 10 mM) ajustado a pH 7.3 (Vargas-Albores et al, 1993), la cual se menciona subsecuentemente como SIC.

Cuenta Total de Hemocitos

Se diluyeron 10 μ l de hemolinfa, en 90 μ l de anticoagulante previamente enfriado. Después de mezclar suavemente con la punta de una pipeta Pasteur o una micropipeta, se colocaron 10 μ l de la mezcla en una cámara de Neubauer (hematocitómetro) y las células fueron contadas utilizando microscopio compuesto a 400X.

Separación del Plasma y Lisado de Hemocitos

Después de la extracción, la hemolinfa se centrifugó a 700 *g* durante 10 min y 4°C, se retiró el plasma y se almacenó en refrigeración para cuantificar componentes plasmáticos. El paquete celular se lavó con anticoagulante y centrifugación a 700 *g* durante 5 min a 4°C. Finalmente se resuspendió, en el mismo volumen extraído, con regulador de cacodilatos (10 mM, pH 7.2) y se centrifugó a 15,000 *g*, 4°C durante 10 min. El sobrenadante o contenido granular de hemocitos se almacenó a -20°C hasta su uso. En otros experimentos, los hemocitos lavados y resuspendidos en cacodilatos, se sonicaron durante 2 pulsos de 10 segundos cada uno (intensidad 3) en un sonicador BRANDSON Sonifier 450 con punta para microtubo; finalmente se centrifugó a 15,000 *g*, 4°C durante 20 min y el sobrenadante llamado lisado de hemocitos, se guardó a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de Proteínas en Lisado de Hemocitos

Para cuantificar proteínas en lisado de hemocitos se usó el método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado para microplaca. Se colocaron

25 µl de muestra en una microplaca y se adicionaron 250 µl de reactivo de Bradford (100 mg de Coomassie Brilliant Blue G; 50 ml de etanol, 100 ml de ácido fosfórico al 85% y 850 ml de agua). Se incubó durante 10 min a 25-28°C y se leyó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se calculó en base a una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

Cuantificación de Proteínas Totales en Plasma de Camarón.

Para cuantificar proteínas en plasma o hemolinfa se usó el método de biuret (Coligan y cols., 1995). El cálculo de concentración de proteínas se realizó con una curva patrón de BSA.

Cuantificación de Metabolitos en Plasma de Camarón.

Para la determinación de glucosa en plasma de camarón se usó el método descrito en el kit comercial GOD-PAP No. 740393 (Merck). El lactato se evaluó usando el método de lactato oxidasa de acuerdo al kit comercial No. 735-10 (SIGMA Co.). La determinación de colesterol en plasma de camarón se evaluó por el método de CHOD-PAP descrito en el kit comercial No. 14394 (Merck) y para la determinación de acilglicéridos se usó el método GPO-PAP según el kit de Merck. Para calcular la concentración en todos los casos se usó una curva con el estándar correspondiente.

Determinación de Actividad Fenoloxidasa (FO).

La determinación de actividad FO en muestras de camarón, se realizó mediante el método de oxidación de L-DOPA adaptado para microplaca (Hernández-López y cols., 1996). Se colocaron 50 µl de

muestra y 50 µl de SIC en una microplaca y se adicionaron 50 µl de L-DOPA (3 mg/ml). Después de 10 min de incubación a 25-28°C se leyó la absorbancia a 490 nm. La actividad específica se calculó tomando en cuenta la concentración de proteínas.

Determinación del Contenido de Fenoloxidasa Total (proFO + FO)

La cantidad de fenoloxidasa total se midió incubando 50 µl de muestra con 50 µl de tripsina (1 mg/ml) a 25-28°C durante 5 min. Después de la incubación, durante 10 min adicionales, con 50 µl de L-DOPA, se midió la absorbancia a 490 nm y se calculó la actividad específica como en la determinación de FO. Para conocer la cantidad de FO presente en la muestra como enzima inactiva (proFO), se restó el valor de FO total del obtenido en la prueba de FO.

Preparación de Antígenos (BGBP y CP)

Se purificó BGBP y CP a partir de plasma de camarón usando cromatografía de afinidad de acuerdo a Vargas-Albores (Vargas-Albores y cols., 1997) y Montaña-Pérez (1999), respectivamente. Las proteínas purificadas se usaron como antígenos para generar anticuerpos y como estándares en las pruebas de ELISA. Los anticuerpos anti-BGBP fueron donados por la Dra Yepiz-Plascencia y se prepararon inoculando conejos con BGBP (0.1 mg) mezclado con adyuvante completo de Freund (1:1). Cada dos semanas se administraron refuerzos con adyuvante incompleto de Freund (Yepiz-Plascencia y cols., 2000). El suero obtenido por centrifugación, después de permitir la coagulación, se almacenó en congelación hasta su uso. Los anticuerpos anti-CP se prepararon de acuerdo a (Reyez-Izquierdo, 2000).

Técnica de ELISA

Para las pruebas de ELISA se usaron placas de poliestireno MaxiSorp™, y las siguientes soluciones: PBS (8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ en 1000 ml de agua deionizada) pH 7.3, PBS-Tween (PBS conteniendo 0.05% de Tween 20) y sustrato TMB (3,3' tetrametil benzidina disuelta en ácido acético 2 M y preparada a 1 mg/ml en regulador de citratos 0.5 M; pH 5.4, conteniendo 10 µl de Peróxido de Hidrógeno). Los antígenos, los anticuerpos y los bloqueadores se diluyeron en PBS y para los lavados se usó PBS-Tween. Como sistema detector se utilizó anti-IgG de conejo (SIGMA) conjugado a peroxidasa, diluido 1:40,000 en PBS. La reacción de color se detuvo por adición de ácido sulfúrico 1 N. La placa se leyó a 450 nm y la concentración de antígeno se determinó con una curva patrón del antígeno purificado correspondiente.

Determinación de Actividad de α_2 Macroglobulina (α_2 M)

Para detectar la actividad de α_2 M en plasma de camarón, se usó tripsina e inhibidor de tripsina de soya (STI) obtenidos comercialmente (SIGMA). Como sustrato se usó N α -Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BAPNA, obtenido de SIGMA) a una concentración de 1 mg/ml (disuelto en 50 µl de DMSO y 950 µl de HEPES 10 mM) y el color generado en la reacción se leyó a 415 nm. La concentración de proteinasa atrapada por la α_2 M, se calculó con una curva patrón de tripsina

Aislamiento de RNA de Hemocitos de Camarón

La hemolinfa extraída a 3 camarones (aproximadamente 3 ml) se centrifugó a 700 *g* durante 10 min a 4°C y los hemocitos se lavaron 2 veces con SIC preparado en agua libre de RNasas (tratada con 0,1% de DEPC y esterilizada). El paquete celular se colocó en un microtubo de 1,7 ml libre de RNasas, se adicionaron 500 µl de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; LiCl 500 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0; LiDS 1% y 5 mM dithiothreitol), se homogenizó y se agregaron 500 µl de fenol ácido (pH 4,3). Una vez mezclado, se agregaron 250 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó a 10,000 *g* durante 20 min a 4°C. La fase superior (acuosa), conteniendo el RNA, se transfirió a otro tubo y se agregaron 20 µl de RNAMATRIX (BIO 101), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugó a 10,000 *g* durante 1 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. El complejo RNA/RNAMATRIX se lavó 2 veces con 250 µl de regulador de lavado (etanol 75% en Tris-HCl 100 mM, pH 7,5) y se centrifugó a 10,000 *g* durante 1 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 25 µl de agua libre de RNasas, se incubó a 55°C durante 5 min, se transfirió el sobrenadante (RNA) a otro tubo. Se determinó la concentración de RNA midiendo la absorbancia a 360/380 nm, haciendo una dilución 1:100 de la muestra original y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Aislamiento de mRNA, Técnica de poli A⁺RNA

El mRNA se separó utilizando Dynabeads™. La muestra (75 µg en 100 µl de agua tratada con DEPC), se calentó a 65°C por 2 min y se colocó en un tubo conteniendo el equivalente a 200 µl de Dynabeads previamente lavadas. Se mezcló y se incubó durante 5 min a

temperatura ambiente para permitir la alineación por complementariedad de bases A=T. Las Dynabeads se separaron con un imán o por centrifugación a 5,000 *g* por 1 min, se eliminó el sobrenadante y se lavaron 2 veces con 200 μ l de regulador de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; LiCl 0.15 M; 1 mM EDTA). Después del último lavado, se eluyó el mRNA adicionando 20 μ l de agua tratada con DEPC y calentando a 65°C por 2 min. El sobrenadante, conteniendo el mRNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

Aislamiento de mRNA Directo (mRNA DIRECT™ Kit, Dynal Biotech).

Para el aislamiento de mRNA, directamente del tejido en mezcla de lisis, se usó el kit de Dynabeads mRNA DIRECT™ (Dynal Biotech). Los hemocitos se lavaron con SIC preparado en agua libre de RNasas y se mezclaron con 500 μ l de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5; LiCl 500 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0; 1% LiDS; 5 mM dithiothreitol) y se homogeneizó con un disruptor manual de tejidos. Se agregaron 200 μ l de dynabeads y se incubaron durante 5 min mezclando permanentemente. Se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 200 μ l de regulador de lavado A (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; LiCl 0.15 M; EDTA 1 mM y LiDS 0.1%). Las dynabeads se transfirieron a un tubo limpio y se lavaron 2 veces con regulador de lavado B (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; LiCl 0.15 M y EDTA 1 mM). Finalmente, se resuspendieron en 20 μ l de agua libre de RNasas y se eluyó el mRNA calentando a 65°C durante 2 min almacenándose a -20°C hasta su uso.

Oblención de cDNA

El cDNA fue sintetizado a partir de mRNA usando la transcriptasa reversa SuperScript II (Life Technologies, Gibco BRL). Aproximadamente 40 ng de mRNA fue transcrito con 200 unidades de SuperScript II y 1 μ l de oligo-dT 1 μ M en un volumen total de 20 μ l, a 42 °C durante 1 h. La reacción fue detenida por incubación a 75 °C durante 10 min. Para la reacción de PCR, se usó la cantidad de cDNA correspondiente a 40 ng del mRNA original. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo (Laemmli, 1970) al 10% teñido con nitrato de plata.

Técnica de RT-PCR

Alternativamente, se utilizó la técnica de RT-PCR (GeneAmp, EZ rTth RNA PCR Kit; rTth DNA Polymerase & EZ buffer pack Perkin-Elmer) para amplificar el mRNA en un solo paso. Con este método se realiza la transcripción reversa y la amplificación por PCR en el mismo tubo. Se usó 1 μ g de mRNA en cada prueba y se adicionaron los componentes de la reacción de acuerdo a la tabla 2. Una vez agregados los reactivos en el tubo, se colocó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) y se realizó la reacción de RT-PCR de acuerdo al siguiente protocolo: 60 min a 60°C, 2 min a 94°C, 40 ciclos de 45 seg 94°C/45 seg 60°C y finalmente 7 min a 72°C.

Tabla 2: Volúmenes de reactivos usados en la técnica de RT-PCR. Se usó un oligo arbitrario denominado A5 con la siguiente secuencia: 5'-AATCTAGAGCTCCCTCCA-3'.

Componente	Muestra (µl)	Control (+) (µl)	Control (-) (µl)
Agua tratada con DEPC y UV	24.0*	23.0*	22.5*
Buffer EZ (5X)	10.0	10.0	10.0
dGTP	1.5	1.5	1.5
dATP	1.5	1.5	1.5
dTTP	1.5	1.5	1.5
dCTP	1.5	1.5	1.5
rTth DNA Polimerasa	2.0	2.0	2.0
Solución de Mn(OAc) ₂ (25 mM)	5.0	5.0	5.0
Oligo DM 151		1.5	1.5
Oligo DM 152		1.5	1.5
RNA pAW109		1.0	
Oligo experimental A5*	1.5*		1.5*
RNA (muestra experimental)	1.5		
Volumen total	50	50	50

* Los volúmenes se ajustaron en cada muestra de acuerdo a la concentración de mRNA.

Electroforesis de RNA en Agarosa 1%.

Para determinar la calidad del RNA obtenido se utilizó el método de electroforesis en agarosa desnaturizante. Se preparó un gel de agarosa al 1% en MOPS libre de RNasas, conteniendo 1.23 ml de formaldehído al 37 %. La muestra se preparó mezclando 1 volumen de muestra con 1 volumen de regulador de carga 2x, se calentó durante 15 min a 65°C para eliminar estructuras secundarias, se mantuvo en hielo para adicionarle 1 µl de bromuro de etidio y se colocó en el gel. La electroforesis se corrió a 50 V hasta que el colorante migró 3/4 del

gel y se observó con luz UV. El gel fue fotografiado utilizando un sistema de fotodocumentación (Kodak Digital Science DC120).

Electroforesis de los Productos de PCR en Geles de Poliacrilamida.

El análisis de los productos de PCR se realizó en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10%. Se mezclaron 10 µl de muestra y 10 µl de regulador de carga (azul de bromofenol, 0.25%; cyanol xileno, 0.25% y glicerol, 39%). La mezcla se colocó en un pozo del gel y la electroforesis se corrió a 20 mA constantes durante 2 h, utilizando TRIS-Boratos pH 8.0 como regulador de corrida. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con nitrato de plata y se calculó el peso molecular utilizando estándares comerciales.

Tinción con Nitrato de Plata para DNA en Geles de Acrilamida

Para analizar el patrón de bandas obtenido en la electroforesis de poliacrilamida, se usó la tinción con nitrato de plata de acuerdo a Wallace (1997). El gel se sumergió en solución fijadora (5 ml de etanol absoluto, 250 µl de ácido acético glacial y 44.75 ml de agua deionizada) durante 10 min con un recambio de solución a los 5 min y se lavó durante 10 min con agua deionizada. Posteriormente, el gel se incubó durante 10 min con solución acuosa de nitrato de plata al 0.1% y se lavó 4 veces durante 10 seg cada una, con agua deionizada. Para revelar las bandas, el gel se sumergió en solución de revelado (1 volumen de NaOH 3% y 1 volumen de formaldehído 0.3%) el tiempo necesario para que las bandas fueran aparentes (regularmente 20 min). La reacción se detuvo sumergiendo el gel en carbonato de sodio 0.075% y el patrón de bandas se analizó por fotodocumenación.

Actividad de Lisozima

Las células, obtenidas de 1 ml de hemolinfa, se resuspendieron en 500 μ l de agua destilada estéril libre de pirógenos y se sonicaron, en baño de hielo, durante 2 pulsos de 10 seg. El sonicado se centrifugó a 15,000 *g* durante 20 min a 4°C y se determinó la actividad de lisozima en el sobrenadante. Se prepararon placas con agarosa al 1.2% (aprox 15 ml por placa) en regulador de fosfatos (NaH_2PO_4 0.05 M, pH 6.8) conteniendo 0.5 mg/ml de *Micrococcus luteus*. Se hicieron perforaciones de 4 mm de diámetro y se colocaron 20 μ l de muestra. Se incubó la placa a 37°C durante 24 h y la actividad se determinó midiendo el diámetro de lisis alrededor de los pozos y comparando con una curva patrón de lisozima de huevo comercial (SIGMA). Para aumentar el contraste en los resultados, las placas se tiñeron por 1 min con el colorante y se destiñeron durante 2 h con agua destilada.

La actividad de lisozima también se midió en líquido de acuerdo al método de (Shugar, 1952). Se incubaron 250 μ l de una suspensión de *M. luteus* 0.5 % en fosfatos, con 20 μ l de muestra, a 37°C durante 2 h. Se midió la absorbancia a 450 nm y la actividad de lisozima se calculó obteniendo la diferencia de absorbancia entre el control negativo y la muestra utilizando una curva patrón de lisozima de huevo comercial. Para algunos experimentos se usaron micrococcus teñidos, el paquete bacteriano se tiño durante 1 min y se lavó con agua utilizando centrifugación.

Inoculación de Partículas Inertes en Camarón

Lotes de 10 camarones con peso promedio de 18 g se mantuvieron en el laboratorio, al menos una semana antes de la inoculación, en agua marina preparada a 36 ppm de salinidad y temperatura de 25°C, con aireación a saturación de oxígeno. Se prepararon suspensiones (10 partículas/ μ l) de Sephadex G15, CM-Sephadex C25 y DEAE-Sephadex A25 en SIC. Se inyectaron 50 μ l de cada una de las suspensiones en el músculo de la región dorsal de los camarones. Los animales se sangraron 24 h después de la inoculación y la hemolinfa se usó para medir parámetros hemáticos.

Inoculación de *Vibrio alginolyticus*

Se usó un cultivo de 24 horas de *Vibrio alginolyticus* en caldo marino (Difco Laboratories). Las bacterias se inactivaron por autoclave (121°C y 15 psi) durante 30 min y se centrifugaron a 2,000 *g* durante 20 min. El paquete se resuspendió en SIC y se ajustó a 0.5 de absorbancia a 600 nm. Se inyectaron 50 μ l de suspensión bacteriana en el músculo de la región dorsal de los camarones y se mantuvieron en observación. Los animales se sangraron 24 h después de la inoculación y la hemolinfa se usó para medir parámetros hemáticos. En otros experimentos, los camarones inoculados con bacterias se sangraron 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 y 24.0 h después de la inoculación.

Resultados y Discusión

En los últimos años la industria acuícola ha estado demandando herramientas que permitan conocer el estado fisiológico y de salud de los camarones en cultivo. Una alternativa es determinar la composición química del plasma, observar sus cambios y detectar moléculas que puedan usarse como marcadores del estado de salud. Para ello se requieren métodos que permitan medir componentes plasmáticos de camarón con la suficiente sensibilidad para detectar variaciones en su concentración debidas a alteraciones fisiológicas. Sin embargo, las características salinas del plasma de camarón son diferentes a las del plasma de los vertebrados, lo que hace necesario evaluar la influencia de la salinidad, en la cuantificación de parámetros plasmáticos de camarón.

La medición de moléculas relacionadas con el sistema de defensa del camarón ha sido usada en algunas condiciones experimentales incluyendo infecciones, nutrición o para evaluación de inmunostimulantes (Le Moullac y cols., 1997; Le Moullac y cols., 1998; Sanchez y cols., 2001). Sin embargo, la falta de información de todos los componentes de defensa o su importancia y correlación no ha permitido obtener resultados concluyentes. Por ejemplo, la cuenta total y diferencial de hemocitos se ha usado para evaluar el efecto de las infecciones y diferentes dietas; sin embargo, no ha sido considerado como un parámetro adecuado, debido a que se modifican en condiciones fisiológicas como muda (Tsing y cols., 1989; Le Moullac y cols., 1997) y reproducción (Sanchez y cols., 2001).

Uno de los principales problemas técnicos para el estudio de parámetros plasmáticos en camarón es la dificultad para tomar muestras de hemolinfa en animales pequeños (menos de 8 g). Debido a que, el volumen de hemolinfa que puede ser extraído es

directamente proporcional al tamaño del animal el uso de microtécnicas es una excelente alternativa. Los métodos en microplacas permiten reducir el volumen de muestra necesario y varias muestras pueden ser analizadas en forma simultánea.

Aunque el uso de la solución anticoagulante diseñada para camarón previene la lisis y activación celular (Vargas-Albores y cols., 1993), el problema es calcular con precisión la cantidad de hemolinfa colectada directamente en la solución anticoagulante. Una forma es pesar la jeringa con anticoagulante antes y después de la colecta pero este proceso requiere tiempo. Por ello, un parámetro interno como la concentración de proteína, puede ser usado para estimar la cantidad de hemolinfa extraída y para normalizar los resultados.

Determinación de Proteínas Totales en Hemolinfa

Los métodos de Bradford (Bradford, 1976) y BCA (Redinbaugh y Turley, 1986) han sido ampliamente usados para cuantificar proteínas en muestras biológicas con un intervalo entre 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estas técnicas, además de sensibilidad y precisión, tienen la ventaja de ser rápidas. Sin embargo, debido a que las concentraciones de proteína en el plasma de camarón sobrepasa el intervalo de detección de las técnicas de Bradford y BCA, se propuso usar el método de biuret, con intervalo de detección entre 1 y 10 mg/ml .

En la técnica de biuret se utiliza 1 ml de muestra y 4 ml de reactivo de tal manera que la muestra queda diluida 5 veces en la reacción (Coligan y cols., 1995). El intervalo de detección de la prueba es de 0.2 a 2 mg de proteína/reacción).

En este trabajo el método fue modificado para realizarse en un sistema de microplaca, utilizando 10 μ l de muestra y 200 μ l del reactivo de biuret. Esta dilución modificó el nivel de detección entre 4.2 y 42 mg/ml. Debido a que la concentración promedio de proteína total en hemolinfa de camarón es de 100 mg/ml, y por la dilución con el anticoagulante llega aproximadamente a 33 mg/ml, el intervalo de detección resulta adecuado y no requiere diluciones posteriores. La curva patrón de BSA se hizo en el intervalo lineal entre 5 y 50 mg/ml (figura 4).

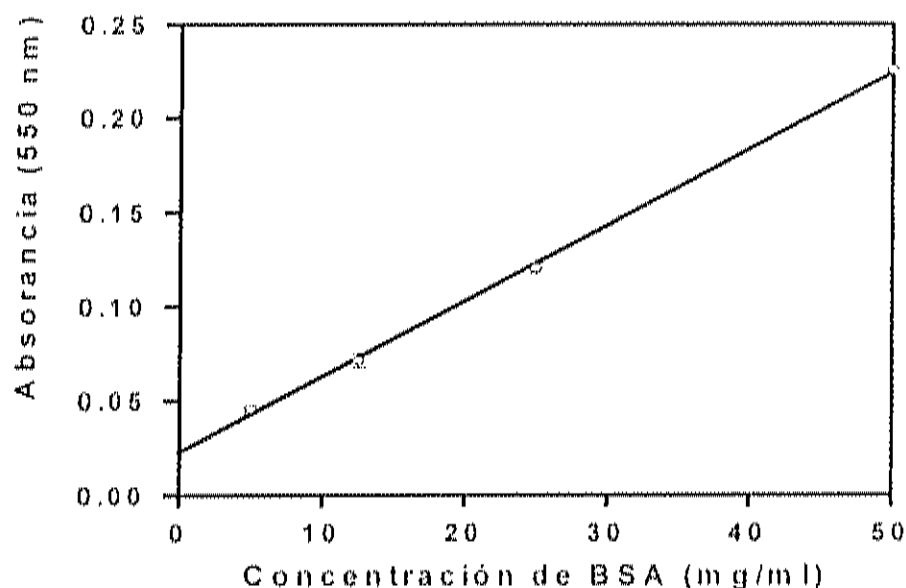


Figura 4: Curva patrón de proteína total utilizando la técnica de biuret. Se usó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 6 repeticiones.

El método de biuret es utilizado en clínica humana para cuantificar el contenido de proteína total en suero. Sin embargo, ya que el camarón tiene tres veces más concentración de sal (0.45 M) que el humano (0.15 M), para utilizar este método en plasma de camarón se debía

demostrar que la alta salinidad en las muestras de camarón no influyeran en la prueba. Al cuantificar BSA disuelta en solución de NaCl 450 mM, SIC o solución anticoagulante, se observó que no hay interferencias en la prueba de biuret.

Basados en estos resultados y en el intervalo de detección de la prueba, se propuso utilizar directamente el plasma obtenido en SIC-EDTA, sin necesidad de otras diluciones. Esto representa una ventaja en comparación con las técnicas de Bradford o BCA donde el plasma tendría que ser diluido aproximadamente 500 veces, aumentando el tiempo de la prueba y la posibilidad de error por un mayor manejo. Adicionalmente, se comparó la concentración de proteína total determinada en plasma o en hemolinfa completa (sin centrifugar para separar el paquete celular y el plasma). De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 25$) entre los dos procesos por lo que es posible el uso de hemolinfa completa para la cuantificación de proteína total en camarón. El hecho de no detectar diferencias de concentración de proteína total entre plasma y hemolinfa se debe probablemente a que la aportación de proteínas por los hemocitos (menor al 1%) no es significativa, sobre todo si se considera que el coeficiente de variabilidad de la prueba en muestras de camarón es del 10%. Con base en estos resultados, se concluye que la cuantificación de proteína total en hemolinfa de camarón es un método simple, preciso y rápido que se realiza de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3: Técnica para la cuantificación de proteína total en hemolinfa de camarón.

1	Colocar 10 µl de hemolinfa (obtenida 1:3 en anticoagulante) en el pozo de una microplaca.
2	Agregar 200 µl de reactivo de biuret
3	Incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
4	Leer absorbancia a 550 nm
5	Calcular la concentración en base a una curva estándar de BSA disuelta en SIC-EDTA (5 y 50 mg/ml).

Determinación de Metabolitos

Otros parámetros plasmáticos en camarón han sido utilizados como indicadores del estado fisiológico o sus modificaciones por dietas, muda y reproducción (Chan y cols., 1988; Rosas y cols., 1992; Hall y Van, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000). Con la intención de contar con métodos fáciles, rápidos y sensibles, se utilizaron kits comerciales para cuantificar la concentración de glucosa, lactato, colesterol y acilglicéridos en el plasma del camarón.

Estos kits han sido perfectamente probados en la clínica humana pero el efecto de las condiciones salinas de la hemolinfa del camarón no ha sido investigado. Por ello, se compararon las curvas de calibración utilizando solución salina (0.15 M) y SIC (0.45 M) para la cuantificación de glucosa, lactato, colesterol y acilglicéridos. Como se puede ver en la figura 5, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los componentes plasmáticos analizados.

Además, se investigó la factibilidad de reducir los volúmenes de muestra y reactivos utilizando microplacas de 96 pozos. Comparando la técnica tradicional estandarizada para celdas de 1 ml con el método

en microplaca no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) cuando se analizaron muestras en forma simultánea y repetida.

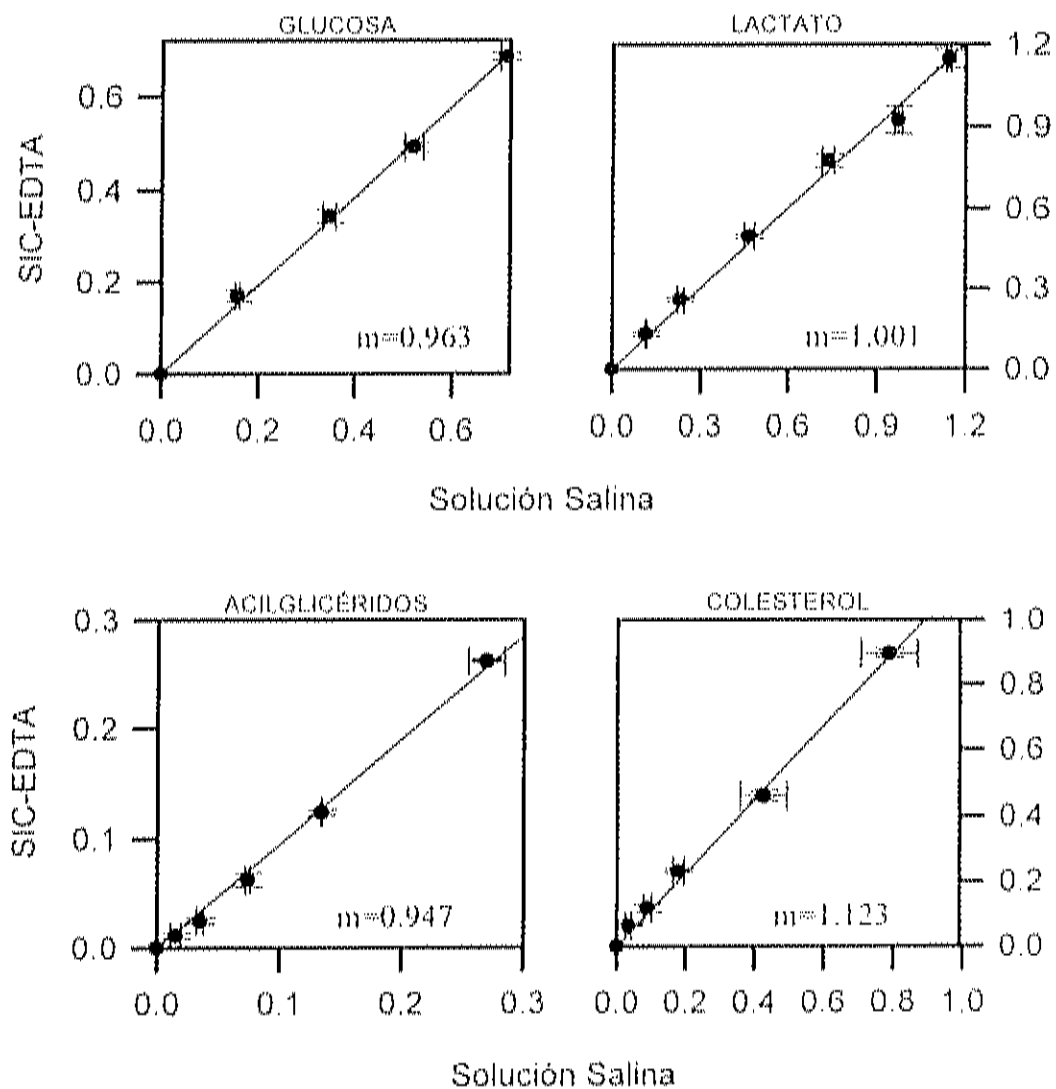


Figura 5: Correlación entre el uso de solución salina 0.15 M o SIC-EDTA como diluyente en las técnicas de glucosa, colesterol, acilglicéridos y lactato. Las barras representan el error estándar.

Las curvas de calibración para cada técnica se hicieron tomando las condiciones establecidas en el protocolo original para cada kit. Los resultados de la estandarización son discutidos con mas detalle en la publicación 2 anexa a este documento y las técnicas son presentadas en las tablas 5, 6, 7 y 8.

En resumen, se logró establecer un sistema de microplaca para medir glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato y proteína total en hemolinfa de camarón, utilizando kits comerciales. La alta salinidad de la hemolinfa, o la presencia de EDTA (usado como anticoagulante) influyeron en la eficiencia de la prueba.

Tabla 4: Técnica para la cuantificación de glucosa en hemolinfa de camarón.

1	Colocar 10 μ l de hemolinfa en el pozo de una microplaca.
2	Agregan 200 μ l de solución reactiva para glucosa.
3	Incubar a temperatura ambiente durante 30 min ó 37°C durante 10 min.
4	Leer la absorbancia a 490 nm.
5	Calcular la concentración con una curva estándar de glucosa diluida en SIC-EDTA, con un intervalo entre 0.1 y 1 mg/ml.

Tabla 5: Técnica para la cuantificación de colesterol en hemolinfa de camarón.

1	Colocar 10 μ l de hemolinfa en el pozo de una microplaca.
2	Agregan 200 μ l de solución reactiva para colesterol.
3	Incubar a temperatura ambiente durante 30 min ó 37°C durante 10 min.
4	Leer la absorbancia a 490 nm.
5	Calcular la concentración con una curva estándar de colesterol diluido en SIC-EDTA, con un intervalo entre 0.03 y 2 mg/ml.

Tabla 6: Técnica para la cuantificación de acilglicéridos en hemolinfa de camarón.

1	Colocar 10 μ l de hemolinfa en el pozo de una microplaca.
2	Agregan 200 μ l de solución reactiva para acilglicéridos.
3	Incubar a temperatura ambiente durante 30 min ó 37°C durante 10 min.
4	Leer la absorbancia a 540 nm.
5	Calcular la concentración con una curva estándar de glicerol diluido en SIC-EDTA, con un intervalo entre 0.03 y 2 mg/ml.

Tabla 7: Técnica para la cuantificación de lactato en hemolinfa de camarón.

1	Colocar 10 μ l de hemolinfa en el pozo de una microplaca.
2	Agregan 200 μ l de solución reactiva para lactato.
3	Incubar a temperatura ambiente durante 30 min ó 37°C durante 10 min.
4	Leer la absorbancia a 540 nm.
5	Calcular la concentración con una curva estándar de lactato diluido en SIC-EDTA, con un intervalo entre 1 y 20 mg/ml.

Técnicas Inmunoenzimáticas

El primer paso involucrado en la respuesta inmune de camarón es el reconocimiento. En el plasma de camarón se han detectado proteínas que pueden reconocer compuestos microbianos como LPS (Vargas-Albores y cols., 1993) o beta-glucanos (Hernández-López y cols., 1996; Vargas-Albores y G., 2000). La proteína que reconoce beta-glucanos, llamada BGBP (Beta Glucan Binding Protein), es una proteína plasmática de 100 kDa que se purifica de forma relativamente simple (Vargas-Albores y cols., 1996; Vargas-Albores y cols., 1997). El plasma es dializado contra agua destilada y la BGBP purificada a partir del precipitado por cromatografía de afinidad usando heparina como ligando (Jiménez-Vega, en prensa).

Debido a que la BGBP no tiene actividad enzimática, para su cuantificación fue necesario diseñar un método inmunoenzimático (ELISA). La BGBP fue purificada y se usó para obtener anticuerpos de conejo anti-BGBP de acuerdo a Yepiz-Plascencia y cols., donde presentó una alta antigenicidad produciendo títulos adecuados de anticuerpos (comprobados por Western Blot) para los análisis cuantitativos (Yepiz-Plascencia y cols., 2000).

Otra proteína involucrada en el sistema de defensa del camarón es la proteína de coagulación (CP). Esta proteína plasmática es polimerizada por una transglutaminasa liberada de las células hialinas para formar el coágulo. Se ha detectado que la CP es una proteína con un peso molecular de 400 kDa (Montaño-Pérez y cols., 1999; Yeh y cols., 1999) que se purifica del plasma de camarón mediante cromatografía de afinidad a heparina (Montaño-Pérez y cols., 1999). De la misma forma que la BGBP, la CP tampoco presenta actividad que pueda ser medida por métodos coloriméticos, por lo que también se implementó un método inmunoenzimático para medir su concentración en plasma de camarón.

Se ha demostrado que tanto BGBP como CP son proteínas involucradas también en el transporte de lípidos. Mientras que CP presenta identidad con la lipoproteína de muy alta densidad (VHDL) aislada del plasma de camarón por gradientes de densidad (Yepiz-Plascencia y cols., 2001), la BGBP es idéntica a la lipoproteína de muy alta densidad (HDL) (Yepiz-Plascencia y cols., 1998) que se sintetiza en el hepatopáncreas (Yepiz-Plascencia y cols., 2000).

Los inmunoensayos son métodos útiles para determinar la concentración de proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos generados en animales de laboratorio como conejos o ratones. Existen varios sistemas pero todos se basan en el uso de un anticuerpo acoplado a un sistema detector que puede ser un compuesto radioactivo, fluorescente o un sistema enzimático. En este último caso, el sistema denominado ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) presenta menos riesgos y no requiere equipo sofisticado como detectores de radiación o fluorescencia. La técnica de ELISA ha sido ampliamente usada en diferentes campos de las ciencias biológicas y presenta un nivel de detección de 1 a 10 µg/ml (Voller y cols., 1979).

Existen varios sistemas de ELISA que pueden ser elegidos dependiendo del caso particular: a) directo, donde se usa el primer anticuerpo marcado b) indirecto, donde el anticuerpo marcado es una inmunoglobulina producida contra el primer anticuerpo, c) tipo "sandwich" donde se usan placas recubiertas con anticuerpos y el sistema detector es el mismo anticuerpo pero marcado con una enzima y d) tipo competencia o inhibición donde el antígeno purificado es adsorbido a las placas y la muestra se agrega mezclada con una concentración conocida de anticuerpo. En este sistema el desarrollo de color es inversamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra (figura 6).

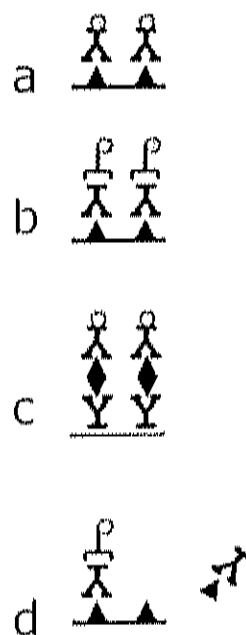


Figura 6: Tipos diferentes de sistemas de ELISA. a) directo, b) indirecto, c) tipo "sandwich" y d) competencia o inhibición.

La fase sólida es uno de los puntos clave en la técnica de ELISA. Existen dos tipos de plástico comercialmente disponibles para los ensayos: MaxiSorp y PolySorp. Los proveedores recomiendan

MaxiSorp para adsorber preferentemente inmunoglobulinas y PolySorp para antígenos más hidrofóbicos como glicoproteínas. Cuando se compararon microplacas de los dos tipos de material para la adsorción de BGBP y CP, se observó que las placas MaxiSorp presentaron una mayor capacidad de adsorción por lo que se eligió este tipo de placas para todas las pruebas de ELISA realizadas en este trabajo.

Aunque el fabricante indica que la capacidad máxima de adsorción de la placa es de 100 ng de proteína/pozo, se realizó una curva de adsorción de BGBP y CP para garantizar la máxima cantidad adsorbida. De acuerdo a los resultados observados en la figura 7, la máxima capacidad de adsorción de BGBP fue de 100 ng/pozo, mientras que se requirieron 200 ng/pozo para saturar la placa con CP, por lo que se adoptaron estas concentraciones como las óptimas para cada prueba.

Como diluyente de los antígenos para la inmovilización se han utilizado reguladores de boratos pH 8.0 (Lee y Walker, 1995) y PBS pH 7.3 (Hernández-López, 1985) los cuales se probaron para diluir el antígeno. Aunque no se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$), se eligió al PBS, pH 7.3 debido a que esta misma solución se usa para los procesos de lavado.

Una vez adsorbido el antígeno en las placas, éstas deben ser tratadas con una proteína, no relacionada con el sistema, para bloquear los sitios no cubiertos por el antígeno. Los dos bloqueadores más usados son la albúmina sérica bovina (BSA) (Adams, 1991; Lee y Walker, 1995) y la leche descremada (Agundis y cols., 2000). Sin embargo, otros bloqueadores, como gelatina (Tsukimura y cols., 2000) y glicina

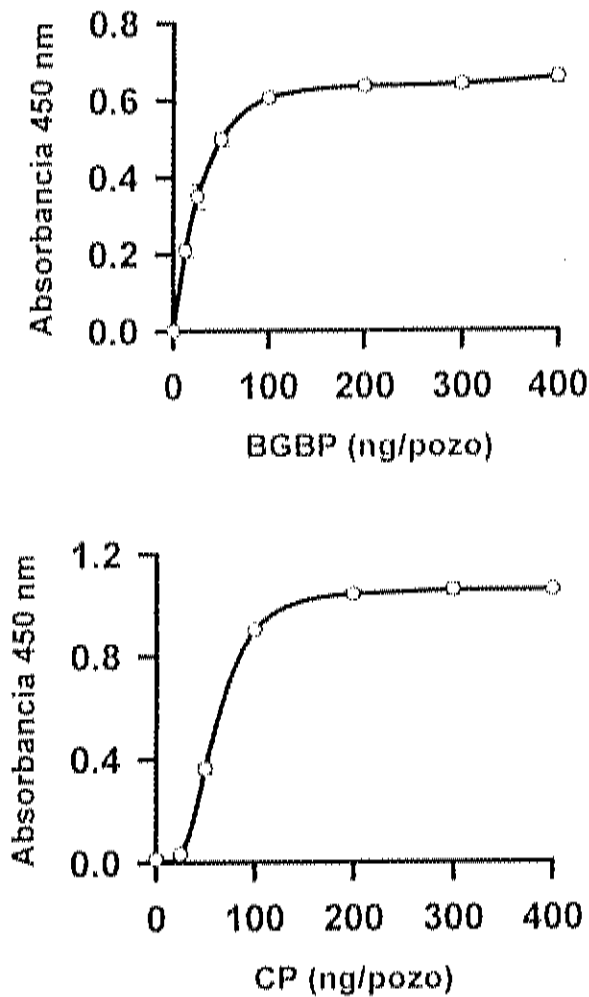


Figura 7: Curvas de titulación de antígeno. En ambos caso se usaron placas MaxiSorp. La máxima adsorción observada fue de 100 ng/pozo para BGBP (A) y 200 ng/pozo para CP (B).

(Santos-Argumedo y cols., 1986), también han sido usados para este tipo de pruebas por lo que se decidió analizar la eficiencia de estos 4 bloqueadores para elegir el que produjera las menores reacciones inespecíficas. De acuerdo a los resultados observados en la figura 8. BSA y glicina fueron los mejores bloqueadores. De éstos, se eligió el uso de glicina 2% porque es mas barato y es más estable, cuando se almacena en refrigeración, que la BSA.

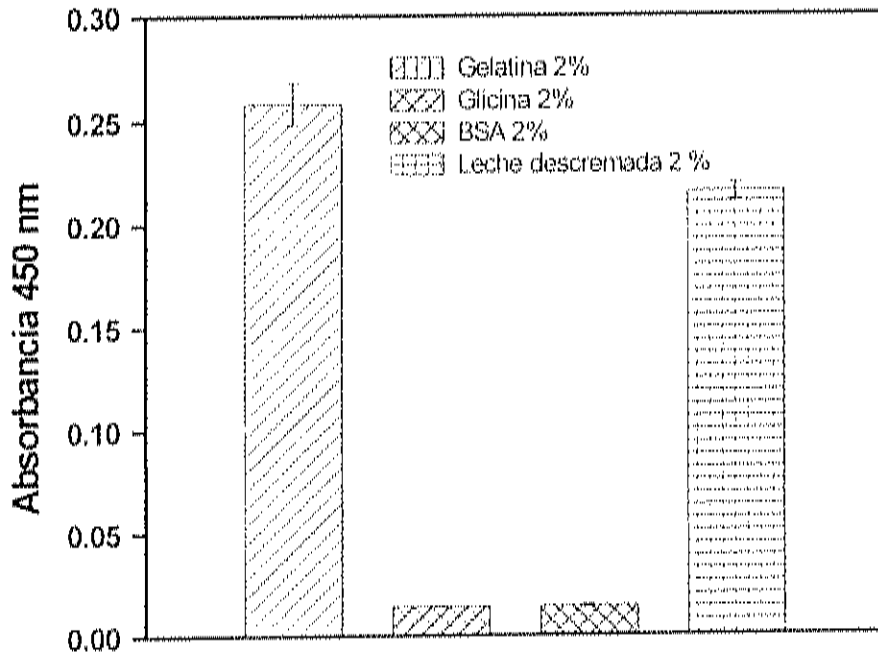


Figura 8: Comparación de 4 soluciones bloqueadoras para la prueba ELISA. Las menores reacciones inespecíficas fueron obtenidas con BSA y glicina. Los valores representan el promedio de 7 repeticiones \pm el error estándar.

Una vez elegida la fase sólida, la concentración de antígeno y el bloqueador, se realizaron ensayos con el sistema completo (antígeno, anticuerpo, conjugado y sustrato). Debido a que en el método indirecto solo se requiere generar los anticuerpos contra el antígeno de interés y todos los demás componentes pueden ser adquiridos comercialmente, este método fue la primera opción para medir BGBP y CP en el plasma del camarón.

Uno de los principales problemas de la técnica de ELISA son las reacciones inespecíficas, generalmente producidas por reacciones antigénicas cruzadas, incluso con el segundo anticuerpo o conjugado o bien por un proceso de bloqueo deficiente. Utilizando el sistema

indirecto de ELISA se obtuvieron constitutivamente reacciones inespecíficas altas las cuales no pudieron ser reducidas por ninguno de los métodos probados como fueron mayor dilución del conjugado y mayor concentración de bloqueador.

Considerando que la hemocianina, principal componente de la hemolinfa (Chen y Cheng, 1993), es una proteína altamente inmunogénica que presenta gran diversidad de epitopes, es posible que su presencia interfiriera en el proceso aumentando las reacciones inespecíficas generadas por reacciones antigénicas cruzadas. Además, debido a que el sistema indirecto de ELISA implica la inmovilización del plasma en la placa, es posible que la mayor concentración de proteína adsorbida fuera hemocianina y solo un bajo porcentaje de antígeno pudiera ser adherido a la placa, lo que reduce la sensibilidad de la prueba.

Una alternativa para evitar el problema de las reacciones inespecíficas fue la implementación de una técnica de ELISA tipo competencia o inhibición. En este método, el antígeno purificado se unió previamente a las placas, se bloquearon con glicina 2% y se agregaron los anticuerpos (anti-BGBP ó anti-CP) mezclados con el plasma. La unión del antígeno contenido en el plasma, con los anticuerpos específicos, evita por competencia la unión con el antígeno previamente adherido a las placas. Esto se traduce en una disminución de color por la reducción en la concentración de conjugado que se une al sistema. Paralelamente se prepararon pozos con anticuerpos no inhibidos para calcular el porcentaje relativo de inhibición. La concentración de los antígenos se calculó con curvas patrón generadas con BGBP ó CP purificadas a partir de plasma de camarón.

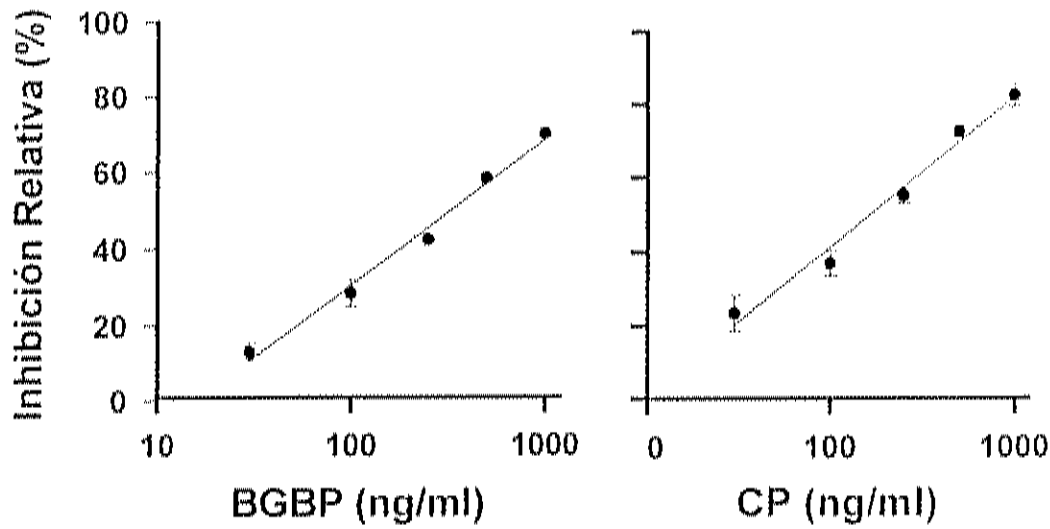


Figura 9: Curva patrón de BGBP (A) y CP (B) de camarón, realizada por ELISA tipo competencia o inhibición.

Las condiciones obtenidas para los ensayos de ELISA-inhibición, consistentemente produjeron curvas estándar con intervalos de detección entre 30 y 1000 ng/ml en ambos antígenos (figura 9) y el proceso completo involucra los pasos enlistados en la tabla 8.

Tabla 8: Técnica para cuantificar BGBP o CP en plasma de camarón.

1	Inmovilizar el antígeno agregando 100 µl de BGBP 1 µg/ml o CP 2 µg/ml, diluidos en PBS.
2	Incubar durante 1 h a 37°C.
3	Lavar 3 veces con PBS-Tween.
4	Incubar durante 1 h a temperatura ambiente con Glicina 2%.
5	Lavar tres veces con PBS-Tween.
6	Agregar 50 µl de muestra y 50 µl de anti-suero diluido 1:500 en PBS (preparar un control utilizando PBS en lugar de muestra).
7	Incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
8	Lavar tres veces con PBS-Tween.
9	Agregar 100 µl de conjugado de peroxidasa diluido en PBS e incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
10	Lavar cinco veces con PBS-Tween.
11	Agregar 100 µl de substrato (TMB) e incubar durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
12	Agregar 50 µl de ácido sulfúrico 1 N.
13	Leer a 450 nm.
14	Calcular la concentración de BGBP o CP utilizando una curva estándar de BGBP o CP purificados de plasma de camarón.

Con la finalidad de reducir el tiempo de ensayo, se probó el uso de placas con antígeno previamente inmovilizado, bloqueadas y almacenadas a 4°C, esto permitió reducir el tiempo de la prueba de 8 a 3 horas. Para determinar la especificidad de los anticuerpos en la prueba de ELISA tipo inhibición, se probaron tres antígenos distintos (tabla 9). En esta prueba se observó que no existe reacción cruzada con otras proteínas involucradas en el sistema inmune de camarón, demostrando la especificidad de la técnica. Aunque los valores de absorbancia fueron significativamente menores que en la prueba para BGBP, los anticuerpos anti-CP también mostraron una especificidad por la CP purificada de plasma de camarón.

Tabla 9: Especificidad de anti-BGBP y anti-CP en pruebas de ELISA. Control negativo BSA (Albúmina Sérica Bovina), CP (Proteína de coagulación), BGBP (Proteína que se une a β -glucanos), α 2M (alfa-2-macroglobulina). Los valores representan la absorbancia promedio de 7 determinaciones \pm el error estándar.

Antígeno	Anti-BGBP	Anti-CP
BSA	0.001 \pm 0.00	0.002 \pm 0.00
CP	0.016 \pm 0.001	0.055 \pm 0.005
α 2M	0.015 \pm 0.006	0.004 \pm 0.0005
BGBP	0.227 \pm 0.006	0.009 \pm 0.0002

Para intentar aumentar la vida media de las placas con el antígeno previamente adsorbido, se probó la eficiencia de las placas conteniendo el antígeno inmovilizado, bloqueadas con glicina, secadas a 50°C, empacadas con vacío y almacenadas a 4°C. Como puede apreciarse en la tabla 10, no se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en comparación con las placas refrigeradas con solución bloqueadora.

Tabla 10: Resultados observados con el uso de placas con antígeno pre-adsorbido y empacadas con vacío en comparación con la prueba completa que inicia con la adsorción de antígeno.

Almacenamiento a 4°C	BGBP Absorbancia 450 nm	CP Absorbancia 450 nm
Glicina 2%	0.181 ± 0.011	0.135 ± 0.004
Secado con vacío	0.174 ± 0.010	0.135 ± 0.012

La medición de BGBP y CP mediante ELISA tipo inhibición presentó ventajas en comparación con la prueba indirecta: las reacciones inespecíficas (fondo o background) se redujeron prácticamente a cero y el tiempo de la prueba se disminuyó de 8 a 3 horas. Esta disminución se logró básicamente por la unión previa del antígeno a la placa. Con base en estos resultados, se diseñaron kits para la medición de BGBP o CP en plasma de camarón, como se discute en la publicación 1 anexa, el procedimiento para el uso de estos kits es simple lo que los hace accesibles tanto para laboratorios de investigación como para laboratorios de granjas de camarón pues no se requiere de equipo sofisticado ni personal especializado.



Figura 10: Fotografía del kit diseñado para la determinación de BGBP.

El kit diseñado contiene una placa de 96 pozos con BGBP o CP (lista para ser utilizada) y empacada con vacío, anticuerpos (anti-BGBP o anti-CP), solución de antígeno (BGBP, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CP, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), solución de lavado (PBS-Tween), conjugado de peroxidasa, sustrato (TMB), diluyente para TMB y ácido sulfúrico 1 N (figura 10). Utilizando el kit, la técnica se realiza de acuerdo a la tabla 11.

Tabla 11: Técnica para la cuantificar de BGBP o CP en plasma de camarón, utilizando el Kit diseñado en este trabajo.

1	Agregar, en cada pozo de la placa, 50 μ l de muestra y 50 μ l de anti-suero diluido 1:500 en PBS (preparar un control utilizando PBS en lugar de muestra) e incubación durante 1 h a temperatura ambiente.
2	Lavar tres veces con 300 μ l de PBS-Tween durante 3 min a temperatura ambiente.
3	Agregar 100 μ l de conjugado de peroxidasa diluido en PBS e incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
4	Lavar tres veces con 300 μ l de PBS-Tween durante 3 min a temperatura ambiente.
5	Agregar 100 μ l de sustrato (TMB) e incubar durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
6	Agregar 50 μ l de ácido sulfúrico 1 N.
7	Leer a 450 nm.
8	Calcular la concentración utilizando una curva de BGBP o CP purificados de plasma de camarón.

Actividad de Fenoloxidasa

Debido a que el sistema de la pro^{FO} es considerado como un integrador de la respuesta inmune de camarón, resulta interesante conocer su concentración en situaciones fisiológicas desfavorables, como infecciones o desnutrición. Los métodos que se han usado hasta la fecha para medir la concentración de pro^{FO}, no siempre han sido los adecuados. Por ejemplo, algunos investigadores (Leonard y cols., 1985; Lanz y cols., 1993; Le Moullac y cols., 1997) cuantifican la pro^{FO} usando diferentes activadores, pero esto solo indica la capacidad que tienen estos activadores para transformar la pro^{FO} en FO y el método no mide la concentración de pro^{FO}.

La FO es una enzima que en el camarón se encuentra almacenada en forma inactiva (pro^{FO}) en los gránulos de los hemocitos. *In vivo*, cuando la

proFO es excitada, se transforma a su forma activa, la fenoloxidasasa propiamente dicha, por proteólisis mediante una serin-proteínasa llamada enzima activadora de la proFO (EAproFO).

Para medir la actividad de la FO se usa una técnica basada en la oxidación de L-DOPA. Sin embargo, para cuantificar la FO total (proFO + FO) es necesario convertir, *in vitro*, la proFO en FO debido a que la primera no tiene actividad enzimática. Generalmente se usa tripsina la cual es una serin-proteínasa, en exceso para garantizar la conversión.

Originalmente la técnica fue diseñada para realizarse en tubo; pero con anterioridad hemos reportado una modificación en microplaca (Hernández-López y cols., 1996). El método en microplaca es simple y la cuantificación de FO solo requiere incubar con L-DOPA. Por su parte, la cantidad de FO total disponible puede ser calculada en base a la proFO convertida a FO utilizando 1 µg de tripsina/pozo. Sin embargo, no se determinó la concentración adecuada de tripsina que garantizara la conversión de proFO a FO.

Para establecer la cantidad necesaria, muestras conteniendo proFO fueron incubadas con diferentes concentraciones de tripsina (0.7 a 100 µg/reacción) y los resultados no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) (tabla 12). Aunque 0.7 µg de tripsina/pozo parece ser suficiente para convertir toda la proFO de la muestra, para asegurar esta reacción se estandarizó el uso de 10 µg de tripsina/reacción.

Tabla 12: Conversión de profFO a FO con diferentes concentraciones de tripsina

Concentración de tripsina ($\mu\text{g}/\text{reacción}$)	Absorbancia a 450 nm	Coefficiente de variación (%)
0.00	0.0	
0.7	0.108 ± 0.007	6.7
1.0	0.118 ± 0.006	5.2
3.0	0.117 ± 0.003	2.7
12.5	0.119 ± 0.002	1.3
25.0	0.118 ± 0.007	5.6
50.0	0.113 ± 0.004	3.2
100	0.108 ± 0.008	7.8

Las técnicas para cuantificar FO y FO total involucran la separación del plasma por centrifugación y la lisis del paquete celular (Asokan y cols., 1997; Sung y cols., 1998), (Cardenas y Dankert, 1997; Hauton y cols., 1997). Sin embargo, con la idea de hacer accesible esta tecnología, no solo a laboratorios de investigación, sino también a empresas acuícolas, se probó utilizar muestras de hemolinfa completa para la medición de FO, sin necesidad de separar las células del plasma.

Anteriormente se había propuesto un método para obtener el contenido granular de los hemocitos de camarón utilizando soluciones de baja fuerza iónica y centrifugación a alta velocidad (15,000 *g*) (Hernández-López y cols., 1996). Sin embargo, el contenido granular de los hemocitos también puede ser liberado disminuyendo la salinidad de la hemolinfa con agua destilada (1:25), lo que significa un cambio en la molaridad de 450 mM a 30 mM (Vargas-Albores y cols., Submitted). Por otro lado, cuando la hemolinfa es diluida o los

hemocitos son suspendidos en SIC no sufren daño ni son activados (Vargas-Albores y cols., 1993). Esto permitió diseñar un método para cuantificar la FO total disponible (FO + proFO) y la FO libre, sin necesidad de separar las células del plasma (tabla 13). La medición de la FO + proFO nos permite conocer la capacidad de respuesta del animal, mientras que la evaluación de la FO liberada es de utilidad para observar la activación de hemocitos en respuesta a antígenos o estresores ambientales.

Tabla 13: Influencia del diluyente en la liberación del sistema proFO de hemocitos de camarón. Los valores representan el promedio de 15 determinaciones \pm el error estándar.

Buffer	Actividad de FO ($\Delta 0.001$ abs/min.)
SIC	8.08 \pm 0.030
Agua	100.30 \pm 0.015

Con la intención de hacer un kit se intentó el uso de tripsina inmovilizada para transformar la proFO en FO. Se agregaron 10 μ l de tripsina (1 mg/ml) a cada pozo y la placa se secó con aire caliente (50°C). Para hacer la determinación, solamente se agrega la muestra, diluida en agua y el sustrato, se incubó durante 20 min y se lee la absorbancia a 490 nm. Como se puede ver en la tabla 14, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la eficiencia de conversión. Las placas preparadas de esta forma, pudieron ser almacenadas en refrigeración y utilizadas al menos 6 meses después sin que se apreciaran diferencias significativas.

Tabla 14: Influencia del tratamiento con tripsina (10 µg/pozo) sobre la conversión de proFO en FO. Los valores representan el promedio de 7 determinaciones ± el error estándar.

Tripsina (10 µg/pozo)	Absorbancia a 490 nm
En seco	0.8736 ± 0.009
En solución	0.8718 ± 0.020

Para simplificar el proceso, se probó la utilización de L-DOPA disuelta en SIC (para FO) o en agua libre de pirógenos (para FO total) como único reactivo en las técnicas. El uso de L-DOPA disuelta en agua produjo dos ventajas: a) la liberación del contenido granular de los hemocitos por diferencia osmótica y b) mayor estabilidad del reactivo lo que permite almacenarlo en refrigeración durante al menos 1 mes sin que se produzca oxidación.

Estos resultados hicieron posible la generación de kits para la medición de actividad FO y FO total en muestras de hemolinfa de camarón. La presentación comercial de los kits puede observarse en la figura 11 y los pasos de las pruebas se enlistan en las tablas 15 y 16.

Tabla 15: Técnica para la cuantificación de FO total en plasma de camarón, utilizando el Kit diseñado en este trabajo.

1	Agregar, en cada pozo de la placa, 10 µl de muestra y 250 µl de L-DOPA disuelta en agua.
2	Incubar durante 20 min a temperatura ambiente y leer absorbancia a 490 nm.

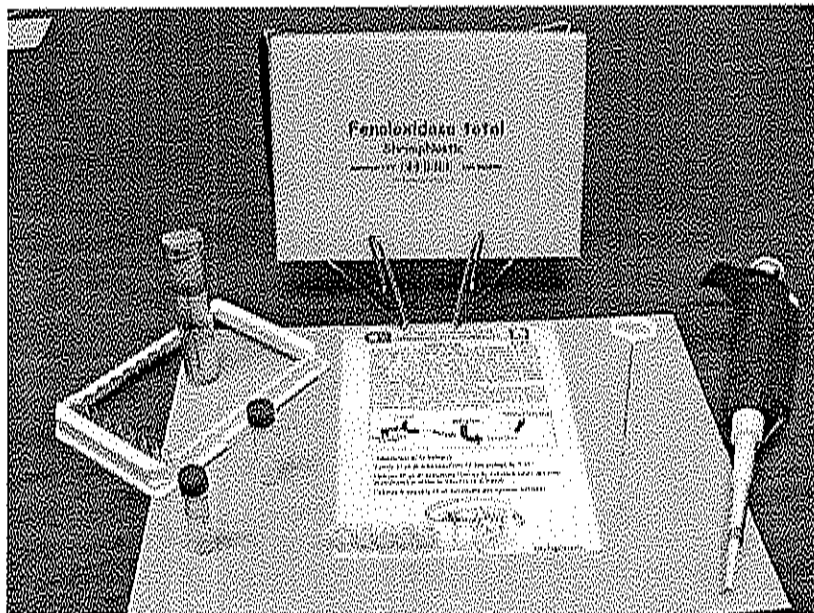


Figura 11: Fotografía del kit diseñado para determinación de fenoloxidasas. Incluye: Manual, Placa con tripsina inmovilizada, Reactivo de color y capilar para muestra.

Tabla 16: Técnica para la cuantificar de FO en plasma de camarón, utilizando el Kit diseñado en este trabajo.

1	Agregar, en cada pozo de la placa, 10 μ l de muestra y 250 μ l de L-DOPA disuelta en SIC.
2	Incubar durante 20 min a temperatura ambiente y leer absorbancia a 490 nm.

Actividad de Alfa-2 Macroglobulina (α 2M)

En invertebrados, la transformación de proFO a FO es realizada por la EAproFO que es una serin-proteinasas. Se ha propuesto que la α 2M, participa en la respuesta inmune regulando la activación del sistema de la proFO inhibiendo a la EAproFO (Hergenbahn y Söderhäll, 1985; Hergenbahn y cols., 1988). La α 2M ha sido estudiada y bioquímicamente caracterizada en camarón (Gollas-Galván, Enviado) y otros crustáceos (Hergenbahn y cols., 1988; Armstrong y cols., 1991; Liang y cols., 1992), incluso ha sido clonada en *Limulus polyphemus* (Iwaki y cols., 1996). A pesar de que se demostró que la actividad de α 2M se incrementa en camarones *Penaeus stylirostris* sometidos experimentalmente a hipoxia (Le Moullac y cols., 1998), hasta la fecha no se ha utilizado la actividad de α 2M como un marcador de respuesta inmune en animales infectados.

Con base en la técnica original de Ganrot (1966) en este trabajo se implementó un método en microplaca para medir la actividad de α 2M en plasma de camarón. La técnica se basa en la habilidad de la α 2M para atrapar físicamente las proteinasas sin afectar su sitio activo. Así, la actividad de α 2M se determina de forma indirecta midiendo la actividad de tripsina atrapada. Para realizar una curva patrón con tripsina se utilizó SIC-EDTA como diluyente, debido a que es la solución en la que se obtiene la hemolinfa. Sin embargo, la alta concentración de sales del SIC-EDTA produjo la formación de precipitado en el transcurso de la reacción.

Por ello, se probaron 5 diferentes diluyentes y como puede apreciarse en la figura 12, el HEPES (10 mM pH 7.5) fue el mejor diluyente al mantener la máxima actividad de tripsina y no presentar precipitación. De acuerdo a estos resultados, el HEPES fue utilizado

tanto para la curva estándar de actividad de tripsina como para medir la actividad de α 2M. La curva generó un intervalo lineal entre 200 y 600 ng el cual fue adecuado para la evaluación de α 2M en el plasma del camarón (tabla 17).

Tabla 17: Técnica para la cuantificación de α 2M en plasma de camarón.

1	Agregar, en cada pozo de la placa, 10 μ l de tripsina (1 mg/ml en HEPES) y 50 μ l de muestra.
2	Incubar durante 10 min a 37°C.
3	Agregar 10 μ l de STI (2 mg/ml en HEPES).
4	Incubar durante 10 min a 37°C.
5	Agregar 100 μ l de BAPNA (5 mg/ml en HEPES).
6	Incubar durante 60 min a 37°C.
7	Leer absorbancia a 415 nm.

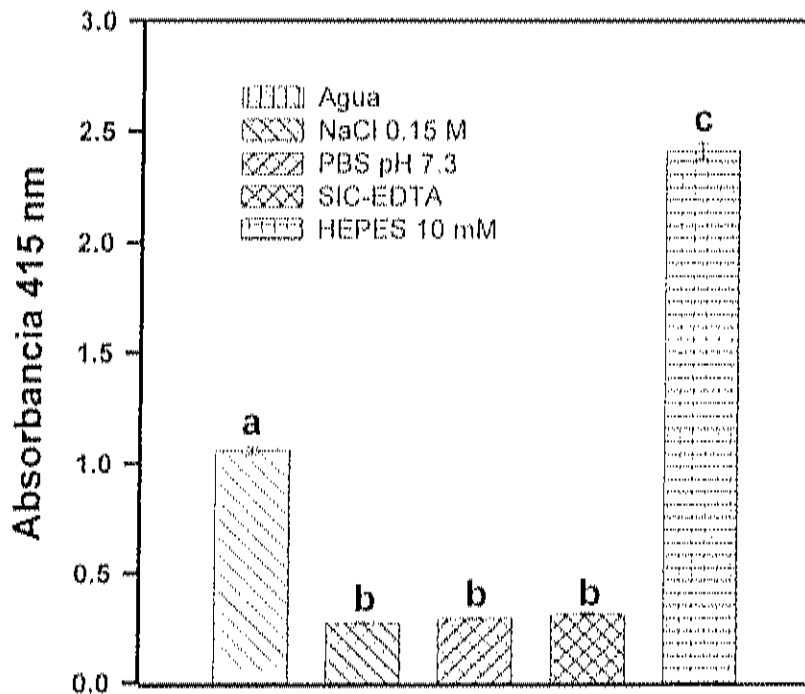


Figura 12: Influencia del diluyente en la prueba de $\alpha 2M$. Se midió actividad de proteinasa usando BAPNA como sustrato. La tripsina y todos los reactivos de la prueba se disolvieron en cada uno de los reguladores probados.

De la misma forma que para la prueba de FO, se ensayó la inmovilización de tripsina en microplacas a una concentración de 10 μg por pozo. Utilizando estas placas y el almacenamiento con vacío genera resultados comparables al uso de tripsina en solución. Adicionalmente, se probó la eficiencia del método para medir la actividad de $\alpha 2M$ en muestras de hemolinfa completa. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) cuando se usaron entre 10 y 50 μl de plasma o hemolinfa completa para la medición de $\alpha 2M$ en camarón (figura 13).

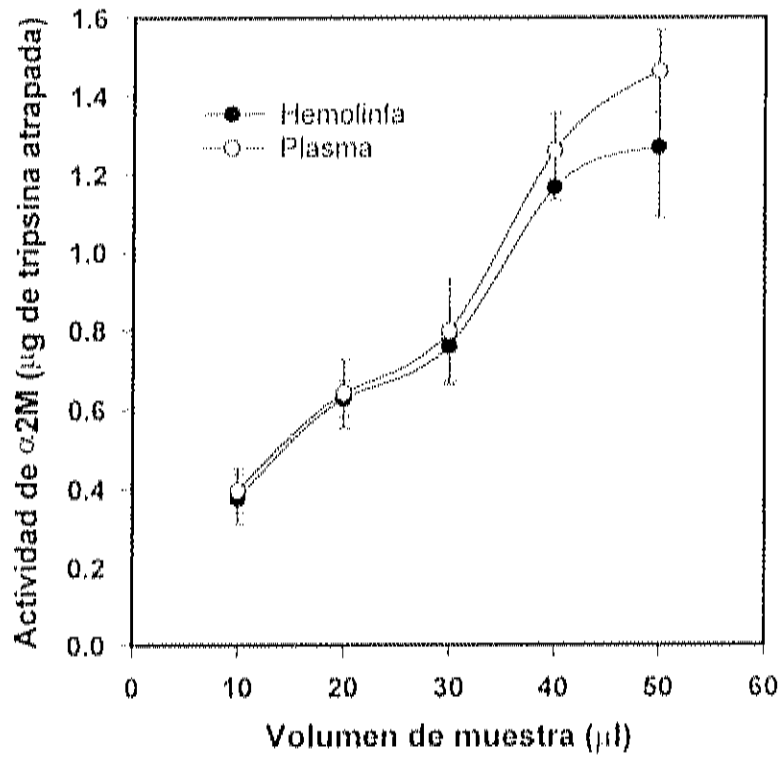


Figura 13: Influencia del volumen y tipo de muestra en la actividad de $\alpha 2M$ de camarón. No se observaron diferencias significativas entre el uso de plasma o hemolinfa completa. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar.

Con base en estos resultados se generó un kit que incluye placas conteniendo 10 µg de tripsina por pozo y reactivos como STI, BAPNA y HEPES, el ensayo involucra los pasos enlistados en la tabla 18. La concentración de α2M se expresa como la cantidad (µg) de tripsina atrapada por la α2M. En camarones aparentemente sanos, los valores normales observados se mantuvieron en un intervalo de 0.75 a 1.7 µg.

Tabla 18: Técnica para cuantificar α2M en plasma de camarón utilizando el kit generado en este trabajo.

1	Agregar 50 µl de hemolinfa en cada pozo de la microplaca.
2	Incubar durante 10 min a 37°C.
3	Agregar 10 µl de reactivo A (STI, 2 mg/ml en HEPES).
4	Incubar durante 10 min a 37°C.
5	Agregar 100 µl de reactivo B (BAPNA, 5 mg/ml en HEPES).
6	Incubar durante 60 min a 37°C.
7	Leer absorbancia a 415 nm.
8	Calcular la concentración de α2M con una curva estándar de tripsina.

Detección de Lisozima en Camarón

La lisozima ha sido ampliamente estudiada observándose que evolutivamente es una proteína altamente conservada. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces entre N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamida del peptidoglucano (compuesto de la pared celular de bacterias Gram positivas) por lo que es un eficiente mecanismo de defensa contra infecciones bacterianas. Dentro de los invertebrados, la lisozima ha sido estudiada en insectos (Kopacek y cols., 1999; Fallon y Sun, 2001) y moluscos (Cheng y Downs, 1988; Chu y La

Peyre, 1989) pero en crustáceos solo existe un reporte donde mencionan su presencia en seis especies de langosta de agua dulce (Fenouil y Roch, 1991).

Hasta el año 2000 no se había detectado la presencia de actividad tipo lisozima en camarón, pese a la disponibilidad de un método relativamente sencillo. El método más usado para la detección de lisozima es el que se basa en la lisis de *Micrococcus luteus*, que se mide por turbidimetría o por difusión radial en agar.

A principios del año 2001, Sotelo-Mundo y cols (Submitted), analizando la secuencia de nucleótidos de un EST (Expressed Sequence Tag; BE188312) correspondiente a *Penaeus vannamei* (Gross y cols., 2001) detectaron dos marcos de lectura similares a lisozima de *Anopheles gambiae* (Kang y cols., 1996). Después de resolver algunas de las bases ausentes en la secuencia, Sotelo-Mundo y cols, diseñaron oligonucleótidos específicos para buscar el gen de lisozima en un banco de genes de camarón generado en un vector de expresión ZAP (Stratagene) y construida por la Dra. Yepiz-Plascencia en el Laboratorio de Biotecnología Marina del CIAD A. C.

Utilizando estos oligonucleótidos y cDNA del banco de genes de hemocitos de camarones, se logró amplificar un fragmento de 435 bp conteniendo un marco de lectura similar al descrito para lisozima de otras especies. Después de clonar y secuenciar este fragmento, Sotelo-Mundo y cols. diseñaron primers específicos (PV-GCFLW y PV-LYZ-1R) con los que se logró amplificar, por PCR a partir del banco de genes, un producto de 450 bp.

Con estos oligonucleótidos específicos, en este trabajo, se buscó el mensaje de lisozima en hemocitos y hepatopáncreas de camarón por RT-PCR. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata y se detectó un

fragmento de 446 bp tanto de hemocitos como de hepatopáncreas (Figura 14).

Se ha propuesto que la respuesta inmune de los camarones puede ser evaluada por medio de la síntesis de proteínas involucradas en la defensa. El análisis de la expresión diferencial de los genes de respuesta inmune puede ser una herramienta para medir un estado fisiológico alterado. Además del análisis por RT-PCR con primers específicos, el estudio de la expresión diferencial utilizando primers arbitrarios también puede ser usado para detectar alteraciones del estado fisiológico de los camarones. Sin embargo, la obtención y preparación de la muestra son procesos fundamentales para el éxito de este análisis. Adicionalmente en este trabajo se estandarizaron métodos para realizar estudios de expresión diferencial en camarón, como se discute en la publicación 3 anexa.

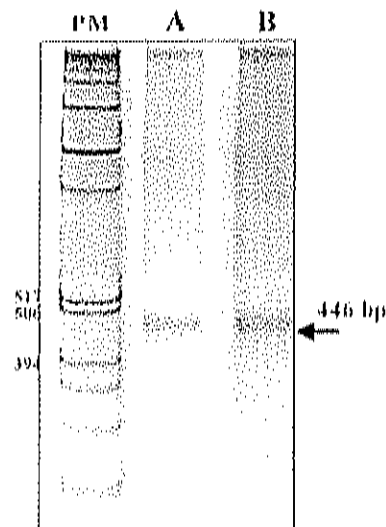


Figura 14: Fragmento de 446 pb obtenido por PCR de cDNA de A) hemocitos y B) hepatopáncreas de camarones aparentemente sanos.

Detección de Actividad de Lisozima en Camarón

Una vez demostrada la presencia de mRNA que codifica para lisozima en hemocitos y hepatopáncreas de camarón, se buscó la presencia de la proteína mediante la detección de actividad de lisozima en lisado de hemocitos de camarón por lisis de *Micrococcus luteus* inmovilizados en agarosa (1.2%). El tiempo de incubación requerido para leer la muestra fue de 24 h a 37°C y el resultado se observó como una zona clara alrededor del punto de aplicación de la muestra.

Aunque los resultados pueden apreciarse a simple vista, se requiere de cierto cuidado debido al bajo contraste que se presenta entre la zona de lisis y la turbidez bacteriana del resto del agar. Por ello, en este trabajo se analizó la posibilidad de teñir las bacterias en el agar después de la prueba (ver metodología). Esta tinción hace posible un mejor contraste y una mayor precisión en la medición de los diámetros de lisis (Figura 15). La concentración de lisozima en las muestras se calculó utilizando una curva patrón realizada con diferentes concentraciones de lisozima comercial.

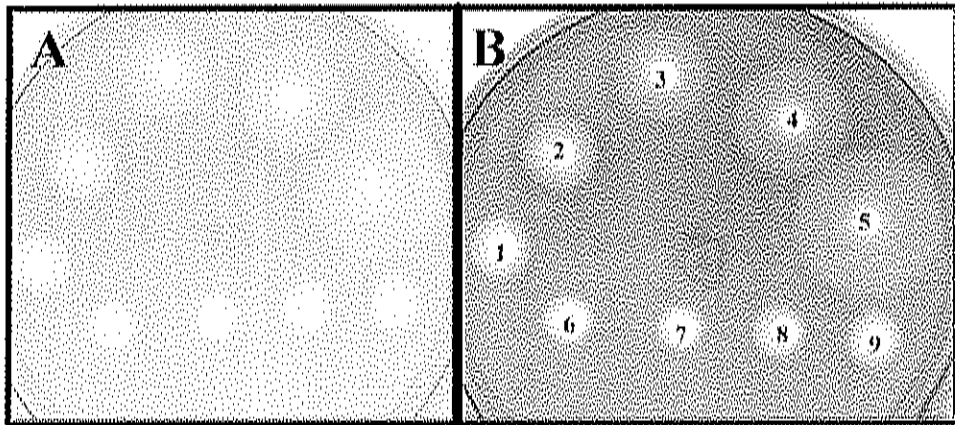


Figura 15: Prueba de lisozima por difusión simple en agar. (A) prueba sin teñir, (B) teñida. 1-5: Lisozima comercial (0.625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 µg/ml), 6, 8 y 9) Lisado de hemocitos de camarón (10 µl), 7) Regulador de fosfatos pH 6.8.

Otro método ampliamente utilizado para medir actividad de lisozima es el turbidimétrico. La diferencia de esta técnica con la anterior es que las bacterias (*M. luteus*) están en un medio líquido y la actividad de lisozima se observa como una disminución de turbidez (medida por espectrofotometría) debida a la lisis de las células bacterianas. Este método tiene la ventaja de ser una técnica más rápida pues se obtienen resultados en un tiempo máximo de 2 h. Sin embargo, esta metodología no fue lo suficientemente sensible para demostrar actividad de lisozima en muestras de camarón.

Buscando un método alternativo, se intentó el uso de bacterias teñidas y suspendidas en regulador de fosfatos. La idea se basa en que el grado de lisis, producida por la actividad de lisozima, podría ser evaluada por la cantidad de colorante liberado al sobrenadante.

Como primer paso se determinó la $\lambda_{\text{máx}}$ para la solución de colorante en el intervalo entre 400 y 650 nm. El pico de máxima absorción fue detectado a 590 nm (figura 16), pero el color generado puede leerse adecuadamente entre 570 y 610 nm.

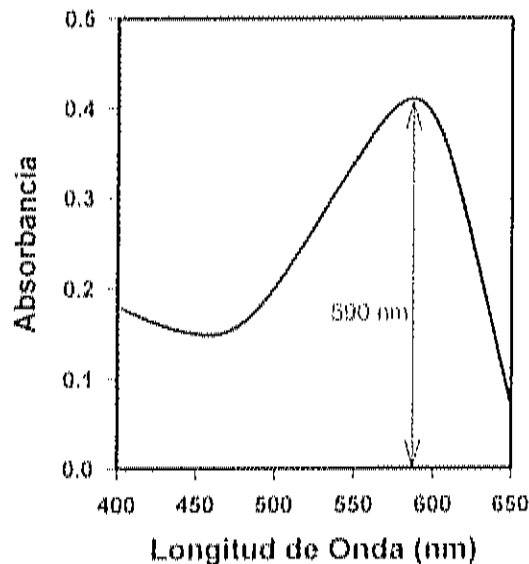


Figura 16: Intervalo de medición de longitudes de onda, probadas para determinar la máxima absorbancia del colorante usado para teñir el *Micrococcus luteus*.

Cuando se usaron bacterias teñidas, como sustrato para la lisozima, el grado de lisis producida por la enzima en 1 hora de incubación fue medido en espectrofotómetro después de eliminar las bacterias restantes por centrifugación. La concentración de lisozima en la muestra de camarón pudo ser estimada utilizando una curva patrón de lisozima comercial en un intervalo entre 3 y 50 $\mu\text{g/ml}$ (figura 17).

Aunque por el método turbidimétrico tradicional no se pudo detectar actividad de lisozima en el lisado de hemocitos, con el método colorimétrico aquí presentado, se pudo determinar que en el lisado de hemocitos de camarón blanco hay una actividad de lisozima equivalente a 4 µg/ml de lisozima comercial.

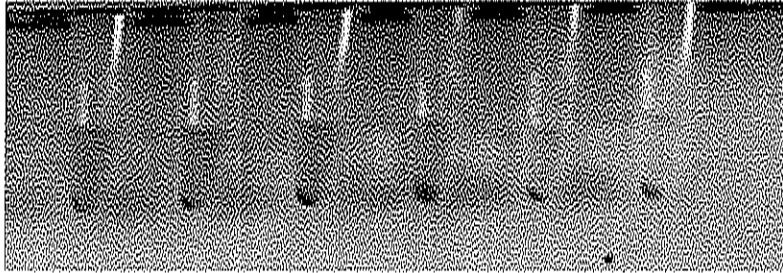


Figura 17: Prueba de lisozima por lisis de *M. luteus* teñidos y resuspendidos en regulador de fosfatos pH 6.8. Se utilizó lisozima comercial para realizar la curva patrón.

Bioensayos

La eficiencia y funcionalidad de los kits y adaptaciones generadas en este trabajo, para la cuantificación de metabolitos en hemolinfa de camarón, fueron probadas en animales cultivados comercialmente, con diferentes condiciones. Cuando se midió la concentración de glucosa, colesterol, acilglicéridos y proteínas en camarones alimentados con un suplemento de ácidos grasos insaturados, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en las concentraciones de colesterol y acilglicéridos en hemolinfa, en relación a camarones sin el suplemento de ácidos grasos, mientras que la concentración de proteína total y glucosa no sufrieron cambios significativos (figura 18).

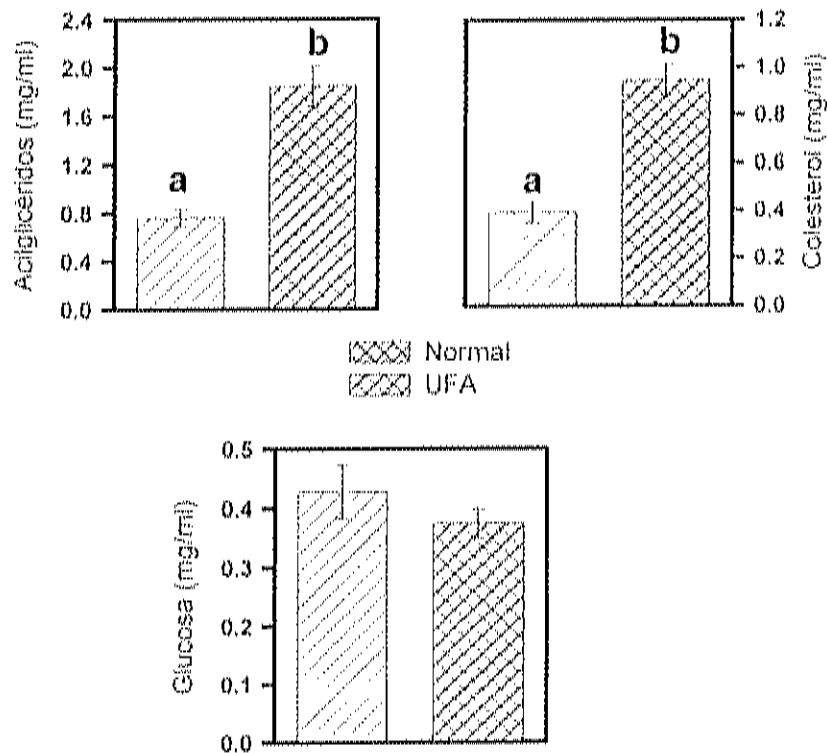


Figura 18: Influencia de la suplementación alimenticia con ácidos grasos insaturados (UFA) sobre la concentración de metabolitos en hemolinfa de camarones cultivados (n=16).

Por otro lado, la cuantificación de metabolitos en hemolinfa de camarones cultivados con alimento de dos fuentes distintas (Purina y Zeigler), detectó una mayor concentración de colesterol y acilglicéridos en los animales alimentados con Zeigler (figura 19).

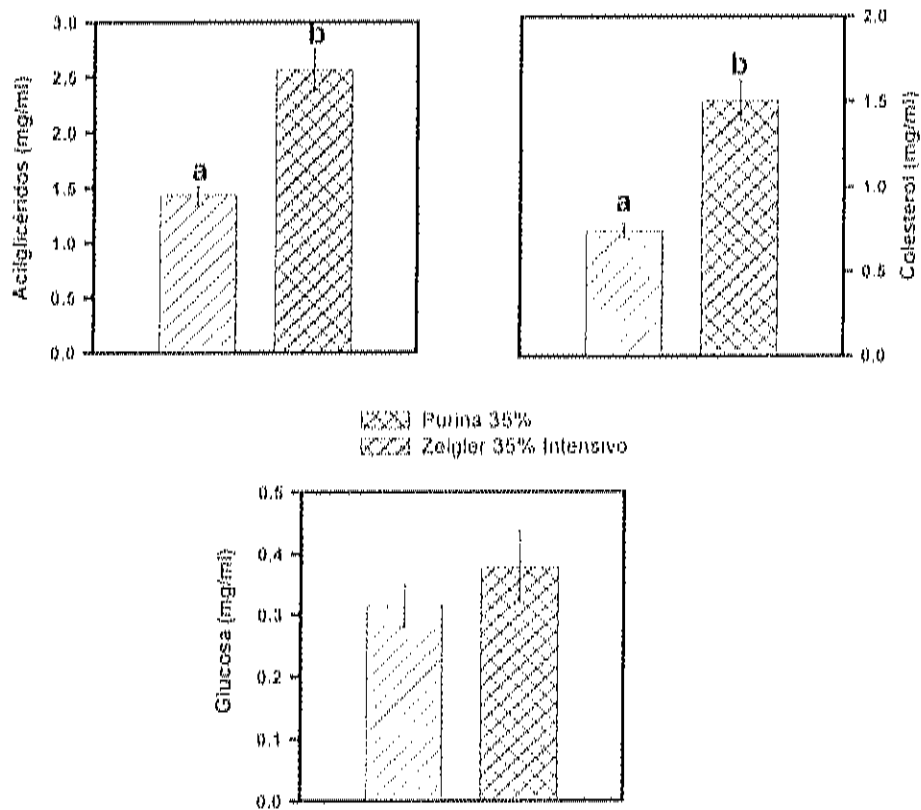


Figura 19: Concentración de metabolitos en plasma de camarones cultivados comercialmente y alimentados con dos tipos de alimento.

Debido a que las técnicas fueron realizadas totalmente en las granjas de cultivo y el manejo de los materiales y reactivos no presentó ningún inconveniente, los resultados permiten concluir que las técnicas implementadas en este trabajo pueden ser usadas no solo por investigadores sino también por personal técnico de las granjas acuícolas. Además, la medición de metabolitos en hemolinfa parece ser una forma de detectar diferencias en el estado nutricional del camarón en diferentes condiciones de cultivo.

Inoculación de Partículas Inertes

La eficiencia de los kits diseñados en este trabajo para cuantificar proteínas y actividades de moléculas involucradas en la respuesta inmune del camarón, fue analizada en organismos sometidos a distintos tratamientos.

Con la finalidad de detectar si la inoculación de partículas extrañas produce cambios en los componentes de la respuesta inmune del camarón, se cuantificó el número total de hemocitos y la concentración de BGBP, CP, FO total y $\alpha 2M$ en hemolinfa de camarones inoculados con partículas inertes o con bacterias del género *Vibrio*, muertas por calor húmedo.

La respuesta celular en crustáceos es producida por los hemocitos, los cuales son responsables de la fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos (Smith y Söderhäll, 1983; Johansson y Söderhäll, 1989). En los invertebrados se ha demostrado que la inoculación de partículas inertes produce una respuesta de defensa (Zahedi y cols., 1992) e induce la transcripción de algunos genes, observándose un cambio en los patrones de mRNA (Cedano-Thomas, 2000) de una manera dependiente de la carga de las partículas. En este trabajo se demostró que, *in vitro*, los hemocitos de camarón se adhieren a Sephadex de una manera dependiente de la carga de la partícula y que esta interacción célula-Sephadex produce la liberación del sistema de la proFO (publicación 4 anexa).

Cuando se midió el número total de hemocitos, la concentración de BGBP, CP, FO total y $\alpha 2M$ en hemolinfa de camarones inoculados con partículas inertes se observaron distintos efectos: Mientras que el número total de hemocitos en hemolinfa disminuyó significativamente 24 horas después de la inoculación (figura 20), de los componentes de la inmunidad humoral solo la concentración de BGBP disminuyó

significativamente ($P > 0.05$) de una manera independiente de la carga (figura 21).

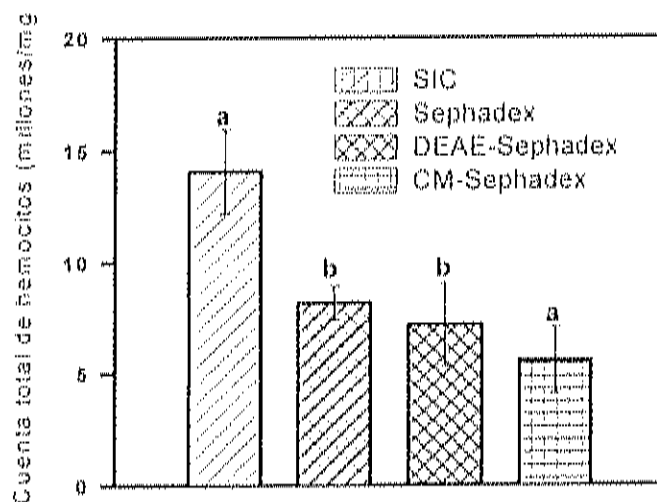


Figura 20: Cuenta total de hemocitos en camarones inoculados con partículas inertes.

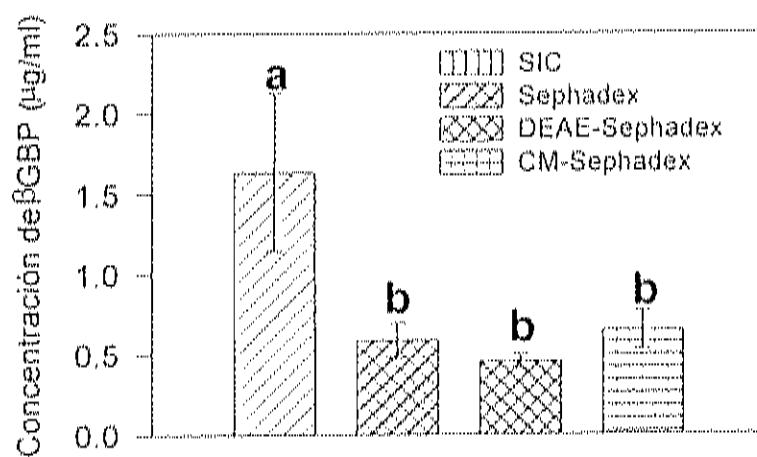


Figura 21: Concentración de BGBP en plasma de camarones inoculados con partículas inertes.

Por otro lado, el análisis de expresión diferencial determinada por RT-PCR en hemocitos de camarón, utilizando un oligonucleótido arbitrario (AATCTAGAGCTCCCTCCA), produjo diferentes patrones dependiendo de la carga de la partícula inoculada (figura 22). En general se observó un mayor número de bandas, respecto al control (SIC) con todas las partículas probadas. Sin embargo, los patrones fueron diferentes de acuerdo a la carga de la partícula. Mientras que Sephadex (carga neutra) produjo el mayor número de bandas, con DEAE-Sephadex (carga negativa) se observó el menor bandeo.

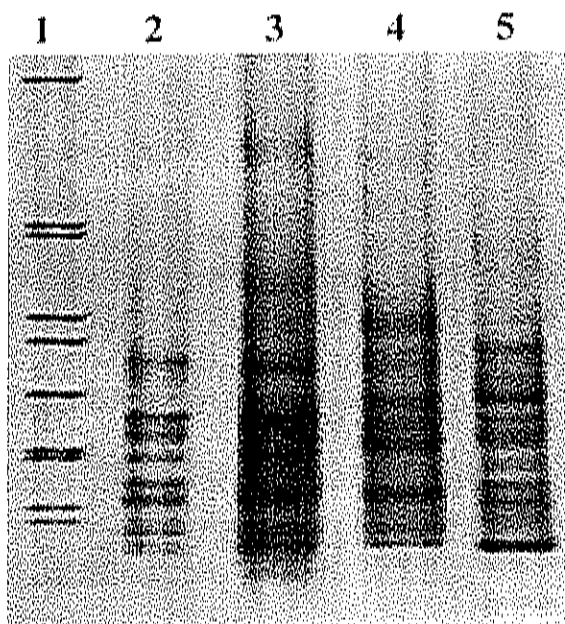


Figura 22: Expresión diferencial en hemocitos de camarón. 1) marcadores de peso molecular; 2) Inoculados con SIC; 3) Inoculados con Sephadex; 4) Inoculados con CM-Sephadex y 5) Inoculados con DEAE-Sephadex

Cuando se amplificó, por RT-PCR con primers específicos para lisozima, mRNA de hemocitos y hepatopáncreas de camarones inoculados con SIC o con DEAE-Sephadex, se detectó un fragmento

de 450 pb en los animales inoculados con SIC (control) pero no en los inoculados con partículas inertes con carga positiva (figura 23) lo que manifiesta que la expresión de lisozima se inhibe por la inoculación de partículas inertes.

Estos resultados confirman la existencia de un sistema inmune en camarón, capaz de reconocer lo propio de lo extraño y además, la respuesta generada es dependiente de la carga del agente extraño, de la misma forma que sucede en otros invertebrados, en donde se ha observado una respuesta de defensa generada contra partículas cargadas positivamente (Zahedi y cols., 1992).

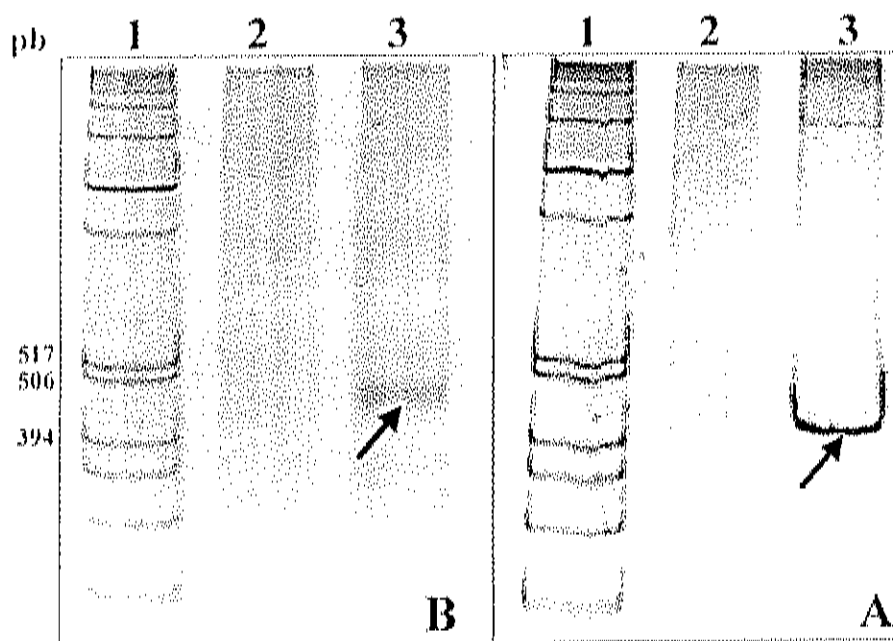
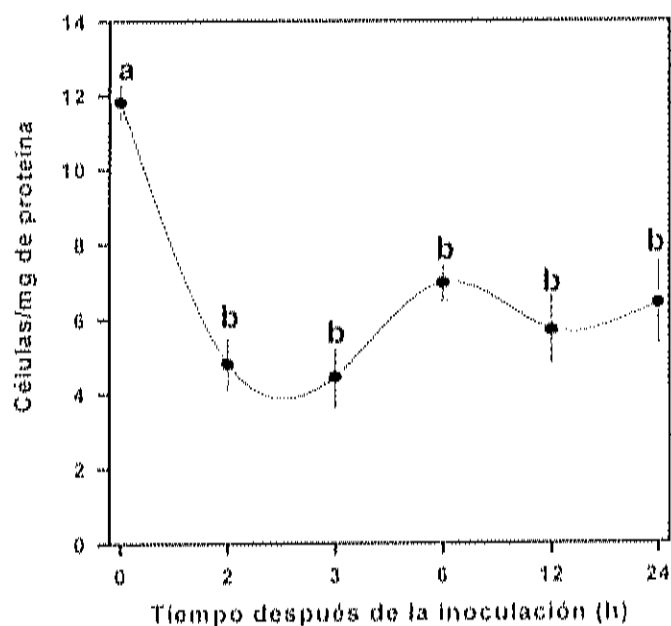


Figura 23: Amplificación de cDNA de lisozima a partir de A) hemocitos o B) hepatopáncreas de camarón. 1) marcadores de peso molecular, 2) inoculados con DEAE-Sephadex y 3) Controles inoculados con SIC. En cada reacción se usaron 40 ng de mRNA. Las flechas indican el producto de 450 pb amplificado

Inoculación de Bacterias.

Cuando se realizó una cinética para medir los parámetros plasmáticos de respuesta inmune en camarones, a diferentes tiempos después de la inoculación con bacterias del género *Vibrio*, se observó una disminución significativa en el número total de hemocitos obtenidos en todos los tiempos analizados (figura 24). Aunque se ha reportado que en el crustáceo *Palaemon elegans* se produce una reducción en el número de hemocitos durante las primeras 8 hs con recuperación a las 24 h después de la inoculación de LPS (Lorenzon y cols., 1999), la disminución del número de hemocitos se ha observado, en otros crustáceos, 24 horas después de la inoculación de bacterias (Smith y Ratcliffe, 1980), exposición a pesticidas (Smith y cols., 1995) y estrés por hipoxia (Le Moullac y cols., 1998).

Figura 24: Cuenta total de hemocitos de camarones



inoculados con *Vibrio alginolyticus*.

La inoculación de bacterias en camarones produjo diferentes modificaciones en la respuesta humoral; mientras que la concentración de BGBP disminuyó desde las 3 horas después de la inoculación, la concentración de CP permanece sin alteración. Por su parte, la actividad de FO disminuyó en las primeras horas del ensayo (1.5 y 3 h), regresando a los valores iniciales a las 6 horas post-inoculación (figura 25).

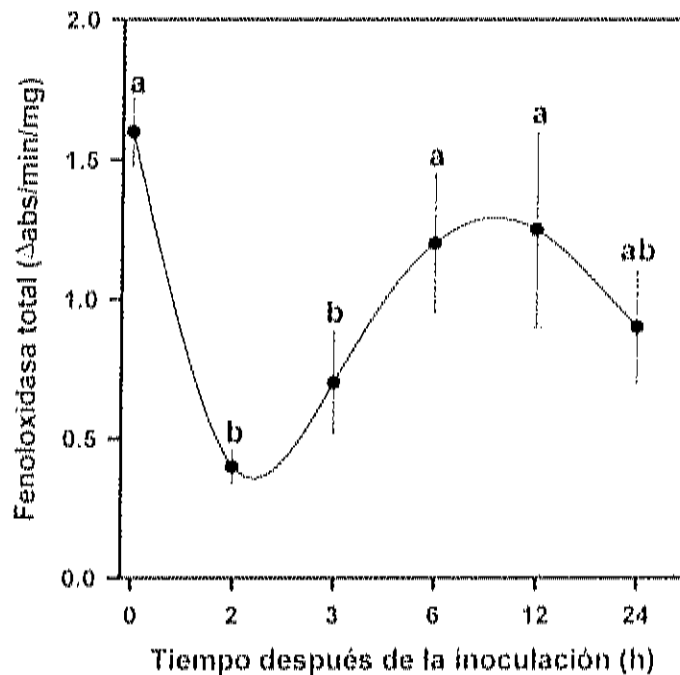


Figura 25: Efecto de la inoculación de bacterias muertas sobre la concentración de fenoloxidasa total en hemolinfa de camarón.

Esta disminución se debe probablemente a que la FO almacenada en los gránulos es utilizada como respuesta inmediata y los niveles son recuperados por la síntesis de nueva proteína. Alteraciones en la actividad de FO también han sido reportadas por otros investigadores en camarón y crustáceos sometidos a condiciones de estrés tales

como salinidad (Vargas-Albores y cols., 1998; Cheng y Chen, 2000), temperatura (Cheng y Chen, 2000; Le Moullac y Haffner, 2000), pH (Cheng y Chen, 2000) o altas concentraciones de NH_3 (Le Moullac y Haffner, 2000).

A pesar de que en otros crustáceos se han detectado incrementos en la actividad de $\alpha 2\text{M}$ producida por estrés hipóxico (Le Moullac y cols., 1998), cuando se midió la actividad de $\alpha 2\text{M}$ en plasma de camarones después de la inoculación de bacterias muertas, la actividad de $\alpha 2\text{M}$ disminuyó significativamente en las primeras 6 horas recuperando sus valores iniciales a partir de las 12 horas (figura 26).

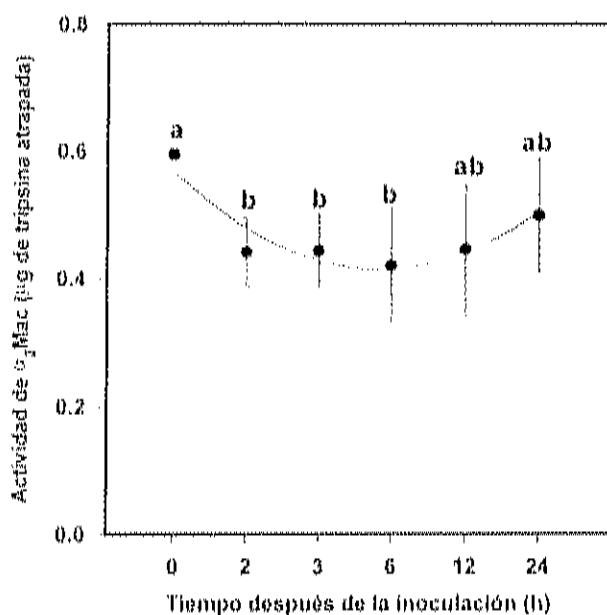


Figura 26: Efecto de la inoculación de bacterias sobre la actividad de $\alpha 2\text{M}$ en plasma de camarón.

La reducción permanente observada en el número de hemocitos y disminución de la actividad de PO y de $\alpha 2\text{M}$ en las primeras 6 horas después de la inoculación, respaldan la idea de que la respuesta

inmune humoral es afectada de manera temprana y una rápida recuperación es generada por el organismo, mientras que la respuesta celular requiere de un mayor tiempo de recuperación.

Por otra parte, cuando se usó la técnica de RT-PCR para detectar el mRNA de lisozima en hemocitos obtenidos 24 h después de la inoculación con *Vibrio alginolyticus* muertos, se detectó una banda de 450 bp correspondiente al producto de amplificación esperado para lisozima. Esta banda parece ser más abundante en los camarones inoculados con bacterias respecto a los controles (con SIC) lo que indicaría una estimulación en la expresión del gen de lisozima en los animales inoculados con bacterias (figura 27).

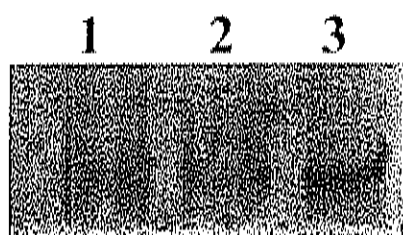


Figura 27: Detección del mRNA de lisozima por RT-PCR en hemocitos de camarones inoculados con: 1) *Vibrio parahaemolyticus*, 2) SIC. El carril 3 representa la amplificación de un clon positivo de lisozima.

Debido a la presencia de enfermedades en los cultivos y al rápido desarrollo de la acuicultura de camarón se ha generado la necesidad de implementar métodos sensibles y precisos con capacidad predictiva, que puedan usarse como herramientas de diagnóstico. Hasta la fecha, en camarón, se ha logrado demostrar la presencia de

actividades de defensa celular y humoral que involucra componentes protéicos de reconocimiento, efectores y moduladores de la respuesta, por ello, una alternativa para prevenir las enfermedades en los cultivos es establecer métodos que permitan medir variaciones en los componentes y proteínas plasmáticas específicas de camarón, debidas a alteraciones fisiológicas o enfermedad. Así, se pretende que las técnicas diseñadas en este trabajo puedan servir como herramientas en la búsqueda de marcadores de salud y que sean la base para el establecimiento de estrategias sanitarias preventivas en el cultivo de camarón. Estas técnicas pueden ser utilizadas en forma rutinaria en laboratorios de investigación o en centros de producción acuicola debido a que son fáciles, rápidas y permiten el manejo de volúmenes pequeños de muestra.

Conclusiones

En este trabajo se demostró el uso técnicas para la evaluación de componentes plasmáticos, tanto aquellas involucradas en procesos metabólicos (glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato, proteínas totales) como en procesos de defensa (BGBP, CP, FO, α 2M, lisozima). Estos métodos pueden ser usados en forma rutinaria en los centros de producción o en laboratorios de investigación. Se demostró que partículas de Sephadex son capaces de producir una respuesta de defensa en camarones, esta respuesta generada contra partículas biológicamente inertes respalda la existencia, en camarón, de un sistema inmune capaz de reconocer lo propio de lo extraño. A pesar de la alta variación observada en el número total de hemocitos, se pudo detectar disminución de este parámetro en camarones inoculados con partículas inertes o bacterias, por lo que parece ser un candidato como marcador de respuesta inmune celular.

Se establecieron las condiciones para la medición de actividades de moléculas relacionadas con el sistema inmune de camarón y se generaron kits, en formato de microplaca, para la detección de FO total, α 2M, CP y BGBP utilizando hemolinfa completa como muestra. El uso combinado de estos kits permitió realizar estudios de diagnóstico del estado inmune de camarones sometidos a diferentes situaciones de estrés.

La inoculación de partículas inertes provocó la disminución de BGBP pero no de los otros componentes del sistema inmune, mientras que la inoculación de bacterias del género *Vibrio* produjo disminución de todos los componentes con excepción de CP, lo que demostró la importancia del antígeno en la respuesta inmune de camarón

Se demostró que el gen de lisozima se sintetiza constitutivamente tanto en hemocitos como en hepatopáncreas de camarón y, aparentemente, su síntesis aumenta por la inoculación de bacterias patógenas muertas.

Aunque es necesario realizar estudios complementarios, la actividad de lisozima detectada en hemocitos de en camarón y la expresión cuantitativa del gen para lisozima puede ser un parámetro importante a considerar para generar estrategias de diagnosticar en las infecciones bacterias que afectan al camarón en cultivo.

Bibliografía

- Adams, A. (1991). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* biotype alginolyticus in penaeid shrimps using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay. *Aquaculture* 93: 101-108.
- Aguirre, G. G. (1990). Evaluación de los niveles de glucogeno y colesterol en el hepatopáncreas de camarón blanco (*P.vannamei*). UANL Monterrey
- Agundis, C.; Pereyra, A.; Zenteno, R.; Brassart, C.; Sierra, C.; Vazquez, L. and Zenteno, E. (2000). Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127B: 165-172.
- Akiyama, D. M.; Dominy, W. G. and Lawrence, A. L. (1989). Penaeid Shrimp nutrition for the comercial feed industry. *Marine Shrimp Culture*: 81-98.
- Anderson, J. S.; Taylor, A. C. and Atkinson, R. J. (1994). Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* (Crustacea: Thalassinidea). *Comparative Biochemistry and Physiology* 108A: 515-522.
- Armstrong, P. B.; Mangel, W. F.; Wall, J. S.; Hainfield, J. F.; Vanholde, K. E.; Ikai, A. and Quigley, J. P. (1991). Structure of $\alpha 2$ macroglobulin from the arthropod *Limulus polyphemus*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2526-2530.
- Armstrong, P. B.; Melchior, R.; Swarnakar, S. and Quigley, J. P. (1998). alpha 2-Macroglobulin does not function as a C3 homologue in the plasma hemolytic system of the American horseshoe crab, *Limulus*. *Molecular Immunology* 35: 47-53.
- Armstrong, P. B. and Quigley, J. P. (1999). $\alpha 2$ -macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 375-390.
- Asokan, R.; Armstrong, M. T. and Armstrong, P. B. (2000). Association of $\alpha 2$ -Macroglobulin with the Coagulin clot in the American Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*: A Potential Role in Stabilization from Proteolysis. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 199: 190-192.
- Asokan, R.; Arumugam, M. and Mullainadhan, P. (1997). Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel - *Perna viridis* Linnaeus. *Developmental and Comparative Immunology* 21: 1-12.

- Aspán, A.; Hall, M. and Söderhäll, K. (1990). The effect of endogeneous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. *Insect Biochemistry* 20: 485-492.
- Bacheré, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191: 3-11.
- Bacheré, E.; Mialhe, E. and Rodriguez, J. (1995). Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (bate) - prospects and applications. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 597-612.
- Baticados, M. C. L.; Lavilla-Pitogo, C. R.; Cruz-Lacierda, E. R.; de la Peña, L. D. and Sunaz, N. A. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Disease of Aquatic Organisms* 9: 133-139.
- Battistella, S.; Bonivento, P. and Amirante, G. A. (1996). Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian Journal of Zoology* 63: 337-343.
- Benjamin, L. R. and James, B. L. (1987). Light and electron microscopy of the hemocytes of *Ligia oceanica* (L.) (Crustacea: Isopoda). *Journal of Invertebrate Pathology* 49: 19-25.
- Bettencourt, R.; Lanz-Mendoza, H.; Lindquist, K. R. and Faye, I. (1997). Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. *European Journal of Biochemistry* 250: 630-637.
- Cardenas, W. and Dankert, J. R. (1997). Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 283-295.
- Cedano-Thomas, Y. (2000). Diferencias en la expresión por inoculación de partículas abióticas en camarón café (*Penaeus californiensis*). Universidad de Sonora Hermosillo, Sonora.
- Clare, A. S. and Lumb, G. (1994). Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Biology* 118: 601-610.
- Coligan, J. E.; Dunn, B. M.; Ploegh, H. L.; Speicher, D. W. and Wingfield, P. T., Eds. (1995). Current protocols in protein science. Current Protocols of Bioch. U. S. A., John Wiley & Sons, Inc.
- Cuzon, G.; Cahu, C.; Aldrin, J. F.; Massager, J. L.; Stephan, C. and Mevel, M. (1980). Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proceedings of World Mariculture Society* 11: 410-423.

- Chan, S.-M.; Rankin, S. M. and Keeley, L. L. (1988). Characterization of the molt stages in *Penaeus vanamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 175: 185-192.
- Chang, C. F.; Chen, H. Y.; Su, M. S. and Liao, I. C. (2000). Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 505-514.
- Chapelle, S. (1986). Aspects of phospholipid metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 4: 423-439.
- Chen, J. C. and Cheng, S. Y. (1993). Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106B: 293-296.
- Chen, J. C. and Cheng, S. Y. (1995). Hemolymph oxygen content, oxyhaemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Journal of Comparative Physiology* 164B: 530-535.
- Chen, J. C.; Cheng, S. Y. and Chen, C. T. (1994). Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109A: 339-347.
- Cheng, T. C. and Downs, J. C. U. (1988). Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 163-167.
- Cheng, W. and Chen, J.-C. (2000). Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 387-391.
- Chu, F.-L. E. and La Peyre, J. F. (1989). Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 224-232.
- Destoumieux, D.; Bulet, P.; Loew, D.; Vandorsselaer, A.; Rodriguez, J. and Bacheré, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). *Journal of Biological Chemistry* 272: 28398-28406.
- Días, A. C. B. (2000). Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* 191: 163-168.

- Donovan, M., A. and Laue, T., M. (1991). A Novel Trypsin Inhibitor from the Hemolymph of the Horseshoe Crab *Limulus polyphemus*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2121-2125.
- Ellis, B. A. and Morris, S. (1995). Effects of extreme pH on the physiology of the Australian yabby *Cherax destructor*: Acute and chronic changes in hemolymph oxygen levels, oxygen consumption and metabolite levels. *Journal of Experimental Biology* 198: 409-418.
- Fallon, A. M. and Sun, D. (2001). Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 263-278.
- Fenouil, E. and Roch, P. (1991). Evidence and characterization of lysozyme in six species of freshwater crayfishes from Astacidae and Cambaridae families. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99B: 43-49.
- Ferraris, R. P.; Parado-Esteva, F. D.; Ladja, J. M. and de Jesus, E. G. (1986). Effect of salinity on the osmotic, chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *Comparative Biochemistry and Physiology* 83A: 701-708.
- Ganong, W. F. (1982). Fisiología Medica. México, El Manual Moderno.
- Ganrot, P. O. (1966). Electrophoretic heterogeneity of alpha-2-macroglobulin. *Clinica Chimica Acta* 14: 493-501.
- Gillespie, J. P.; Kanost, M. R. and Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611-643.
- Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. (1997). Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A: 419-425.
- Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B: 77-82.
- Gollas-Galván, T.; Sotelo-Mundo, R. R., Yepiz-Plascencia, G. and Vargas-Albores, F. (Enviado). Purification and characterization of α 2-macroglobulina from shrimp (*Penaeus vannamei*).
- Gross, P. S.; Bartlett, T. C.; Browdy, C. L.; Chapman, R. W. and 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*. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 565-577.
- Guzmán-Murillo, A.; Ochoa, J. L. and Vargas-Albores, F. (1993). The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A: 271-275.
- Hall, M.; Ruigong, W.; Van Antwerpen, R.; Sottrup-Jensen, L. and Söderhäll, K. (1999). The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1965-1970.
- Hall, M. R. and Van, H. E. (1998). The effect of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29: 290-299.
- Hauton, C.; Hawkins, L. E. and Williams, J. A. (1997). *In situ* variability in phenoloxidase activity in the shore crab, *Carcinus maenas* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology* 117B: 267-271.
- Hergenbahn, H. G.; Hall, M. and Söderhäll, K. (1988). Purification and characterization of an α_2 -macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Biochemical Journal* 255: 801-806.
- Hergenbahn, H. G. and Söderhäll, K. (1985). α_2 -macroglobulin-like activity in plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81B: 833-835.
- Hernández-López, J. (1985). Estandarización de la técnica de ELISA y su uso en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Instituto Politécnico Nacional México, D. F.
- Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 113C: 61-66.
- Hose, J. E.; Martín, G. G. and Gerard, A. S. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 178: 33-45.
- Itami, T.; Asano, M.; Tokushige, K.; Kubono, T.; Nakagawa, A.; Takeno, N.; Nishimura, H.; Maeda, M.; Kondo, M. and Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164: 277-288.

- Iwaki, D.; Kawabata, S.; Miura, Y.; Kato, A.; Armstrong, P. B.; Quigley, J. P.; Nielsen, K. L.; Dolmer, K.; Sottrupjensen, L. and Iwanaga, S. (1996). Molecular cloning of *Limulus* α_2 -macroglobulin. *European Journal of Biochemistry* 242: 822-831.
- Jeackel, W. H.; Aizpun, J. E. and Moreno, V. J. (1991). Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of the digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* bate. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98B: 253-260.
- Johansson, M. W. (1999). Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 303-315.
- Johansson, M. W.; Keyser, P.; Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today* 5: 171-176.
- Kang, D.; Romans, P. and Lee, J.-Y. (1996). Analysis of a lysozyme gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Gene* 174: 239-244.
- Kanost, M. R. (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 291-301.
- Kanost, M. R.; Zepp, M. K.; Ladendorff, N. E. and Andersson, L. A. (1994). Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 27: 123-136.
- Karunasagar, I.; Pai, R.; Malathi, G. R. and Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infectant. *Aquaculture* 128: 203-209.
- Kopacek, P.; Vogt, R.; Jindrak, L.; Weise, C. and Safarik, I. (1999). Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 989-997.
- Ladendorff, N. E. and Kanost, M. R. (1991). Bacteria-induced protein P4 (Hemolin) from *Manduca sexta*: A member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18: 285-300.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lanz, H.; Hernández, S.; Garrido-Guerrero, E.; Tsutsumi, V. and Aréchiga, H. (1993). Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental and Comparative Immunology* 17: 399-406.
- Lavilla-Pitogo, C. R.; Lcaño, E. M. and Paner, M. G. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164: 337-349.
- Le Moullac, G. and Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: 121-131.
- Le Moullac, G.; Le Groumellec, M.; Ansquer, D.; Froissard, S.; Levy, P. and Aquacop (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle - protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 227-234.
- Le Moullac, G.; Soyez, C.; Saulnier, D.; Ansquer, D.; Avarre, J. C. and Levy, P. (1998). Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 621-629.
- Lee, R. F. and Walker, A. (1995). Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology* 271: 401-412.
- Leonard, C.; Söderhäll, K. and Ratcliffe, N. A. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry* 15: 803-810.
- Liang, Z.; Lindblad, P.; Beauvais, A.; Johansson, M. W.; Latge, J.-P.; Hall, M.; Cereneus, L. and Söderhäll, K. (1992). Crayfish α -macroglobulin and 76 kDa protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kDa protein. *Journal of Insect Physiology* 38: 987-995.
- Lightner, D. V. (1996). Disease of culture penaeid shrimp. in: Handbook of mariculture. Crustacean aquaculture. McVey, J. P. Boca Raton, Fl., CRC Press: 939-486.
- Lightner, D. V. (1996). Epizootiology, distribution and impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Scientific and Technical Review* 15: 579-601.
- Lorenzon, S.; De Guarrini, S.; Smith, V. J. and Ferrero, E. A. (1999). Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 31-50.

- Lotz, J. M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 405-413.
- Maheswari, R.; Mullainadhan, P. and Arumugam, M. (1997). Characterisation of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards). *Fish & Shellfish Immunology* 7: 17-28.
- Marques, M. R. F. and Barracco, M. A. (2000). Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191: 23-44.
- Martin, G. G. and Graves, B. L. (1985). Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology* 185: 339-348.
- Martin, G. G.; Hose, J. E.; Omori, S.; Chong, C.; Hoodbhoy, T. and McKrell, N. (1991). Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100B: 517-522.
- Miura, Y.; Kawabata, S. and Iwanaga, S. (1994). A *Limulus* intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 269: 542-547.
- Miura, Y.; Kawabata, S.; Wakamiya, Y.; Nakamura, T. and Iwanaga, S. (1995). A *limulus* intracellular coagulation inhibitor type 2 - purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *Journal of Biological Chemistry* 270: 558-565.
- Montaño-Pérez, K.; Yepiz-Plascencia, G.; Higuera-Ciapara, I. and Vargas-Albores, F. (1999). Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B: 381-387.
- Muta, T. and Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 8: 41-47.
- Muta, T.; Miyata, T.; Misumi, Y.; Tokunaga, F.; Nakamura, T.; Toh, Y.; Ikehara, Y. and Iwanaga, S. (1991). *Limulus* factor-C -An Endotoxin sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *Journal of Biological Chemistry* 266: 6554-6561.
- Muta, T.; Oda, T. and Iwanaga, S. (1993). Horseshoe crab coagulation factor B: A unique serine protease zymogen activated by cleavage of an Ile-Ile bond. *Journal of Biological Chemistry* 268: 21384-21388.

- Perazzolo, L. M. and Barracco, M. A. (1997). The prophenoloxidase system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental and Comparative Immunology* 21: 385-395.
- Quackenbush, L. S. (1989). Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: In vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94B: 253-261.
- Racotta, I. S. and Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei* to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125A: 437-443.
- Racotta, I. S. and Palacios, E. (1998). Hemolymph Metabolic Variables in Response to Experimental Manipulation Stress and Serotonin Injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29: 351-356.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. (1990). Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 97B: 515-520.
- Ratcliffe, N. A.; Brookman, J. L. and Rowley, A. F. (1991). Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Developmental and Comparative Immunology* 15: 33-39.
- Ratcliffe, N. A.; Rowley, A. F.; Fitzgerald, S. W. and Rhodes, C. P. (1985). Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology* 97: 183-350.
- Ratner, S. and Vinson, S. B. (1983). Phagocytosis and Encapsulation: Cellular Immune Responses in Arthropoda. *American Zoologist* 23: 185-194.
- Reddy, M. S. and Rao, K. V. R. (1991). Tissue glycolytic potential of penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* during methylparathion, carbaryl and aldrin exposure. *Biochemical International* 23: 367-375.
- Reddy, M. S. and Rao, V. R. (1991). Methylparathion induced alterations in the tissue carbohydrate catabolism of marine prawn *Metapenaeus monoceros*. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 47: 925-932.
- Redinbaugh, M. G. and Turley, R. B. (1986). Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Analytical Biochemistry* 153: 267-271.
- Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium *Bacillus* S11. *Aquaculture* 191: 271-288.

- Reyez-Izquierdo, T. (2000). Características estructurales y funcionales de la proteína coaguladora del camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora
- Rodriguez, J. and Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.
- Rosas, C.; Sanchez, A.; Escobar, E.; Soto, L. and Bolongaro-Crevenna, A. (1992). Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology* 101A: 323-328.
- Roth, R. I. and Levin, J. (1992). Purification of *Limulus polyphemus* proclotting enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 267: 24097-24102.
- Roth, R. I. and Tobias, P. S. (1993). Lipopolysaccharide-binding proteins of *Limulus* amoebocyte lysate. *Infection and Immunity* 61: 1033-1039.
- Sanchez, A.; Pascual, C.; Sanchez, A.; Vargas-Albores, F.; Le Moullac, G. and Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198: 13-28.
- Sano, T. and Fukuda, H. (1987). Principal microbial diseases of mariculture in Japan. *Aquaculture* 67: 59-69.
- Santos, E. A. and Keller, R. (1993). Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustaceans species: A role of crustaceans hyperglucemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A: 343-347.
- Santos-Argumedo, L.; Hernández-López, J.; Quezada-Pascual, F. and Estrada-Parra, S. (1986). Estandarización del inmunoanálisis enzimático. *Infectologia* VI: 18-23.
- Sartoris, F. J. and Poertner, H. O. (1997). Increased concentration of hemolymph Mg²⁺ protect intracellular pH and ATP levels during temperature stress and anoxia in the common shrimp *Crangon crangon*. *Journal of Experimental Biology* 200: 785-792.
- Saul, S. J. and Sugumaran, M. (1989). o-Quinone/quinone methide isomerase: A novel enzyme preventing the destruction of self-matter by phenoloxidase-generated quinones during immune response in insects. *FEBS Letters* 249: 155-158.
- Schmidt, O. and Theopold, U. (1991). Immune defense and suppression in insects. *BioEssays* 13: 343-346.

- Schmitt, A. S. and Santos, E. A. (1993). Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea:Decapoda) during emersion. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106: 329-336.
- Shafir, S.; Tom, M.; Ovadia, M. and Lubzens, E. (1992). Protein vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 183: 394-400.
- Shariff, M.; M., Y. F.; Devaraja, T. N. and Rao, P. S. (2001). The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. *Aquaculture Research* 32: 181-187.
- Shiau, S. Y. and Chou, B. S. (1994). Grass shrimp, *Penaeus monodon*, growth as influenced by dietary taurine supplementation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108: 137-142.
- Shin, S. W.; Park, S. S.; Park, D. S.; Kim, M. G.; Kim, S. C.; Brey, P. T. and Park, H. Y. (1998). Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 827-37.
- Shugar, D. (1952). Measurement of lysozyme activity and the ultra violet inactivation of lysozyme. *Biochimical and Biophysical Acta* 8: 302.
- Smith, V. J. and Ratcliffe, N. A. (1980). Cellular defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*: in vivo hemocytic and histopathologic responses to injected bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* 35: 65-74.
- Smith, V. J. and Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell and Tissue Research* 233: 295-303.
- Smith, V. J.; Swindlehurst, R. J.; Johnston, P. A. and Vethaak, A. D. (1995). Disturbance of host defense capability in the common shrimp, *Crangon crangon*, by exposure to harbour dredge spoils. *Aquatic Toxicology* 32: 43-58.
- Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review. *Developmental and Comparative Immunology* 6: 601-611.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10: 23-28.

- Söderhäll, K.; Cerenius, L. and Johansson, M. W. (1994). The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Annals of the New York Academy of Sciences* 712: 155-161.
- Sotelo-Mundo, R.; Islas Osuna, M.; E., D. L. R.; Hernández-López, J.; Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (Submitted). Lysozyme from hemocytes of the white shrimp *Penaeus vannamei*: cDNA sequencing and enzymatic activity. *Marine Biotechnology*.
- Spotts, D. G. and Lutz, P. L. (1981). L-Lactic acid accumulation during activity stress in *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus duorarum*. *Journal of World Mariculture Society* 12: 244-249.
- Sritunyalucksana, K.; Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 179-186.
- Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191: 53-69.
- Sritunyalucksana, K. S.; Sithisarn, P.; Withayachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1999). Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 21-30.
- Stuck, K. C.; Watts, S. A. and Wang, S. Y. (1996). Biochemical response during starvation and subsequent recovery in postlarval pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Marine Biology* 125: 33-45.
- Sun, S. C.; Lindstrom, I.; Boman, H. G.; Faye, J. and Schmidt, O. (1990). Hemolin -An insect immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250: 1729-1732.
- Sung, H. H.; Chang, H. J.; Her, C. H.; Chang, J. C. and Song, Y. L. (1998). Phenoloxidase Activity of Hemocytes Derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 26-33.
- Taft, A. S.; Chen, C. C.; Li, J. and Christensen, B. M. (2001). Molecular cloning of two prophenoloxidase genes from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 10: 97-103.
- Tait, J. (1911). Types of crustacean blood coagulation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 9: 191-198.
- Tanaka, S.; Aketagawa, J.; Takahashi, S.; Shibata, Y.; Tsumuraya, Y. and Hashimoto, Y. (1991). Activation of a limulus coagulation factor G by (1-3)-beta-D-glucans. *Carbohydrate Research* 218: 167-174.

Tanaka, S.; Aketagawa, J.; Takahashi, S.; Shibata, Y.; Tsumuraya, Y. and Hashimoto, Y. (1993). Inhibition of high-molecular-weight (1-3)-beta-D-glucan-dependent activation of a limulus coagulation factor G by laminaran oligosaccharides and curdlan degradation products. *Carbohydrate Research* 244: 115-127.

Teshima, S.; Kanazawa, A.; Koshio, S. and Kondo, N. (1989). Nutritive value of sitosterol for the prawn *Penaeus japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 153-157.

Thorpe, K. E.; Taylor, A. C. and Huntingford, F. A. (1995). How costly fighting? Physiological effects of sustained exercise and fighting in swimming crabs, *Necora puber* (Brachyura Portunidae). *Animlitical Behaviour* 50: 1657-1666.

Tsing, A.; Arcier, J.-M. and Brehlin, M. (1989). Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 64-77.

Tsukimura, B.; Bender, J. S. and Linder, C. J. (2000). Development of an anti-vitellin ELISA for the assessment of reproduction in the ridgeback shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127A: 215-224.

Tyler, R. and Taylor, E. W. (1988). Analysis of hemolymph and muscle acid-base status during aerial exposure in the crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Journal of Experimental Biology* 134: 409-422.

Urich, K. (1994). *Comparative Animal Biochemistry*. Berlin, Springer-Verlar.

Vargas-Albores, F. (1992). El sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). Universidad Nacional Autónoma de México México DF

Vargas-Albores, F. (1995). The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *Journal of Marine Biotechnology* 3: 153-156.

Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G., (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191: 13-21.

Vargas-Albores, F.; Gollas-Galván, T. and Hernández-López, J. (Submitted). Separation of hemocytes populations from *Penaeus californiensis*, *P. vannamei* and *P. stylirostris* by density gradient. *Crustacean Biology*.

Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J. L. (1991). Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en la acuicultura. *Biotecnología* 1: 17-25.

- Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J. L. (1993). A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104A: 407-413.
- Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, M. A. and Ochoa, J.-L. (1992). Size-dependent haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comparative Biochemistry and Physiology* 103A: 487-491.
- Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, M. A. and Ochoa, J.-L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F.; Hinojosa-Baltazar, P.; Portillo-Clark, G. and Magallón-Barajas, F. (1998). Influence of temperature and salinity on the proPO system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Aquaculture Research* 29: 549-553.
- Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Söderhäll, K. (1996). A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Developmental and Comparative Immunology* 20: 299-306.
- Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 116B: 453-458.
- Vargas-Albores, F. and Ochoa, J.-L. (1992). Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102A: 1-5.
- Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (1998). Shrimp immunity. *Trends in Comparative Biochemical & Physiology* 5: 197-210.
- Voller, A.; Bidwell, D. E. and Bartlett, A. (1979). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Virginia, Dynatech Laboratories, Inc.
- Wallace, A. J. (1997). Combined single strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis. in: Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. Taylor, G. R. New York, CRC Press: 79-88.
- Yeh, M.-S.; Chen, Y.-L. and Tsai, I.-H. (1998). The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121B: 169-176.

- Yeh, M.-S.; Huang, C. J.; Leu, J. H.; Lee, Y. C. and Tsai, I.-H. (1999). Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *European Journal of Biochemistry* 266: 624-633.
- Yepiz-Plascencia, G.; Gollas, G. T.; Vargas-Albores, F. and García-Banuelos, M. (2000). Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Marine Biotechnology* 2: 485-492.
- Yepiz-Plascencia, G.; Jiménez-Vega, F.; Romo-Figueroa, M. G.; Sotelo-Mundo, R. and Vargas-Albores, F. (2001). Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei*. *Enviado a Comparative Biochemistry and Physiology* 132B: 585-592
- Yepiz-Plascencia, G.; Vargas-Albores, F.; Jimenez-Vega, F.; Ruiz-Verdugo, L. M. and Romo-Figueroa, G. (1998). Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121B: 309-314.
- Zahedi, M.; Denham, D. A. and Ham, P. J. (1992). Encapsulation and melanization responses of *Armigeres subalbatus* against inoculated Sephadex beads. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 258-263.
- Zou, E.; Du, N. and Lai, W. (1996). The effects of several hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology* 114: 105-109.

Anexos

1 **Micro methods for quantifying immune components of shrimp.**

2 Hernández-López Jorge¹, Gollas-Galván Teresa², Yepiz-Plascencia Gloria² and Vargas-
3 Albores Francisco²

4
5 ¹CIBNOR. PO Box 349; Guaymas, Son; 85400, México.

6 ²CIAD. Marine Biotechnology. PO Box 1735; Hermosillo, Son; 83000, México

7
8 **Running Title: Methods in shrimp immunity.**

9 Corresponding Author: Jorge Hernández-López
10 Center for Biological Research
11 PO Box 349
12 Guaymas, Son
13 85400 México
14 Tel: +52 (622) 1 22 37
15 e-mail: jhlopez@cibnor.mx

16

1 **Abstract**

2 Modifications of defense system parameters in shrimp have been observed under
3 experimental conditions. However, the absence of information about all defense
4 components, their physiological importance and correlation has drove to no conclusive
5 results. One problem may be the lack of reliable and effective indicators to measure
6 defense status. In this work, simple, sensitive, cheap and time saving methods for
7 BGBP/HDL, proPO/PO and α_2M quantification are proposed. This group of plasma
8 proteins represent three main steps in the immune response: recognition, action and
9 control and combined with total or differential hemocytes count could give a better view
10 of the immune status of shrimp.

1 **Introduction**

2 Although invertebrates do not have immunoglobulins and memory cells, they have
3 defense cells and proteins that recognize and destroy non-self material. Cellular response
4 is mediated by phagocytosis, encapsulation, nodulation and cytotoxicity (Battistella et al.,
5 1996; Johansson et al., 2000; Ratcliffe et al., 1991), meanwhile humoral response
6 involves agglutinins, enzymes, cytokines, antibacterial peptides and lytic factors
7 (Bacheré, 2000; Boulanger et al., 2001; Lowenberger, 2001; Marques and Barracco,
8 2000). Some of these components and/or activities are integrated in sequentially activated
9 systems. In crustaceans, the coagulation and the prophenoloxidase (proPO) activating
10 system, have been defined as important defense mechanism (Johansson and Söderhäll,
11 1989; Söderhäll, 1982; Söderhäll and Cerenius, 1998). The first one is an essential
12 mechanism that prevents loss of hemolymph through breaks in the exoskeleton and the
13 dissemination of bacteria throughout the body (Martin et al., 1991), while the proPO
14 activating system participates in both non-self recognition and destruction (Ashida and
15 Yamazaki, 1990; Battistella et al., 1996; Cardenas and Dankert, 1997; Dunphy, 1991;
16 Gillespie et al., 1997; Perazzolo and Barracco, 1997; Söderhäll and Cerenius, 1998;
17 Söderhäll et al., 1994; Sung et al., 1996; Vargas-Albores, 1995), and has been considered
18 a key component of immune response in insects and crustacean.

19 The proPO system is activated by microbial compounds such as lipopolysaccharides
20 (LPS) (Lanz et al., 1993; Söderhäll and Häll, 1984), peptidoglycans (PG) (Brookman et
21 al., 1989) or β -glucans (BG) (Ashida et al., 1983; Hernández-López et al., 1996; Smith
22 and Söderhäll, 1983; Söderhäll, 1981; Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000). The

1 activation includes controlled exocytosis, proteolytic transformation of proPO to active
2 enzyme (phenoloxidase; PO) and the control of the reaction products in order to avoid
3 undesired tisular damage.

4 Although microbial compounds can activate the system directly, plasma recognition
5 proteins can enhance the stimulation (Vargas-Albores et al., 1996). A 100 kDa protein
6 β -glucan binding protein (BGBP) has been detected in crayfish (Cerenius et al., 1994;
7 Duvic and Söderhäll, 1992; Lee et al., 2000) and shrimp (Vargas-Albores et al., 1996;
8 Vargas-Albores et al., 1997). This is synthesized in hepatopancreas (Yepiz-Plascencia et
9 al., 2000) and it is identical to the high density lipoprotein (HDL) isolated from shrimp
10 plasma (Ruiz-Verdugo et al., 1997; Yepiz-Plascencia et al., 1995; Yepiz-Plascencia et al.,
11 1998). After recognition, the complex BGBP- β -glucan reacts with a receptor in the
12 hemocyte (Barracco et al., 1991) initiating the activation of proPO (Cerenius et al., 1994).

13 In insects, proPO has been detected in hemocytes (Leonard et al., 1985), in plasma
14 (Ashida et al., 1983) or in both hemolymph fractions (Ashida, 1990; Brehélin et al., 1989;
15 Saul et al., 1987). However, in crustaceans proPO has been detected only inside
16 hemocytes (Hernández-López et al., 1996; Lanz et al., 1993; Smith and Söderhäll, 1991;
17 Söderhäll and Smith, 1983; Vargas-Albores et al., 1993). In spite of the proPO system
18 components location, the activation mechanism of proPO seems to be quite similar in
19 insects and crustaceans.

20 In shrimp, proPO has been detected as a 114 kDa zymogen which is proteolitically
21 transformed to 107 kDa active form (Collas-Galván et al., 1999). proPO activation is

1 mediated by a Ca^{2+} -dependent serine-proteinase named proPO activating enzyme
2 (PPAE), located as zymogen inside hemocytic granules and is activated in plasma after
3 degranulation (Gollas-Galván et al., 1997) thereafter cleaving proPO to PO.

4 Because the key component for proPO activation is the PPAE, it has been proposed that
5 the control of the response in crustacean is mediated by proteinase inhibitors (Aspán et
6 al., 1990; Johansson and Söderhäll, 1989) such as α_2 macroglobulin ($\alpha_2\text{M}$) (Hergenbahn
7 et al., 1988) and trypsin inhibitor (Hergenbahn et al., 1987).

8 The proPO activating mechanism and the components involved have been largely studied
9 in crayfish (Huang et al., 2000; Lee et al., 2000; Söderhäll and Cerenius, 1998; Wang et
10 al., 2001) and shrimp (Gollas-Galván et al., 1999; Sritunyaluksana et al., 1999a; Vargas-
11 Albores and Yepiz-Plascencia, 2000; Yeh et al., 1999). However, only the determination
12 of PO activity has been recently used to evaluate immune status in crustaceans (Cheng
13 and Chen, 2000; Le Moullac and Haffner, 2000; Rengpipat et al., 2000; Rodriguez and
14 Le Moullac, 2000; Sanchez et al., 2001).

15 Recently, cellular parameters as hemocytes count or reactive oxygen intermediates
16 (ROIs) production and humoral parameters as antibacterial activity or concentration of
17 plasmatic proteins, are considered markers for health status (Le Moullac and Haffner,
18 2000; Le Moullac et al., 1997; Lorenzon et al., 1999; Rodriguez and Le Moullac, 2000).
19 However, the lack of reliable and effective indicators to measure defense status
20 (Sritunyaluksana et al., 1999b) is still a constraint. In this way, micro methods for
21 quantitative determination of a recognition factor (BGBP), immune effector (proPO) and

- 1 α_2M as regulatory molecule in shrimp hemolymph are proposed as useful tool for shrimp
- 2 immune status evaluation.

1 **Material and methods**

2 Pyrogen-free materials were acquired commercially (quality cell culture, endotoxin-free)
3 when available. Glassware was washed and placed at 180°C during 4 hours. Plastic was
4 washed and immersed in a 1% E-toxa-clean (Sigma Chem. Co.) solution for 30 minutes,
5 before rinsing with pyrogen-free water and dried at 37°C. Only cell culture or endotoxin
6 free chemicals (Sigma Chem. Co.) were used. All solutions used with alive cells were
7 prepared with pyrogen-free water.

8 Extraction and Separation of the Hemolymph

9 Shrimp salt solution (SSS), was prepared as Vargas-Albores (1992). A shrimp
10 anticoagulant solution was prepared by adding 10 mM EDTA.Na₂ to SSS. The
11 hemolymph was extracted from the pleopod base of the first abdominal segment near the
12 genital pore. 300 µl of hemolymph were obtained using a 1-ml syringe, 27-gauge needle,
13 containing 600 µl of pre-cooled anticoagulant solution.

14 Protein determination

15 Total protein concentration was determined using alkaline-cooper solution (Hycel S.A.)
16 according to biuret method (Cotton et al., 1997). The method was modified for
17 microplates by incubating 10 µl of plasma or total hemolymph with 200 µl of alkaline-
18 cooper solution. Protein concentration was calculated using bovine serum albumin (BSA)
19 as reference.

1 Antigen and antiserum preparation

2 BGBP protein was purified using affinity chromatography according to Vargas-Albores
3 (1997) and used as standard. anti-BGBP was preparing according with Yepiz-Plascencia
4 et al. (2000). Briefly, Purified BGBP/HDL (0.1 mg) was mixed with complete adjuvant
5 (1:1) and inoculated in rabbits, and booster injections containing incomplete Freund's
6 adjuvant were administrated every 2 weeks. Rabbit blood was obtained after last
7 inoculation and the serum, obtained after clot formation and centrifugation, was frozen
8 until use.

9 Micro-plate assay for total PO activity determination

10 The total PO activity (PO + proPO) in hemolymph was measured spectrophotometrically
11 in 96 wells micro-titer plates using L-DOPA as substrate according to Hernández-López
12 et al. (1996). Briefly, 200 µl of trypsin (0.1 mg/ml in deionized water) were added to
13 10 µl of total hemolymph and incubated 10 min at 28°C. After incubation, 50 µl of L-
14 DOPA were added and incubated 10 min. Absorbance at 490 nm was recorded. The PO
15 activity was calculated as $\Delta A_{490\text{nm}}/\text{min}/\text{mg}$ of protein.

16 In parallel experiments, 10 µl of hemolymph and 250 µl of 1 mg/ml L-DOPA were
17 incubated in micro-wells containing 10 µl of 1 mg/ml trypsin. After 20 min at 28°C,
18 absorbance at 490 nm was recorded and activity was calculated as above.

1 Micro-plate assay for α_2 -Macroglobulin activity.

2 α_2 M activity was measured incubating (15 min at 37°C) 50 μ l of cell free plasma or total
3 hemolymph with 10 μ l of 1 mg/ml trypsin in a microplate. Then, 10 μ l of 2 mg/ml
4 soybean trypsin inhibitor (STI) were added and incubated for 10 min at 37°C. Finally,
5 100 μ l of 1 mg/ml BAPNA (N-Benzoyl-DL-*l*-arginina-*p*-nitroamilida) were added and
6 incubated 2h at 37°C. A_{415nm} was recorded and activity calculated as μ g of trypsin
7 trapped by α_2 M, using trypsin as reference.

8 ELISA inhibition assay

9 A competitive ELISA procedure to quantify shrimp plasma BGBP was developed
10 immobilizing 100 μ l of purified BGBP (1 μ g/ml in PBS buffer, pH 7.2) per well by
11 incubation for 1 h at 37°C. Afterwards, the plate was washed twice with PBS plus 0.05%
12 Tween 20 (PBS-Tween) and blocked with 100 μ l of BSA (2 % in PBS) for 1 h at 37°C.
13 After washing twice with PBS-Tween, 50 μ l of shrimp plasma and 50 μ l of anti-
14 HDL/BGBP were added and incubated at 37°C for 1 h. The plate was washed twice with
15 PBS-Tween and incubated (1 h at 37°C) with 100 μ l of anti-rabbit peroxidase conjugated.
16 The plate was washed 6 times with PBS-Tween and incubated 30 min at 37°C with 100
17 μ l of 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (1 mg/ml in citrate buffer, pH 5.4, plus 10 μ l of
18 hydrogen peroxide). Reaction was stopped with 50 μ l of sulfuric acid (1 N) and A_{450nm}
19 was recorded.

- 1 Positive control was prepared incubating 50 μ l of PBS plus 50 μ l of anti-BGBP/HDL
- 2 before incubation with conjugate and considered as 100%. Unspecific reactions were
- 3 determined using wells without antigen and purified BGBP was used as reference.

1 **Results and Discussion**

2 Modifications of defense system parameters have been observed under experimental
3 conditions including infections (Le Moullac et al., 1997; Le Moullac et al., 1998),
4 nutrition (Ulrich et al., 1992) or immunostimulants evaluation (Itami et al., 1998;
5 Sritunyaluksana et al., 1999b). However, the absence of information about all defense
6 components, their physiological importance and correlation has drove to no conclusive
7 results. Both hemocytes total and differential count have been widely used, although they
8 are not considered good parameters due to high modifications under different
9 physiological conditions as molt (Le Moullac et al., 1997; Tsing et al., 1989) and
10 reproduction (Sanchez et al., 2001).

11 In addition, some determinations, as proPO/PO, have to be explained based on their
12 activation mechanism and correlated with the clinical signs of the animal. Considering
13 that proPO is transformed to PO when the system is activated, the measurement of total
14 proPO reflects the defensive animal capacity while the detection of PO is indicative that
15 the animal could be infected and the proPO system is being activated. On the other hand,
16 the manipulation of the hemolymph sample is also important. In the case of proPO/PO,
17 pyrogen-free glassware and solutions should be used in order to avoid the system
18 activation and misinterpretations (Vargas-Albores et al., 1993). Hemocytes degranulation
19 can also be induced by hyper or hypo-osmotic solutions (Hernández-López et al., 1996)
20 or by using an inappropriate anticoagulant. Also degranulation can also occur when
21 centrifugation force is more than 1500xg (Hernández-López et al., 1996) leading to
22 erroneous results.

1 Based on ionic and osmotic characteristics of shrimp hemolymph (Vargas-Albores and
2 Ochoa, 1992), an anticoagulant solution was developed, which allows shrimp hemolymph
3 collection and separation of hemocytes without cellular damage or activation (Vargas-
4 Albores et al., 1993). In addition, since microbial compounds can activate proPO, all
5 buffers should be prepared with pyrogen-free materials. Finally the centrifugation force
6 must be less than 1000xg.

7 Other technical problems, mainly if the animals are small, is to determine the accurate
8 quantity of extracted hemolymph. To avoid sample coagulation, it has to be collected
9 directly in anticoagulant solution and the dilution should be calculated with precision. A
10 procedure consists on weighing the syringe with anticoagulant before and after sampling,
11 then the weight, not the volume, of the obtained sample should be considered for
12 calculations. However, this procedure is time-consuming and an internal parameter, such
13 as total protein concentration, could be used to normalize the results.

14 Although Bradford (Bradford, 1976) and BCA (Redinbaugh and Turley, 1986) methods
15 are widely used for protein quantification, they are very sensitive to evaluate total protein
16 in shrimp plasma that ranges from 80 to 100 mg/ml. To avoid sample dilution, biuret
17 method was selected for a direct quantification of total plasma protein, saving time and
18 excessive sample manipulation.

19 The purification of shrimp BGBP is simple and involves precipitation of plasma by
20 dialysis against distilled water and affinity chromatography in immobilized heparin
21 (Jiménez-Vega et al., In press). Purified BGBP/HDL seems to have adequate

1 immunogenicity and its inoculation in rabbits produced a good antibody titer (1:10000 for
2 ELISA).

3 ELISA assays has been used for quantifying crustacean proteins as vitellogenins (Chang
4 and Shih, 1995; Lee and Watson, 1994; Lee et al., 1997; Sagi et al., 1999), lectins
5 (Agundis et al., 2000) and cuticular phenoloxidase (Chen et al., 1992). For the
6 quantification of shrimp BGBP by direct ELISA, the immobilization of plasma samples
7 to the microplates is a necessary time-consuming step. In addition, since haemocyanin
8 comprises more than 80% of total plasma protein (Figueroa-Soto et al., 1997) most of the
9 well surface is covered by this protein, reducing the relative quantity of BGBP and
10 consequently the sensitivity. A competitive ELISA was designed immobilizing purified
11 shrimp BGBP in the plates and this procedure permitted to reduce both time of analysis
12 and unspecific reactions.

13 The adequate quantity of immobilized antigen was determined incubating 100 µl of
14 purified BGBP, at different concentrations in the Maxysorp™ polystyrene microplate,
15 finding that 100 ng of BGBP was the maximum quantity coated per well (Fig 1).
16 Although for complete immobilization, several protocols recommend to incubate the
17 plates 2 h at 37°C followed by overnight at 4°C (Agundis et al., 2000; Derelle et al.,
18 1986; Lee and Walker, 1995), shrimp BGBP is adsorbed quickly and 30 min at 37°C
19 seems to be enough for the complete immobilization of 100 ng (Fig 2). This could be due
20 to BGBP hydrophobicity considering that this protein is also a HDL. In order to
21 standardize the process, the immobilization of antigens was done using 100 µl of 1 µg/ml
22 of purified BGBP in PBS (pH = 7.3) and incubating 1 h at 37°C.

1 The optimal antibody dilution in competitive ELISA test was determined using serial
2 dilutions of anti-BGBP/HDL. The dilution of the anti-BGBP/HDL serum 1:500, gave the
3 best results (Fig 2), in a combination of low background, optical density range and
4 sensibility. According to the reference curve, that was carried with different
5 concentrations of purified BGBP, the competitive ELISA assay permits quantitative
6 determination of 30 to 1000 ng/ml.

7 Cross reactivity was tested using BSA or other major shrimp plasma proteins. In spite of
8 hemocyanin, which is not retained by the heparin column, clotting protein (CP) and α_2M
9 were tested. Although eluted at different salinity, these proteins were retained by the
10 heparin column and their plasma concentrations are considerable, 20 % (Durlat and
11 Vranckx, 1983) and 0.5-2% (Armstrong et al., 1990), respectively. Anti-BGBP/HDL
12 showed a small cross reaction, less than 6%, with BSA, CP or α_2M (Table 1), and this
13 reaction did not have significant effect in the BGBP quantification. Accuracy was
14 determined making repetitive measurement of the standard solution (1 $\mu\text{g/ml}$). The
15 calculated intra-assay coefficient of variation for a minimum of 50 samples, was 5.7%.

16 For proPO/PO quantification, L-DOPA oxidation has been widely used (Cardenas and
17 Dankert, 1997; Chen et al., 1991; Gómez-Jiménez et al., 2000; Jackson et al., 1993;
18 Söderhäll, 1981). Previously, we proposed a microplate method for proPO/PO (Hernández-
19 López et al., 1996), and other authors (Cheng and Chen, 2000; Sanchez et al., 2001; Scholz
20 et al., 1999) have used this method. According to the proPO activating system model, it is
21 necessary to quantify separately proPO and PO because each one reflect different immune
22 status or phase. Plasma PO is an indication that the proPO system has been activated

1 probably due to an infectious process or other stress condition. However proPO
2 concentration reflects the immune capability of shrimp, expecting that at higher proPO
3 concentration a better defense response. In fact, the PO has to be evaluated in cell-free
4 plasma; meanwhile for proPO quantification hemocytes have to be used.

5 In crustaceans, including shrimp, proPO has been detected in the supernatant of hemocyte
6 lysate (Asokan et al., 1997; Cardenas and Dankert, 1997; Gollas-Galván et al., 1997;
7 Hauton et al., 1997; Hernández-López et al., 1996; Sung et al., 1998). Alternatively the
8 granular content of hemocytes could be obtained by using a low salinity buffer and high-
9 speed centrifugation (Hernández-López et al., 1996). In both cases, separation and lysis
10 of hemocytes is required and the possibility to use whole hemolymph was investigated.

11 The granular content was released from hemocytes using hypo or hyper osmotic solutions
12 (Fig 4), detecting > 80% of proPO outside hemocytes at 50 mM NaCl. The salinity of
13 shrimp hemolymph is, in average, equivalent to 450 mM NaCl (Vargas-Albores and
14 Ochoa, 1992). Thus, diluting 10 µl of hemolymph with 250 µl of distilled water, the
15 salinity of the hemolymph samples dropped to 18 mM NaCl and release of proPO system
16 values from hemocytes increased from 2.03 ± 0.06 to 17.7 ± 0.2 units. The in vitro
17 transformation of proPO to PO by trypsin was tested using different trypsin
18 concentrations (0.7 to 100 µg per well) finding that 10 µg of trypsin was enough for all
19 proPO transformation, even in samples with high proPO concentration. In summary the
20 method includes the incubation of 10 µl of hemolymph and 10 µg of trypsin with 250 µl
21 of L-DOPA (1 mg/ml distilled water) during 20 min.

1 In vivo, the proPO proteolytic activation occurs by PPAE and this proteolytic activity
2 must be controlled in order to prevent undesired tissue damage. Plasma α_2M has been
3 proposed as a regulatory proteinase inhibitor (Armstrong et al., 1996) and its
4 quantification could help in the evaluation of physiological status of shrimp. A decrement
5 could be explained as a proteinase activation in physiological process (PPAE in proPO
6 activating system) or by a direct inhibition of bacterial proteinases.

7 In contrast to the active site proteinase inhibitors, α_2M physically traps the proteinases
8 without affecting its catalytic site, and this property is used to determine its activity since
9 the entrapped proteinase hydrolyzes low, but not high, molecular weight substrates. In
10 addition, entrapped proteinases are protected against inhibitors, as STI, making possible
11 to quantify α_2M as the quantity of entrapped trypsin that hydrolyzes small substrates, like
12 BAPNA (Ganrot, 1966).

13 The described method for quantification is accurate and has been extensively used (de
14 Boer et al., 1993; Hergenroth and Söderhäll, 1985; Kopáček et al., 2000). For shrimp
15 samples, the procedure was modified for small samples and high environmental salinity.

16 Because α_2M is measured indirectly by trapped trypsin activity, it was necessary to
17 prepare a standard curve. When trypsin was dissolved in SIC-EDTA, a reduction of
18 trypsin activity and precipitation was observed. Also SSS, PBS and 150 mM NaCl
19 produced precipitation after 30 min incubation. On the other hand, water produced good
20 results, but the best sensibility was obtained using 10 mM HEPES (Table 2). Thus,
21 10 mM HEPES (pH 7.5) was used for both trypsin standard curve (linear from 0.2 to

1 0.6 μ g) and α_2 M activity test. Although α_2 M determination is done in cell-free plasma,
2 statistical differences were not observed when whole hemolymph samples (10 to 50 μ l)
3 were used,

4 In order to have a better view of the immune status of the shrimp, these proposed
5 methods could be combined with total or differential hemocytes count, oxygen
6 intermediates, phagocytosis and others. Simple, sensitive, cheap and time saving methods
7 for BGBP, proPO/PO and α_2 M quantification are now available, and this group of
8 proteins could represent three main steps of immune response: recognition, action and
9 control.

10 **Acknowledgments**

11 We are thanks to Jimenez-Vega F. for BGBP purification. This research was partial
12 supported by CONACyT grant No. 31544-B.

1 **References**

- 2 Agundis, C., Pereyra, A., Zenteno, R., Brassart, C., Sierra, C., Vazquez, L., Zenteno, E.
3 2000. Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)
4 hemolymph by ELISA. *Comp. Biochem. Physiol.* 127B:165-172.
- 5 Armstrong, P.B., Melchior, R., Quigley, J.P. 1996. Humoral immunity in long-lived
6 arthropods. *J. Insect. Physiol.* 42:53-64.
- 7 Armstrong, P.B., Quigley, J.P., Rickles, F.R. 1990. The *Limulus* blood cell secretes α -
8 macroglobulin when activated. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 178:137-143.
- 9 Ashida, M. 1990. The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res. Immunol.*
10 141:908-910.
- 11 Ashida, M., Ishizaki, Y., Iwahana, H. 1983. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial
12 cell walls or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem.*
13 *Biophys. Res. Comm.* 113:562-568.
- 14 Ashida, M., Yamazaki, H. 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects:
15 with special reference to its activation., p. 239-265, *In* Ohnishi, E. and Ishizaki, H.,
16 eds. *Molting Metamorph.* Springer-Verlag, Berlin.
- 17 Asokan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P. 1997. Activation of prophenoloxidase in
18 the plasma and haemocytes of the marine mussel - *Perna viridis* Linnaeus. *Develop.*
19 *Comp. Immunol.* 21:1-12.
- 20 Aspán, A., Hall, M., Söderhäll, K. 1990. The effect of endogeneous proteinase inhibitors
21 on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish
22 haemocytes. *Insect Biochem.* 20:485-492.
- 23 Bacheré, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-11.
- 24 Barracco, M.A., Duvic, B., Söderhäll, K. 1991. The β -1,3-glucan-binding protein from
25 the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces
26 spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res.* 266:491-497.
- 27 Battistella, S., Bonivento, P., Amirante, G.A. 1996. Hemocytes and immunological
28 reactions in crustaceans. *Italian J. Zool.* 63:337-343.
- 29 Boulanger, N., Ehret-Sabatier, L., Brun, R., Zachary, D., Bulet, P., Imler, J.L. 2001.
30 Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagellate parasite
31 *Crithidia* spp. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:129-137.

- 1 Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
2 quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*
3 72:248-254.
- 4 Brehélin, M., Drif, L., Baud, L., Boemare, N. 1989. Insect haemolymph: Cooperation
5 between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19:301-
6 307.
- 7 Brookman, J.L., Rateliffe, N.A., Rowley, A.F. 1989. Studies on the activation of the
8 prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect*
9 *Biochem.* 19:47-57.
- 10 Cardenas, W., Dankert, J.R. 1997. Phenoloxidase specific activity in the red swamp
11 crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.* 7:283-295.
- 12 Cerenius, L., Liang, Z., Duvie, B., Keyser, P., Hellman, U., Tapio-Palva, E., Iwanaga, S.,
13 Söderhäll, K. 1994. Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding
14 protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269:29462-29467.
- 15 Cotton, F., Delobbe, E., Gulbis, B. 1997. Assessment of a biuret method without
16 concentration step for total protein determination in cerebrospinal fluid. *Clin.*
17 *Biochem.* 30:313-314.
- 18 Chang, C.F., Shih, T.W. 1995. Reproductive cycle of ovarian development and
19 vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebr.*
20 *Reprod. Develop.* 27:11-20.
- 21 Chen, J.S., Preston, J.F., Wei, C., Hooshar, P., Gleeson, R.A., Marshall, M.R. 1992.
22 Structural comparison of crustacean, potato, and mushroom polyphenol oxidases. *J.*
23 *Agr. Food Chem.* 40:1326-1330.
- 24 Chen, J.S., Rolfe, R.S., Marshall, M.R., Wei, C.I. 1991. Comparison of phenoloxidase
25 activity from Florida spiny lobster and Western Australian lobster. *J. Food Sci.*
26 56:154-157.
- 27 Cheng, W., Chen, J.-C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune
28 parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish*
29 *Immunol.* 10: 387-391.
- 30 de Boer, J.P., Creasey, A.A., Chang, A., Abbink, J.J., Roem, S., Eerenberg, A.J.M.,
31 Hack, C.E., Taylor, F.B. 1993. Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of
32 fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon
33 model. *Infect. Immun.* 61:5035-5043.
- 34 Derelle, E., Groselaude, J., Meusy, J., Junera, H., Martin, M. 1986. ELISA titration of
35 vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp.*
36 *Biochem. Physiol.* 85B:1-4.

- 1 Dunphy, G.B. 1991. Phenoloxidase activity in the serum of two species of insects, the
2 gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lymantriidae) and the greater wax moth, *Galleria*
3 *mellionella* (Pyrilidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 98B:535-538.
- 4 Durliat, M., Vranckx, R. 1983. Analysis of clotting defects in diseased lobsters: II.
5 Immunochemical study of blood proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A:103-108.
- 6 Duvic, B., Söderhäll, K. 1992. Purification and partial characterization of a β -1,3-glucan-
7 binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus*
8 *leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 207:223-228.
- 9 Figueroa-Soto, C.G., Calderón de la Barca, A.M., Vázquez-Moreno, L., Higuera-Ciápara,
10 L., Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification of hemocyanin from the white shrimp (
11 *Penaeus vannamei* Boone), by immobilized metal affinity chromatography. *Comp.*
12 *Biochem. Physiol.* 117B:203-208.
- 13 Ganrot, P.O. 1966. Electrophoretic heterogeneity of alpha-2-macroglobulin. *Clinical of*
14 *Chemical Acta* 14:493-501.
- 15 Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenzcek, T. 1997. Biological mediators of insect
16 immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 42:611-643.
- 17 Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on
18 the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*,
19 Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 117A:419-425.
- 20 Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase
21 from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comp. Biochem.*
22 *Physiol.* 122B:77-82.
- 23 Gómez-Jiménez, S., Uglow, F.R., Gollas-Galvan, T. 2000. The effects of cooling and
24 emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster
25 *Pandalirus interruptus*. *Fish Shellfish Immunol.* 10:631-635.
- 26 Hauton, C., Hawkins, L.E., Williams, J.A. 1997. *In situ* variability in phenoloxidase
27 activity in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 117B:267-
28 271.
- 29 Hergenbahn, H.G., Aspán, A., Söderhäll, K. 1987. Purification and characterization of a
30 high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenoloxidase activation from crayfish plasma.
31 *Biochem. J.* 248:223-228.
- 32 Hergenbahn, H.G., Hall, M., Söderhäll, K. 1988. Purification and characterization of an
33 α_2 -macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus*
34 *leniusculus*. *Biochem. J.* 255:801-806.
- 35 Hergenbahn, H.G., Söderhäll, K. 1985. α_2 -macroglobulin-like activity in plasma of the
36 crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B:833-835.

- 1 Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the
2 prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes).
3 Comp. Biochem. Physiol. 113C:61-66.
- 4 Huang, T.-S., Wang, H., Lee, S.Y., Johansson, M.W., Soderhall, K., Cerenius, L. 2000. A
5 cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase
6 homologue similar to *Drosophila* masquerade. J. Biol. Chem. 275:9996-10001.
- 7 Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, T., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura,
8 H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of
9 kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived
10 from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture 164:277-288.
- 11 Jackson, A.D., Smith, V.J., Peddie, C.M. 1993. In vitro phenoloxidase activity in the
12 blood of *Clona intestinalis* and other ascidians. Develop. Comp. Immunol. 17:97-108.
- 13 Jiménez-Vega, F., Sotelo-Mundo, R., Ascencio-Valle, F., Vargas-Albores, F. In press.
14 BGBP (1,3-b-D glucan binding protein) from white shrimp *Penaeus vannamei*. is also
15 an heparin binding protein. Cell and Shellfish Immunology.
- 16 Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyaluksana, K., Söderhäll, K. 2000. Crustacean
17 haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191:45-52.
- 18 Johansson, M.W., Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO
19 system. Parasitol. Today 5:171-176.
- 20 Kopáček, P., Weise, C., Saravanan, T., Vitova, K., Grubhoffer, L. 2000. Characterization
21 of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick
22 *Ornithodoros moubata*. Eur. J. Biochem. 267:465-475.
- 23 Lanz, H., Hernández, S., Garrido-Guerrero, E., Tsutsumi, V., Aréchiga, H. 1993.
24 Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. Develop.
25 Comp. Immunol. 17:399-406.
- 26 Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in
27 Crustacea. Aquaculture 191:121-131.
- 28 Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., Aquacop. 1997.
29 Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris*
30 in relation with the moult cycle - protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol.
31 7:227-234.
- 32 Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avurte, J.C., Levy, P. 1998. Effect
33 of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp
34 *Penaeus stylirostris*. Fish Shellfish Immunol. 8:621-629.

- 1 Lee, C.-Y., Watson, R.D. 1994. Development of a quantitative enzyme-linked
2 immunosorbent assay for vitellin and vitellogenin of the blue crab *Callinectes sapidus*.
3 J. Crust. Biol. 14:617-626.
- 4 Lee, F.Y., Shih, T.W., Chang, C.F. 1997. Isolation and characterization of the female-
5 specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn.
6 *Macrobrachium rosenbergii* - comparison with ovarian vitellin. Gen. Comp.
7 Endocrinol. 108:406-415.
- 8 Lee, R.F., Walker, A. 1995. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during
9 ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 271:401-412.
- 10 Lee, S.Y., Wang, R., Söderhäll, K. 2000. A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding
11 protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*.
12 Purification, characterization and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 275:1337-1343.
- 13 Leonard, C., Söderhäll, K., Ratcliffe, N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and
14 protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. Insect Biochem. 15:803-810.
- 15 Lorenzon, S., De Guarrini, S., Smith, V.J., Ferrero, E.A. 1999. Effects of LPS injection
16 on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. Fish Shellfish Immunol. 9:31-50.
- 17 Lowenberger, C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol.
18 Biol. 31:219-229.
- 19 Marques, M.R.F., Barracco, M.A. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in
20 crustaceans. Aquaculture 191:23-44.
- 21 Martin, G.G., Hose, J.E., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T., McKrell, N. 1991.
22 Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation
23 in decapod crustaceans. Comp. Biochem. Physiol. 100B:517-522.
- 24 Perazzolo, L.M., Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase system of the shrimp
25 *Penaeus paulensis* and associated factors. Develop. Comp. Immunol. 21:385-395.
- 26 Ratcliffe, N.A., Brookman, J.L., Rowley, A.P. 1991. Activation of the prophenoloxidase
27 cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides.
28 Develop. Comp. Immunol. 15:33-39.
- 29 Redinbaugh, M.G., Turley, R.B. 1986. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay
30 for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. Analytical Biochemistry.
31 153:267-271.
- 32 Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 2000. Immunity
33 enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium *Bacillus*
34 SH. Aquaculture 191:271-288.

- 1 Rodriguez, J., Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health
2 control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191:109-119.
- 3 Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos, M., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciajara, I.,
4 Yepiz-Plascencia, G.M. 1997. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the
5 white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B:91-96.
- 6 Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrin, R., Weil, S. 1999. A newly established ELISA
7 showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein
8 in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*
9 115:37-45.
- 10 Sanchez, A., Pascual, C., Sanchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C.
11 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus*
12 adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198:13-28.
- 13 Saul, S.J., Bin, L., Sugumaran, M. 1987. The majority of prophenoloxidase in the
14 hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes.
15 *Develop. Comp. Immunol.* 11:479-486.
- 16 Scholz, U., Garcia-Diaz, G., Rieque, D., Cruz Suarez, L.E., Vargas Albores, F.,
17 Latchford, J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei*
18 (Boone) by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*
19 176:271-283.
- 20 Smith, V.J., Söderhäll, K. 1983. β -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro*
21 and *in vivo*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole.* 164:299-314.
- 22 Smith, V.J., Söderhäll, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of
23 marine invertebrates. *Develop. Comp. Immunol.* 15:251-261.
- 24 Söderhäll, K. 1981. Fungal cell wall β -1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase
25 attachment to foreign surface of crayfish hemocyte lysate. *Develop. Comp. Immunol.*
26 5:565-573.
- 27 Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition
28 system of arthropods? A review. *Develop. Comp. Immunol.* 6:601-611.
- 29 Söderhäll, K., Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in
30 invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10:23-28.
- 31 Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M.W. 1994. The prophenoloxidase activating
32 system and its role in invertebrate defense. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712:155-161.
- 33 Söderhäll, K., Häll, L. 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase
34 activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta* 797:99-104.

- 1 Söderhäll, K., Smith, V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus*
2 *maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. *Develop. Comp.*
3 *Immunol.* 7:229-239.
- 4 Sritunyalucksana, K., Cerenius, L., Söderhäll, K. 1999a. Molecular cloning and
5 characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.
6 *Develop. Comp. Immunol.* 23:179-186.
- 7 Sritunyalucksana, K.S., Sithisarn, P., Withayaachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1999b.
8 Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph
9 of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish*
10 *Immunol.* 9:21-30.
- 11 Sung, H.H., Chang, H.J., Her, C.H., Chang, J.C., Song, Y.L. 1998. Phenoloxidase
12 Activity of Hemocytes Derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium*
13 *rosenbergii*. *J. Invertebr. Pathol.* 71:26-33.
- 14 Sung, H.H., Yang, Y.L., Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the
15 tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crust. Biol.* 16:278-284.
- 16 Tsing, A., Arcier, J.-M., Breh, Jin, M. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid
17 shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.* 53:64-77.
- 18 Ullrich, B., Vollmer, M., Stoecker, W., Storch, V. 1992. Hemolymph protein patterns and
19 coprophagous behaviour in *Oniscus asellus* L. (Crustacea, Isopoda). *Invertebr.*
20 *Reprod. Develop.* 21:193-200.
- 21 Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*):
22 Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.* 3:153-156.
- 23 Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A., Ochoa, J.-L. 1993. An anticoagulant
24 solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp
25 (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:299-303.
- 26 Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K. 1996. A plasma protein isolated
27 from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of
28 prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Develop. Comp. Immunol.* 20:299-306.
- 29 Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification and
30 comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*).
31 *Comp. Biochem. Physiol.* 116B:453-458.
- 32 Vargas-Albores, F., Ochoa, J.-L. 1992. Variations of pH, osmolality, sodium and
33 potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus*
34 *stylirostris*) according to size. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A:1-5.
- 35 Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role
36 in shrimp immune response. *Aquaculture* 191:13-21.

- 1 Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L., Söderhäll, K. 2001. Properties of the
2 prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus*
3 *leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 268:895-902.
- 4 Yeh, M.-S., Huang, C.J., Lwu, J.H., Lee, Y.C., Tsai, I.-H. 1999. Molecular cloning and
5 characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus*
6 *monodon*). *Eur. J. Biochem.* 266:624-633.
- 7 Yepiz-Plascencia, G., Gollas, G.T., Vargas-Albores, F., García-Banuelos, M. 2000.
8 Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by
9 *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Mar. Biotechnol.* 2:485-492.
- 10 Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R., Higuera-
11 Ciapara, I. 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp
12 *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem.*
13 *Physiol.* 111B:181-187.
- 14 Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L.M.,
15 Romo-Figueroa, G. 1998. Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP):
16 comparison of biochemical characteristics. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B:309-314.
- 17

1 Table 2

2 Influence of buffer in α_2M determination. Precipitation was observed with 150 mM

3 NaCl, PBS and SSS-EDTA. Values are average \pm standard error.

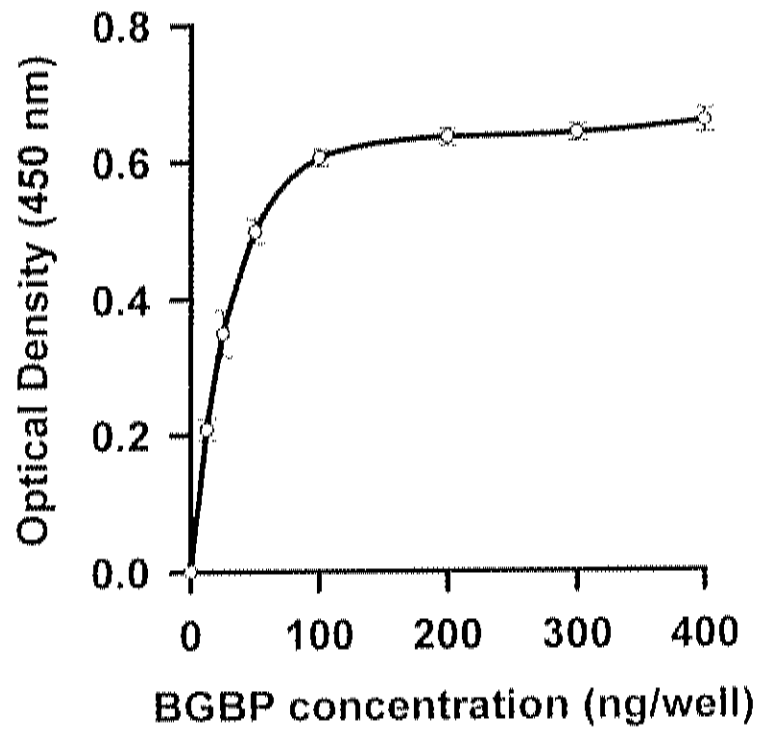
Buffer	Absorbance (415 nm)
Water	1.060 \pm 0.016
150 mM NaCl	0.275 \pm 0.003
PBS (pH 7.3)	0.295 \pm 0.003
SSS-EDTA	0.316 \pm 0.007
10 mM HEPES (pH 7.5)	2.414 \pm 0.036

4

5

1 Figure 1

- 2 Maximum adsorption capability of microplate, purified shrimp BGBP was diluted in PBS
3 pH 7. The maximum adsorption by well was observed with 100 ng of BGBP.



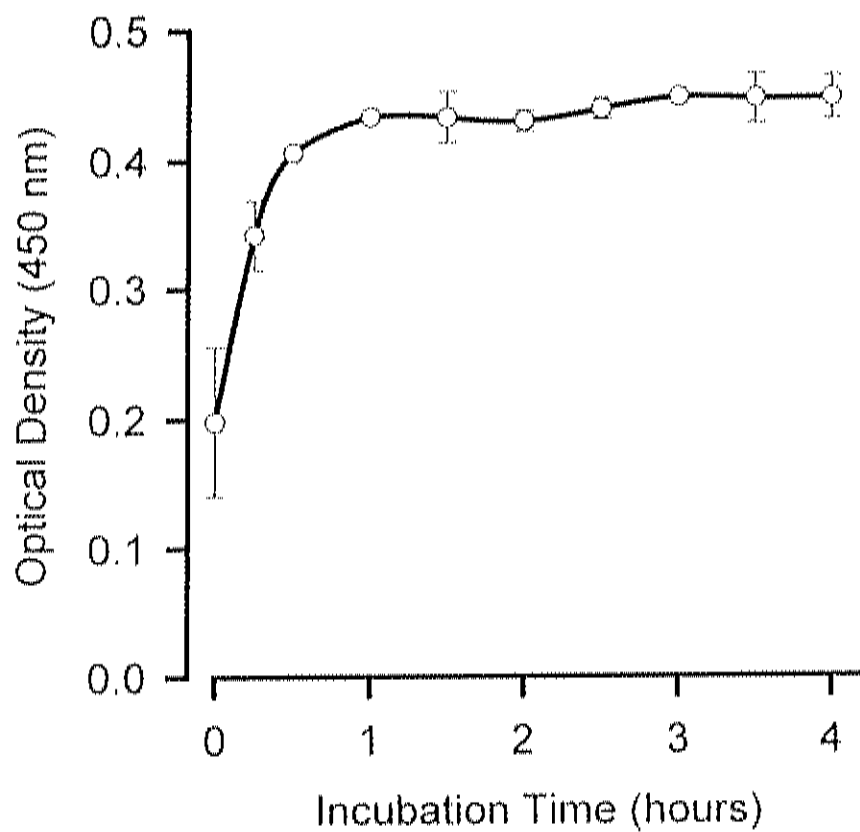
4

5

1 Figure 2

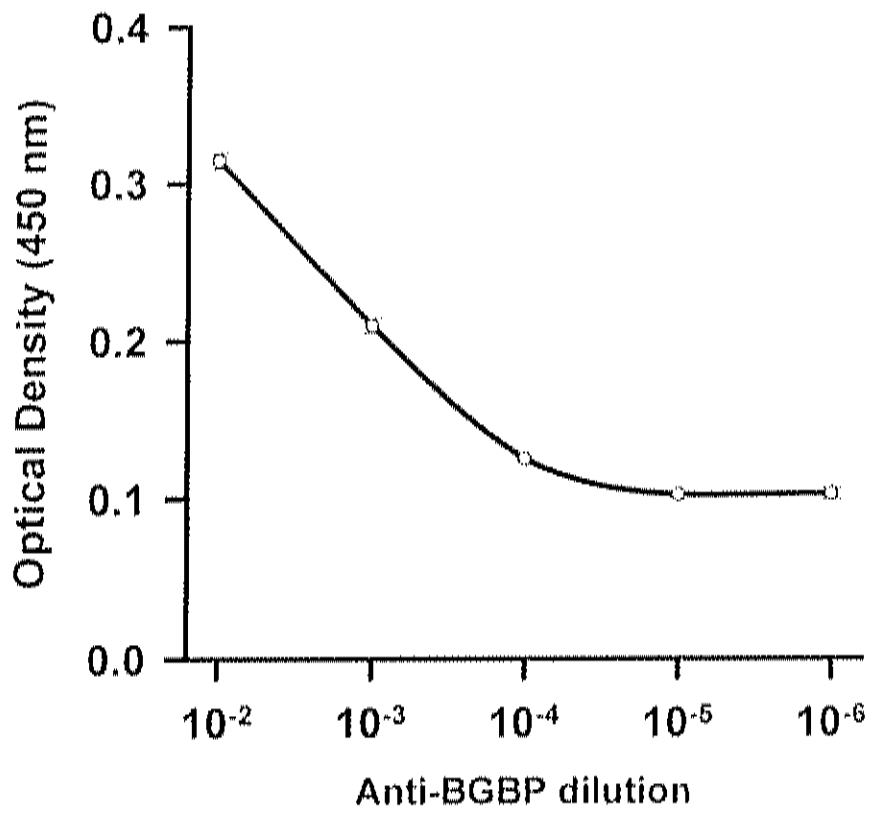
2 Required binding BGBP time to microplate for ELISA determination. Values are average

3 \pm standard error, n=8.



1 Figure 3

2 Anti-BGBP titration using wells coated with 100 ng of shrimp purified BGBP.



3

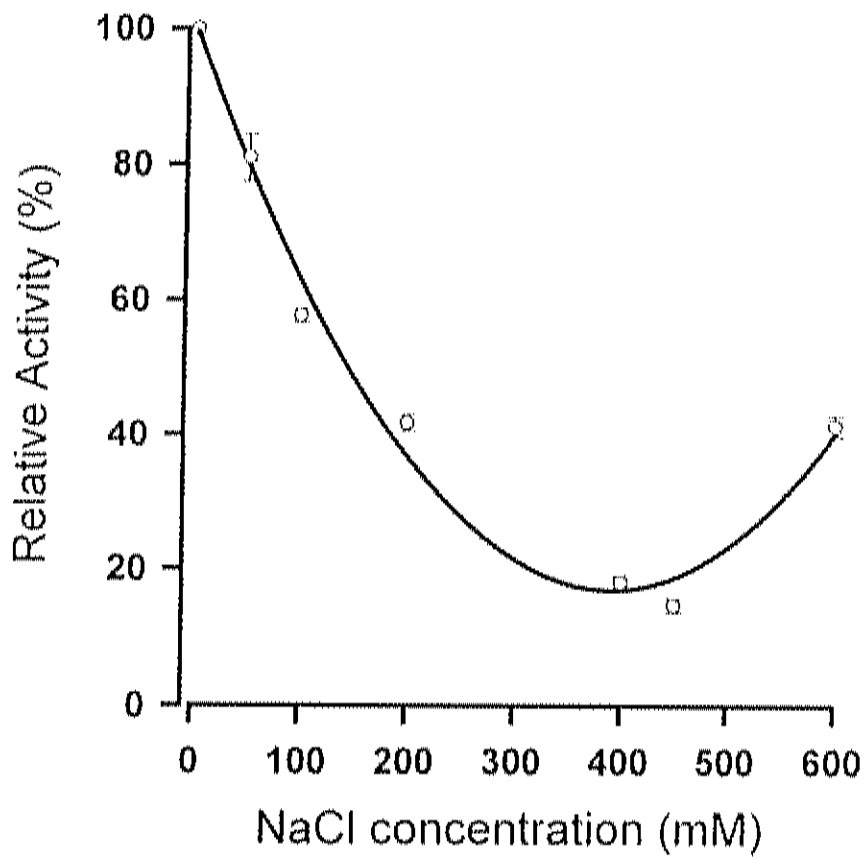
4

1 Figure 4

2 Release of proPO from hemocytes when cells were suspended in water with different

3 NaCl concentrations. More than 80% of proPO system was released with 50 mM NaCl.

4



5

6

BT26

Estandarización de un Micrométodo para la Cuantificación de Glucosa, Lactato, Colesterol, Acilglicérols y Proteínas en Plasma de Camarón.

Hernández-López, Jorge²; Soto-Hernández, Jorge¹; y Vargas-Albores, Francisco²

¹ CIBNOR, S.C. MAR BERMEJO 195, PLAYA P. S. RITA. LA PAZ, B.C.S.

² LAB. BIOTECNOLOGÍA MARINA, DTAOA; CIAD, A.C. 1735 HILLO, SON.

jhlopez@cascabel.ciad.mx, Km. 0.6 Carr. a La Victoria, Hermosillo, Sonora. 83000
Tel. (62) 80 00 57 ext. 524 Fax (62) 80 00 55

Categoría del Trabajo **Estudiantil**
Modalidad: **Oral**

RESUMEN

En los últimos años la industria acuícola ha estado demandando herramientas que permitan conocer el estado fisiológico y de salud de los camarones en cultivo. Una alternativa es determinar la composición química del plasma, observar sus cambios y detectar moléculas que puedan usarse como marcadores del estado de salud. Para ello se requieren métodos que permitan medir componentes plasmáticos de camarón con la suficiente sensibilidad para detectar variaciones en su concentración debidas a alteraciones fisiológicas. En este trabajo se determinó la factibilidad de los métodos para determinar la concentración plasmática de glucosa, lactato, colesterol y acilglicéridos en camarón utilizando los kits comerciales empleados en clínica humana. También se evaluó la eficiencia del método de biuret para la medición de proteínas. No se observaron alteraciones en la eficiencia de los kits comerciales ni en la determinación de proteína cuando la reacción se realizó a 0.45 M de NaCl, salinidad del plasma de camarón. Adicionalmente, se determinó la factibilidad

del uso de microplacas para la medición de metabolitos y proteínas totales en plasma de camarón. El uso de microplacas permite analizar varias muestras en forma simultánea y reducir los volúmenes de muestra y reactivos. Se comparó la técnica en microplaca con la técnica estandarizada para celdas de 1 cm y no se encontraron diferencias significativas cuando se analizaron muestras en forma simultánea y repetida, concluyéndose que es factible el uso de esta metodología en muestras de plasma de camarón.

INTRODUCCIÓN

La aparición de la enfermedad está relacionada al rompimiento del equilibrio entre el medio ambiente, la fisiología del hospedero y las estrategias invasivas del parásito. Sin embargo, para el caso del camarón y todas las especies acuáticas, el control de las condiciones del medio ambiente se dificulta por los volúmenes de agua empleados en los cultivos comerciales. Los tratamientos contra los agentes causales, por su parte, además de ser costosos y producir daños al medio ambiente, hasta ahora no han sido eficientes. Así, el conocimiento de las alteraciones fisiología del animal parece ser el camino más factible para controlar las enferme-

Tabla 1. Precisión y exactitud de las técnicas adaptadas a microplaca para medir concentraciones de metabolitos y proteínas totales en plasma de camarón (n=40).

	Concentración Estándar (mg ml ⁻¹)	Concentración Calculada (media ± d.s.)	CV (%)	ER (mg ml ⁻¹)
Proteínas	20	21.740±0.860	4	0.740=3%
Glucosa	0.5	0.510±0.017	3	0.010=2%
Colesterol	0.4	0.414±0.014	3	0.010=2%
Acilglicéridos	1.0	1.048±0.040	3	0.048=4%
Lactato	0.2	0.142±0.003	1	-0.058=29%

CV = Coeficiente de Variación (precisión)

ER = Error Relativo (exactitud)

dades y, de ese modo, disminuir el riesgo de la inversión.

La determinación de algunos parámetros bioquímicos de sistemas, órganos y tejidos se ha utilizado en vertebrados, principalmente en el humano, para evaluar el estado de salud o fisiológico. Alteraciones metabólicas pueden ser detectadas por la cuantificación de glucosa, colesterol, proteínas y acilglicéridos en el plasma.

En los invertebrados existe poca información sobre el significado clínico de modificaciones en los componentes del torrente circulatorio o hemolinfa. Sin embargo, en camarón, se ha propuesto que la determinación de algunos iones, metabolitos y proteínas plasmáticas específicas, así como la cantidad y tipo de hemocitos en el plasma sería de ayuda para evaluar el estado de salud o detectar cambios fisiológicos (Vargas-Albores y cols. 1991). Por ejemplo, se ha encontrado que la glucosa, el colesterol y las proteínas, pueden estar involucrados en deficiencias nutricionales (Hall y Van, 1998), mientras que el lactato y la glucosa pueden servir como indicadores de estrés en los camarones (Chen y Cheng, 1993; Chen y cols 1994; Anderson y cols, 1994). Otros estudios han relacionado la concentración de proteínas totales y glucosa en plasma de camarón, con variaciones durante el ciclo de muda (Chan y cols, 1988; Horst, 1989)

A pesar de que la industria acuícola ha estado demandando herramientas de diagnóstico rápidas y económicas, los avances en este campo no han sido muy substanciosos y los pocos casos carecen de propiedades tales como bajo costo, facilidad y dis-

posición. Debido a lo anterior, se hace necesario establecer una serie de metodologías que permitan generar estrategias diagnósticas así como detectar organismos más resistentes que puedan servir como reproductores.

Materiales y Métodos

Glucosa, lactato, acilglicéridos y colesterol fueron cuantificados utilizando kits comerciales para diagnóstico clínico en humanos. Glucosa, GOD-PAP Merck-740393; lactato, SIGMA-735-10; acilglicéridos, GPO-PAP Merck-1.14354.0001 y colesterol CHOD-PAP Merck-14394. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo a la técnica de biuret descrita en Current Protocols in Protein Science (Coligan y cols, 1995). Para la adaptación de las técnicas a volúmenes pequeños se usaron microplacas de policarbonato (CORNING). En algunos ensayos se usaron celdas de 1 cm de espesor (SIGMA).

Determinación de la factibilidad de la técnica

Para determinar la influencia de la alta salinidad (450 mM) del plasma de camarón se realizaron dos curvas de calibración para cada técnica, utilizando como diluyentes solución salina (NaCl 150 mM) o Solución Isotónica para Camarón: SIC (NaCl 450 mM, NaCl 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7.3) descrita por Vargas-Albores y cols. (1993). Las curvas de calibración se elaboraron usando los estándares de cada kit y albúmina sérica bovina para la cuantificación de proteínas.

Comparación de los métodos

Se usaron organismos con un promedio de 14.4 g de peso y 13.5 cm de talla, los cuales fueron man-

Tabla 2. Influencia de la alimentación en los niveles de proteínas totales y metabolitos plasmáticos de camarón blanco. Valor promedio \pm desviación estándar (mg mL^{-1}).

	Ayuno	Alimentados
Proteínas	125.8 \pm 22.26	149.9 \pm 31.39*
Glucosa	0.102 \pm 0.07	0.420 \pm 0.24*
Colesterol	0.449 \pm 0.10	0.498 \pm 0.11
TAG	1.487 \pm 0.25	1.586 \pm 0.34
Lactato	0.053 \pm 0.03	0.089 \pm 0.07

*Diferencias significativas ($P < 0.02$)

tenidos durante dos días en el laboratorio a 25°C y salinidad de 36 ‰. De cada animal se obtuvieron 200 mL de hemolinfa de acuerdo a Hernández López y cols (1996) y se cuantificó la concentración plasmática de metabolitos y proteínas.

Adaptación de las técnicas a microplaca

Para todas las determinaciones se utilizaron celdas de 1 cm y microplacas de 96 pozos, en el caso de celdas de 1 cm se colocaron 10 o 20 μl de muestra y 1 ml de reactivo; en el caso de microplacas se utilizaron 10 μl de muestra y 200 μl de reactivo. Por su parte, para la cuantificación de proteínas se utilizaron 100 μl de muestra y 1 ml de reactivo para la prueba en celdas de 1 cm (Bauer, 1986) mientras que para el ensayo en microplaca se usaron 20 μl de muestra y 200 μl de reactivo.

Para cada prueba, utilizando el método en microplaca, se determinó el intervalo de sensibilidad utilizando diluciones de estándar mientras que la precisión y exactitud se establecieron haciendo mediciones repetidas. Para evaluar su reproducibilidad y concordancia con el estándar se calculó el coeficiente de variación (CV) y el error relativo (ER) de las medidas obtenidas, de acuerdo a Ayres (1970).

Influencia del ayuno.

Se usaron 36 organismos (18 hembras y 18 machos) de 13 \pm 0.5 cm de longitud y 14.5 \pm 1.6 g de peso. Se mantuvieron durante una semana, bajo condiciones controladas (36 ‰ de salinidad y 25°C). Para el experimento, el lote original se dividió en 2 grupos de 18 organismos (9 hembras y 9 machos) cada uno y se mantuvieron en ayuno durante 24 horas. Después del periodo de ayuno,

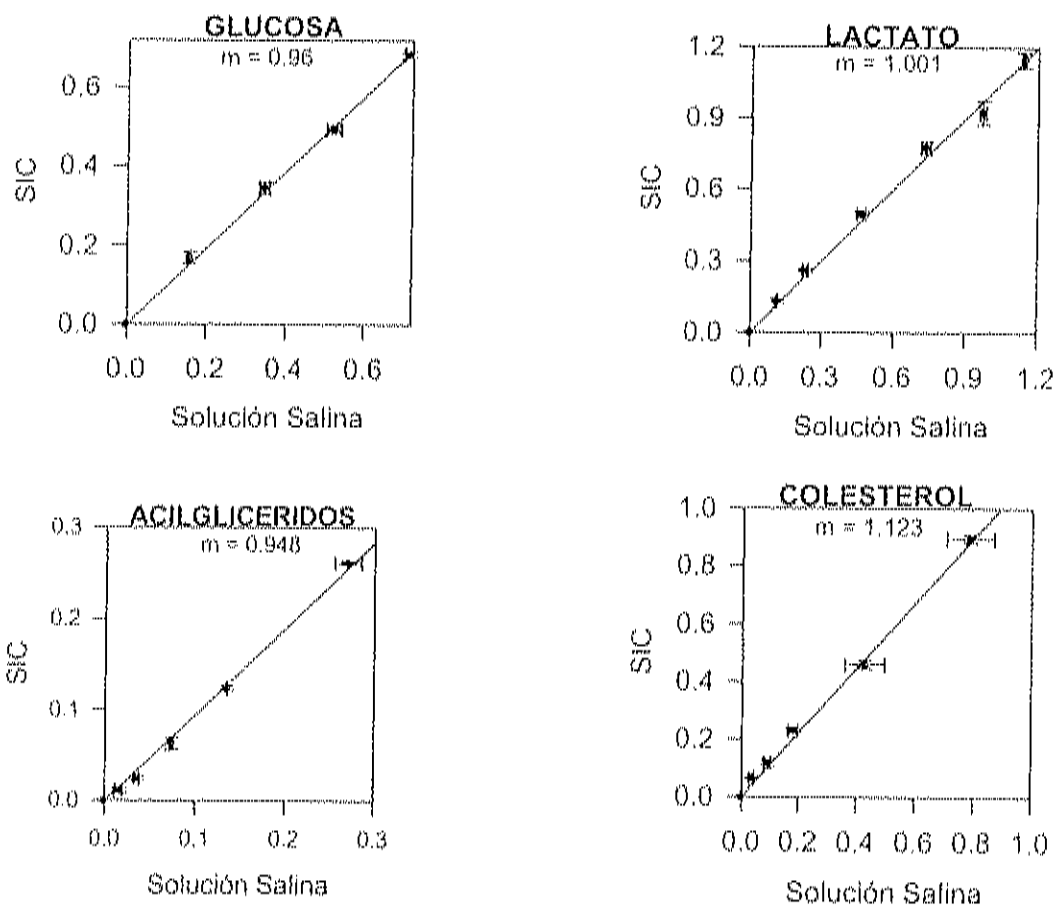
los animales del primer grupo se alimentaron y los del segundo grupo continuaron en ayuno. Dos horas después se sangraron todos los organismos y se les midió la concentración de metabolitos plasmáticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los métodos que han sido utilizados para medir proteínas, glucosa, lactato, colesterol y triglicéridos en camarón son colorimétricos, colorimétrico-enzimáticos y cromatografía de gases (Chen y cols, 1994; Hall y Van, 1998; Shen y cols, 1994; Fernández y cols, 1995; Spotts y Lutz, 1981). Sin embargo, los dos primeros presentan la ventaja de no requerir equipo sofisticado y personal especializado por lo que pueden ser accesibles a cualquier laboratorio que cuente con un espectrofotómetro. Aunque el método de Bradford (Bradford, 1976) ha sido el más usado para estimar la concentración de proteínas en muestras biológicas (intervalo de detección entre 150 y 750 $\mu\text{g/ml}$), el método de elección para estimar el contenido de proteínas totales en plasma de camarón fue el de biuret debido a que las concentraciones de proteína en el plasma de camarón se encuentran en el intervalo de detección de ésta técnica (1 a 100 mg/ml , Coligan y cols, 1995) lo que permite utilizar las muestras de plasma sin diluir.

A pesar de que los kits comerciales han sido utilizados para cuantificar colesterol, glucosa y lactato en hemolinfa de camarones (Chan y cols, 1988; Van y Hall, 1998; Spotts y Lutz, 1981), no ha quedado claro si las condiciones distintas que existen

C **Figura 1.** Correlación entre los métodos utilizando Solución salina y SIC; las barras representan el error estándar. El análisis de pendientes no mostró diferencias significativas (95% confianza).



en el plasma de camarón afectan o no la acción de los reactivos. Por ello, en este trabajo se probó la influencia de la alta salinidad en la cuantificación de glucosa, lactato, colesterol y acilglicéridos. Cuando se compararon las curvas de calibración utilizando solución salina y SIC no se observaron diferencias significativas (95 % confianza) en todos los componentes plasmáticos analizados (figura 1). Los resultados sugieren que las condiciones de mayor salinidad del SIC (condiciones semejantes al plasma del camarón) no afectan la técnica de los kits comerciales para medir glucosa, colesterol, lactato y acilglicéridos. De la misma manera, la prueba de proteínas por biuret no se afectó por la utilización de SIC.

El uso de microplacas para la cuantificación de compuestos plasmáticos en camarón puede reducir el gasto de reactivos y aumentar la

maniobrabilidad, además de que permite analizar varias muestras en forma simultánea (>90). Debido a esto, se puede aplicar a los sistemas de cultivo para llevar registros, de forma rápida y sencilla, de los parámetros bioquímicos en los organismos cultivados. En este trabajo se estandarizaron las técnicas para medir metabolitos y proteínas totales en plasma de camarón utilizando microplaca. Se realizó una curva de calibración para cada técnica tomando del protocolo original las condiciones de temperatura y tiempos de incubación para cada kit. En el caso de las proteínas totales los parámetros se tomaron de Coligan y cols. (1995).

Analizando diferentes volúmenes de plasma, se observó que el uso de 10 µl de muestra produce resultados reproducibles por lo que se adoptó este volumen como el adecuado en cada prueba. Con

el fin de que la cantidad de reactivo a usar fuera constante y con base en la capacidad de los pozos, se estableció un volumen de 200 µl para cada prueba. La sensibilidad de cada una de las técnicas se determinó con base al intervalo lineal de las curvas, donde la medida del ajuste de la recta de regresión (r^2) a los datos observados fuera cercana a 1. Por otro lado, se encontró que las técnicas en microplaca presentan buena precisión y exactitud en todos los casos a excepción del lactato, el cual resultó ser la prueba con mayor precisión pero la de menor exactitud (tabla 1).

Cuando se compararon los métodos de microplaca y de celdas de 1 cm de espesor, no se observaron diferencias significativas (t pareada, 95% de confianza), por lo que ambos métodos pueden ser usados indistintamente.

De la misma manera que en los vertebrados, las modificaciones de la concentración de componentes bioquímicos del plasma producidos por la ingesta de alimento, pueden ser detectadas en la hemolinfa de invertebrados incluyendo crustáceos. Cuando se analizaron plasmas obtenidos de camarones en ayuno y alimentados, el análisis por ANDEVA de los resultados demostró un aumento significativo en la concentración de proteínas ($P=0.014$) y glucosa ($P<0.001$). Por su parte, los niveles de colesterol, lactato y acilglicéridos no presentaron diferencias significativas (95 % de confianza) entre los animales alimentados y en ayuno (tabla 2).

Por otro lado, la concentración de metabolitos y proteínas en plasma de camarón no presentó diferencias significativas con relación al sexo ($P>0.5$). Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros trabajos ya que, aunque se ha encontrado que la concentración de proteínas puede ser afectada por el crecimiento en *P. japonicus* (Cuzon y cols, 1980; Chen y Cheng, 1993a), por el ciclo de muda en *P. vannamei* (Chan y cols, 1988) y *H. americanus* (Mercaldo-Allen, 1991) y por la temporada del año, al parecer no existen diferencias relacionadas con el sexo (Chen y Cheng, 1993a). Por su parte, las concentraciones de glucosa plasmática se han visto afectadas por la alimentación en *P. monodon* (Hall y Van, 1998), por el ciclo circadiano en *P. aztecus* (Rosas *et al.*, 1992) y por el ciclo de muda en *P. vannamei* (Chan *et al.*,

1988), pero en ningún caso, se han detectado diferencias relacionadas con el sexo.

Aunque en la actualidad se encuentran en proceso de investigación, este tipo de pruebas se pretenden usar como diagnóstico del estado fisiológico de los camarones en cultivo. Los resultados preliminares permiten suponer que existen cambios en los niveles de algunos metabolitos plasmáticos debidos a infecciones. Sin embargo, los cambios producidos por enfermedades pueden estar mas relacionados con actividades de defensa por lo que se pretende incrementar el número de pruebas involucrando ensayos como el de actividad de la fenoloxidasas, hemaglutinación, cuenta total y diferencial de hemocitos, actividad antibacteriana y actividad fagocítica.

CONCLUSIONES

El uso de concentraciones salinas semejantes a las existentes en la hemolinfa del camarón (450 mM) no altera la determinación de proteína ni la eficiencia de los kits comerciales para la cuantificación de metabolitos plasmáticos.

Es factible el uso de técnicas en microplaca para cuantificar metabolitos y proteínas totales en plasma de camarón debido a que los resultados obtenidos con este método no presentan diferencias respecto al método de celdas de 1 cm de espesor. Adicionalmente, el método en microplaca reduce la cantidad de solución reactiva utilizada en técnicas enzimáticas y de biuret y permite hacer aproximadamente 90 determinaciones simultáneamente.

Las concentraciones de metabolitos y proteínas totales en el plasma de camarón no tienen relación con el sexo de los organismos, pero se encontraron diferencias por ayuno en las concentraciones de glucosa y proteínas plasmáticas en camarón.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, J.S.; A.C. Taylor Y R.J. Atkinson. 1994. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Alpheidae macandreae* (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem Physiol.* 108A(4):515-522.

- BRADFORD M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- CUZON, G.; Calu C.; Aldrin J. F.; Massager J. L.; Stephan G. and M. Mevel. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proc. World Maricul. Soc.* 11:410-423.
- CHAN, S.M.; Rankin S.M. and Keeley L.L.. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis y hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. 1988. *Biol. Bull.* 175:185-192.
- CHEN J.C.; Cheng S.Y. and Chen C.T. 1994. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A:339-347.
- CHEN J.C. and Cheng S.Y. 1993. Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology.* 27:281-291.
- CHEN J.C. and Cheng S.Y. 1993a. Studies on hemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:293-296.
- COLIGAN, J.E.; Dunn, B.; Ploegh, H.L.; Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. Eds. 1995. *Current Protocols in Protein Science.* Vol.1.Unit3. John Wiley & Sons, Inc.
- FERNÁNDEZ, I.; Basterrechea M.; Olivera M.; and Noa, M. 1995. Variations des lipides totaux, acide gras et sterols chez la crevette blanche *Penaeus schmitti* aux differents stades du cycle de mue. *Rev. Invest. Mar.* 16:171-176.
- HALL, M.R. and Van H.E. 1998. Diurnal variation and effects of feeding on blood glucose in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Physiol. Zool.* 71:574-583.
- HERNÁNDEZ LÓPEZ, J.; Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F. 1996. Activation of prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 61-66.
- HORST, M.N. 1989. J. Association between chitin synthesis and protein synthesis in the shrimp *Penaeus vannamei*. *Crust. Biol.* 9:257-265.
- MERCALDO-ALLEN, R. 1991. Changes in the blood chemistry of the american lobster, *Homarus americanus*, H. Milne Edwards, 1837, over the molt cycle. *J. Selfish Res.* 10:147-156.
- ROSAS, C.; Sánchez, A.; Escobar, E.; Soto, L. and Bolongaro, A. 1992. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A:323-328.
- SHEN, S.S.; Liu, P.C.; and Chen, J.C. 1994. Cholesterol requirement of juvenile tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture.* 125:134-137.
- SPOTTS, D. G. and Lutz, P.L.. 1981. L-Lactic acid accumulation during activity stress in *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus duorarum*. *World Maricul. Soc.* 12 :244-249.
- VAN, H.E. and Hall, M.R.. 1998. The effect of prophylactic formalin bath treatment on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquatic Soc.* 29:357-364.
- VARGAS-ALBORES, F., Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A:299.
- VARGAS-ALBORES, F., Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J.L. 1991. Posibles indicadores salud de los camarones y su aplicación en acuicultura. *Biotecnología.* 1:17-25.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado parcialmente gracias al apoyo de CONACyT, proyecto 25242-B.

BT31

Optimización de técnicas para el aislamiento e identificación de bandas de mRNA de hemocitos de camarón

Cedano Thomas Yenelli¹; Hernández-López, Jorge²; Vargas-Albores, Francisco¹ y Yepiz Plascencia, Gloria¹.

¹ LAB. BIOTECNOLOGÍA MARINA, DTAOA; CIAD, A.C. 1735 HILLO, SON. 83000

² CIBNOR, S.C. MAR BERMEJO 195, PLAYA P. S. RITA. LA PAZ, B.C.S. 23090

fvargas@cascabel.ciad.mx Km. 0.6 Carr. a La Victoria Hermosillo, Sonora. 83000
Tel. (62) 80 00 57 ext. 524 Fax (62) 80 00 55

Categoría del Trabajo: **Estudiantil**
Modalidad: **Cartel**

RESUMEN

Se ha demostrado que los crustáceos, incluyendo al camarón, no cuentan con un sistema inmune igual que el de los vertebrados. Sin embargo, tienen mecanismos que los protegen contra enfermedades. Se ha propuesto que la respuesta inmune de los camarones puede ser identificada por medio de la síntesis de proteínas involucradas en la defensa. Esta síntesis protéica puede ser detectada por el número de mRNAs producido en animales enfermos o inmunocomprometidos. Los hemocitos (células sanguíneas) de los camarones, son la línea de defensa y reaccionan contra estímulos producidos por agentes infecciosos por lo que representan una buena alternativa para el estudio de mRNA. El número de mRNAs puede ser evaluado mediante electroforesis en acrilamida. Sin embargo, la baja concentración de mRNAs producido por las células, hace necesario emplear métodos de amplificación como la técnica de PCR. Debido a que no se cuenta con la metodología para la obtención y amplificación de mRNA a partir de hemocitos de camarón en este trabajo se estandarizaron las condiciones de obtención de

RNA total, mRNA y cDNA a partir de hemocitos de camarón. Así mismo, se determinaron las condiciones de amplificación por la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos arbitrarios. Los cDNA amplificados fueron analizados por electroforesis en acrilamida y los patrones de bandas fueron revelados mediante una tinción con nitrato de plata.

INTRODUCCIÓN

Debido a la demanda mundial, las técnicas de cultivo intensivo de camarón están manifestándose como una alternativa de alta producción. Sin embargo, la intensificación del cultivo de camarón se convierte en una actividad de alto riesgo debido, fundamentalmente, a la aparición y diseminación de enfermedades que llegan a afectar seriamente la producción. Aunque mucho se ha avanzado en los conocimientos de los parámetros ambientales de los cultivos y en la identificación de organismos que los afectan, la presencia de padecimientos infecciosos siguen siendo un problema en acuicultura debido a la ausencia de metodología para un diagnóstico temprano y tratamientos eficientes.

En los cultivos intensivos, el desarrollo y la transmisión de patógenos es altamente peligrosa debido a la alta densidad de población, por lo que es

Tabla 1. Volúmenes de reactivos utilizados en la técnica de RT-PCR.

Reactivos	control(+)	control(-)	muestra
Mezcla Madre	23.6µl	23.6µl	23.6µl
Muestra Problema	-	-	0.5µg
Primer	-	0.5µl	0.5µl
Primer control 151	0.9µl	0.9µl	-
Primer control 152	0.9µl	0.9µl	-
Muestra control	0.6µl	-	-
Agua-DEPC UV	4.0 µl	4.1 µl	5.4 µl

necesario el reconocimiento, la prevención y el tratamiento temprano de muchas enfermedades contagiosas. En éste tipo de cultivos, el conocimiento de los padecimientos, su etiología, forma de transmisión, diagnóstico y tratamiento temprano, se traducen en incentivos económicos ya que permiten mantener las enfermedades bajo control (Vargas-Albores 1992).

Una alternativa que está teniendo importancia en los últimos años, es el diagnóstico del estado de salud del hospedero, debido a la posibilidad de detectar enfermedades en estadios tempranos. Por ejemplo, es posible que la respuesta inmunológica de los camarones pueda ser identificada observando la síntesis de proteínas involucradas en la defensa de camarón. A su vez diferencias en la síntesis protéica pueden ser detectadas por variación en el número de mRNAs producido en animales enfermos o inmunocomprometidos. El número de mRNAs puede ser evaluado mediante electroforesis en poliacrilamida. Sin embargo, la baja concentración de mRNA producido por las células, hace necesario emplear métodos de amplificación basados en RAPDs-PCR (siglas en in-

gles de: amplificación al azar de DNAs polimórficos mediante la reacción en cadena de la polimerasa) y analizando los productos por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Aunque en general no se conoce el significado fisiológico de las variaciones que pudieran tener los componentes de la hemolinfa, la búsqueda de marcadores de salud y su interpretación deben ser consideradas para el establecimiento de medidas preventivas, que puedan ofrecer mayor porcentaje de seguridad, no solo para el control de la infección sino para el medio ambiente. A pesar de que los avances en este campo no han sido sustanciosos, el uso de técnicas como RAPDs-PCR parecen ser una buena opción para el diagnóstico. Sin embargo, los protocolos existentes no parecen cumplir con las necesidades de ensayo para muestras de tejido de camarón, por lo que es necesario establecer las condiciones para el análisis de este tipo de muestras.

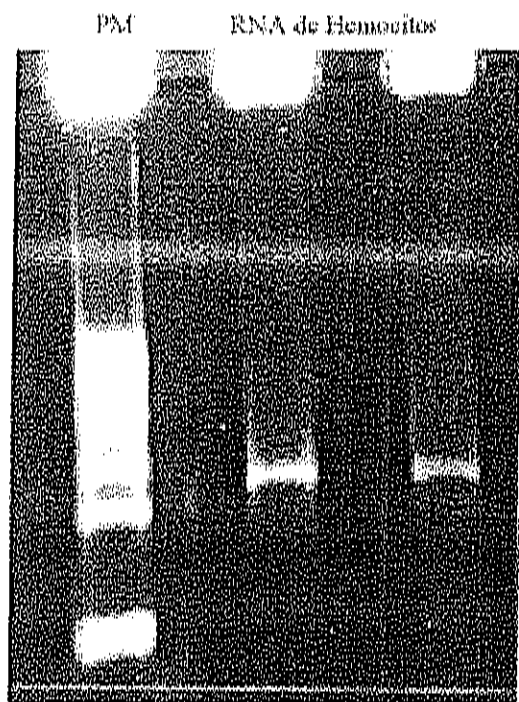
MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de RNA total se usó

Tabla 2. Composición de la mezcla madre utilizada en la técnica de RT-PCR

Reactivos	Volumen
Buffer EZ5X	6µl(7)42µl
dCTP 10 mM	0.9µl(7)6.3µl
dGTP 10 mM	0.9µl(7)6.3µl
dATP 10 mM	0.9µl(7)6.3µl
dTTP 10 mM	0.9µl(7)6.3µl
Sol. Mn(OAc)2 (25mM)	3µl(7)21µl
rTth polimerasa 2.5 U/µl	1µl(7)7µl
Agua-DEPC UV	10µl(7)70µl
Volumen total	165.2/7 = 23.6µl (por reacción)

Figura 1. Electroforesis en agarosa de RNA obtenido de hemocitos de camarón. PM = marcadores de peso molecular



RNAMATRIX (Rnaid plus BIO 101) mientras que el mRNA se aisló usando esferas con poli-Adenilación (Dynabeads Oligo (dt)₂₅). La obtención de cDNA y la amplificación por PCR se realizaron usando el kit GeneAmp, EZ rTth RNA; rTth DNA Polymerase & EZ buffer pack y los oligonucleótidos (oligos) arbitrarios fueron obtenidos de STRATAGEN. Los reactivos para electroforesis en agarosa y poliacrilamida fueron obtenidos de Merck, Bio Rad y Sigma Chemical Co. Para la determinación de la cantidad de RNA obtenido se usó un espectrofotómetro PERKIN ELMER Lambda Bio-20. Todo el material se usó libre de RNasas (Ribonucleasas).

Obtención de muestras.

La hemolinfa fue obtenida en anticoagulante de acuerdo a la técnica descrita por Vargas-Albores y cols. (1993) adicionado con inhibidores de RNasas. Los hemocitos fueron separados del plasma de acuerdo a Hernández-López y cols. (1996). Para prevenir activación y ruptura celular se usaron tubos de vidrio nuevos y libres de pirógenos.

Obtención de RNA a partir de hemocitos

Se adicionaron 500 µl de mezcla de lisis (Rnaid plus Kit, BIO 101) al paquete celular obtenido de 3 ml de hemolinfa y se homogeneizó con un pistilo de plástico para microtubos. Se realizó una extracción con fenol seguida de una extracción con cloroformo alcohol isoamílico recuperando la fase superior. El RNA de la muestra fue aislado con RNAMATRIX (Rnaid plus Kit, BIO 101) y recuperado en agua tratada con DEPC (difenilpirocarbamato) y calentada a 55°C. La pureza y concentración del RNA obtenido fue determinada mediante la medición de absorbancia a 260/280 nm haciendo una dilución 1:100 de la muestra original. La integridad del RNA fue determinada por electroforesis en agarosa conteniendo 1.5 % de formaldehído.

Obtención de mRNA

El mRNA fue obtenido a partir del RNA total ajustando la cantidad de RNA total a 75 µg/100 µl. La muestra, precalentada a 65°C por 2 min, se colocó en un tubo conteniendo Dynabeads (Dynal) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Des-

Figura 2. Análisis de los productos de AP-PCR obtenidos con 10 oligos comerciales. Los oligos de la serie A produjeron los mejores resultados.

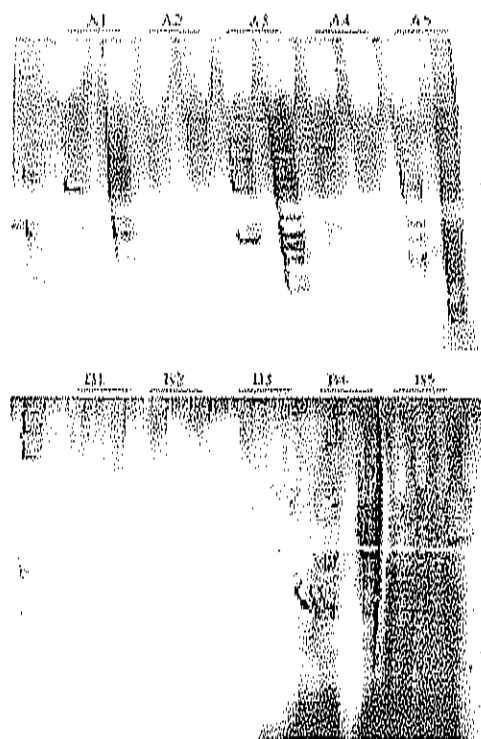
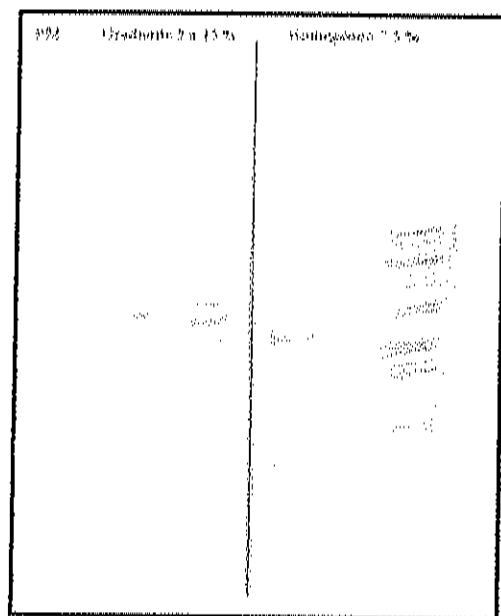


Figura 3. Comparación entre electroforesis de productos de AP-PCR utilizando geles de poliacrilamida en gradiente y homogéneo. Se aprecia una mayor resolución de bandas con poliacrilamida en gradiente.



pués de dos lavados con solución de lavado (Dyna), el mRNA se eluyó en 20 μ l de agua tratada con DEPC calentando a 65°C durante 2 min.

Obtención de cDNA y amplificación por PCR. La producción de cDNA y la amplificación por PCR (RT-PCR) se realizó de acuerdo a las instrucciones recomendadas en el kit GeneAmp, el cual permite realizar las dos reacciones en el mismo tubo. Se utilizaron 0.5 μ g de mRNA por cada reacción. Las condiciones para la PCR fueron elegidas de acuerdo a lo establecido para DNA de músculo de camarón (Morales-Corral, 1999): 60 min a 70°C, 120 seg a 95°C, 60 ciclos de 60 seg 95°C/60 seg 72°C, 7 min 72°C utilizándose oligos arbitrarios. Los productos de RT-PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

RESULTADOS Y DISCUSION

La extracción de la hemolinfa, la separación de los hemocitos y la obtención de RNA son pasos críticos que deben cuidarse en la obtención de muestras para la técnica de RT-PCR. En el pre-

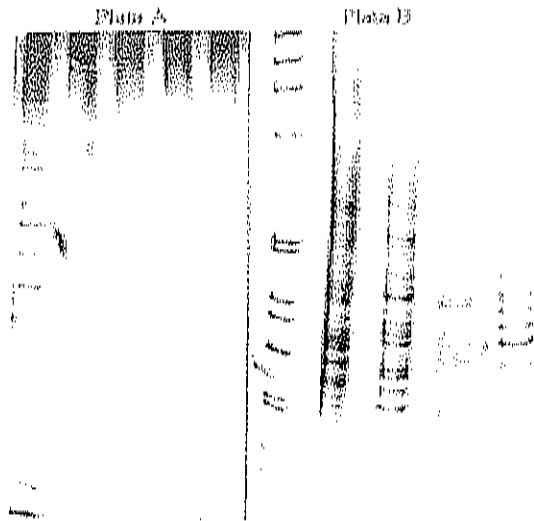
sente trabajo se usó agua libre de pirógenos y de RNasas para la preparación del anticoagulante y las soluciones de lavado de los hemocitos. Para evitar activación y ruptura celular, el plasma fue separado de los hemocitos por centrifugación a 800 g y la extracción de RNA se realizó con material y reactivos libres de RNasas. Así, cuidando todos los factores, se pudo obtener RNA de buena calidad (Figura 1).

El mRNA se aisló a partir de 75 μ g de RNA total, según el protocolo de Dynal. Debido a que la cantidad de mRNA obtenida fue muy baja y no pudo ser medida por espectrofotometría, la concentración de mRNA obtenida fue calculada en base al 5% de eficiencia de recuperación con el kit de Dynal. De esta forma, en cada aislamiento se asumió una recuperación de 3.75 μ g/ μ l de mRNA. La técnica de RT-PCR fue estandarizada para volúmenes de 30 μ l, usando solamente 0.5 μ g de mRNA (Tabla 1). La reacción para PCR fue modificada del protocolo original (GeneAmp Kit) utilizando una mezcla madre con todos los reactivos comunes (Tabla 2).

Con el fin de seleccionar los primers que generaran el mayor número de bandas en el análisis electroforético de los productos de amplificación, se probaron 10 diferentes oligonucleótidos (oligos) arbitrarios obtenidos comercialmente, denominados como grupo A (A1-A5) y grupo B (B1-B5). Los oligos de las dos series usadas tienen el mismo tamaño (18 pares de nucleótidos) y no todos fueron capaces de producir fragmentos por PCR. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron 3 oligos: A1, A3 y A5 (Figura 2).

Los productos de PCR obtenidos con los oligos seleccionados fueron analizados en geles de poliacrilamida. Aunque con geles homogéneos al 7.5 % se obtiene un buen patrón de bandas, utilizando gradiente del 5 a 15 % se observa una mejor resolución y separación de bandas (Figura 3). La técnica de tinción con nitrato de plata ha sido utilizada recientemente para teñir oligonucleótidos en geles de poliacrilamida (Morales-Corral, 1999) y poder observar el patrón de bandas. En este trabajo se compararon dos técnicas de tinción con nitrato de plata. La primera tomada de la técnica que se usa para la tinción de proteínas en geles de acrilamida descrita en Coligan y cols (1995) y adaptada por el Centro de Estudios en Salud de

Figura 4. Comparación entre la tinción de plata para proteínas (Plata A) tomada de Coligan y cols. (1995) y la técnica descrita en Wallas (1997) modificada en este trabajo (Plata B).



Guatemala. La segunda, que utiliza menos reactivos, es más rápida, presenta mayor sensibilidad y ofrece una mejor resolución (figura 4), fue tomada de Wallas (1997) con las siguientes modificaciones: se aumentaron 5 min de exposición al fijador, un lavado con agua desionizada antes de la tinción y reducción de 15 a 10 min de exposición al nitrato de plata.

Aunque estas técnicas han sido estandarizadas para muestras de hemocitos, en la actualidad se está investigando en nuestro laboratorio la posibilidad de emplearlas para el análisis de organismos en estado larval, donde es técnicamente imposible obtener muestras de hemolinfa.

CONCLUSIONES

Debido a que el principal problema en la aplicación de estas técnicas es el riesgo de lisis celular por activación con pirógenos y degradación del RNA, se recomienda el uso de material y reactivos libres de pirógenos y de RNasas.

El uso de electroforesis en geles de poliacrilamida polimerizados en gradiente de 5 a 15 %, en combinación con el uso de la técnica de tinción con

nitrato de plata permite obtener la mejor resolución en el patrón de bandas obtenido. Esto se traduce en una mayor facilidad de interpretación de los resultados.

Debido a las características del material genético, es posible usar estas técnicas para el análisis de organismos en estado larval.

BIBLIOGRAFÍA

CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD. 1991. Tinción de Plata para Proteínas. Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala.

COLIGAN, J.E.; Dunn, B.; Ploegh, H.L.; Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. Eds. 1995. Current Protocols in Protein Science. Vol.1. Unit3. John Wiley & Sons, Inc.

HERNÁNDEZ LÓPEZ, J.; Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113C: 61-66.

MORALES-CORRAL, M. 1999. Comparación de los Patrones de los Fragmentos Obtenidos por AP-PCR de los Camarones: *Penaeus vannamei* (camarón blanco), *P. californiensis* (camarón café) y *P. stylirostris* (camarón azul). Tesis Profesional, Químico Biólogo, Universidad de Sonora.

VARGAS-ALBORES, F. 1992. El sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). Ph.D. Thesis, UNAM.

VARGAS-ALBORES, F., Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol., 106A:299.

WALLAS, A. J. 1997. Combined Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. In Taylor R. G. Ed Laboratory Methods. CRC Press (USA) Pp. 79-94.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado gracias al apoyo parcial de SIMAC, proyecto 970106029 y CONACYT, proyecto 25242-B.

Isolation of Penaeid shrimp hemocyte populations by density gradient centrifugation

Francisco Vargas-Albores^{*,*}, Teresa Gollas-Galván* and Jorge Hernández-López^{**,*}

*CIAD, Marine Biotechnology, PO Box 1735; Hermosillo, Son; 83000, México

** CIBNOR, PO Box 128; La Paz, BCS; 23000, México.

Abstract

Hemocytes from penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*, *P. vannamei* and *P. stylirostris*) were separated using a discontinuous Percoll gradient. Shrimp hemocytes were spontaneously adhered to glass, allowing slide preparations for staining and microscopic differential counting. Like other crustaceans, shrimp has three main populations differing in presence and size of cytoplasmic granules. Prophenoloxidase activity was mainly located in large granules hemocytes and the small granules cells seem to be responsible for encapsulation. Hemocyte discrimination ability was tested using Sephadex and manifested by enhanced adherence and releasing proPO activating system.

Keywords: immune cells, recognition, adherence, proPO, prophenoloxidase, hyaline cell, granular cell.

Introduction

The economic importance of shrimp is motivating the intensification of its culture in numerous farms. However, the high culture density has been associated with the development of epizootics (Couch, 1978; Lightner et al., 1985), which are often explosive and could lead to loss of the whole stock. Although antibiotics and disinfectants are widely used, monitoring health condition of cultured shrimps has been proposed as an alternative prophylactic measure. Hemocytes or circulating cells count may be a health monitor, since most infectious diseases modify the composition of the crustacean hemolymph (de Backer, 1961; Bang, 1971). Unfortunately there are few studies on shrimp hemocytes separation and/or classification (Rodríguez et al., 1995; Gargioni and Barracco, 1998; Yip and Wong, 2002) and they can not be applied for routine analysis.

Furthermore, the origin and ontogenetic development of crustacean hemocytes are still not clear, leading to an imprecise hemocytes classification (Ratcliffe et al., 1985; Hose et al., 1990; Clare and Lamb, 1994). Crustacean hemocytes have been morphologically classified by light microscopy; however criteria and terminology often differs among authors. More uniform information derives from electron microscopic studies (Bauchau and Mongeot, 1978), but even with ultrastructural characterization, the classification of

* Corresponding Author: Dr. Francisco Vargas-Albores; CIAD, PO Box 1735; Hermosillo, Son.; 83000 México; fvargas@casabel.ciad.mx

crustacean hemocytes is still a subject of discussions (see Bauchau, 1981; Martin and Graves, 1985; Benjamin and James, 1987; Tsing et al., 1989).

Thus, classification of crustacean hemocytes has been complicated due to the abundance of schemes that are based primarily on subtle morphological criteria (Martin and Graves, 1985). However, based on morphological, cytochemical and functional criteria, several hemocytes categories have been recognized in decapod crustacean (Hose and Martin, 1989), including penaeid shrimp where three hemocyte types have been described (Tsing et al., 1989), but there is not information about hemocyte function or separation methods.

Shrimp hemocytes respond to environmental changes by degranulation and autolysis. Previously we have reported the use of an anticoagulant solution (Vargas-Albores et al., 1993) for shrimp hemolymph extraction, which conserves the ionic and osmotic composition of shrimp hemolymph (Vargas-Albores and Ochoa, 1992). Hemocytes from *Penaeus californiensis* have been separated from plasma by centrifugation on this solution, without apparent cellular damage (Vargas-Albores et al., 1993). However, the solution capability to maintain cellular stability of *P. vannamei* and *P. stylirostris* has not been tested.

Based on the density gradient method used for separation of mammalian leukocytes (Pertoft and Laurent, 1977), comparable methods have been implemented for invertebrate cell separation, such as sea urchins (Bertheussen and Seljelid, 1978), oysters (Cheng et al., 1980) and crabs (Söderhäll and Smith, 1983). Until now, there is no routine method for shrimp hemocyte separation and two major technical problems should be solved. The first one is related to control the rapid and efficient shrimp coagulation system, and the second is the high cellular reactivity. There are no reports on successful separation of shrimp hemocyte populations, and the available studies (Martin and Graves, 1985; Hose et al., 1987; Tsing et al., 1989; Hose et al., 1990) were done using non-separated populations.

Cellular defenses in crustaceans appear to be associated to a specific hemocyte population. The prophenoloxidase (proPO) activating system is responsible for melanization and is also involved in non-self recognition mechanisms and encapsulation (Smith and Söderhäll, 1983; Johansson and Söderhäll, 1989a). Like in freshwater crayfishes (Smith and Söderhäll, 1991; Lariz, 1993 #74), in shrimp the proPO system is mainly located inside the cell granules (Vargas-Albores et al., 1993; Hernández-López et al., 1996; Le Moullac et al., 1997), but its distribution among granular hemocyte populations has not been described.

Hemocytes, as component of the immune system, attack pathogens, damaged cells and foreign or non-self material. The ability of shrimp hemocyte to recognize abiotic particles, less complex than pathogens or sub-cellular materials, may help to identify the mechanisms whereby they can distinguish self from non-self materials and which hemocyte population is involved. In this work, we tested the effect of the anticoagulant solution on hemocytes shrimp, developed a procedure based on Percoll gradient for their separation and detailed the distribution of proPO in isolated populations. We also demonstrated the ability of separated hemocytes populations to recognize abiotic particles and report that particle charge has a role in the recognition process.

Materials and Methods

Pyrogen-free water was prepared using a Detoxi-Gel column (Pierce). Pyrogen-free glassware was acquired commercially (quality cell culture, endotoxin-free) when available. If not, glassware was washed and placed at 180°C for 4 h, while plasticware was soaked in 1 % E-toxa-clean (Sigma Chem. Co.) solution for 30 min and thoroughly rinsed with pyrogen-free water. Only cell culture or endotoxin-free chemicals (Sigma Chem. Co.) were used. All solutions in contact with cells were prepared with pyrogen-free water.

Solutions

Shrimp salt solution (SSS: 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/Kg), corresponding to the ionic and osmotic values of shrimp hemolymph (Vargas-Albores and Ochoa, 1992), was used to prepare the shrimp anticoagulant solution (SAS) by adding 10 mM EDTA.Na₂ to the SSS. This solution was used for isolation of *P. californiensis* hemocytes without apparent cellular modifications (Vargas-Albores et al., 1993). Glutaraldehyde (2.5%) in 10 mM cacodylate buffer (pH 7) was used as fixative for microscopy.

Animals and Sampling

P. stylirostris were obtained from a commercial farm (Sonora, Mexico). *P. californiensis* and *P. vannamei* were grown in an experimental tide pond (Center for Biological Research, La Paz, BCS, Mexico). The animals were maintained in 200-l aquaria (24 ± 4°C, salinity: 36 ppt) at least 2 days before the experiment. Only the hemolymph from intermolt, apparently healthy juvenile shrimp (10-14 g) was used. The hemolymph was extracted from the pleopod base of the first abdominal segment near the genital pore. One volume of hemolymph was obtained using 0.5-ml syringes, 27-gauge needle, containing 2 volumes of precooled (10°C) SAS.

Total and Differential Hemocytes count

For cell counts, 10 µl of fresh hemolymph were diluted with 90 µl of SSS. The total hemocyte count (THC) was determined in a Neubauer chamber. For differential hemocytes count (DHC), 20 µl of samples were placed on a slide and incubated 15 min, at 24±2°C in a humid chamber to permit the adherence of the cells to the glass. The slides were washed with SSS and fixed with glutaraldehyde solution for 15 min. The slides were always kept humid and stained by Giemsa and/or Hematoxylin-eosin methods. Based on the presence and size of granules, different cell populations were identified under light microscope.

Separation by Percoll gradients

Percoll linear gradients were generated by centrifuging 3 ml of 70% Percoll™ solution in round-bottom polycarbonate tubes at 15,000 × g, 10°C for 20 min. Discontinuous gradients were formed by adding sequentially 500 µl of different Percoll solutions (35, 40, 45, 50, 55 and 60%) directly to the centrifugation tube.

Nine hundred microliters of shrimp diluted hemolymph (1:3 with anticoagulant) were loaded on top of the gradient (continuous or discontinuous). The tubes were centrifuged at 2,500 g for 10 min, at 4°C. After centrifugation, the cell bands were separated using a Pasteur pipette, resuspended in 2 ml of SAS and free sedimentation of Percoll was allowed for 2 min. The cells in suspension were analyzed by light and phase contrast microscopy. Cell density was calculated using as reference density marker beads (Sigma Chem. Co.) ranging from 1.018 to 1.138 g/ml.

Hemocytic proPO in isolated cell populations

Isolated hemocyte populations were washed with SSS and proPO was obtained by cell degranulation (Hernández-López et al., 1996). Briefly, the cells were resuspended in 0.01 M sodium cacodylate, pH 7.0 and centrifuged at 15,000 × g for 1 min at room temperature. The resulting supernatant was used for spectrophotometric estimation of proPO in microwell plates, incubating with trypsin and using L-DOPA as substrate as previously reported (Gollas-Galván et al., 1997).

Adherence to Sephadex assay

Fifty microliters of isolated hemocyte population were incubated with 50 μ l of Sephadex™, DEAE-Sephadex™ (positive charged) or CM-Sephadex™ (negative charged), 15 min. at 25°C, in 1.7-ml siliconized tubes. Ten μ l of mixture were placed on a slide and observed under light microscope.

Activation of proPO system by Sephadex

Isolated hemocyte types (100 μ l) were incubated with 100 μ l of Sephadex, DEAE-Sephadex or CM-Sephadex, 1 h, at 25°C. Afterwards, the samples were centrifuged at 800 x g for 10 min, and total PO activity was quantified in the supernatant, as mentioned above.

Results and Discussion

Although different nomenclatures have been proposed, three major types of hemocytes have been described in crustaceans and they have been referred as hyaline, semi-granular and granular cells (Bauchau, 1981; Söderhäll and Smith, 1983; Benjamin and James, 1987), based on size and number of intracellular granules. This classification may be confusing and some authors have suggested that the differences are related to developmental stage rather than different cell stream (Bauchau, 1981; Benjamin and James, 1987). Nonetheless, there is no evidence that all crustacean hemocyte populations develop from one basic stem cell.

Other classification proposes only two cell types: hyaline and granular cells. The latter are subdivided in small granule hemocyte (SGH) and large granule hemocyte (LGH), according to the cytoplasmatic granule size (Tsing et al., 1989). This nomenclature is used in this work. Clare and Lamb (1994), working with the blue crab (*Callinectes sapidus*), proposed that circulating cells arise from two distinct progenitor cell lines. The first one develops to hyaline cells and the second line develops to LGH either directly or via SGH, suggesting that SGH are an immature form of LGH.

It is possible to distinguish three main types of circulating cells (Fig 1) under phase contrast microscopy by obtaining the shrimp hemolymph directly in 2.5% glutaraldehyde. Hyaline cells have rounded shape (7-8 μ m), with regular borders, low contrast and lack intracellular granules. These cells have been also referred as "agranular cells" (Martin and Graves, 1985), however other authors (Tsing et al., 1989) point to

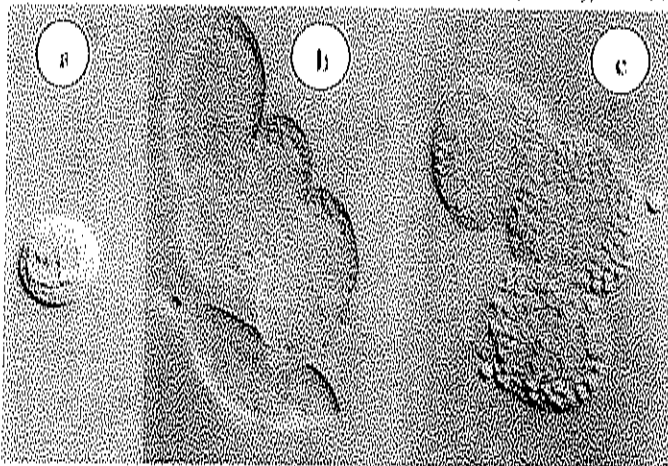


Figure 1 Circulating cells in the shrimp hemolymph observed under contrast phase microscopy. a: hyaline hemocyte; b: Small granule hemocyte (SGH). c: Large granule hemocyte (LGH). The bar is 5 μ m.

that this name is correct only at light microscopy level since by electron microscopy it is not possible to affirm the absence of granules and that granules are associated with the coagulation system.

The second type of cells observed in shrimp hemolymph, was considered as SGH, with a typical oval to spindle-shape and measured approximately 18 x 6 μ m. The distinctive feature of these cells was the predominance of round and dark small granules (0.4-0.6 μ m). Although with similar shape and size, the third type of cells detected in shrimp hemolymph contains numerous large granules (0.8-1.1 μ m), and was considered as LGH.

All hemocyte populations are able to adhere to glass by incubating hemolymph in a humid chamber for at least 10 min before washing with SSS. Once adhered to the glass, hyaline cells had two different cell forms. Some of them retained its shape and size, with a small cytoplasm (similar to vertebrate lymphocytes) while other cells extended their cytoplasm, apparently due to adherence, changed the nucleus/cytoplasm ratio and extended up to 60 μm of diameter. After extension, fixation and staining with Giemsa or HE, the nucleus was observed as dark blue and cytoplasm as light blue.

SGH and LGH also adhered to glass and extended, although not as much as hyaline cells (45 μm), but presenting cytoplasmic extensions or pseudopods. In general, using Giemsa stain, both kind of cells looked similar: nucleus in dark blue, cytoplasm in light blue and granules in violet (basophilic). However, a little percentage of SGH had orange (eosinophilic) granules and this feature was not found in LGH. On the other hand, by HE stain, no differences were observed in granules. The granules of LGH were markedly refringent and some cells presented nucleus with a kidney shape, morphologically resembling vertebrate granulocytes (eosinophils and basophils).

For the separation of the cells, we tested different Percoll gradients prepared in SSS-EDTA. Following the procedure described and used in several invertebrates (Söderhäll and Smith, 1983; Johansson and Söderhäll, 1985; Johansson and Söderhäll, 1989b) a continuous gradient of 40, 50, 60 and 70 % of Percoll was tested in order to optimize cell separation. Although good separations were obtained with 50 or 60% gradients, a diffuse zone of dispersed cells often extending between bands was observed. When these bands were analyzed under phase-contrast microscopy they contained different cell populations. Using density markers the average cell density was estimated and a Percoll discontinuous gradients (45, 50 and 55%) was used thereafter. For *P. californiensis* cells separation was successful using 45 and 50% Percoll phases. Meanwhile, for *P. stylirostris* and *P. vannamei*, 45, 50 and 55% Percoll were necessary to obtain complete separation. Hyaline cells from the three species of shrimps were located between plasma and first Percoll layer (density ≤ 1.035 g/ml). However, differences in density were observed in the granular series populations. The density of *P. californiensis* SGH ranged from 1.035 to 1.062 (average 1.048 g/ml), while the same kind of cells in *P. stylirostris* and *P. vannamei* had density of 1.068 g/ml. Similarly, *P. californiensis* LGH showed a density > 1.062 , and *P. stylirostris* and *P. vannamei* > 1.075 g/ml.

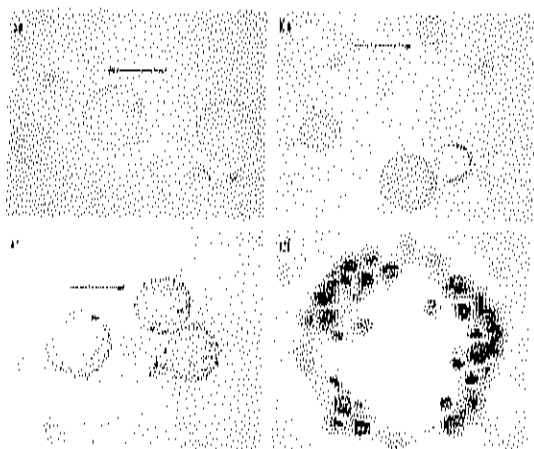


Figure 3 Shrimp hemocytes showed different degree of recognition to: (a) Sephadex, X40, (b) CM-Sephadex, X40, and (c, d) DEAE-Sephadex, X40, X100, respectively. Arrows point to shrimp hemocytes.

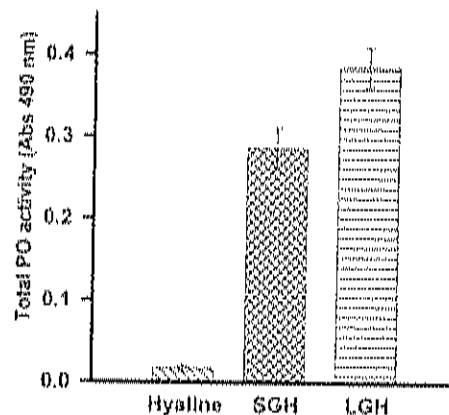


Figure 2 PO activity in hemocytes populations of shrimp. The cells from 900 μl of hemolymph were separated by discontinuous Percoll gradient; each band was washed and incubated with L-DOPA. The bar represents average \pm SE (n=15).

Using the described discontinuous gradients of Percoll, three distinct cell bands were obtained in the studied shrimp specie. The less dense band, layered in the plasma-gradient interface, contained hyaline cells that are very unstable and can die rapidly if they are not manipulated under adequate conditions. During these experiments, hyaline cells were recovered immediately from the gradient, and re-suspended in cold SSS. By this, the cells were viable for 50-60 min, but afterwards they lysed. The second band occurred in the middle interface and comprised SGH, while the densest band, lying in the bottom of the tube, was composed entirely of LGH. Both

granular cell populations are more stable than hyaline and, although degranulation can occur, they maintain their morphological characteristics at least 2 h after gradient separation. In contrast to continuous gradient, using discontinuous gradient dispersed zone or dispersed cells were rarely observed. Additionally, the discontinuous gradient method does not require a high-speed centrifugation process that is an advantage for small laboratories in shrimp farms.

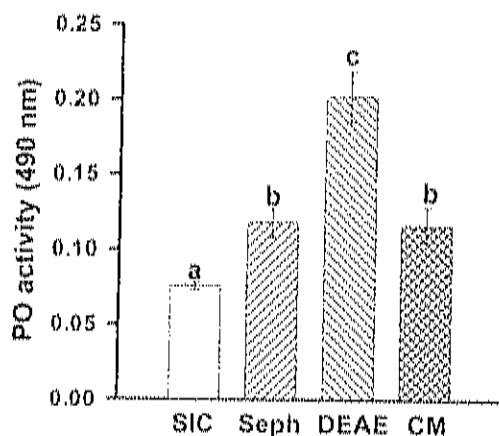


Figure 4 Shrimp hemocytes proPO release, induced by differently charged Sephadex. Differences were detected by student's t-test ($p < 0.05$)

The PO activity has been detected in the granular hemocytes of several crustaceans (Johansson and Söderhäll, 1989a; Smith and Söderhäll, 1991; Johansson and Söderhäll, 1992). As in *Procambarus clarkii* (Lanz et al., 1993), *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus monodon* (Sung et al., 1998), PO activity was detected in the LGH and SGH of *P. californiensis*, *P. stylirostris* and *P. vannamei* microscopically in slides of whole hemolymph. Additionally, working with populations of hemocytes separated by density gradient ($n=15$), the PO activity was demonstrated in LGH (0.462 ± 0.011) and SGH (0.150 ± 0.016) but not in hyaline cells (Fig. 2).

The total number of hemocytes (THC) ranged from 4 to 14×10^6 cells/ml of hemolymph for the three shrimp species. The lowest counts were found in *P. californiensis* ($4.0 \pm 1.6 \times 10^6$ hemocytes per ml) while the highest cell concentration was detected in *P. stylirostris* ($14.1 \pm 5.3 \times 10^6$ cells/ml), while *P. vannamei* had $9.35 \pm 2.1 \times 10^6$ cells/ml. However, these differences could be due to different physiological condition, age or developmental state (Tsing et al., 1989). The differential counting of the hemocytes results in SGH as the most abundant population (51%) and LGH as the least abundant cell type (19%) while the hyaline hemocytes were, in average, 29%. All cell types were similar in abundance in the three shrimp species (Table 1). Although different proportions in shrimp cells have been reported (Tsing et al., 1989; Le Moullac et al., 1997) this could be due to differences in methodology, or even more, species.

The total number of hemocytes (THC) ranged from 4 to 14×10^6 cells/ml of hemolymph for the three shrimp species. The lowest counts were found in *P.*

As in other crustaceans, shrimp hemocytes are involved in several defense responses including prevention of blood loss, recognition of non-self, phagocytosis and encapsulation. In the mosquito, *Armigenes subulbatus*, it has been demonstrated that the inoculation of inert particles such Sephadex results in a melanization and encapsulation response, which is dependent of the charge (Zahedi et al., 1992). When shrimp hemocytes were incubated with Sephadex (Seph: no charge), DEAE-Sephadex (DEAE-Seph: positively charged) or CM-Sephadex (CM-Seph: negatively charged), a charge-dependent interaction was observed. Approximately 90% of DEAE-Seph particles had cells attached. Remarkably, only 5% of CM-Seph spheres had cells attached, and very few cells were seen attached to the Seph particles (Fig. 3). Additionally, the incubation of hemocytes with Sephadex triggered exocytosis of proPO system in a charge-dependent manner. Although every Sephadex type produced a significant proPO system release respect to control, DEAE-Seph produced the highest proPO system response (Fig. 4).

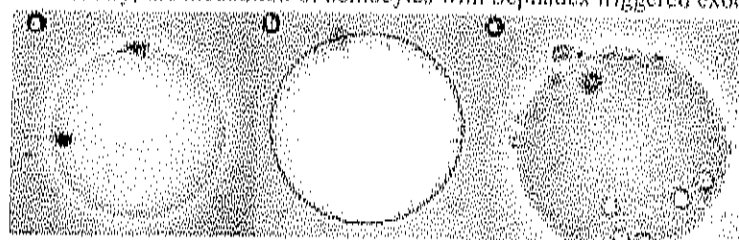


Figure 5 Three different hemocytes populations, separated by discontinuous Percoll gradient, incubated with DEAE-Sephadex: (a) Hyaline Hemocytes, (b) Large Granules Hemocytes and (c) Small Granules Hemocytes. Arrows point to

Although every Sephadex type produced a significant proPO system release respect to control, DEAE-Seph produced the highest proPO system response (Fig. 4).

Shrimp hemocyte adherence was studied by incubation of separated populations of hyaline,

SGH and LGH with DEAE-Seph. Only SGH showed clear adherence while the other populations did not basically react (Fig. 5) indicating that SGH is the hemocyte population in charge of encapsulation. Thus, different cellular functions are apparently distributed in the shrimp hemocyte populations: coagulation in hyaline cells, proPO in both granular hemocytes, but encapsulation appears to be made only by SGH.

The separation of hemocytes by discontinuous Percoll gradient allowed to work with separated viable cell populations and to define the respective role in the immune defense. In addition, the cell adherence to the glass results in an easy way to prepare slides for differential counting after routine stain (Giemsa or HE). Finally, the shrimp hemocyte capability for recognizing abiotic particles shows the great potential of its immune system, which is beginning to be understood.

Acknowledgment

We thank Jorge Soto-Hernández by technical support, Dr. G. Yepiz-Plascencia and Dr. R. Sotelo-Mundo for critical reading the document. This research was partial supported by grant SIMAC No. 970106029 and CONACyT No. 31544-B and 25242-B

Tables and Figures

Table 1

Total and differential count of hemocytes in shrimp hemolymph. Samples from 10 animals of each species were analyzed by triplicate.

	<i>P. californiensis</i>	<i>P. vannamei</i>	<i>P. stylirostris</i>
Total count (10 ⁶ cells/ml)	4.04 ± 1.63	9.35 ± 2.10	14.16 ± 5.30
Hyaline (%)	27.4 ± 4.4	25 ± 3.9	24.6 ± 2.1
SGH (%)	52 ± 6.5	53.1 ± 10.6	51.5 ± 2.5
LGH (%)	20.7 ± 6.1	22.1 ± 8.2	14.1 ± 1.9

References

- Baug, P.B., 1971. Transmissible diseases, probably viral origin, affecting the amoebocytes of the European shore crab *Carcinus maenas*. *Infect. Immun.* 3, 617-623.
- Bouchau, A.G., 1981. Crustaceans. In Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds). *Invertebrates Blood Cells*. Academic Press, New York, pp. 365-420.
- Bouchau, A.G. and Mègez, J.C., 1978. Structure et fonctions des hématocytes chez les crustacés. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 119, 227-248.
- Benjamin, L.R. and James, B.J., 1987. Light and electron microscopy of the hemocytes of *Ligia oceanica* (L.) (Crustacea: Isopoda). *J. Invertebr. Pathol.* 49, 19-25.
- Bertheussen, K. and Seljelid, R., 1978. Echinoid phagocytes *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 111, 401-412.
- Cheng, T.C., Huang, J.W., Karadogan, H., Renwanz, L. and Yoshino, T.P., 1980. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.* 36, 35-40.
- Claire, A.S. and Lamb, G., 1994. Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar. Biol.* 118, 601-610.
- Couch, J.A., 1978. Diseases, parasites and toxic responses of commercial Penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. *Fish. Bull.* 76, 1-44.

- de Backer, J., 1961. Rôle joué par les hémocytes dans les réactions tissulaires de défense chez les crustacés. Ann. Soc. R. Zool. Belgique 92, 141-151.
- Gargioni, R. and Baraceni, M.A., 1998. Hemocytes of the Palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the Penaeid *Penaeus paulensis*. J. Morphol. 236, 209-221.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F., 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 117A, 419-425.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113C, 61-66.
- Hose, J.E. and Martin, G.G., 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. J. Invertebr. Pathol. 53, 335-346.
- Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S., 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. 178, 33-45.
- Hose, J.E., Martin, G.G., Nguyen, V.A., Lucas, J. and Rosenstein, T., 1987. Cytochemical feature of shrimp hemocytes. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. 173, 178-184.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1985. Eoscytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. J. Comp. Physiol. 156B, 175-181.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1989a. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol. Today 5, 171-176.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1989b. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. Insect Biochem. 19, 183-190.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1992. Cellular defence and cell adhesion in crustacean. Anim. Biol. 1, 97-107.
- Lanz, H., Tansami, V. and Arévalo, H., 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. Dev. Comp. Immunol. 17, 389-397.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Freissard, S., Levy, P. and Aquacop., 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle - protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 7, 227-234.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Williams, R.R., Mohney, L.L., Clerf, J.P.M. and Bell, T.A., 1985. Recent advances in penaeid virus disease investigations. J. World Maricult. Soc. 16, 267-274.
- Martin, G.G. and Graves, B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185, 339-348.
- Pertoff, H. and Laurent, T.C., 1977. Isopycnic separation of cells and cell organelles by centrifugation in modified colloid silica gradients. In Cansimopoulos, N. (Ed), Methods in Cell Separation, vol. 1, Plenum, New York, pp. 25-65.
- Raefliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97, 183-336.
- Rodríguez, J., Boullé, V., Mialhe, E. and Bacher, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell. Sci. 108, 1043-1050.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. Cell Tissue Res. 232, 295-303.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15, 251-261.
- Söderhäll, K. and Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7, 229-239.
- Song, J.H., Chang, H.J., Her, C.H., Chang, J.C. and Song, Y.L., 1998. Phenoloxidase Activity of Hemocytes Derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. J. Invertebr. Pathol. 71, 26-33.
- Tsing, A., Arcier, J.-M. and Brehelin, M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. J. Invertebr. Pathol. 53, 64-77.
- Vargas-Albores, F. and Ochoa, J.-L., 1992. Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. Comp. Biochem. Physiol. 102A, 1-5.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A. and Ochoa, J.-L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. 106A, 299-303.
- Yip, E.C.H. and Wong, J.T.Y., 2002. Fluorescence activated cell-sorting of haemocytes in Penaeid prawns. Aquaculture 204, 25-31.
- Zabedi, M., Denham, D.A. and Ham, P.J., 1992. Encapsulation and melanization responses of *Amuricea subalbans* against inoculated Sphadex beads. J. Invertebr. Pathol. 59, 258-263.

- de Buckel, J., 1961. Rôle joué par les hémocytes dans les réactions tissulaires de défense chez les crustacés. Ann. Soc. R. Zool. Belgique 92, 141-151.
- Gargioni, R. and Barzaco, M.A., 1998. Hemocytes of the Palaemonids *Macrabrachium rosebergii* and *M. acanthurus*, and of the Penaeid *Penaeus paulensis*. J. Morphol. 236, 209-221.
- Gallas-Galván, T., Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F., 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 117A, 419-425.
- Hernández-López, J., Gallas-Galván, T. and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113C, 61-66.
- Hose, J.E. and Martin, G.G., 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Stegonina taeniata*. J. Invertebr. Pathol. 53, 333-346.
- Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S., 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, 178, 33-45.
- Hose, J.E., Martin, G.G., Nguyen, V.A., Lucas, J. and Rosenstein, T., 1987. Cytochemical feature of shrimp hemocytes. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. 173, 178-184.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. J. Comp. Physiol. 156B, 173-181.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1989a. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol. Today 5, 171-176.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1989b. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. Insect Biochem. 19, 183-190.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1992. Cellular defence and cell adhesion in crustacean. Anim. Biol. 1, 97-107.
- Lanz, H., Tautz, V. and Aréolaga, H., 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. Dev. Comp. Immunol. 17, 389-397.
- Le Moullac, G., Le Grounellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquavac, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle - protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 7, 227-234.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Williams, R.R., Mohney, L.L., Clerx, J.P.M. and Bell, T.A., 1985. Recent advances in penaeid virus disease investigations. J. World Maricult. Soc. 16, 267-274.
- Martin, G.G. and Graves, B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185, 339-348.
- Pertoldi, R. and Laurent, T.C., 1977. Isopycnic separation of cells and cell organelles by centrifugation in modified colloid silica gradients. In Cabimpoalas, N. (Ed), Methods in Cell Separation, vol. 1, Plenum, New York, pp. 25-65.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97, 183-350.
- Rodriguez, J., Bonito, V., Mialhe, E. and Bacheré, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell Sci. 108, 1043-1050.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1993. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. Cell Tissue Res. 233, 29-303.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15, 251-261.
- Söderhäll, K. and Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7, 229-239.
- Song, H.H., Chang, H.J., Her, C.H., Chang, J.C. and Song, Y.L., 1998. Phenoloxidase Activity of Hemocytes Derived from *Penaeus monodon* and *Macrabrachium rosebergii*. J. Invertebr. Pathol. 71, 26-33.
- Tsing, A., Archer, J.M. and Brehelin, M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. J. Invertebr. Pathol. 53, 64-77.
- Vargas-Albores, F. and Ochoa, J.-L., 1992. Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. Comp. Biochem. Physiol. 102A, 1-5.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A. and Ochoa, J.-L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. 106A, 299-303.
- Yip, E.C.H. and Wong, J.T.Y., 2002. Fluorescence activated cell-sorting of haemocytes in Penaeid prawns. Aquaculture 204, 25-31.
- Zahedi, M., Deubam, D.A. and Haw, P.J., 1992. Encapsulation and melanization responses of *Artemia salina* against inoculated Sephadex beads. J. Invertebr. Pathol. 59, 258-263.