

**ESCUELA SUPERIOR
POLITÉCNICA DEL LITORAL**

FACULTAD DE INGENIERÍA MARÍTIMA Y CIENCIAS DEL MAR

**"IMPLANTACION DE LA TECNICA DE AP-PCR (ALEATORY-
PRIMED POLYMERASE CHAIN REACTION) PARA EL
ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL ADN GENOMICO DE
Penaeus vannamei "**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de

ACUICULTOR

Presentada por:

José A. Melena Cevallos

GUAYAQUIL-ECUADOR

1997

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL."

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

José A. Melena C.

José A. Melena C.



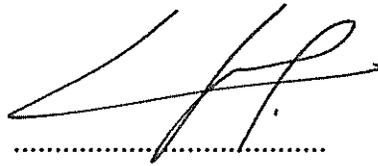
Jorge Calderón V., Ph. D.

Presidente del Tribunal



Virna Cedeño E., M. Sc.

Director de Tesis



Eric Mialhe, Ph. D.

Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser apoyo permanente durante toda mi vida.

A mis padres, porque han dedicado su vida a la mía, luchando a diario para brindarme las oportunidades que a muchos otros les fueron negadas. Gracias por su amor. Los amo.

A mi familia, especialmente a Lucy, mi hermana. Gracias por tu apoyo.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su director general Dr. Jorge Calderón, por haberme permitido realizar esta tesis.

A Virna, mi directora de Tesis y compañera de trabajo, por demostrarme su confianza cuando se presentaron las dificultades.

A Eric, incansable generador de ideas y permanente motivador de aquellos que hemos trabajado junto a él.

Al personal de CENAIM, en particular a los integrantes de Patología, Inmunología y Genética.

A mis compañeros tesisistas, por ayudarme cuando fue necesario.

A mis amigos, a quienes considero como parte de mi familia.

A Marcelo Muñoz, amigo excepcional. Gracias por serlo.

A Rosa Elena, mi complemento. Te quiero.

Finalmente, a quien en vida fue Dra. Lucía Carrera, por su valioso ejemplo.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Porque el día ha llegado
y estamos juntos para verlo.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	ii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Material Genético.....	3
1.1.1. La molécula de ácido desoxirribonucleico.....	3
1.1.2. El ADN y la importancia de su secuencia.....	5
1.1.3. La Replicación del ADN.....	5
1.2. Organización del Genoma de la célula animal.....	7
1.2.1. El núcleo.....	7
1.2.2. La mitocondria.....	7
1.2.3. El ADN expresado y no expresado.....	8
1.3. Estructura y expresión del gen.....	9
1.3.1. Transcripción.....	9
1.3.2. Traducción.....	10
1.3.3. Proteínas.....	11
1.3.4. Alelos.....	12
1.4. La Variabilidad genética.....	12
1.4.1. Elementos transposables: Definición.....	13
1.4.2. Estructura.....	13
1.4.3. Mecanismo.....	15
1.4.4. Clasificación.....	15
1.5. Técnicas para el análisis de la variabilidad genética.....	16

1.5.1. Variabilidad de Alocimas.....	16
1.5.2. Polimorfismos de patrones de restricción (RFLP).....	18
1.5.3. La Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente (AP-PCR: Aleatory-Primed Polymerase Chain Reaction).....	21
1.6. Domesticación y Selección.....	25
2. MATERIALES Y METODOS.....	26
2.1. Material biológico.....	26
2.2. Extracción de ADN genómico.....	26
2.2.1. Protocolo de extracción de ADN genómico de mosquito.....	26
2.2.2. Protocolo de extracción de ADN genómico por tratamiento con Proteinasa K.....	27
2.2.3. Protocolo de extracción de ADN genómico de camarón por ebullición de hemocitos.....	28
2.3. Cuantificación de ADN y estimación de su pureza.....	29
2.4. AP-PCR (Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente).....	30
2.5. Electroforesis.....	31
3. RESULTADOS.....	33
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45
ANEXOS.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la molécula de ADN.....	4
Figura 2: Replicación del ADN.....	7
Figura 3: Transcripción y Traducción del ADN.....	11
Figura 4: Causas de variabilidad genética.....	14
Figura 5: Técnicas para el análisis de la variabilidad genética.....	20
Figura 6: Principio de la PCR.....	22
Figura 7: Representación esquemática de la AP-PCR y su producto RAPD.....	24

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados de las AP-PCR efectuadas.....38

INDICE DE ABREVIATURAS

A:	Adenina
ADN:	Acido Desoxirribonucleico
ADN mt:	Acido Desoxirribonucleico mitocondrial
AP-PCR:	Aleatory-Primed Polymerase Chain Reaction (Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente)
ARN:	Acido Ribonucleico
ARNasa:	Enzima digestora del ARN
ARN m:	Acido Ribonucleico mensajero
ARN r:	Acido Ribonucleico ribosómico
ARN t:	Acido Ribonucleico de transferencia
C:	Citosina
DO:	Densidad óptica
dATP:	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP:	Deoxicitidina trifosfato
dGTP:	Deoxiguanosina trifosfato
dNTP:	Deoxinucleótido trifosfato
dTTP:	Deoxitimidina trifosfato
ddATP:	Dideoxiadenosina trifosfato
ddCTP:	Dideoxicitidina trifosfato
ddGTP:	Dideoxiguanosina trifosfato
ddNTP:	Dideoxinucleótido trifosfato

ddTTP:	Dideoximidina trifosfato
Eco R1:	Enzima de restricción de <i>Escherichia coli</i> cepa R1
EDTA:	Ethylenediamine tetraacetic acid
Enzima Taq:	Enzima de polimerización del ADN (<i>Thermus aquaticus</i>)
ET:	Elemento transposable
Exp:	Experimento
fg:	fentogramo
G:	Guanina
mM:	milimol
mm:	milimetro
mOsm:	miliosmoles
ng:	nanogramo
ORF:	Open reading frames (Ventanas de lectura para transcripción)
P:	iniciador
pb:	par de bases
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Reacción de polimerización en cadena)
<i>P. vannamei</i> :	<i>Penaeus vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i> :	<i>Penaeus stylirostris</i>
<i>P. aztecus</i> :	<i>Penaeus aztecus</i>
<i>P. setiferus</i> :	<i>Penaeus setiferus</i>
pg:	picogramo
pH:	Potencial de Hidrogeno

RAPD:	Random Amplified Polymorphism DNA (Polimorfismo de patrones de ADN amplificado)
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de patrones de restricción del ADN)
RPM:	Revoluciones por minuto
°C:	grados centígrados
SSBP:	Single Strand Binding Proteins
T:	Timina
TAE:	Tris Acido Acético EDTA
TE:	Tris EDTA
U:	unidad
μL :	microlitro
μM :	micromol

RESUMEN

Con el objetivo de iniciar un estudio sobre la diversidad genética del camarón blanco *Penaeus vannamei*, el presente trabajo fue dirigido fundamentalmente a implementar la técnica AP-PCR (Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente) para obtener patrones de amplificación, los cuales servirán para el análisis del polimorfismo según el concepto de RAPD (Random amplified polymorphism DNA) y la identificación de marcadores genéticos que puedan ser asociados con características fenotípicas de interés para el sector acuicultor.

Se utilizaron camarones procedentes del departamento de maduración del CENAIM, a los cuales se les extrajo muestras de diferentes tejidos para implementar un protocolo de extracción de ADN y, subsecuentemente, desarrollar un protocolo eficaz y reproducible de AP-PCR.

Los primeros resultados demostraron que la aplicación de los protocolos de AP-PCR para *P. vannamei* previamente publicados (García *et al.*, 1994, 1996) no permitieron obtener producto alguno de amplificación.

En base a experimentaciones, realizadas con mezclas de ADN bacteriano y ADN de camarón, se demostró la necesidad de utilizar soluciones diluídas de ADN de camarón para su empleo en AP-PCR, correspondientes a concentraciones inferiores a 100 pg/ μ L por muestra.

En estas condiciones fue posible obtener regularmente productos de amplificación para muestras de hemolinfa con volúmenes entre 300 y 500 μ L.

De esta manera el protocolo desarrollado en el presente trabajo permite considerar la realización de análisis genéticos e inmunológicos paralelamente, sin sacrificar al animal, lo que abre la vía a investigaciones sobre la selección de camarones.

INTRODUCCION

La historia del cultivo de camarón en Ecuador es relativamente reciente, no sobrepasa las 3 décadas, y ha dado lugar a una industria que se ha desarrollado rápidamente. Actualmente el Ecuador se ubica entre los primeros productores a nivel mundial con 95.000 toneladas de camarón, esencialmente de la especie *Penaeus vannamei* (National Aquaculture Chamber, 1996).

El camarón exportado es el producto final de un proceso que se inicia con el suministro de larvas, silvestres o procedentes de laboratorios, se continúa con algunos meses de cultivo en piscinas y se termina con el procesamiento en las empacadoras con destino al mercado internacional.

La tecnología desarrollada en el campo del cultivo de camarón no ha logrado evitar la dependencia del medio y su alteración. En efecto, la obtención de larvas a partir del medio así como de reproductores, maduros y listos para desovar o inmaduros y destinados a los laboratorios de maduración, constituye un grave problema de sobreexplotación de poblaciones naturales. En consecuencia, si los procesos de maduración no son bien dominados para ser aplicados de forma rutinaria y en cantidad suficiente para cubrir las necesidades, se pone en grave riesgo la sustentabilidad del cultivo de camarón. Además estas prácticas impiden los procesos de domesticación y selección de cepas que presenten características interesantes en lo que concierne al cultivo de camarón en condiciones artificiales de piscinas.

La tecnología está también particularmente limitada en lo que respecta a la prevención y el control de enfermedades. La utilización de reproductores o de larvas silvestres contribuye a la introducción de agentes patógenos en los criaderos, la falta de pruebas de diagnóstico impide identificar precózmemente a los patógenos que pueden causar epidemias y endemias y, consecuentemente, grandes pérdidas económicas. A estos problemas económicos se suman problemas ecológicos debido a la utilización de cantidades masivas de

antibióticos para intentar hacer frente a las mortalidades, la eliminación de estas moléculas en el medio ambiente ha causado la aparición de resistencia bacteriana. Otra medida para evitar las enfermedades es la de construir nuevas camaroneras lo que trae como consecuencia directa la continua destrucción del manglar. Por ello, un progreso tecnológico considerable consistiría en utilizar cepas domesticadas y seleccionadas por la resistencia a enfermedades.

Estos procesos de domesticación y selección son indudablemente prioritarios para el futuro del cultivo de camarón en términos económicos y ecológicos, y deben inspirarse en las producciones animales y vegetales del sector agropecuario. Mientras que en agricultura, la domesticación de cepas adaptadas a diferentes biotopos fue un proceso empírico que se realizó en el transcurso de los siglos, la domesticación de cepas de camarón adaptadas a las condiciones de cultivo podría hacerse en un lapso de tiempo muy corto, con la elaboración de programas genéticos. Así, los esquemas de domesticación deberían integrar la utilización de marcadores genéticos a fin de facilitar los procesos de selección que consideran criterios fenotípicos tales como el crecimiento, la supervivencia, la capacidad de reproducción y , más particularmente, la capacidad inmunitaria.

Para el presente trabajo se ha programado el desarrollo de la técnica AP-PCR (Aleatory Primed-Polimerase Chain Reaction), a fin de disponer a mediano plazo de marcadores genéticos que permitan caracterizar camarones a niveles infraespecíficos en base a sus perfiles de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).

1. ANTECEDENTES

1.1. MATERIAL GENÉTICO

En la naturaleza existen básicamente dos tipos de organismos: eucariotes y procariotes. En la célula eucariota, una membrana delimita el núcleo que alberga el material genético separándolo así del citoplasma. Al contrario, en el caso de la célula procariota, el material genético está en contacto directo con el citoplasma.

En todas las células de los organismos eucariotes y procariotes, el material genético está compuesto por el ácido desoxirribonucleico (ADN), siendo esta molécula la portadora de toda la información que necesita la célula para desarrollarse, funcionar y multiplicarse.

1.1.1. La molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es una macromolécula de tipo polimérica constituida de unidades denominadas nucleótidos (monómeros). Cada nucleótido tiene una molécula de azúcar, la desoxirribosa, y un grupo fosfato involucrado en la unión polimérica de las moléculas de desoxirribosa mediante enlaces fosfodiéster. Cada nucleótido contiene, ligada a la desoxirribosa, una de cuatro bases nitrogenadas ya sea: la adenina (A), la guanina (G), la citosina (C) o la timina (T). Estas bases nitrogenadas se unen por complementariedad de modo específico ($A=T$ y $G=C$), lo que causa la estructura en doble cadena del ADN. Tal estructura es mantenida junta por puentes de hidrógeno entre las bases, 2 entre adenina y timina, y 3 entre citosina y guanina. Las bases están dirigidas hacia el centro. En esta estructura con pares de bases (pb), las cadenas son orientadas en direcciones opuestas, llamadas 5'(5 prima)→3'(3 prima) y 3'→5', tomándose como referencia los números de los átomos de carbono de la desoxirribosa (figura 1).

El material genético de organismos eucariotes, como los crustáceos, contiene alrededor de 10^9 pares de bases, es decir, 1 pg, en tanto que, en organismos procariotes,

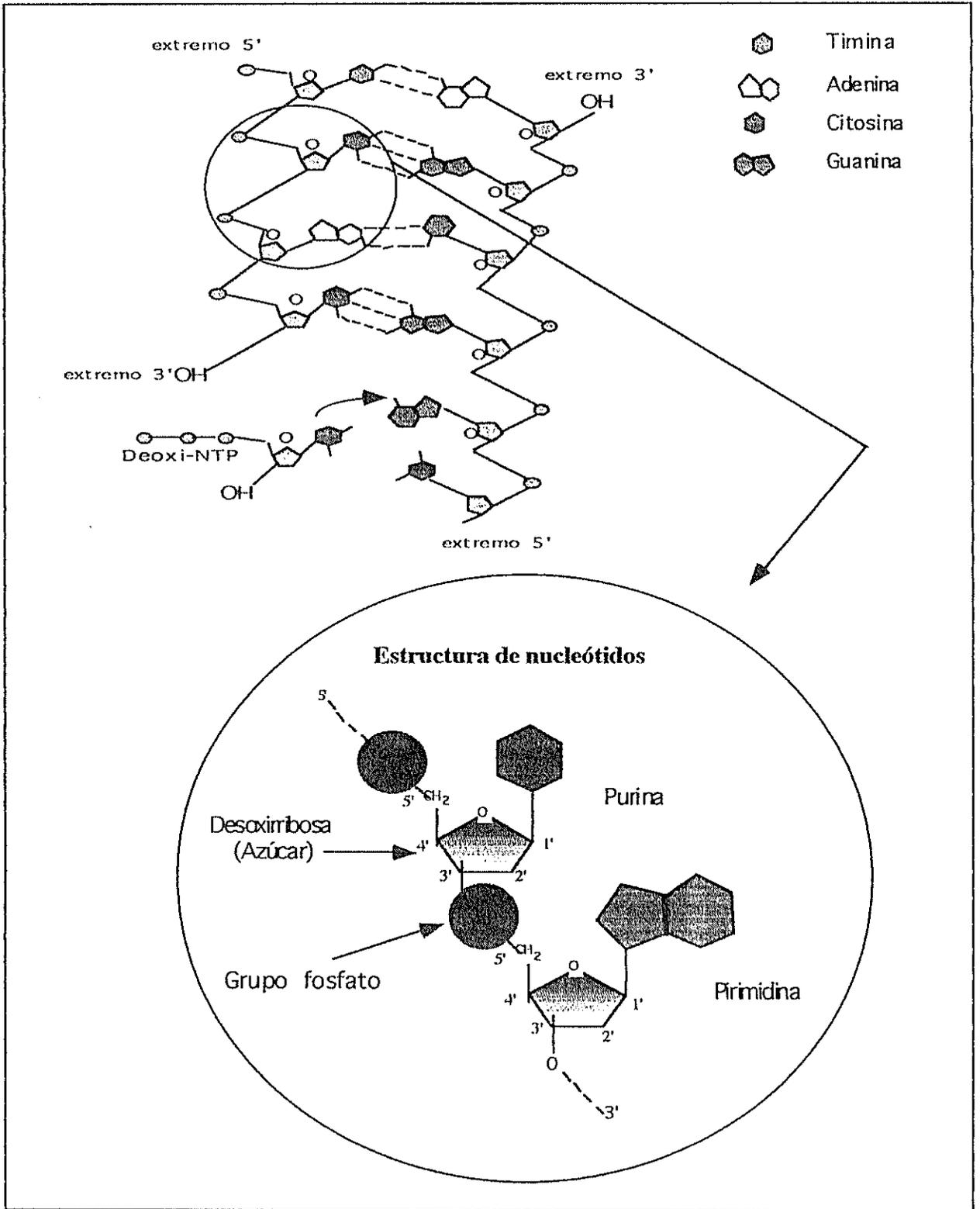


Figura 1: Estructura de la molécula de ADN "(después de Purves *et al.* , 1993)"

como las bacterias, corresponde a alrededor de 10^6 pares de bases, es decir, 1 fg.

1.1.2. El ADN y la importancia de su secuencia

Conociendo que todas las moléculas de ADN están conformadas por 4 tipos de nucleótidos, la identidad genética de cada especie está, en consecuencia, basada en el número total de nucleótidos y su secuencia. Para determinar la secuencia de una molécula de ADN, una primera etapa consiste en cortarla con enzimas de restricción que reconocen sitios específicos generalmente constituidos de 4 ó 6 nucleótidos. En una siguiente etapa los fragmentos de ADN resultantes de la digestión por la enzima de restricción pueden ser secuenciados mediante la técnica de Sanger que consiste en cuatro reacciones paralelas, cada una de las cuales permite determinar las posiciones de cada tipo de nucleótido (anexo I).

En el ADN, alrededor del 2 al 5% corresponde a genes, es decir a secuencias que tienen una información correspondiente a una proteína. El resto del ADN corresponde a secuencias que codifican para moléculas de ARN y a secuencias no codificantes. Estas últimas están presentes frecuentemente como repeticiones muy variables en términos de tamaño y de secuencia. Las funciones de estas repeticiones son prácticamente desconocidas.

1.1.3. La Replicación del ADN

La replicación del ADN es un proceso esencial a fin de que cada una de las células hijas provenientes de una célula madre contenga una copia idéntica del ADN. El proceso de replicación es semi-conservativo, es decir, que las dos cadenas originales de una molécula de ADN se separan y cada una funciona como un patrón para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Finalmente, cada molécula de ADN resultante de la replicación semi-conservativa consta de la asociación de una cadena nueva y una vieja.

El proceso de la síntesis de la nueva cadena de ADN es catalizado por enzimas ADN polimerasas (anexo I), la síntesis es realizada a partir de un iniciador (ADN o ARN) que es una pequeña secuencia que se fija debido a la complementaridad de su secuencia sobre la

cadena vieja que es utilizada como matriz. Los nucleótidos de la nueva cadena son añadidos en su extremo 3' donde se encuentra un grupo hidroxilo libre en el carbón 3' de la desoxirribosa terminal. Este grupo hidroxilo reacciona con un grupo fosfato perteneciente al carbón 5' de la desoxirribosa del deoxinucleótido trifosfato que va ser incorporado en la nueva cadena creciente.

Para la replicación del ADN, las dos cadenas en estructura helicoidal deben ser desenrolladas y separadas una de la otra a fin de ser patrones para la síntesis de las nuevas cadenas complementarias. En la apertura de las cadenas interviene primeramente la helicasa, una enzima que promueve la separación de ambas, y después las "single-strand binding proteins" (SSB) que colaboran manteniéndolas separadas, lo que conduce a una estructura de replicación en forma de tenedor.

Una cadena neo-sintetizada puede crecer continuamente por su extremo 3' a medida que el tenedor de replicación avanza a partir del iniciador. Esta nueva cadena es llamada cadena conductora.

La otra cadena neo-sintetizada, llamada cadena retrasada, es producida discontinuamente debido a que su extremidad 5' necesita ser frecuentemente restablecida con nuevos iniciadores a medida que el tenedor se desplaza. A partir de estos iniciadores, y en orientación inversa al movimiento del tenedor, se van a sintetizar fragmentos de ADN (5' a 3') con tamaños de 100-200 nucleótidos en los eucariotes y de 1000-2000 en los procariotes. Estos fragmentos discontinuos son llamados fragmentos de Okasaki. La ADN polimerasa no tiene la capacidad de crear los iniciadores por lo que para ello interviene una ARN polimerasa llamada primasa. Posteriormente los iniciadores de ARN son degradados por la ADN polimerasa y reemplazados por ADN; todos los fragmentos de Okasaki son ligados unos con otros por la enzima ADN ligasa (figura 2).

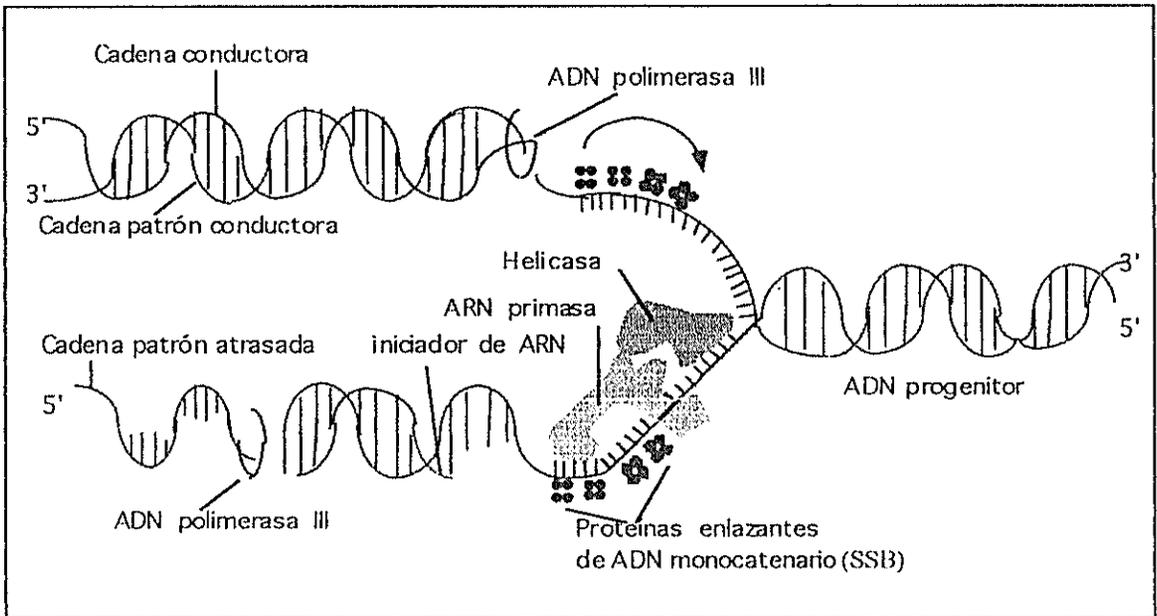


Figura 2: Replicación del ADN "(tomado de Purves *et al.*, 1993)"

1.2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DE LA CÉLULA ANIMAL

En la célula animal, la mayor parte del ADN genómico se encuentra localizada en el núcleo y una parte mucho más reducida en las mitocondrias.

1.2.1. El núcleo

En el citoplasma de toda célula eucariota se encuentra el núcleo limitado por una doble membrana. En el núcleo están contenidos los cromosomas cada uno de los cuales está constituido por una molécula de ADN asociada a diferentes proteínas que constituyen su armazón y cuyo número varía según la especie. Este ADN nuclear está constituido por alrededor de 10^9 pares de bases correspondiendo a la información requerida por la célula para desarrollar sus funciones.

1.2.2. La mitocondria

La mitocondria es un organelo presente en las células eucariotas, transmitido esencialmente por vía materna con el ovocito. Este organelo está rodeado por una doble

membrana y contiene enzimas que intervienen en el proceso energético de la célula. El ADN mitocondrial (ADNmt) se presenta como una molécula circular con un tamaño aproximado de 15.000 a 40.000 pb. El ADNmt está acompañado de ribosomas que permiten elaborar las proteínas necesarias para la síntesis de la mitocondria.

1.2.3. El ADN expresado y no expresado

En el genoma de todos los eucariotes superiores existen secuencias de ADN presentes en copias únicas y otras en copias repetidas.

Las secuencias en copia única corresponden a la mayoría de los genes que codifican para proteínas.

El ADN repetitivo incluye igualmente genes, que pueden corresponder ya sea a proteínas, como por ejemplo las histonas que son parte del armazón de los cromosomas, o a las moléculas de ARN que están implicadas en la expresión de los genes y la síntesis de las proteínas. La mayor parte del ADN repetitivo corresponde a secuencias no expresadas, algunas conocidas como pseudogenes que se derivan de genes, pero que han perdido la capacidad de expresión debido a mutaciones o eliminaciones. Según sus tamaños, las pequeñas repeticiones son conocidas como microsatélites (repetición de uno o de algunos nucleótidos), minisatélites (repetición de una o algunas decenas de nucleótidos) o satélites (varias decenas de nucleótidos). Las proporciones relativas de estas diferentes clases de ADN varían enormemente entre especies. Por ejemplo, en la *Drosophila melanogaster* el 30 % y el 24 % del genoma son genes de una sola copia y secuencias entre genes, respectivamente; en tanto que el 6 % lo constituyen familias de genes repetitivos, y el restante 40 % son principalmente una colección variable de satélites de ADN (John & Miklos, 1988).

1.3. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN DEL GEN

Un gen es una secuencia de ADN cuya expresión conduce a una proteína o a una de las moléculas de ARN involucradas en la expresión de los genes (ARN ribosómico y ARN de transferencia). Básicamente, en los eucariotes, un gen contiene tres tipos de secuencias, el promotor, los exones y los intrones. Las secuencias nucleotídicas presentes en los exones contienen la información genética correspondiente a la proteína codificada por el gen, mientras que las secuencias presentes en los intrones no intervienen directamente en la síntesis de la proteína.

1.3.1. Transcripción

La transcripción de un gen corresponde a la síntesis de ARN por la ARN polimerasa, esta síntesis se efectúa por la copia de una de las cadenas de ADN del gen a partir del promotor que es una extremidad del gen, pero que no es transcrita. El promotor del gen, corresponde a la zona a nivel de la cual va a fijarse la proteína enzimática ARN polimerasa para sintetizar el ARN. El ARN se diferencia del ADN por la naturaleza del azúcar en los nucleótidos, siendo en este caso una ribosa mientras que en el ADN se trata de una desoxirribosa. Todas las moléculas de ARN transcritas intervienen en la expresión de los genes, estas moléculas pueden ser ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr) o ARN de transferencia (ARNt). El ARNm corresponde a la copia de un gen que codifica para una proteína, es decir, que esta molécula de ARNm va posteriormente a ser utilizada como soporte de información para obtener la proteína, según un proceso llamado traducción. El ARNr es el elemento constitutivo esencial de los ribosomas y los ARNt sirven para transportar los aminoácidos en la síntesis de las proteínas.

La regulación de la expresión de un gen está ligada esencialmente a su transcripción, que depende de la interacción entre el promotor y la ARN polimerasa. Los promotores son diferentes en lo que respecta a su eficiencia para ligarse a la ARN polimerasa. Esta eficiencia depende, por una parte, de la variabilidad de la secuencia de los promotores, y, por otra, de

la asociación del promotor con cofactores protéicos, previa la fijación de la ARN polimerasa. La presencia exclusiva en ciertas células de cofactores específicos para un promotor dado puede ser la responsable de la especificidad de la transcripción del gen correspondiente.

Luego de haber sido transcritos, los ARNm de eucariotes van a seguir un proceso de maduración complejo cuya etapa primordial consiste en la eliminación de secuencias denominadas intrones, las cuales no intervienen en la codificación para la síntesis de la proteína, pero intervienen frecuentemente a nivel de la transcripción por la vía de secuencias específicas llamadas "enhancers" (mejoradores).

1.3.2. Traducción

La traducción de las moléculas de ARNm en proteínas se efectúa a nivel de los ribosomas. La construcción de la cadena polipeptídica está basada en la lectura de la secuencia de los nucleótidos del ARNm por parte del ribosoma. Esta lectura se la realiza en tripletas de nucleótidos, a las que se denominan codones.

El punto de inicio de la lectura del ARNm está determinado por los tres nucleótidos AUG que constituyen el codón de iniciación de la traducción. Este codón AUG corresponde al aminoácido de la metionina. Luego, a cada tripleta nucleotídica le corresponde un aminoácido, de acuerdo con el código genético (anexo II). Al final de la secuencia codificante se encuentra un último codón llamado de terminación que no corresponde a aminoácido alguno. Cada nuevo aminoácido incorporado a la proteína durante el transcurso de la síntesis es transportado a nivel del ribosoma por una molécula de ARN de transferencia. Existe un tipo de ARNt para cada tipo de aminoácido (figura 3).

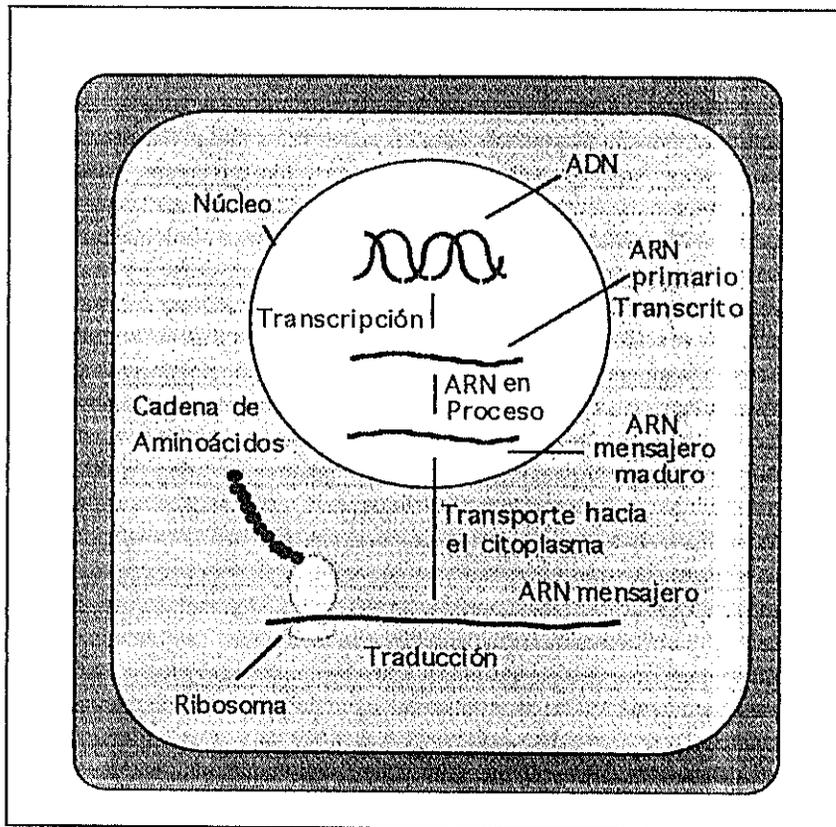


Figura 3: Transcripción y traducción del ADN "(tomado de Griffiths *et al.* , 1993)"

1.3.3. Proteínas

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos (monómeros) conectados por enlaces peptídicos. Las proteínas tienen estructura compleja correspondiente a cuatro niveles de estructuración.

La estructura primaria, conformada por la secuencia lineal de los aminoácidos, está directamente relacionada a la secuencia nucleotídica del gen. Los otros niveles más altos de estructuración se derivan de ella ya que dependen de las interacciones químicas y eléctricas entre aminoácidos. Es importante indicar que cambios en la secuencia nucleotídica del gen van, por ende, a conducir a cambios en la secuencia de los aminoácidos, según las referencias del código genético. Este cambio en la estructura primaria va a tener repercusiones sobre la configuración de la proteína y sobre su carga eléctrica global.

La estructura secundaria se caracteriza por el ordenamiento que experimenta la cadena polipeptídica debido a su enrollamiento, dando lugar a tres tipos de estructuras secundarias: Hélice alfa, "Beta-pleated sheet" y triple hélice.

La estructura terciaria especifica la localización de cada átomo en la molécula en un espacio tridimensional, con relación a todos los otros átomos.

La estructura cuaternaria es la configuración propia de las proteínas conformadas por dos o más cadenas de polipéptidos.

1.3.4. Alelos

Un gen puede presentarse bajo diversas formas llamadas alelos, lo que significa que hay diferencias a nivel de secuencias nucleotídicas. Para cada uno de los genes que están presentes en copias únicas en el genoma, todo organismo diploide posee dos ejemplares del gen, un ejemplar proviene del ovocito materno y uno del espermatozoide paterno. Si los dos ejemplares de un gen dado son idénticos, el organismo es llamado homocigoto, mientras que será llamado heterocigoto si los dos alelos son diferentes. La capacidad de reconocimiento de las diferencias entre alelos es, por tanto, primordial para determinar la naturaleza homo o heterocigota de un organismo. La diferencia entre alelos puede ser observable a nivel de las proteínas para las que ellos codifican, por ejemplo debido a las diferencias de peso molecular o de la carga eléctrica que son detectadas por electroforesis. Los alelos pueden también ser detectables a nivel de las secuencias nucleotídicas.

1.4. LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Durante los procesos que involucran a la replicación del ADN, suelen producirse errores que implican cambios en la secuencia del genoma y, particularmente, de los genes codificantes para las proteínas. Estos cambios son globalmente llamados mutaciones puntuales y pueden conducir a la ausencia de la proteína o a la producción de formas modificadas y funcionales en mayor o menor grado.

Las mutaciones durante la producción de los gametos son cruciales en términos de selección y evolución, ya que pueden conducir a formas modificadas de proteínas mejor adaptadas a una condición particular, lo que conducirá a la selección de organismos mutantes. De esta manera la variabilidad genética se presenta como primordial en términos de adaptación.

También se pueden producir mutaciones como resultado de la integración en el interior de un gen de diversos tipos de elementos, como transposones o virus, que van generalmente a inhibir el gen interponiendo su secuencia nucleotídica. La variabilidad genética puede también resultar de la infección por un virus que contiene una copia de un gen dado. Por otra parte, el número de copias de un gen dado puede ser incrementado como consecuencia de fenómenos de transposición de elementos transposables existentes en los genomas eucariotes (figura 4).

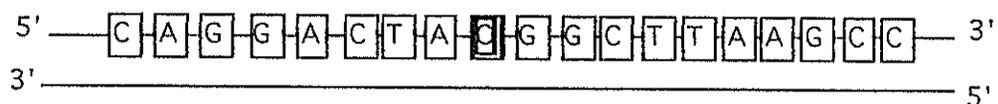
1.4.1. Elementos transposables: Definición

Los elementos transposables son secuencias de ADN que desempeñan un papel importante en la variabilidad del genoma de su hospedador (Berg & Howe, 1989 *vide* Agarwal *et al.*, 1993). Son capaces de moverse, solos o asociados a genes del hospedador, desde su lugar original hacia un sitio diferente en el mismo cromosoma o en otro. Consecuentemente, pueden insertarse en genes o cerca de ellos, dando lugar a mutaciones (Agarwal *et al.*, 1993).

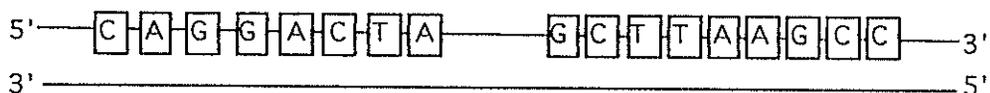
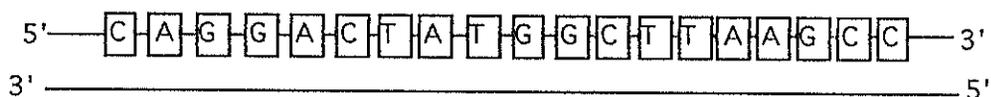
1.4.2. Estructura

Un elemento transposable está constituido por una región central y dos terminaciones repetidas. En la región central se encuentra un gen que codifica para la producción de una enzima llamada transposasa que reconoce las secuencias terminales del elemento, generalmente idénticas, y procede a excisar el elemento trasladándolo luego al lugar de inserción.

Mutación puntual



Eliminación



Transposición

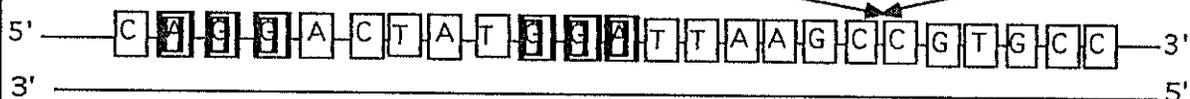


Figura 4: Causas de variabilidad genética

1.4.3. Mecanismo

El movimiento de un elemento transposable se conoce como transposición y puede ser replicativa o no replicativa.

La transposición replicativa implica que el elemento sintetiza una copia de sí mismo la que constituirá la secuencia transpuesta, a diferencia de la transposición no replicativa donde el elemento al moverse deja vacía su posición original creando una brecha que puede ocasionar daños a la estructura del genoma.

1.4.4. Clasificación

Los elementos transposables (ET) pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura y a su mecanismo de transposición (Finnegan, 1991) en:

La Clase I, que corresponde a elementos que transponen a través de la síntesis de un ARN intermediario, comprende dos categorías:

- Elementos con terminaciones directas largas (LTR: "Long Terminal Repeats"), que están relacionados con los retrovirus en cuanto a su estructura y secuencia. Contienen regiones codificantes similares a las de los genes *gag* y *pol* de retrovirus.
- Elementos sin terminaciones, que contienen regiones codificantes (ORF: "Open Reading Frames") con similitud a los genes *gag* y *pol* de retrovirus .

Entre los ETs de la clase I, están los elementos de la familia Copia, los elementos "Gypsy" y los elementos Ty. Todos ellos son conocidos en una amplia variedad de organismos, incluyendo insectos y vertebrados.

La Clase II, donde sus miembros transponen directamente bajo la forma de ADN, está conformada también por dos categorías:

- Elementos con terminaciones invertidas cortas (STIR: "Short Terminal Inverted Repeats") y tienen una o más ORFs que codifican para su transposición. Los elementos mejor estudiados de este tipo son los elementos P de *Drosophila melanogaster*. Otros elementos correspondientes a esta categoría son Tc, Ac y Mariner.
- Elementos con terminaciones invertidas largas (LTIR: "Long Terminal Inverted Repeats"). De ellos, solo la familia de los elementos FB de *D. melanogaster*, ha sido estudiada detalladamente.

La proporción de ETs en un genoma varía de una especie a otra pero usualmente es del 10 % . Sin embargo, aunque pueden afectar indudablemente la variabilidad de los genes y genomas, generalmente no tienen un efecto notable sobre la vida de los individuos dentro de una especie. Esto se debe a la baja tasa de transposición, en el orden de 10^{-4} - 10^{-5} por elemento por generación (Finnegan, 1991).

1.5. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Diversas técnicas son empleadas para determinar la variabilidad genética de los organismos eucariotes. Entre las más importantes están el análisis de alozimas, el polimorfismo de patrones de restricción (RFLP: "Restriction Fragment Length Polymorphism") y, más recientemente, la reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente (AP.- PCR: "Alcatory-Primed Polymerase Chain Reaction").

1.5.1. Variabilidad de alozimas

El análisis de variabilidad de alozimas se basa en la diferencia de movilidad electroforética que pueden tener proteínas enzimáticas, diferencia relacionada con su secuencia de aminoácidos y subsecuentemente, con la estructura, el peso molecular y la carga eléctrica. Para este tipo de análisis, la electroforesis es practicada generalmente en gel de almidón y luego de la migración de las proteínas, éstas son detectadas por adición de un substrato específico incoloro que es transformado en un producto coloreado que precipita en

el gel a nivel de la banda de migración de la enzima considerada. De esta manera se observan varias bandas de actividades enzimáticas; las diferencias en las migraciones indican la existencia de una variabilidad alélica (Hartl & Clark, 1989).

Las técnicas electroforéticas han sido utilizadas por muchos años para estudiar la variación de alozimas en diversos organismos, incluyendo el "crayfish" (Brodskii *et al.*, 1975 *fide* Powell *et al.*, 1995; Nemeth & Tracey, 1979 *fide* Powell *et al.*, 1995; Brown, 1981 *fide* Powell *et al.*, 1995; Busack, 1988 *fide* Powell *et al.*, 1995), además de identificar especies y formular hipótesis sobre las relaciones filogenéticas a niveles supra e infraspecíficos (Busack, 1988 *fide* Powell *et al.*, 1995; Lavery & Staples, 1990 *fide* Powell *et al.*, 1995).

Actualmente, la mayoría de trabajos de diversidad genética en camarón peneido han sido hechos a través de la variabilidad de alozimas con resultados que indican relativamente pocos polimorfismos (Hedgecock, 1977 *fide* García *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1990 *fide* García *et al.*, 1994; Mulley & Latter, 1980 *fide* García *et al.*, 1994; Lester, 1983 *fide* García *et al.*, 1994; Labacena *et al.*, 1994). Por ejemplo, se han reportado bajos niveles de variación genética y poca diferenciación geográfica dentro de 4 especies de camarón peneido: en *P. vannamei* (16 % de polimorfismo), *P. stylirostris* (26 %), *P. aztecus* (33 %) y *P. setiferus* (29 %) (Lester, 1983 *fide* García *et al.*, 1994).

Sin embargo, para estos análisis frecuentemente es necesario seleccionar docenas de enzimas, requiriendo cada una su propio sustrato y proceso de revelación. Esto puede ser tedioso cuando un gran número de individuos debe ser estudiado (Powell *et al.*, 1995). Además, es importante comprender que según esta tecnología, es posible detectar solamente modificaciones suficientemente importantes como para conducir a cambios notables en la configuración de la enzima (Ferris & Berg, 1987 *fide* Kantanen *et al.*, 1995; Burke, 1989 *fide* Kantanen *et al.*, 1995; Wayne & Jenks, 1991 *fide* Kantanen *et al.*, 1995); estas modificaciones están localizadas en solo algunos genes entre los miles que existen en las

células eucariotas. En consecuencia, según esta tecnología, la variabilidad del genoma es ampliamente subestimada.

1.5.2. Polimorfismos de patrones de restricción (RFLP)

El polimorfismo de patrones de restricción del ADN se basa en la utilización de enzimas de restricción que son proteínas de origen bacteriano. Estas enzimas se caracterizan por su capacidad de cortar moléculas de ADN doble cadena en sitios particulares con secuencias nucleotídicas determinadas, generalmente de cuatro a seis nucleótidos. Cada enzima de restricción reconoce una secuencia específica.

Los fragmentos de ADN generados por cada enzima son, subsecuentemente, separados por electroforesis en función de sus pesos moleculares y detectados, según dos modalidades diferentes.

Se puede tratar de una simple coloración con bromuro de etidio, y, por lo tanto, es posible detectar las secuencias repetidas que aparecen como bandas mayores, ya que estos fragmentos están en proporción mucho más importante que aquellos que corresponden a las secuencias de copia única. El patrón de estos fragmentos de restricción correspondiente a las secuencias repetidas es representativo de una gran parte del genoma sin distinción entre las partes no codificantes y codificantes para las proteínas. De hecho, utilizando una enzima de restricción que reconoce un sitio de 6 nucleótidos, es decir, presente en promedio 1 vez por cada 4000 nucleótidos $(1/4)^6$ parecería que la utilización de tal enzima permite analizar alrededor de $6/4000$ del genoma, es decir 0,0015, y detectar mutaciones puntuales de un solo nucleótido que ocasionen que la enzima pierda su capacidad de cortar el ADN en el sitio mutado. Así, para un genoma eucariote de alrededor de 10^9 pb, la técnica de RFLP permite teóricamente detectar mutaciones en 15×10^5 nucleótidos. En la práctica, la detección luego de la coloración con el bromuro de etidio, es posible únicamente con fragmentos repetidos mucho más numerosos que los otros a fin de que aparezcan claramente visibles en el gel coloreado, lo que limita el poder de reconocimiento de la variabilidad de los perfiles.

Una manera de aumentar la sensibilidad de detección de las bandas y, subsecuentemente, de la variabilidad de los genomas consiste en utilizar una sonda según la técnica de "Southern blot". En este caso, todos los fragmentos de ADN, cortados por una enzima de restricción y separados por electroforesis, van a ser transferidos sobre una membrana de nitrocelulosa o de nylon que va a ser luego incubada con una sonda específica de una secuencia para la cual se busca la variabilidad. Esta sonda va a reconocer con una gran sensibilidad los fragmentos de restricción correspondientes a ella y entonces se puede determinar de manera precisa un perfil específico de migración electroforética del individuo. Sin embargo, esta técnica permite únicamente analizar polimorfismos de sitios de restricción en el interior de secuencias reconocidas por la sonda, la cual corresponde frecuentemente al ADN mt que es una molécula pequeña de ADN circular cuyo contenido y organización de genes es altamente conservado, lo que permite utilizar sondas heterólogas disponibles. Sin embargo, la tasa de divergencia de secuencias de la mitocondria a nivel de linajes de mamíferos, es casi 10 veces mayor a la del ADN nuclear (Hartl & Clark, 1989).

En comparación con la variabilidad de alozimas, estos polimorfismos RFLP pueden ser detectados más económicamente y para un gran número de individuos, sin información previa del genoma (Hartl & Clark, 1989).

Esta técnica ha sido utilizada para examinar el grado de diversidad genética en el ADN mt y nuclear de *P. vannamei* (Alcivar-Warren *et al.*, 1994 *fide* García *et al.* ,1994; Bagshaw & Buckholt, 1994 *fide* García *et al.* ,1994). Se han observado grandes diferencias a nivel del ADNmt entre especies por medio de análisis de RFLP, diferencias confirmadas por secuenciación directa (Palumbi & Benzie, 1991 *fide* García *et al.* ,1994). Teniendo en cuenta que la transmisión de mitocondrias de una generación a la otra se efectúa por intermedio de los ovocitos, el análisis de la variabilidad genética del ADNmt por la vía de RFLP está adaptada particularmente al seguimiento de familias maternas obtenidas de poblaciones que forman parte de programas de crianza (García *et al.*, 1994) (figura 5).

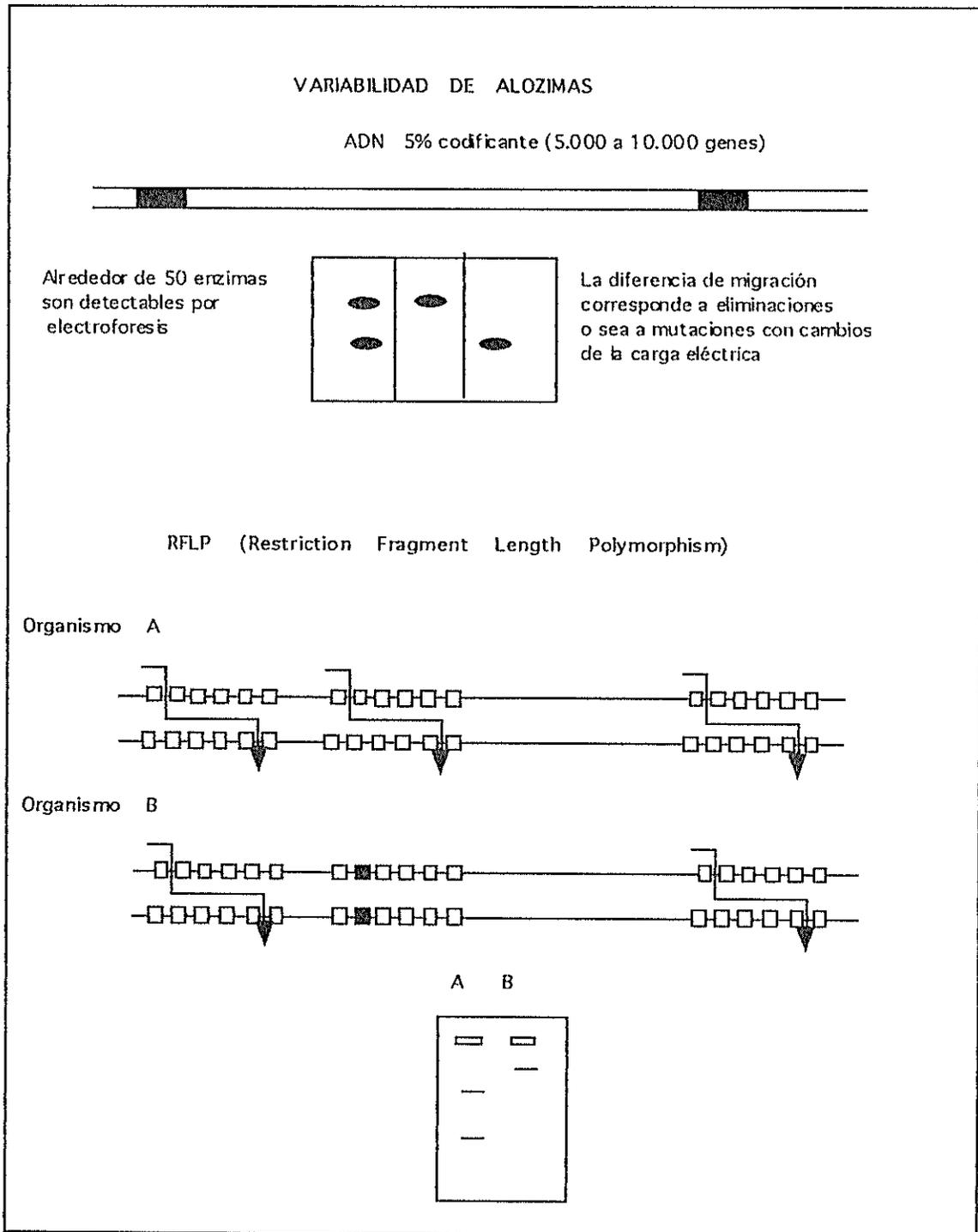


Figura 5: Técnicas para el análisis de la variabilidad genética

1.5.3. La Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente (AP-PCR: Aleatory-Primed Polymerase Chain Reaction)

Es una técnica relativamente reciente (Williams *et al.*, 1990 *fide* García *et al.*, 1994), basada en la reacción de polimerización en cadena (PCR) inventada por Kary Mullis en 1985, que permite la síntesis enzimática *in vitro* de secuencias específicas de ADN. Este método consiste en una serie de ciclos de reacción de polimerización que involucran la desnaturalización de la molécula de ADN utilizada como patrón convirtiéndola en dos cadenas separadas, la hibridación o unión de cada iniciador a la cadena respectiva y la polimerización que es la síntesis de nuevas cadenas a partir de los iniciadores por la acción de una enzima termoestable (Taq ADN polimerasa). Como resultado se produce la acumulación exponencial de un fragmento específico, limitado lateralmente por la ubicación de cada iniciador al hibridarse con su correspondiente cadena. Debido a que el producto sintetizado del primer ciclo puede servir como patrón en el siguiente, el número de copias del ADN estudiado se duplica en cada ciclo. Así, 20 ciclos de PCR producen una amplificación de un millón de veces, aproximadamente (Saiki, 1990) (figura 6).

En el método de AP-PCR, las secuencias de los iniciadores son determinadas de manera arbitraria, generalmente con alrededor de 10 nucleótidos lo que corresponde a una probabilidad teórica de fijación sobre el ADN objetivo de alrededor de 10^{-6} , es decir, $0,25^{10}$. De esta manera, al ponerse en contacto ADN bacteriano (alrededor de 10^6 pb) con tal fragmento decamérico va a producirse teóricamente la fijación de uno o dos fragmentos por genoma y, subsecuentemente, un producto de amplificación cuya talla es específica de la cepa bacteriana. En el caso de un ADN eucariote con alrededor de 10^9 pb, se podrán fijar varios cientos de iniciadores sobre las secuencias complementarias presentes en el genoma. Se pueden producir numerosos productos de amplificación a partir de pares de iniciadores

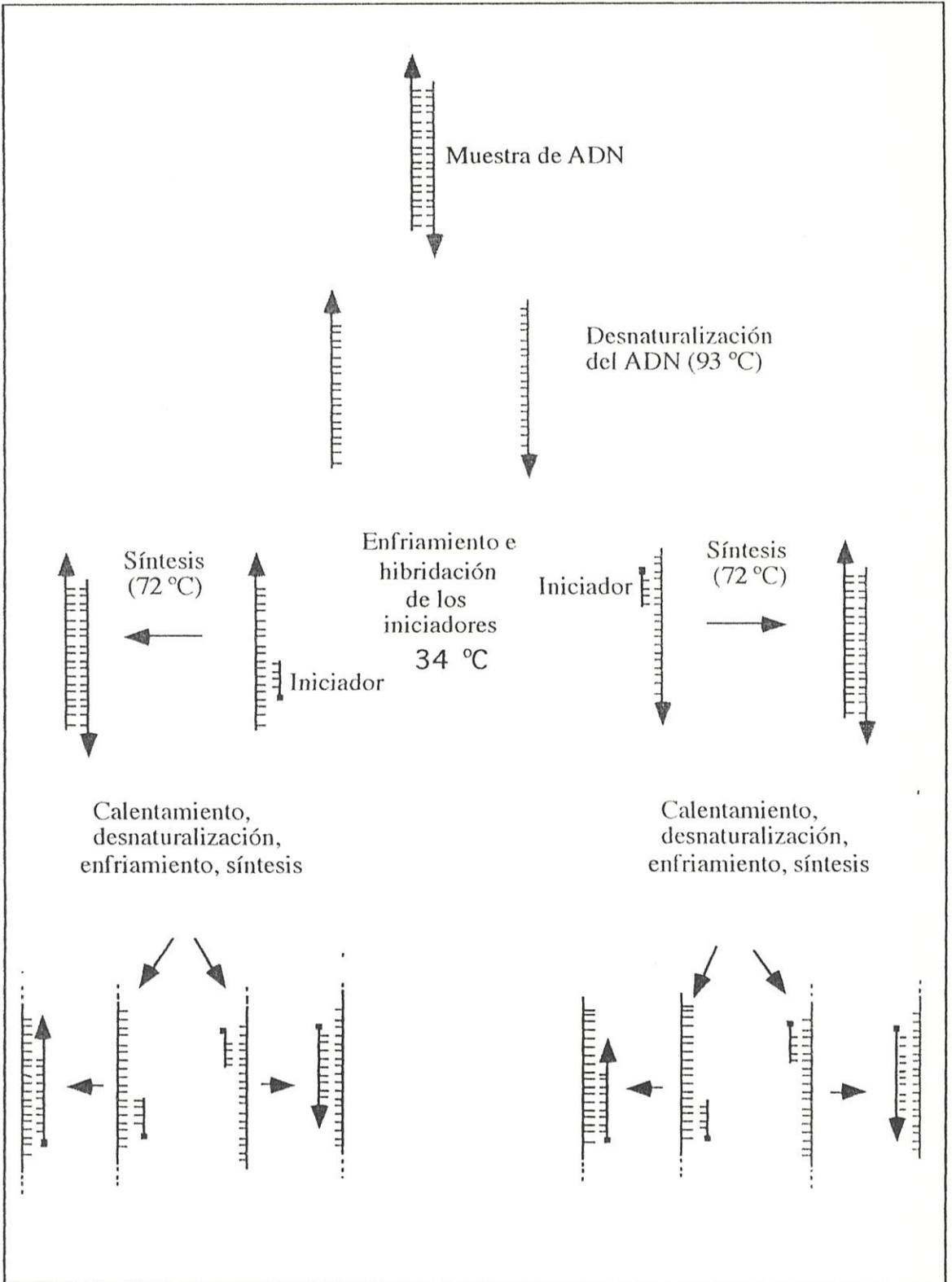


Figura 6: Principio de la PCR

que están en orientaciones opuestas y a una distancia, el uno del otro, de alrededor de 1000 a 2000 nucleótidos, lo que es compatible con los tiempos de polimerización del ADN por la enzima termoestable Taq polimerasa. En algunos casos pueden utilizarse 2 iniciadores (Micheli *et al.*, 1993 *fide* Foo *et al.*., 1995). Los fragmentos de ADN amplificado son visualizados como bandas en un gel de agarosa y constituyen un patrón característico de cada individuo, teniendo ciertas bandas valores de marcadores a niveles supraespecíficos, y otras a niveles infraespecíficos. El polimorfismo de estos perfiles de productos de amplificación aleatoria o RAPD ("Random amplified polymorphism DNA") se emplean para identificar marcadores genéticos específicos de fenotipos de interés, como por ejemplo, la resistencia a un agente patógeno (Hadrys *et al.*, 1992 *fide* Foo *et al.*., 1995; Williams *et al.*, 1993 *fide* Foo *et al.*., 1995) (figura 7).

La AP-PCR cuenta con algunas grandes ventajas, entre ellas tenemos: no se necesita tener información sobre el genoma, no se requiere tener mucho ADN en las muestras gracias al proceso de amplificación, de esta manera el perfil de RAPD puede ser observado fácilmente en el gel sin hacer "Southern blot", y se pueden utilizar y evaluar diferentes iniciadores hasta obtener los marcadores esperados. Si se considera un iniciador decamérico que puede teóricamente fijarse alrededor de 1000 veces sobre el ADN genómico de un eucariote, se puede pensar que esta técnica permite analizar mutaciones en alrededor de 10000 nucleótidos, considerando que el iniciador va a fijarse, solamente, si la homología con el ADN genómico es del 100 %.

Los marcadores genéticos por AP-PCR han sido utilizados para identificar tomates resistentes a *Pseudomonas* (Martin *et al.*, 1991 *fide* García *et al.*., 1994); para relacionarlos con genes de resistencia al moho veloso en el sorgo (Gowda *et al.*, 1995) o para el estudio de variaciones genéticas entre poblaciones de *Penaeus monodon* (Tassanakajon *et al.*, 1995). De igual forma, se han empleado para la identificación de tres especies de tilapia del género *Oreochromis* y cuatro subespecies de *O. niloticus* (Bardakci & Skibinski, 1994 *fide* Dinesh *et al.*., 1996).

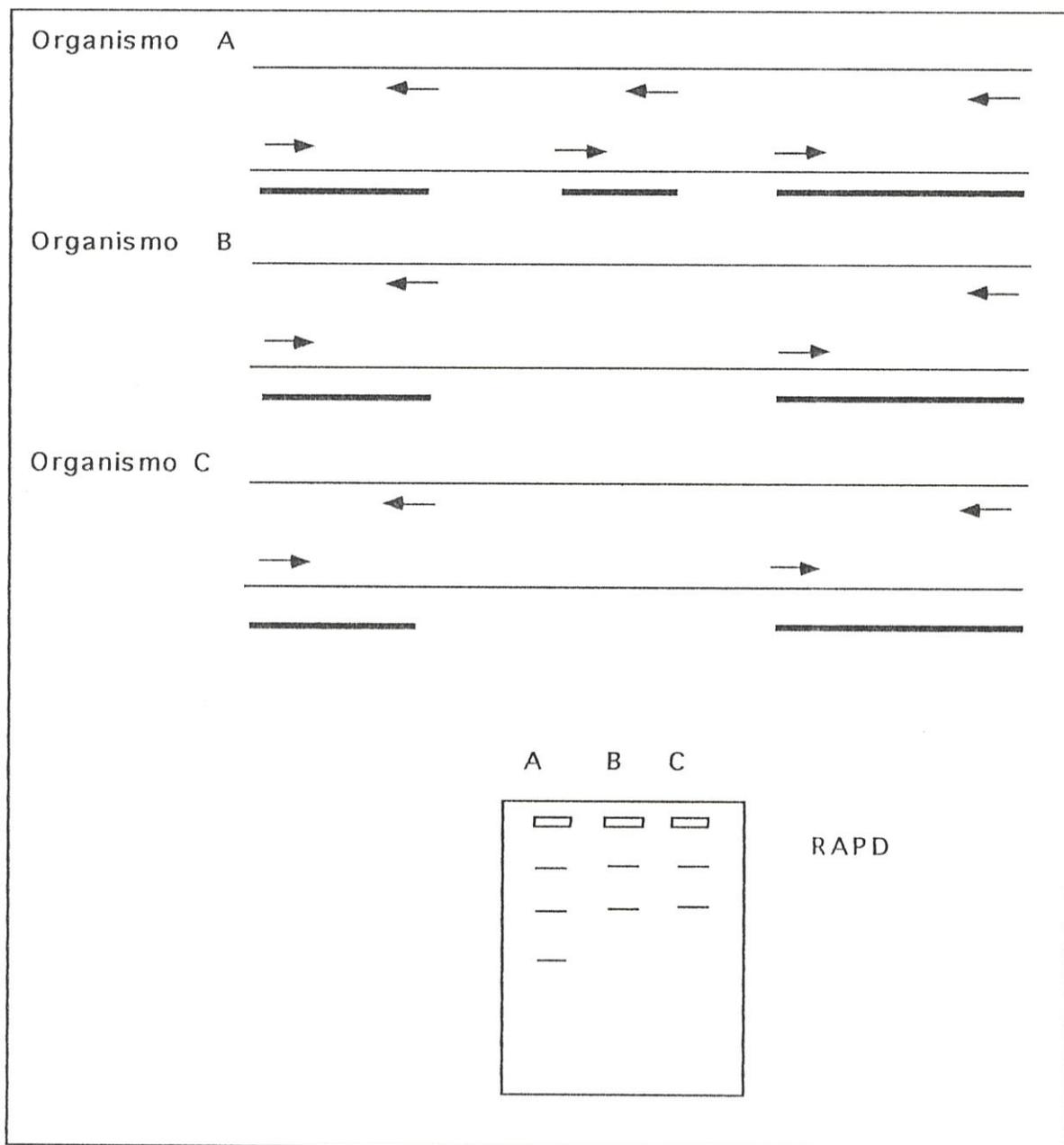


Figura 7: Representación esquemática de la AP-PCR y su producto RAPD

1.6. DOMESTICACIÓN Y SELECCIÓN

Los camarones peneidos utilizados en acuicultura son casi exclusivamente provenientes de reproductores salvajes, ya se trate de larvas pescadas del mar o de larvas procedentes de laboratorios. Esta situación es perjudicial desde varios puntos de vista. En primer lugar, hay una sobre-explotación de las poblaciones naturales, lo que pone en duda la sustentabilidad de las actividades de cultivo. Además, es importante considerar que estos animales introducen permanentemente, en los cultivos, agentes patógenos que provocan epidemias y endemias. Por otra parte, pueden ser particularmente débiles y sensibles a los agentes patógenos en la medida en que no están adaptados a las condiciones de cultivo.

Por tanto, es fundamental, en términos de sustentabilidad ecológica y económica, poner en marcha programas de selección genética de camarones con características de resistencia a los agentes patógenos. Los avances en la habilidad para promover la maduración sexual de los camarones peneidos han conducido en los 80s al desarrollo de poblaciones cultivadas en sistemas cerrados, lo que ha permitido el establecimiento de líneas de camarones y la iniciación de programas de selección (Sandifer & Lynn, 1980 *fide* Malecha & Hedgecock, 1986). Así, en Hawaii (USA) se han desarrollado poblaciones de *P. vannamei* y *P. stylirostris* a partir de sistemas cerrados. En Tahití, se han establecido líneas de diferentes especies de camarones, en particular una de *P. stylirostris* resistente al virus IHHN (IFREMER, Francia). En ambos casos, el proceso de selección fue muy empírico, siendo los animales escogidos en base a su supervivencia en la piscina, tasas de crecimiento, y desempeño reproductivo.

Con el desarrollo de modelos de patología experimental, como por ejemplo, para bacterias causantes del síndrome de zoea, y la elaboración de pruebas para evaluar el nivel inmunitario de camarones (Muñoz, M., com. pers.), se vuelve posible iniciar programas de selección de cepas resistentes. En esta perspectiva, es primordial poder identificar los animales más resistentes con la ayuda de marcadores genéticos, presentándose la técnica AP-PCR como el método a elegir.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron camarones silvestres *P. vannamei* procedentes del departamento de Maduración del CENAIM.

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se probaron diferentes protocolos de extracción de ADN genómico a partir de diferentes tejidos de camarón.

2.2.1. Protocolo de extracción de ADN genómico de mosquito (Mialhe, E., com. pers.)

- Se colocaron 400 μL de tampón "Grinding" (anexo III) a la muestra de tejido presente en un tubo "eppendorf" (1.5 ml), macerándola hasta homogenizar los tejidos del animal; incubándose, luego, en un baño maría (SIBATA, control unit CU-80) a 65 °C por 30 minutos.
- Se añadió 56 μL de acetato de Potasio 8 M (anexo III), mezclándolo y dejándolo en hielo 30 minutos.
- Se centrifugó la muestra a 13000 rpm por 10 minutos utilizando una microcentrifugadora (HERAEUS SEPA TECH, Biofuge 13), recuperando rápidamente el sobrenadante, añadiéndose 0.1 volúmenes de acetato de Sodio 3 M pH 5.2 (anexo III) y 2 volúmenes de etanol helado al 100%, dejando a temperatura ambiente por 5-10 minutos.
- Se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se lavó el "pellet" del ADN con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó, nuevamente a 13000 rpm durante 5 minutos.

- Se eliminó el alcohol, se secó al vacío 1 min y luego a temperatura ambiente por 15 minutos, resuspendiendo posteriormente el ADN en 150 μL de TE (anexo III).
- Se añadió 1 μL de ARNasa, incubando la mezcla de ADN y enzima a 37 °C por 1 hora y media para eliminar ARN.
- Finalmente, se realizó la cuantificación del ADN con el espectrofotómetro (PHARMACIA, Genequant).

2.2.2. Protocolo de extracción de ADN genómico por tratamiento con Proteinasa K ("Short Protocols in Molecular Biology", 1992. Modificado)

- Se tomó una muestra de tejido de camarón y se la guardó -80 °C (HETO, CL 410/xx08) durante aproximadamente una hora, luego de lo cual se trituró el tejido utilizando un mortero hasta convertirlo en un fino polvo.
- Se depositó el tejido triturado en un tubo "eppendorf" (500 μL) que contiene un tampón de extracción (anexo III) añadiéndose proteinasa K con una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Se incubó a 58 °C durante 3 horas, adicionando posteriormente un volumen de fenol:cloroformo/isoamil, agitando el tubo durante 5 minutos y centrifugándolo a 13000 rpm por 10 minutos.
- Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen de fenol:cloroformo/isoamil, agitando el tubo durante 5 minutos y centrifugándolo a 13000 rpm por 10 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante, al cual se agregó un volumen de cloroformo/isoamil, agitando el tubo durante 5 minutos y centrifugándolo a 13000 rpm por 10 minutos.

- Se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 0.1 volumen de Acetato de Sodio 3 M, pH 5.2, y 2 volúmenes de etanol al 100 %. El tubo fue ligeramente invertido varias veces. Se centrifugó la mezcla a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Se eliminó el alcohol del tubo al verterlo y se hizo un lavado con etanol al 70 %. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Se eliminó el alcohol y se secó al vacío hasta conseguir su total evaporación resuspendiéndose el ADN en 150 μ L de TE.
- Se le añadió 1 μ L de ARNasa, incubando la mezcla a 37 °C por 1 hora y media.
- Finalmente, se realizó su cuantificación con el espectrofotómetro.

2.2.3. Protocolo de extracción de ADN genómico de camarón por ebullición de hemocitos en TE, Tampón "Grinding", Tampón de Extracción o Agua destilada (Protocolo según el departamento de Biología Molecular, CENAIM)

- Se extrajeron entre 300 - 500 μ L de hemolinfa a partir de la región ventral de un camarón y se colocó dicho volumen en un tubo "eppendorf" (500 μ L), centrifugándose a 13000 rpm durante 6 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se utilizó Solución de Hanks 780 mOsm (anexo III) para lavar los hemocitos sedimentados. Se resuspendieron los hemocitos y se centrifugaron nuevamente a 13000 rpm durante 6 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L del tampón correspondiente colocándose el tubo en un beaker con agua a temperatura de ebullición durante 10 minutos.
- Se enfrió el tubo, de inmediato, en hielo durante 2 minutos, centrifugándolo a 13000 rpm durante 15 minutos.

- Se tomó el sobrenadante, colocándolo en un tubo nuevo. El sobrenadante contiene el ADN.

2.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ESTIMACIÓN DE SU PUREZA

Después de la extracción es necesario conocer la concentración y pureza del ácido nucleico que se ha logrado obtener. Se aplicaron dos formas de cuantificar el ADN para su posterior utilización:

La primera, por espectrofotometría utilizando la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas que consiste en absorber los rayos ultravioletas a 260 nm.

Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a:

Una solución de ADN bicatenario a 50 $\mu\text{g/ml}$

Una solución de ARN monocatenario a 40 $\mu\text{g/ml}$

Las proteínas absorben a un máximo de 280 y 260 nm. Para determinar si existe una contaminación protéica se realizó un control de densidad óptica comparando la razón DO_{260}/DO_{280} , la cual debe situarse entre 1.8 y 2.0 para considerar puro a un ADN.

La segunda, por cuantificación de los hemocitos en una cámara de NeuBauer utilizando el siguiente protocolo:

- Se tomó una alícuota de 10 μL de hemolinfa y se la depositó en la cámara tratando de dispersarla homogéneamente.
- Se contaron las células presentes en los cuatro cuadrantes esquineros y en el cuadrante central, multiplicando luego por el factor 50000.
- Se obtiene la cantidad de ADN al multiplicar el valor obtenido por el siguiente factor de conversión: 1 hemocito = 0,1 pg de ADN.

2.4. AP-PCR (REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN EN CADENA INICIADA ALEATORIAMENTE) PROTOCOLO IMPLEMENTADO

- Se hicieron diluciones a partir de una solución que contenía ADN genómico de camarón y TE utilizando entre 1 ng y 10 pg, empleándose 10 μL de cada una de estas diluciones para completar el volumen de reacción colocado por tubo.
- Se elaboró el volumen de reacción necesario para las muestras utilizadas en la AP-PCR, el cual constó de:

	Concentración en "stock"	Concentración en tubo (muestra)
Agua	volumen variable	volumen variable
Tampón	10 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	200 μM
MgCl ₂	50 mM	2 mM
Iniciador	300 ng/ μL	20 ng/ μL
Taq polimerasa	5 U/ μL	0.02 U/ μL

- El volumen preparado depende del número de muestras. El volumen establecido para cada tubo fue de 50 μL , siendo depositado en cada uno de ellos.
- Se les agregó 10 μL de cada dilución (una dilución diferente por tubo) y 50 μL de aceite mineral para conservar el volumen de la muestra.

- Finalmente, fueron insertados en los portatubos existentes en el termociclador (Cryothermo reactor Gene-tech Apparatus SPCR 1), el cual fue programado para funcionar con los siguientes parámetros:

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Pre-desnaturalización	93	4
Desnaturalización	93	1
Hibridación	34	1,5
Polimerización	72	2

La duración del programa fue de 50 ciclos.

Al concluir este programa, existía un programa complementario que contaba con una extensión de 10 minutos para la fase de polimerización y, a continuación, una reducción gradual de la temperatura hasta alcanzar 4 °C, para conseguir el mantenimiento de los productos amplificados.

2.5. ELECTROFORESIS

- El gel fue preparado utilizando el tampón de electroforesis (anexo III) empleándose entre 1 y 1,2 % de agarosa.
- Se utilizó una estufa para calentar la agarosa y mezclarla con el tampón de electroforesis, dejándola enfriar, posteriormente. Una vez que su temperatura ha descendido por debajo de los 60 °C se colocó el gel en una bandeja (molde), previamente sellada, insertándole un peine para crear los pozos donde se van a colocar las muestras de ADN. El bromuro de Etidio, tinte que permite la visualización del ADN, fue añadido al gel en la siguiente proporción: 1 μ L/20 ml de tampón de electroforesis empleado en el gel.

- Cuando el gel se solidificó, se retiraron los sellos de la bandeja y el peine. Luego se colocó la bandeja, portando el gel, en la cubeta de electroforesis (APPARATUS CORPORATION, Maxicell) añadiéndose suficiente tampón de electroforesis para cubrir el gel ≈ 1 mm.
- Se prepararon las muestras de ADN con una apropiada cantidad de tampón de depósito 5X (anexo III) colocándolas en los pozos con una pipeta. Se debe incluir un marcador de peso molecular apropiado.
- Se arreglaron los polos, generados por una fuente de poder (APPARATUS CORPORATION-EC 135-Minicell) de tal manera que el ADN (cargado negativamente) migre hacia el ánodo o polo positivo, deteniendo la electroforesis cuando el tinte azul de bromofenol del tampón de depósito migró totalmente, indicando así que los fragmentos de ADN estaban ópticamente bien separados.

RESULTADOS

Los experimentos de AP-PCR (tabla 1) fueron emprendidos considerando inicialmente los parámetros publicados por García *et al.*, 1994 (anexo IV). De esta manera se utilizó ADN extraído de tejido muscular siendo cada reacción efectuada con 100 ng de ADN, 300 ng por cada uno de los 6 iniciadores (P1-P6) (anexo V) y 2.5 U de Taq polimerasa, aplicándose 40 ciclos (experimento 1). En estas condiciones no se obtuvo producto de amplificación alguno. Caso similar se produjo en una segunda experimentación realizada en las mismas condiciones (exp. 2).

Se realizó una nueva serie de reacciones de AP-PCR (exp. 3) utilizando únicamente el iniciador P1 (300 ng) en 40 ciclos, se trató el ADN con ARNasa efectuando varias diluciones. Las concentraciones de ADN estuvieron comprendidas entre 160 y 1,6 ng (con y sin tratamiento con ARNasa). No se observó ningún producto de amplificación, se obtuvieron iguales resultados en otro experimento (exp. 4) para el cual el rango de diluciones fue más grande llegando a utilizarse únicamente 1,9 pg de ADN. Esta serie de diluciones fueron realizadas para analizar el efecto de la cantidad de ADN en la muestra, encontrándose los iniciadores en cantidades fijas. El tratamiento con la ARNasa tuvo como finalidad evitar la presencia del ARN en las muestras.

Con el fin de verificar la eficiencia de la Taq polimerasa y de los iniciadores, en el experimento 5 se adicionó ADN bacteriano (200 ng) como control positivo debido a que sus patrones de amplificación son conocidos, además de ADN extraído del músculo, de hemocitos, del pedúnculo ocular y de larvas de camarón. Para ello, se modificaron los parámetros de la AP-PCR sustituyéndolos por aquellos probados con ADN de bacterias (Motte, E., com. pers.) (anexo IV). Luego de 35 ciclos en presencia de 300 ng del iniciador P1 no se observó ninguna amplificación. Se repitió el experimento (exp. 6) utilizando parámetros de AP-PCR diferentes (García *et al.*, 1996) (anexo IV) durante 40 ciclos, pero se obtuvieron resultados similares, sin embargo, cabe indicar que en la muestra que

correspondía al ADN de hemocitos en el experimento 5 pudo percibirse una banda. Se consideró que el problema podría estar relacionado efectivamente con la disponibilidad de iniciadores; con el fin de verificarlo se mantuvo el protocolo de AP-PCR aplicado en el experimento anterior, realizando una experimentación con 1500 ng del iniciador P1 más 200 ng del ADN de hemocitos o de larvas, empleando nuevamente ADN bacteriano (200 ng) como control positivo. No se observó ningún producto de amplificación en las muestras de ADN de camarón excepto en el control con ADN bacteriano (experimento 7).

Otras dos series de experimentaciones (8 y 9) pudieron confirmar la ausencia de amplificaciones del ADN bacteriano en presencia de cantidades relativamente importantes de ADN de camarón (200 a 400 ng). La ausencia de productos de amplificación en el ADN bacteriano y en el ADN de camarón no pudo ser solucionada utilizando mayores cantidades de iniciadores introducidos, de forma abundante, en estas pruebas.

De esta manera, pareció que el ADN en cantidad excesiva puede impedir la eficiencia de la amplificación. Así, el hecho de que las primeras amplificaciones sean numerosas generando consigo muchos productos que compitan entre ellos para las amplificaciones posteriores, pudo traer como consecuencia que ninguno de estos productos (bandas) puedan ser lo suficientemente amplificados como para ser observados en el gel (anexo VII).

Convendría indicar que para que un producto de amplificación pueda ser observado en el gel debe corresponder a más de 10 ng lo que para un fragmento de 1000 pares de bases equivale a alrededor de 10^{10} copias siendo el coeficiente de amplificación de 10^3 en los primeros 10 ciclos. Para el caso de ADN de camarón, aproximadamente 1 pg representa el genoma de una célula.

En el experimento 10, conservando los parámetros de la AP-PCR anterior, se sometió a amplificación ADN extraído de larvas de camarón. La solución inicial contenía alrededor de 400 ng de ADN, se efectuó una serie de 5 diluciones (1/10) lo que significa que las amplificaciones fueron hechas a partir de 40 ng, 4 ng, 400 pg, 40 pg y 4 pg en todos los

casos mezclados con ADN bacteriano. Luego de 35 ciclos se pudo observar "smears" (productos amplificados de muchos tamaños que no consiguieron estar presentes en cantidades suficientes para ser visualizados como bandas) en las dos concentraciones más altas, mientras que los productos típicos de ADN bacteriano fueron observados únicamente en las dos concentraciones más bajas de ADN de camarón. Esto indica que habría inhibición de la amplificación del ADN bacteriano en presencia de altas concentraciones de ADN de camarón (anexo VI).

Normalmente para 100 ng hay alrededor de 100 millones de copias del genoma bacteriano (1fg/genoma). Una amplificación con el 100 % de eficiencia conduce a un factor de multiplicación por 1000 en 10 ciclos (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 = 2^{10}) De esta manera una muestra que contiene inicialmente 1 millón de copias de ADN bacteriano (1 ng), luego de 10 ciclos contiene 10^9 copias de un producto de amplificación; luego de 20 ciclos son aproximadamente 10^{12} copias lo que es técnicamente suficiente ya que para ser detectable en el gel se deben tener 10 ng, es decir, 10^{10} .

Cuando las concentraciones de ADN de camarón fueron más elevadas no se observó producto alguno luego de la amplificación. Esta ausencia podría ser debida a una competición por los iniciadores, entre el ADN de camarón y el ADN bacteriano, lo que implicaría que ningún producto pudo estar en una cantidad lo suficientemente alta como para ser detectado. En el experimento 11 se incorporó la idea de realizar 2 AP-PCRs en secuencia, modificando los parámetros de la experiencia anterior y utilizando ADN de larvas. Luego de 25 ciclos por cada AP-PCR, en presencia de 1500 ng de iniciadores P1 y P2, no se obtuvo producto amplificado alguno.

Se realizó una nueva experimentación (exp. 12) a partir de ADN extraído de hemocitos. La elección de este tejido se presentó mucho más apropiada que el músculo en la perspectiva de obtener patrones RAPD de camarón sin sacrificar el animal e incluso en paralelo con análisis inmunológicos que permitan identificar individuos con capacidades inmunitarias superiores.

Se logró demostrar que para las más bajas concentraciones de ADN extraído de dos muestras de hemolinfa, se obtuvieron productos de amplificación utilizando tanto un solo iniciador (P3) como la mezcla de tres iniciadores (P3, P4, P5).

Se efectuó otro experimento (13) utilizando concentraciones más bajas de ADN de hemocitos (120, 12 y 1.2 pg) y el iniciador P3 en diferentes cantidades (1, 2 y 3 μ g). Luego de la amplificación se pudieron distinguir bandas tenues producidas a partir de todas las muestras, aunque dichas bandas lucían más nítidas con 120 pg sin importar la cantidad de iniciador (anexo VI).

En el experimento 14 se demuestra que para una cantidad de ADN comprendida entre 1200 pg y 12 pg, después de una amplificación de 25 ciclos, una reamplificación de 25 ciclos permite obtener productos detectables en el gel de electroforesis. Luego de una segunda amplificación se pudieron observar bandas lo que indica claramente que los productos estaban presentes pero en cantidades insuficientes para ser visibles en el gel luego de la primera amplificación. Esta experimentación confirmaría la hipótesis planteada que señalaba un proceso de competición por parte de los iniciadores, lo que afectaba su disponibilidad a través de los ciclos de la AP-PCR y, por ende, la generación de nuevos productos amplificados (anexo VI).

Por otra parte, en el experimento 15 se realizó una digestión previa del ADN de hemocitos con una enzima de restricción (Eco R1). Se pretendió facilitar la hibridación de los iniciadores con el ADN, sin embargo, parece que ésto interfirió con la amplificación, probablemente creando cortes entre los sitios de fijación de los iniciadores (anexo VI).

En la perspectiva de poder aplicar las reacciones de AP-PCR a grandes series de muestras de hemolinfa, se realizó un grupo de experimentaciones que tuvieron por objeto el disponer de un protocolo simple y reproducible de preparación de ADN a partir de una muestra de hemolinfa.

De esta manera los hemocitos fueron sometidos a ebullición en diversos tampones y luego centrifugados. La cantidad de ADN obtenida fue estimada mediante una electroforesis por comparación de la intensidad de las bandas de ADNs extraídos por medio de estos protocolos con ADNs previamente cuantificados por espectrofotometría y sometidos a diluciones. En el experimento 16 se logró determinar que con el tampón TE se observaron productos de amplificación luego de la primera amplificación de 25 ciclos y con otros dos tampones únicamente luego de la reamplificación y de manera diferente según las cantidades iniciales de ADN (anexo VI).

En las mismas condiciones con solamente 20 ciclos para la operación de amplificación y reamplificación no se observó ningún producto amplificado (exp. 17). En el transcurso de dos series de experimentaciones (18 y 19) se confirmaron los resultados del experimento 16 determinando que el tampón TE era el más indicado para obtener productos con una sola amplificación de 50 ciclos con cantidades que van de 1000 pg a 10 pg de ADN. Lo mismo sucedió con el experimento 20, en donde únicamente se hizo una reducción del número de ciclos, de 50 a 35. El resultado mostró que la intensidad de las bandas obtenidas disminuyó, debido probablemente a la menor cantidad de producto amplificado que se generó.

Cabe señalar que las concentraciones de ADN fueron estimadas (exp. 18, 19 y 20) por conteo del número de hemocitos considerando que alrededor de 0,1 pg de ADN puede ser extraído a partir de uno.

Según el análisis del conjunto de estos resultados, es posible obtener el patrón RAPD de un camarón a partir de una muestra de hemolinfa con un volumen entre 300 y 500 μL , para extraer el ADN por ebullición en TE. La cantidad de ADN utilizada en la AP-PCR es menor a 1 ng por muestra, la cual luego es sometida a una serie de 50 ciclos con parámetros específicos (anexo IV) en presencia de 1 μg de iniciador y una unidad de Taq polimerasa.

Tabla 1. Resultados de las AP-PCRs efectuadas

Exp.	Origen del ADN	Cantidad de ADN	Iniciador	Taq	Parámetros de AP-PCR	Ciclos	Observaciones
1	músculo	100 ng	P1-P6 (300 ng por cada uno)	2,5 U	García et al., 1994	40	No hubo producto amplificado (bandas)
2	músculo	100 ng	P1: 300 ng	2,5 U	García et al., 1994	40	No hubo bandas
3	músculo	(10Ex-1-10Ex-3): 160 ng, 16 ng y 1,6 ng	P1: 300 ng	0,5 U	García et al., 1994	40	No hubo bandas
4	músculo	(10Ex-1-10Ex-6): 195 ng, 19,5 ng, 1,9 ng, 195 pg, 19,5 pg, 1,9 pg	P1: 300 ng	1 U	García et al., 1994	40	No hubo bandas
5	músculo, hemolinfa, ped. ocular, branquias, larvas y bacterias	200 ng	P1: 300 ng	1 U	Motte, 1996	35	Una banda en muestra de ADN de hemocitos
6	músculo, hemolinfa, branquias y larvas.	200 ng	P1: 300 ng	1 U	García et al., 1996	40	No hubo bandas
7	hemolinfa, bacterias y larvas	200 ng	P1: 1500 ng	1 U	García et al., 1996	40	No hubo bandas excepto las presentes en ADN bacterial (control +)
8	músculo y bacterias	200 ng	P1: 1500 ng	1 U	García et al., 1996 (modificado): polimerización dura 5 minutos	40	No hubo bandas excepto en control +
9	músculo, branquias, hemolinfa, ped. ocular, larvas y bacterias.	400 ng	P1 ó P2: 1000 ng por cada uno en dos series separadas de muestras	1 U	Motte, 1996	35	No hubo bandas excepto en control +
10	larvas y bacterias. Además producto amplificado de AP-PCR 9	(10-Ex1-10-Ex5): 40 ng, 4ng, 400 pg, 40 pg y 4 pg	P1: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	35	Incremento progresivo de intensidad de bandas correspondientes a ADN de bacterias al mismo tiempo que se producía la disminución gradual del ADN de larvas de camarón (10Ex-1-10Ex-5)
11 (A)	larvas	200 ng	P1 y P2: 1500 ng por cada uno	1 U	García et al., 1996 (modificado): polimerización dura 3 minutos	25	No se aplicó electroforesis
11 (B)	producto amplificado de AP-PCR 11 (A)		P1 y P2: 1500 ng por cada uno	1 U	García et al., 1996 (modificado): polimerización dura 3 minutos	25	No hubo bandas
12	hemolinfa	ADN 1 (10Ex-1-10Ex-5): 1200 ng, 120 ng, 12 ng, 1,2 ng y 120 pg ADN 2 (10Ex-1-10Ex-4): 600 ng, 60 ng, 6 ng y 600 pg	P3: 1000 ng P3, P4 y P5: 1000 ng por cada uno	1 U	Motte, 1996	35	Bandas en muestras con ADN 1 (10Ex-5) y con ADN 2 (10Ex-4) tanto para p3 como para combinación (P3, P4 y P5)
13	hemolinfa	(10Ex-5-10Ex-7): 120 pg, 12 pg y 1,2 pg	P3: 1000 ng, 2000 ng y 3000 ng	1 U	Motte, 1996	35	Bandas tenues en todas las muestras, siendo más nítidas en 10 Ex-5

Exp.	Origen del ADN	Cantidad de ADN	Iniciador	Taq	Parámetros de AP-PCR	Ciclos	Observaciones
14 (A)	hemolinfa	(10Ex-4-10Ex-6): 1,2 ng, 120 pg y	P3: 1000 ng y 5000 ng	1 U	Motte, 1996	25	Bandas en muestra con dilución 10Ex-4 y 5000 ng de P3
14 (B)	producto amplificado de AP-PCR 14 (A)	(10Ex-4-10Ex-6): 1,2 ng, 120 pg y 12 pg	P3: 1000 ng y 5000 ng	1 U	Motte, 1996	25	Bandas en todas las muestras
15	hemolinfa	1* = ADN 1 (10Ex-2-10Ex-3): 100 pg, 10 pg	P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	35	Bandas en muestra con dilución 10Ex-5 de ADN no digerido
16 (A)	hemolinfa	ADN 2 (10Ex-2-10Ex-3): 10 pg, 1 pg 2* = ADN 1 (10Ex-2-10Ex-3): 100 pg, 10 pg ADN 2 (10Ex-2-10Ex-3): 10 pg, 1 pg 3* = ADN 1 (10Ex-2-10Ex-3): 100 pg, 10 pg ADN 2 (10Ex-2-10Ex-3): 10 pg, 1 pg 4*(10-2-10-3): 10 pg, 1 pg 5*(10-2-10-3): 10 pg, 1 pg	P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	25	Bandas tenues en muestra con 2* (10Ex-2)
16 (B)	producto amplificado de AP-PCR 16 (A)		P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	25	Bandas en muestras con 2* (10Ex-3), 3* (10Ex-2) y 4* (10Ex-2)
17 (A)	hemolinfa	1* , 2* , 3* , 4* y 5* en iguales diluciones que en AP-PCR 16 (A)	P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	20	No hubo bandas
17 (B)	producto amplificado de AP-PCR 17 (A)		P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	20	No hubo bandas
18 (A)	hemolinfa	1* (10Ex-1-10Ex-2): 100 pg, 10 pg 2* = ADN 1 (10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg ADN 2 (10Ex-1-10Ex-2): 100 pg, 10 pg 3* = ADN 1 (10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg ADN 2 (10Ex-1-10Ex-2): 100 pg, 10 pg 4*(10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg 5*(10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg	P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	50	Bandas en muestras con 2* (10Ex-1), 3* (10Ex-1) y en 4* (10Ex-1)
18 (B)	producto amplificado de AP-PCR 18 (A)		P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	2 por 25	Bandas en muestras con 2* (10Ex-2) y con 4* (10Ex-1)
19 (A)	hemolinfa	2* = ADN 1 (10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg	P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	50	Bandas en muestras con 4* (10Ex-1, 10Ex-2)

Exp.	Origen del ADN	Cantidad de ADN	Iniciador	Taq	Parámetros de AP-PCR	Ciclos	Observaciones
		ADN 2 (10Ex-1-10Ex-2): 100 pg, 10 pg					
		3* = ADN 1 (10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg					
		ADN 2 (10Ex-1-10Ex-2): 100 pg, 10 pg					
		4* = ADN 1 (10Ex-1-10Ex-2): 1 ng, 100 pg					
		ADN 2 (10Ex-1-10Ex-2): 100 pg, 10 pg					
19 (B)	producto amplificado de AP-PCR 19 (A)		P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	50	Bandas en muestras con 4* (10Ex-1, 10Ex-2)
20	hemolinfa	2*, 3* y 4* en iguales diluciones que en AP-PCR 19 (A)	P3: 1000 ng	1 U	Motte, 1996	35	Bandas tenues en muestras con 4* (10Ex-1, 10 Ex-2)

AP-PCR: Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente

A: Primera AP-PCR

B: Segunda AP-PCR

ng: nanogramos

pg: picogramos

P: iniciador

Ex: exponente

ADN: Acido Desoxirribonucleico

U: unidad

Taq: Enzima de polimerización del ADN

Exp: Experimentación

1*: ADN extraído por tratamiento

con proteinasa K

2*: ADN extraído por ebullición

en tampón de extracción

3*: ADN extraído por ebullición

en tampón Grinding

4*: ADN extraído por ebullición

en TE

5*: ADN extraído por ebullición

en agua destilada

CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo por objeto implantar un protocolo de AP-PCR ("Aleatory-Primed Polymerase Chain Reaction") que permitiese obtener patrones de amplificación en el camarón *P. vannamei*. Tales patrones son la base para el análisis del polimorfismo según el concepto de RAPD y para la identificación de marcadores genéticos que puedan ser correlacionados con caracteres fenotípicos de interés para la camaronicultura, como por ejemplo, criterios de resistencia frente a agentes patógenos.

Recientemente se han publicado trabajos sobre el polimorfismo de *P. vannamei* determinado por RAPD (García *et al.*, 1994), por lo que para emprender este trabajo se tomó en consideración inicialmente el protocolo de AP-PCR utilizado por estos autores. Según este protocolo, las reacciones de AP-PCR son efectuadas utilizando de 100 ng a 1 μ g de ADN de camarón extraído a partir de tejido muscular, lo que impone evidentemente, el sacrificio de los animales. Se efectuaron varias experimentaciones pero sin éxito, ya que no se observó producto de amplificación alguno incluso luego de 40 ciclos.

Por esto, se consideró la utilización, como referencia, de ADN bacteriano cuyo patrón de amplificación es conocido y obtenido de manera reproducible a partir de 200 ng luego de 35 ciclos (Motte, E., com. pers.). Esta cantidad de ADN bacteriano fue por consecuencia introducida en muestras de 200 a 400 ng de ADN de camarón, lo que condujo a observar que la amplificación del ADN bacteriano era totalmente inhibida. En cambio, cuando la misma cantidad de ADN bacteriano fue introducida en soluciones muy diluídas de ADN de camarón (10^{-4} a 10^{-5}), se obtenían sus productos típicos de amplificación luego de 35 ciclos.

En vista de estos resultados, no se puede excluir el hecho de que existan inhibidores en las soluciones con elevadas concentraciones de ADN de camarón. Sin embargo, este problema de baja amplificación parecería más relacionado con la disponibilidad de los iniciadores. En efecto, para un genoma bacteriano que contiene alrededor de 10^6 pares de

bases, la probabilidad de hibridación de un iniciador de 10 nucleótidos está en el orden de 1 a 2 veces por genoma ($1/4^{10} = 10^{-6}$), es decir, que tal iniciador puede conducir en promedio a un producto de amplificación por genoma. Para que dicho producto pueda ser observado en un gel debe representar alrededor de 10 ng, lo que por ejemplo para un producto de una talla de 1000 pares de bases corresponde a alrededor de 10^{10} copias. En el caso de una muestra de 100 ng de ADN bacteriano, hay alrededor de 10^8 copias del genoma (1 genoma= 1fg), por lo tanto, teóricamente es posible obtener estas 10^{10} copias luego de solamente 7 ciclos de amplificación ($2^7 = 128$). En la práctica, en el caso del ADN bacteriano solo, generalmente es necesario conducir a una amplificación de 2^{35} , es decir 3×10^{10} . Esto significa que la eficiencia de la amplificación real es alrededor de 10^8 veces más baja que la amplificación teórica. En presencia de ADN de camarón, esta eficiencia es extremadamente reducida ya que se necesitan alrededor de 50 ciclos (2^{50} , es decir 10^{15}).

Es particularmente interesante analizar la multiplicación de las posibilidades de hibridación de los iniciadores para comprender la ausencia de productos de amplificación cuando la muestra contiene una gran cantidad inicial de ADN de camarón. En efecto, en el caso de las células de organismos eucariotes como el camarón, el ADN tiene una talla de alrededor de 10^9 pares de bases, lo que significa que un iniciador de 10 nucleótidos puede fijarse alrededor de 1000 veces por genoma y generar de esta manera varios miles de productos de amplificación correspondientes a las combinaciones de pares de iniciadores en orientación inversa. Teniendo en cuenta los tiempos de polimerización programados con el termociclador, en el orden de 1-3 minutos, los productos cuyas tallas son inferiores a 6000 pb son los únicos que pueden ser efectivamente amplificados y van a volverse progresivamente más numerosos en la muestra. Sin embargo, hay una fuerte competencia entre los iniciadores por todos los sitios de fijación posibles sobre el ADN genómico y sobre los productos de amplificación, lo que hace que muchas fijaciones no correspondan a hibridaciones emparejadas que conduzcan a un producto de amplificación. Por tanto, solo algunos productos serán amplificados en cada ciclo con un rendimiento que será mucho más bajo que en el caso del ADN bacteriano donde prácticamente toda hibridación de iniciadores

sobre una misma molécula va a conducir a una cantidad extremadamente baja de ADN objetivo, teniendo como consecuencia que los productos de amplificación representen desde los primeros ciclos una parte importante y rápidamente mayoritaria en los sitios de fijación para los iniciadores.

En la práctica, con cantidades de ADN de camarón en el orden de los 100 μg , correspondientes a alrededor de 100 copias del genoma, se mostró posible obtener, luego de una serie de 50 ciclos, productos de amplificación en cantidades suficientes para ser detectadas en el gel, es decir 10 ng o 10^{10} copias de un producto de 1000 pb. Por tanto, la eficiencia de amplificación es baja ya que las 10^{10} copias pueden resultar teóricamente de 30 ciclos ($2^{30}=10^9$) pero en la práctica necesitan 50 ciclos ($2^{50} = 10^{15}$).

Por tanto, a partir de este protocolo, con una cantidad de ADN 1000 veces menor que en el caso del protocolo señalado inicialmente, fue posible obtener un patrón de amplificación característico de un camarón. Esto permitió substituir la utilización de ADN extraído del músculo por el ADN extraído de hemocitos, siendo suficiente un volumen menor a 500 μl de hemolinfa. Así, es posible efectuar los análisis de AP-PCR, sin sacrificar los camarones, desde que alcanzan un peso de alrededor de 1 gramo.

Por otra parte, cabe destacar el logro que representó implementar un protocolo de extracción de ADN que permite efectuar fácilmente numerosos análisis de AP-PCR. Este protocolo, basado en la ebullición de los hemocitos en TE, fue relativamente fácil de elaborar a partir de datos bibliográficos y considerando los trabajos realizados recientemente por el equipo de investigación de Biología Molecular del CENAIM para establecer los patrones RAPD de bacterias.

RECOMENDACIONES

1. Optimizar la técnica AP-PCR para conseguir incrementar su eficiencia en términos de reproducibilidad.
2. Crear una base genética de datos utilizando la técnica AP-PCR con poblaciones silvestres y cultivadas de *P. vannamei*, para efectuar la determinación de patrones de bandas asociados a orígenes geográficos específicos.
3. Aplicar la técnica AP-PCR en conexión con pruebas de inmunoevaluación para intentar relacionar patrones de bandas característicos con estados inmunitarios específicos.
4. Identificar marcadores genéticos de grupos de camarones *P. vannamei* con características de interés en acuicultura. Los estudios posteriores deberán ser encaminados a determinar si existe una relación entre estos marcadores genéticos y secuencias correspondientes a un gen o a un grupo de genes para posteriormente caracterizarlos, clonarlos y secuenciarlos.

BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, M., BENZAADI, N., SALVADO, J.-C., CAMPBELL, K. & MOUCHES, C. 1993. Characterization and genetic organization of full-length copies of a LINE Retroposon Family Disperse in the genome of *Culex pipiens* Mosquitoes. Insect Biochem. Molec. Biol. Vol. 23, # 5, p. 621-629.

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J. & STRUHL, K. 1992. Short protocols in Molecular Biology. Second edition. USA. 2-10.

DINESH, K.R., LIM, T.M. CHAN, W.K. & PHANG V.P.E. 1996. Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. Aquaculture Internacional 4, 19-30.

ESTADÍSTICAS. 1996. Acuicultura del Ecuador. Revista especializada de la Cámara Nacional de Acuicultura. Febrero-Marzo. Volumen 13. Ecuador. p. 26-27.

FINNEGAN, D.J. 1991. Transposable elements and their biological consequences in *Drosophila* and other insects. Insect Molecular Science.(ed. by J.M. Crampton and P. Eggleston). Academic press, p. 35-48.

FOO, C.L., DINESH, K.R., LIM, T.M., CHAN, W.K. & PHANG, V.P.E. 1995. Inheritance of RAPD markers in the Guppy Fish, *Poeciliareticulata*. Zoological Science 12: 535-541.

GARCÍA, D., FAGGART, M., RHOADES, L. & ALCIVAR-WARREN, A. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three genetic techniques. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5), 270-280.

GOWDA, P.S.B., XU, G.-W., FREDERIKSEN, R.A. & MAGILL, C.W. 1995. DNA markers for downy mildew resistance genes in sorghum. Genome, 38: 823-826.

GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D., LEWONTIN, R. & GELBART, W.M. 1993. An introduction to Genetic Analysis. Fifth Edition. USA. p. 400.

HARTL, D. & CLARK, A. 1989. Principles of Population genetics. USA. p. 22-30.

JOHN, B. & MIKLOS, G. 1988. The Eukaryote Genome in Development and Evolution. Allen & Unwin, London, England. p. 22-26.

KANTANEN, J., VILKI, J., ELO, K. & MAKI-TANILA, A. 1995. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. *Animal Genetics*, 26, 315-320.

LABACENA, M., TORRES, M. & ESPINOSA, G. 1994. Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. 80-87.

MALECHA, S.R. & HEDGECOCK, D. 1986. Prospects for domestication and breeding of marine shrimp. Sea Grant technical report. 37 p.

POWELL, M., MEADE, M. & WATTS, S. 1995. Identification of six commercially cultured crayfish species using total protein separation by isoelectric focusing. *Journal of Crustacean Biology*, 15(4): 763-770.

PURVES, W.K., ORIAN, G.H. & HELLER, H.C. 1992. Life: The Science of Biology. Third Edition. USA. p. 306-328.

SAIKI, R., 1990. PCR. Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California. USA. p. 13-20.

TASSANAKAJON, A., MENASVETA, P., JARAYABPHAN, P. & BOONSAENG, V. 1995. Rapid detection of genetic variations in black tiger prawns (*Penaeus monodon*) by random amplified polymorphic DNA Analysis. World Aquaculture Society. Book of Abstracts. World Aquaculture '96. Bangkok, Thailand. January 29 - February 2, 1996. p. 400-401.

ANEXOS

ANEXO I

MÉTODO DE SECUENCIACIÓN DE SANGER

En la técnica de Sanger para secuenciar ADN, el ADN de una sola cadena que se va a secuenciar es dividido en cuatro muestras. A cada una se le añade la enzima ADN polimerasa (para sintetizar la cadena complementaria), un iniciador, los cuatro deoxirribonucleótidos trifosfatos o dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, uno de los cuales está marcado radioactivamente de modo que las nuevas cadenas de ADN puedan ser detectadas por su radioactividad), y pequeñas cantidades de los cuatro dideoxirribonucleótidos trifosfatos o ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) a razón de uno por muestra.

Cada muestra pronto contendrá una mezcla de ADN hecha de una cadena desconocida y cadenas complementarias más cortas; estas cadenas complementarias son de varias longitudes, pero todas radioactivas. En el grupo que contiene ddATP, por ejemplo, cada vez que una T es alcanzada en la cadena patrón, las cadenas complementarias crecientes añaden, al azar, un dATP o un ddATP. Si el ddATP es añadido, el crecimiento de la cadena termina en este punto. Dependiendo de la oportunidad, algunas de las cadenas replicadas crecen más que otras antes que un ddATP determine el final de la replicación.

Entonces, dentro de cada una de las cuatro mezclas de reacción, las cadenas son separadas. Las cadenas pueden ser observadas entonces por un gel de electroforesis. Cada mezcla de reacción es corrida en un diferente escalón en el gel. Debido a que se conoce que ddNTP fue utilizado en cada mezcla de reacción, es posible saber que base ha sido la última en las cadenas de cada grupo.

Comparando la migración de los fragmentos terminados de cada una de las mezclas, uno puede determinar la secuencia exacta de las bases en la muestra original de ADN (Ver figura).

LAS ADN POLIMERASAS Y SU FUNCIÓN

Las enzimas polimerasas son de tres tipos:

ADN polimerasa I o pol I,

ADN polimerasa II o pol II, y

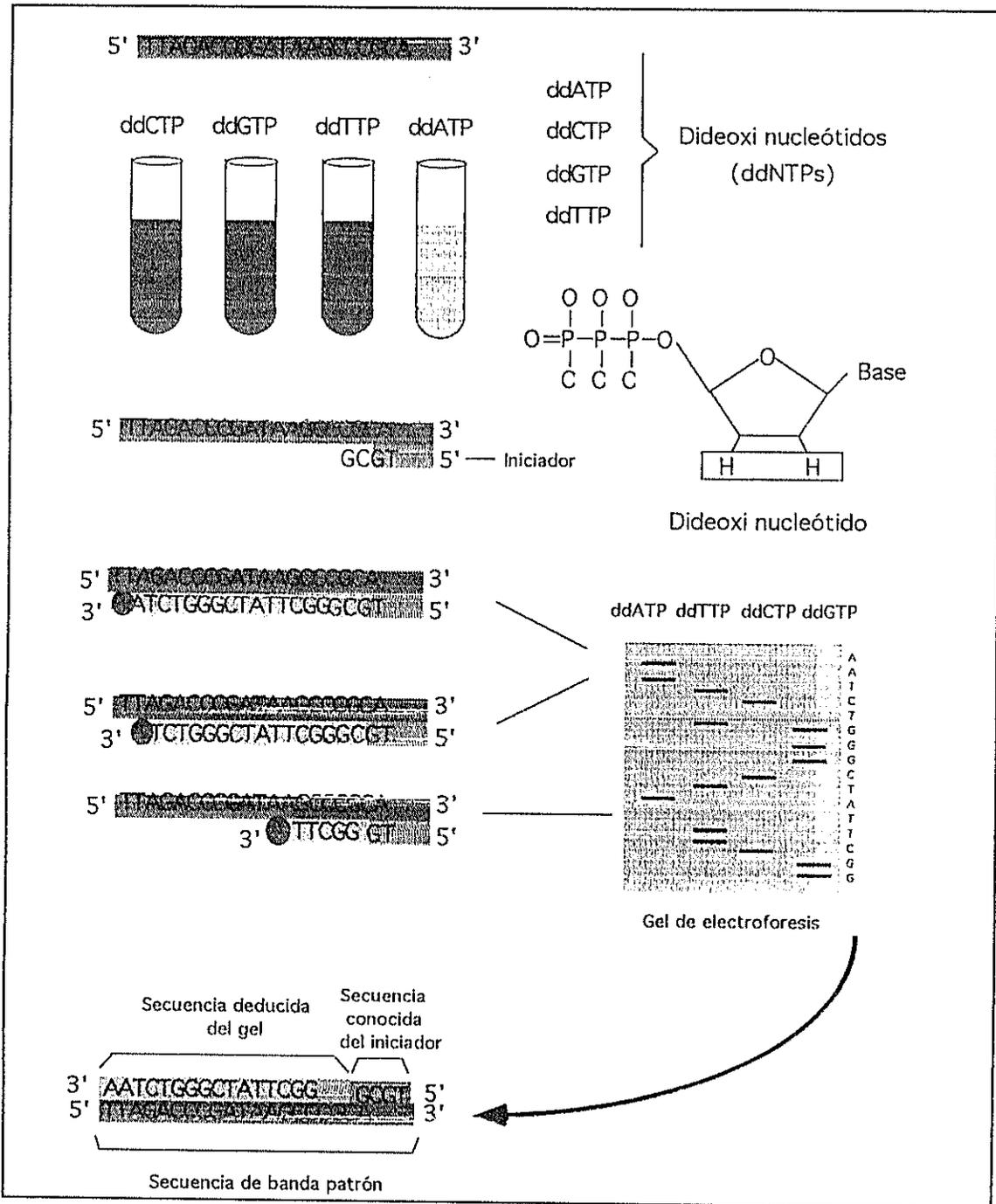
ADN polimerasa III o pol III.

La ADN polimerasa I tiene tres actividades, las cuales parecen estar localizadas en diferentes partes de la molécula:

- 1.- Una actividad de polimerasa, la cual cataliza el crecimiento de la cadena en la dirección 5'-3'.
- 2.- Una actividad de exonucleasa 3'-5', la cual remueve las bases mal apareadas.
- 3.- Una actividad de exonucleasa 5'-3', la cual degrada ADN de doble cadena.

La ADN polimerasa II puede operar para reparar ADN dañado, aunque ninguna función ha sido asignada a esta enzima.

El completo complejo, u holoenzima, de pol III contiene al menos 20 diferentes subunidades de polipéptidos. El complejo de pol III completará la replicación de ADN de una sola cadena si hay al menos un segmento bicatenario ya presente.



Metodo de secuenciación de Sanger

ANEXO II

Código genético

	U	C	A	G	
U	UUU Phe UUC UUA Leu CUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Pare UAG Pare	UGU Cys UGC UGA Pare UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU His CAC CAA Gin CAG	CGU Arg CGC CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC Ile AUA Met AUG	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GGC	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG	U C A G

ANEXO III

REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS DIFERENTES

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

TE

Tris.Cl (pH 7.4) 10 mM

EDTA (pH 8.0) 1 mM

Tampón de Electroforesis TAE 1X

Solución stock 50X, pH 8.5:

Tris base 242.0 g

Acido acético glacial 57.1 ml

Na₂EDTA.2H₂O 37.2 g

Se coloca agua hasta llegar a un litro.

Tampón de depósito 5X

Ficoll 400 20%

Na₂EDTA, pH 8,0 0,1 M

SDS 1 %

bromphenol blue 0,25 % (w/v)

xylene cyanol 0,25 % (w/v)

EDTA (Acido etilendiamino tetraacético) 0,5 M.

Disolver 186,1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 700 ml de agua.

Ajustar pH a 8.0 con 10 M NaOH (≈ 50 ml.).

Añadir agua hasta 1 litro.

Tampón Grinding

Tris	0.18 M
LiCl	0.09 M
EDTA	4.5 mM
SDS	1 %

pH a 8.2 con HCl.

Solución balanceada de Hanks

KCl	5.4 mM
Na_2HPO_4	0.3 mM
KH_2PO_4	0.4 mM
NaHCO_3	4.2 mM
CaCl_2	1.3 mM
MgCl_2	0.5 mM
MgSO_4	0.6 mM
NaCl	137 mM

D-glucosa 5.6 mM

rojo fenol (opcional) 0.02 %

Añadir agua hasta 1 litro.

Ajustar el pH a 7.4

Acetato de Sodio

Disolver 408 g. de Acetato de Sodio. 3H₂O en agua.

Ajustar el pH a 5.2 con Acido acético.

Añadir agua hasta 1 litro.

Tampón de Extracción

Tris HCl (pH 8) 10 mM

EDTA 0.1 M

Sarcosil 10 %

Agua

ANEXO IV

Parámetros de los diferentes protocolos de AP-PCR utilizados

Protocolos	I		II		III		IV	
	Temp (°C)	Per (min.)	Temp (°C)	Per (min)	Temp (°C)	Per (min)	Temp (°C)	Per (min)
Desnaturalización	92	1	93	1	93	1	93	1
Hibridación	35	1,5	52	1,5	35	1,5	34	1,5
Polimerización	72	1	72	1	72	3	72	2

Temp: temperatura

Per: periodo

I: García et al., 1994

II: García et al., 1996

III: Motte, 1996

IV: Implementado

°C: Grados centígrados

min: minutos

ANEXO V

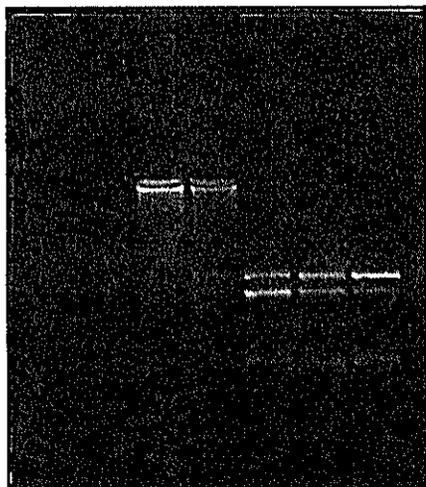
Secuencias de los iniciadores

INICIADOR	SECUENCIA
P1	5'- GGGTAACGCC-3'
P2	5'- GTGATCGCAG-3'
P3	5'- GTTGCGATCC-3'
P4	5'- GTAGACCCGT-3'
P5	5'- TCCGCTCTGG-3'
P6	5'- GGACCCITAC-3'

Anexo VI

Experimentación # 10

1 2 3 4 5 6 7



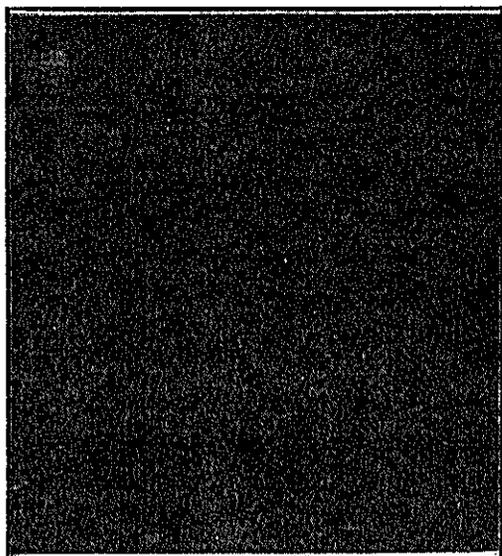
Larvas

1. ADN: 40 pg
2. ADN: 4 pg
3. ADN 40 ng + ADN E 22 (200 ng)
4. ADN: 4 ng + ADN E 22 (200 ng)
5. ADN: 400 pg + ADN E 22 (200 ng)
6. ADN: 40 pg + ADN E 22 (200 ng)
7. ADN: 4 pg + ADN E 22 (200 ng)

Iniciador P1: 1000 ng

Experimentación # 13

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



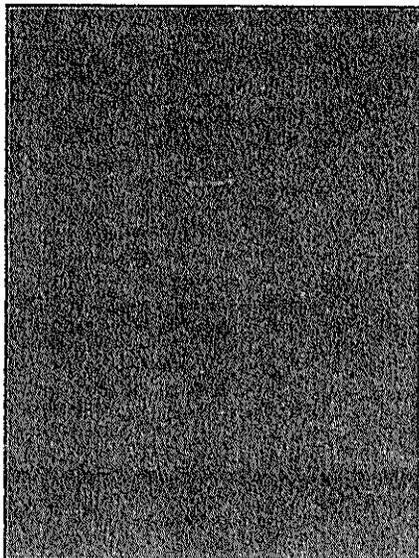
Hemocitos

M. MPM

1. ADN: 120 pg; P3: 1000 ng
2. ADN: 120 pg; P3: 2000 ng
3. ADN: 120 pg; P3: 3000 ng
4. ADN: 12 pg; P3: 1000 ng
5. ADN: 12 pg; P3: 2000 ng
6. ADN: 12 pg; P3: 3000 ng
7. ADN: 1,2 pg; P3: 1000 ng
8. ADN: 1,2 pg; P3: 2000 ng
9. ADN: 1,2 pg; P3: 3000 ng

Experimentación # 14 A

1 2 3 4 5 6 7

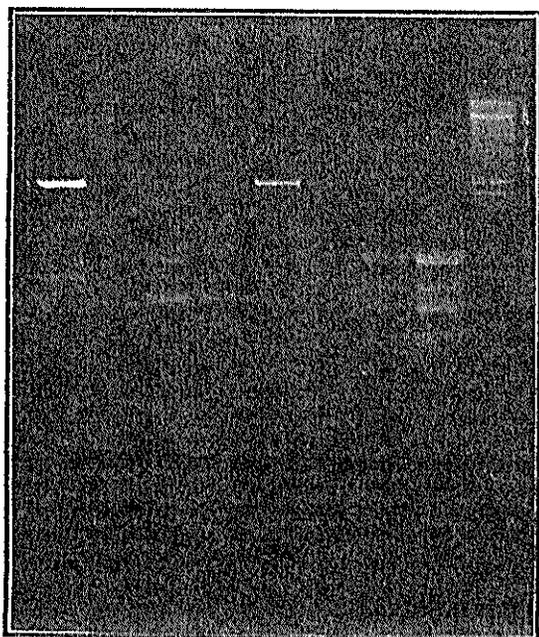


Hemocitos

1. ADN :1,2 ng; P3: 1000 ng
2. ADN: 120 pg; P3: 1000 ng
3. ADN: 12 pg ; P3: 1000 ng
4. ADN: 1,2 ng; P3: 5000 ng
5. ADN: 120 pg; P3: 5000 ng
6. ADN: 12 pg; P3: 5000 ng
7. Control negativo (agua)

Experimentación # 14 B

1 2 3 4 5 6 7 8 M

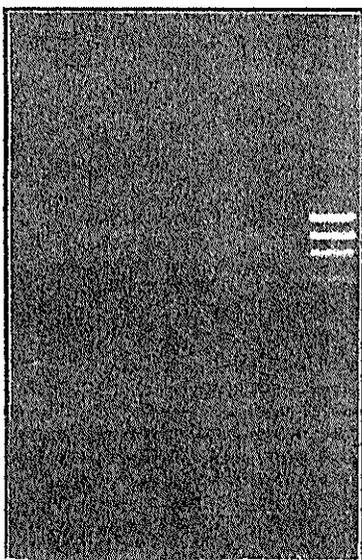


Hemocitos

1. ADN: 120 pg; P3: 1000 ng
2. ADN: 120 pg; P3: 5000 ng
3. ADN: 120 pg; P3: 1000 ng
4. ADN: 120 pg; P3: 5000 ng
5. ADN: 12 pg; P3: 1000 ng
6. ADN: 12 pg; P3: 5000 ng
7. ADN: 12 pg; P3: 1000 ng
8. ADN: 12 pg; P3: 5000 ng
- M. MPM

Experimentación # 15

1 2 3 4 5 6 M

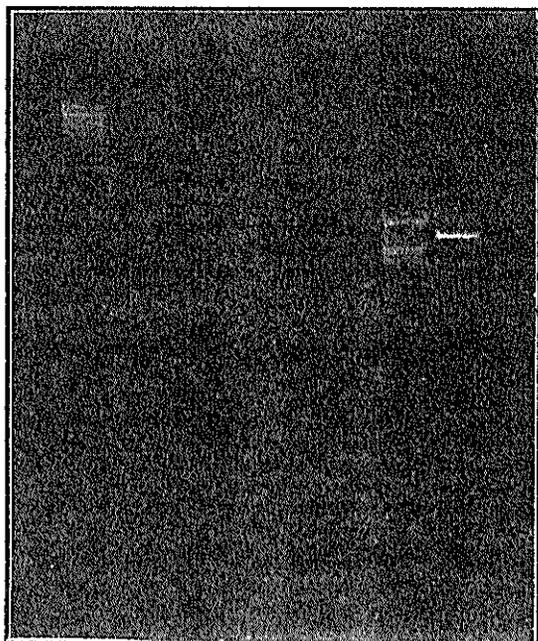


Hemocitos

1. ADN digerido: 1,2 ng; P3: 1000 ng
 2. ADN digerido: 120 pg; P3: 1000 ng
 3. ADN digerido: 12 pg ; P3: 1000 ng
 4. ADN: 1,2 ng; P3: 1000 ng
 5. ADN: 120 pg; P3: 1000 ng
 6. ADN: 12 pg; P3: 1000 ng
- M. MPM

Experimentación # 16 B

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9

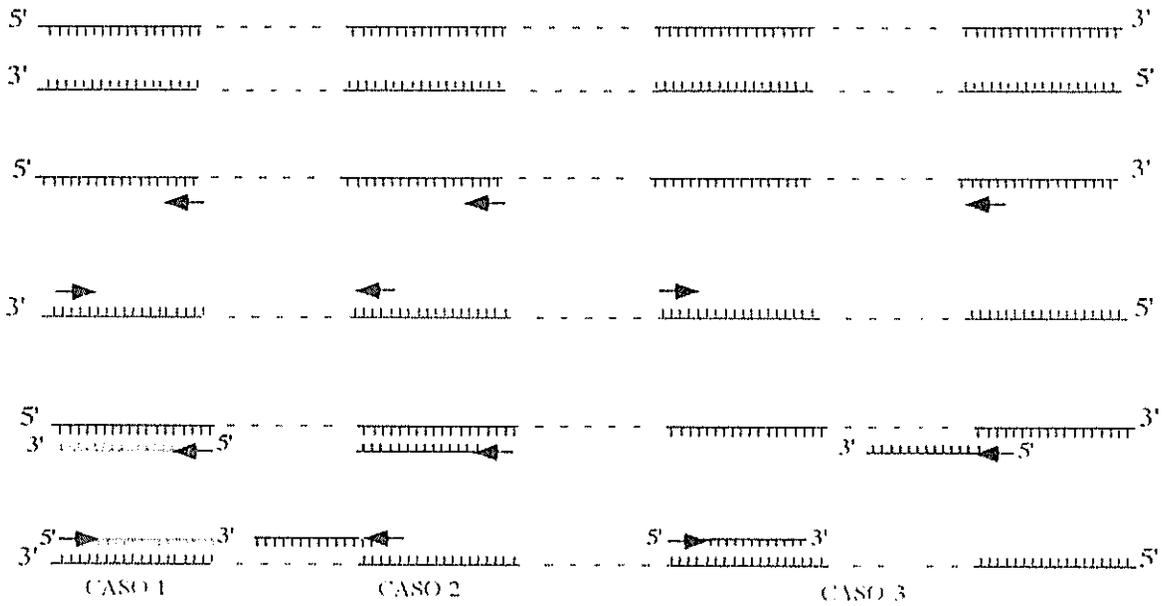


Hemocitos

1. Control positivo (bacteria)
- M. MPM
2. ADN (proteinas K): 100 pg; P3: 1000 ng
 3. ADN (proteinas K): 10 pg; P3: 1000 ng
 4. ADN (tampón de extracción): 100 pg; P3: 1000 ng
 5. ADN (tampón de extracción): 10 pg; P3: 1000 ng
 6. ADN (tampón grinding): 10 pg; P3: 1000 ng
 7. ADN (tampón grinding): 100 pg; P3: 1000 ng
 8. ADN (TE): 10 pg; P3: 1000 ng
 9. ADN (agua destilada): 10 pg; P3: 1000 ng

ANEXO VII

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL COMPORTAMIENTO DE LOS INICIADORES DURANTE LA AP-PCR UTILIZANDO ADN DE CAMARON



AMPLIFICACION

SIN AMPLIFICACION

SIN AMPLIFICACION