



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL  
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Caracterización del camarón *Penaeus vannamei* en base a criterios  
genéticos e inmunitarios"

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de  
ACUICULTOR

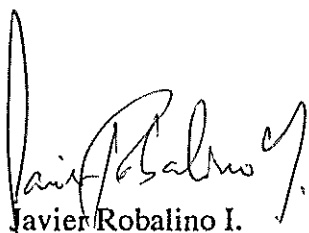
Presentada por  
Javier Robalino Iturralde

GUAYAQUIL-ECUADOR  
1997

## DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad de 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)



Javier Robalino I.

# DEDICATORIA

A mis padres,  
*Gonzalo y Jenny*

A la memoria de *Lucía*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Gonzalo, Jenny, Gonzalo A. y Lorena por el apoyo incondicional y el amor brindado durante tantos años, amor que no siempre he merecido. A mis padres por el inmenso esfuerzo que ha costado educarme. A Josefina Iturralde por sus consejos y por velar permanentemente por mi bienestar y el de mis hermanos.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral por brindarme la oportunidad de formarme dentro y fuera de las salas de clase. Un agradecimiento especial al Ing. Raúl Coello.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) por darme la oportunidad de realizar este trabajo y de incursionar en el maravilloso mundo de la investigación; a su director, Jorge Calderón, PhD, por el apoyo brindado.

Al laboratorio PLAYAESPEC, especialmente al Dr. Walter Briones y a Filiberto Suárez por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

A Carrera Internacional, igualmente por su valiosa y oportuna colaboración.

A Virna Cedeño por aceptar ser mi directora y por el tiempo invertido en la elaboración de este documento. Gracias por el apoyo en todo sentido.

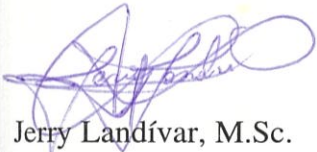
A Eric Mialhe, por ayudarme a redescubrir mi fascinación por la biología y la investigación, por apoyar mi vocación de enseñar y demostrarme que el mundo es inmenso, la vida corta y muchas las cosas por hacer. Gracias también por el tiempo dedicado a la concepción y culminación de esta tesis.

A mis compañeros de CENAIM, por su contribución y ayuda desinteresada en la realización de esta tesis, la cual es el resultado de un verdadero trabajo de equipo. Un agradecimiento especial a José Melena por su constancia y por el arduo trabajo realizado a lo largo de un año. También a Ricardo Cedeño, Ernesto Valenzuela, Marcelo Muñoz, Irma Betancourt, Leonardo Bastidas, Félix Falconí. Gracias a mis amigos de siempre Walter, Gonzalo, Ricardo, Leonardo, Jorge, Miguel..... A Sonny Mendoza por haberme brindado su preciosa amistad y por enseñarme a ser más humano, un beso para ti.

Finalmente a los que no ayudaron tanto, de todos se aprende algo.



Jorge Calderón, Ph.D.  
Presidente del Tribunal



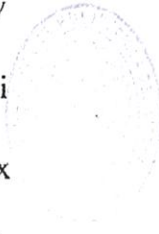
Jerry Landívar, M.Sc.  
Miembro del Tribunal



Virna Cedeño  
Director de Tesis

## TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de contenidos.....	i
Abreviaturas.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	x
Resumen.....	xi
Introducción.....	1
I. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Identificación y caracterización de genes y sus productos.....	4
1.1.1. Técnicas.....	9
1.1.1.1. Sondas nucleicas.....	9
1.1.1.2. Sondas inmunológicas.....	13
1.1.1.3. Pruebas de actividad.....	19
1.1.2. Estrategias.....	25
1.1.2.1. A partir del gen.....	25
1.1.2.2. A partir de la proteína.....	26
1.1.2.3. A partir de la actividad.....	28
1.2. Marcadores genéticos.....	29
1.2.1. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	30
1.2.2. ADN mitocondrial (ADNmt).....	33
1.2.3. Microsatélites.....	33
1.2.4. AP-PCR (Alleatory-primed polymerase chain reaction).....	36



FAC. BIOL.  
HABANA

1.3. Marcadores inmunitarios del camarón.....	39
1.3.1. Hemogramas.....	39
1.3.2. <u>Cuantificación del anión superóxido</u> .....	40
1.3.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma.....	42
1.3.4. Inmunodosificación de factores plasmáticos.....	42
1.4. Selección por genética cuantitativa.....	49
II. MATERIALES Y METODOS.....	52
2.1. Material biológico.....	52
2.1.1. Camarones.....	52
2.1.2. Control del ciclo de muda y extracción de hemolinfa.....	52
2.2. Caracterización del genoma.....	52
2.2.1. Protocolo de extracción de ADN genómico.....	52
2.2.2. Condiciones de AP-PCR.....	53
2.2.3. Iniciadores.....	54
2.2.4. Determinación de perfiles de RAPD.....	55
2.3. Cuantificación de efectores inmunitarios.....	55
2.3.1. Determinación del hemograma.....	55
2.3.2. Cuantificación del anión superóxido.....	55
2.3.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana.....	56
2.3.4. Inmunodosificación de factores plasmáticos.....	57
III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	59
3.1. Protocolo optimizado de AP-PCR.....	59

3.2. Perfiles de RAPD de los camarones analizados.....	61
3.3. Valores individuales de los efectores inmunitarios.....	65
3.3.1. Determinación del hemograma.....	67
3.3.2. Cuantificación del anión superóxido.....	68
3.3.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana.....	69
3.3.4. Inmunodosificación de la alfa-2-macroglobulina.....	70
3.3.5. Inmunodosificación del factor de coagulación.....	71
3.3.6. Inmunodosificación de una aglutinina.....	71
3.4. Análisis integrado de los efectores inmunitarios y los perfiles de RAPD.....	72
CONCLUSIONES.....	85
RECOMENDACIONES.....	91
REFERENCIAS.....	92
ANEXOS.....	100



## ABREVIATURAS.

Ac	Anticuerpo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Acido desoxirribonucleico genómico
ADNmt	Acido desoxirribonucleico mitocondrial
Ag	Antígeno
AP-PCR	Alleatory-primed polymerase chain reaction
ARMĐ	Análisis de Rangos Múltiples de Duncan
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTPs	Dioxinucleótidos trifosfato
EDTA	Etilén diamino tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
Hcam	Hembra de camaronera
Hsil	Hembra silvestre

IF	Inmunofluorescencia
INCO-DP	International Cooperation for Developing Countries
Kb	Kilo pares de bases
KDa	Kilo Daltons
LB	Luria Bertani
Mcam	Macho de camaronera
MHBSS	Solución salina modificada de Hank's
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Msil	Macho silvestre
NBT	Nitro blue tetrazolium
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase chain reaction
PMA	Phorbol myristate acetate
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment lenght polymorfism

rpm	Revoluciones por minuto
SAM	Selección asistida por marcadores
TA	Temperatura ambiente
Tris	Hydroximethyl aminomethane
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
UV	Ultravioleta

CA  
1991  
1001.100A

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: El cromosoma y la molécula de ADN.....	5
Figura 2: Regulación de la expresión de los genes a nivel de la transcripción.....	6
Figura 3: Transcripción y traducción de los genes.....	7
Figura 4: El código genético.....	8
Figura 5: Hibridación de las sondas nucleicas al ADN blanco.....	10
Figura 6: Técnica de dot blot.....	11
Figura 7: Técnica de Southern blot.....	12
Figura 8: Selección de clones en bancos de ADNg y ADNc.....	14
Figura 9: Técnica de northern blot.....	15
Figura 10: Principio de la PCR.....	16
Figura 11: Relación antígeno-anticuerpo.....	17
Figura 12: Producción de anticuerpos policlonales.....	18
Figura 13: Hibridación linfocitaria y producción de anticuerpos monoclonales.....	20
Figura 14: Especificidad de los anticuerpos.....	21
Figura 15: La inmunofluorescencia.....	22
Figura 16: Técnica de ELISA.....	23
Figura 17: Selección de clones de interés en un banco de ADN construido en vectores de expresión.....	24
Figura 18: Estrategias de identificación y caracterización de genes y sus productos.....	27
Figura 19: Acción de las enzimas de restricción.....	31
Figura 20: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción.....	32

Figura 21: Aporte materno del ADNmt.....	34
Figura 22: Los microsátélites.....	35
Figura 23: Principio de la AP-PCR y obtención de perfiles de RAPD.....	37
Figura 24: Los tipos hemocitarios del camarón.....	41
Figura 25: La fagocitosis.....	41
Figura 26: Principio de la cuantificación del anión superóxido.....	43
Figura 27: Mecanismo de acción de algunos péptidos microbicidas en insectos.....	44
Figura 28: Función de las aglutininas.....	46
Figura 29: Función inhibitoria de las proteasas por parte de la alfa-2-macroglobulina....	47
Figura 30: El rol de los factores de coagulación en los mecanismos antihemorrágicos....	48
Figura 31: Esquema de cruces controlados utilizando marcadores RAPD.....	51
Figura 32a: Perfiles de RAPD de los 12 camarones analizados, primer #174.....	62
Figura 32b: Perfiles de RAPD de los 12 camarones analizados, primer #456.....	62
Figura 33: Porcentajes relativos de hemogramas determinados en tres ciclos de muda para 20 camarones.....	73
Figura 34: Porcentajes relativos de los índices de producción de anión superóxido (Tasa NBT) determinados en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.....	74
Figura 35: Porcentajes relativos de la actividad antibacteriana del plasma determinada en tres ciclos de muda para 20 camarones.....	75
Figura 36: Porcentajes relativos de la cantidad de alfa-2-macroglobulina determinada en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.....	76

Figura 37: Porcentajes relativos de la cantidad de factor de coagulación determinada en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.....	77
Figura 38: Porcentajes relativos de la cantidad de aglutinina determinada en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.....	78
Figura 39: Índices inmunitarios parciales calculados para los 12 animales analizados.....	81
Figura 40: Índice inmunitario global calculado para los 12 camarones analizados.....	82
Figura 41: Variación individual del índice inmunitario global y de los subíndices correspondientes a las pruebas cuantificadas vía dot blot y vía otras pruebas en los 12 camarones analizados.....	83
Figura 42: Variación individual de los porcentajes relativos para hemograma y tasa de producción de anión superóxido en 20 camarones.....	84
Figura 43: Variación individual de los seis efectores inmunitarios en relación con el índice inmunitario global en los 12 camarones analizados.....	90

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1a: Descripción de los perfiles de RAPD para los 12 camarones analizados, primer #174.....	63
Tabla 1b: Descripción de los perfiles de RAPD para los 12 camarones analizados, primer #456.....	64
Tabla 2: Porcentaje relativo de seis pruebas inmunitarias para 30 reproductores supervivientes durante tres ciclos de muda.....	66
Tabla 3: Medias y desviaciones estándar para las seis pruebas inmunitarias determinadas en 12 camarones.....	89

## RESUMEN

Se ha efectuado un trabajo exploratorio para asociar marcadores genéticos y marcadores inmunitarios en el camarón *Penaeus vannamei*. En lo que concierne a los marcadores genéticos, se retuvo la técnica de AP-PCR en la medida en que permite establecer perfiles RAPD a partir de ADN extraído de un pequeño volumen de hemolinfa. Utilizando la misma muestra de hemolinfa, y gracias a seis pruebas que han sido recientemente puestas a punto en CENAIM, fue posible cuantificar diversos tipos de efectores inmunitarios: cantidad de hemocitos, actividad antibacteriana del plasma, metabolismo respiratorio de los hemocitos y cantidades de alfa-2-macroglobulina, de una aglutinina y del factor de coagulación.

Estas diversas pruebas han permitido poner en evidencia una variabilidad individual y temporal para los caracteres inmunitarios considerados, en particular la actividad fagocítica de los hemocitos, la actividad antibacteriana del plasma y la cantidad de aglutinina circulante. A partir de los valores determinados para cada prueba y para cada animal se estableció un índice global de capacidad inmunitaria.

Entre doce camarones que fueron analizados en 3 etapas de intermuda y para los cuales se establecieron los perfiles RAPD con la ayuda de dos iniciadores, fue posible identificar un animal, hembra silvestre, con un índice global de capacidad inmunitaria superior a aquel de los otros camarones mantenidos en las mismas condiciones de cultivo.

Estos trabajos, totalmente originales para los camarones pencidos, abren la vía a programas de domesticación y selección en miras a la obtención de líneas de animales con mejor capacidad de resistencia, en particular frente a bacterias, considerando la naturaleza de los efectores inmunitarios estudiados.



## INTRODUCCION

La acuicultura de camarones en Ecuador, como en la mayoría de otros países, depende totalmente del aprovisionamiento de animales salvajes, sean estos larvas o reproductores. Este hecho implica dos tipos de impactos graves, uno de orden ecológico ocasionado por la merma de las poblaciones naturales y otro de orden económico ocasionado por la crianza de animales no adaptados a las condiciones artificiales de cultivo y la introducción de patógenos, lo cual favorece la aparición de epidemias.

La solución a este doble problema se basa en la domesticación y selección de cepas con gran capacidad de resistencia, lo que desde el punto de vista técnico de cultivo es concebible ya que ha sido posible mantener y madurar reproductores en el curso de generaciones sucesivas, hasta alrededor de cuarenta generaciones.

El éxito de la domesticación y selección dependerá grandemente de la capacidad de identificar animales con fenotipos de interés tales como el crecimiento, la capacidad de reproducción o la capacidad inmunitaria y la resistencia a microorganismos. Algunos caracteres de interés como el crecimiento, son de fácil identificación, mientras que otros, como la capacidad inmunitaria, han requerido el desarrollo de una serie de pruebas cuya fiabilidad permite ahora considerarlas como criterios de selección. Sin embargo, estos fenotipos de interés resultan generalmente de la expresión de numerosos genes no identificados ni caracterizados. Esto impone la caracterización de los camarones a nivel genómico a fin de identificar marcadores genéticos que puedan ser correlacionados con uno o varios caracteres fenotípicos de interés.

La técnica de caracterización genética de elección corresponde a la AP-PCR ya que permite fácilmente, sin ninguna información previa del genoma de la especie, determinar marcadores genéticos a nivel infraespecífico e incluso a nivel individual. Además esta

técnica puede ser realizada a partir de pequeños volúmenes de hemolinfa que son obtenidos sin sacrificar al animal y que son utilizados también para realizar las pruebas inmunitarias.

El presente trabajo se inscribe de manera completamente original dentro de la estrategia de domesticación y selección de camarones, ya que se trata del primer estudio que concierne conjuntamente a los marcadores genéticos y a los marcadores inmunitarios.

## I. ANTECEDENTES

La domesticación y la selección de camarones adaptados a las condiciones de cultivo y resistentes a agentes patógenos constituyen prioridades para la sustentabilidad económica y ecológica de la camaronicultura. Consecuentemente existe en la actualidad un gran interés, de parte de los productores y de los científicos, en la genética de camarones, siendo el objetivo primordial mejorar la producción mediante la identificación, y luego la selección, de animales con fenotipos de interés.

Ciertos fenotipos corresponden a la expresión de un solo gen cuyo producto influencia directamente el fenotipo, frecuentemente de manera radical; este tipo de regulación monogénica corresponde a los caracteres llamados cualitativos. El fenotipo de la descendencia depende de la naturaleza, dominante o recesiva, de los alelos transmitidos. Entre los fenotipos monogénicos conocidos en los animales se puede citar el color del pelo, que depende de la presencia de una proteína pigmentaria.

Otros fenotipos corresponden a la expresión de varios genes cuyos diferentes productos influyen conjuntamente el fenotipo. El carácter es considerado como cuantitativo ya que, en función de la asociación de diferentes alelos de cada gen, el fenotipo va a situarse en un rango de valores. Por ejemplo, el crecimiento de un organismo o su resistencia a enfermedades dependen de la expresión de numerosos genes. Subsecuentemente, cada organismo tiene un valor fenotípico que puede ser cuantificado y que se sitúa entre los valores extremos característicos de la especie, considerando el efecto de las diferentes condiciones del medio. Los fenotipos de tipo cuantitativo son mucho más difíciles de caracterizar a nivel genético en razón de su naturaleza poligénica que complica también el análisis de la transmisión.

Es conveniente subrayar que la mayoría de criterios de interés para programas de selección son de tipo cuantitativo. De ahí la importancia de poder caracterizar los fenotipos a nivel de los genes, de sus productos de expresión que son las proteínas y de la actividad

de estas últimas. Este objetivo puede ser relativamente fácil de realizar en el caso de fenotipos monogénicos, mientras que la caracterización de fenotipos poligénicos es un proceso extremadamente complejo que los genetistas prefieren substituir por la identificación de marcadores genómicos específicos de un fenotipo dado.

A continuación se presenta la información relacionada con la identificación y caracterización de genes y sus productos (1.1), los marcadores genéticos (1.2), los marcadores inmunitarios del camarón (1.3) y la selección por genética cuantitativa (1.4).

### **1.1. Identificación y caracterización de genes y sus productos.**

En los eucariotes, el material genético está compuesto de moléculas de ADN, correspondiendo cada una a un cromosoma (Figura 1). En animales, como el camarón, el tamaño total de las moléculas es de alrededor de  $10^9$  pares de nucleótidos de los cuales sólo aproximadamente el 5% corresponde a genes. Un gen está caracterizado por una secuencia denominada promotor, seguida de la secuencia codificante. El promotor es reconocido de manera específica por una proteína enzimática, la ARN polimerasa, cuya función consiste en sintetizar una molécula de ARN correspondiente a la secuencia codificante del gen (Figura 2). Este proceso es conocido como la transcripción del gen (Figura 3). La molécula de ARN, llamada ARN mensajero (ARNm), va a pasar al citoplasma en donde es reconocida por el ribosoma y utilizada para sintetizar una cadena de aminoácidos. Este proceso corresponde a la traducción (Figura 3). Así, la secuencia nucleotídica del gen codifica para la secuencia en aminoácidos de la proteína. La correspondencia entre cada tipo de aminoácido y una o más tripletas de nucleótidos (codones) define el código genético. (Figura 4). La proteína, en función de su secuencia de aminoácidos tiene una estructura tridimensional característica, directamente relacionada con su función y su actividad. Un organismo eucariote como el camarón posee miles de genes, y por tanto varios miles de proteínas que intervienen en el conjunto de funciones vitales.

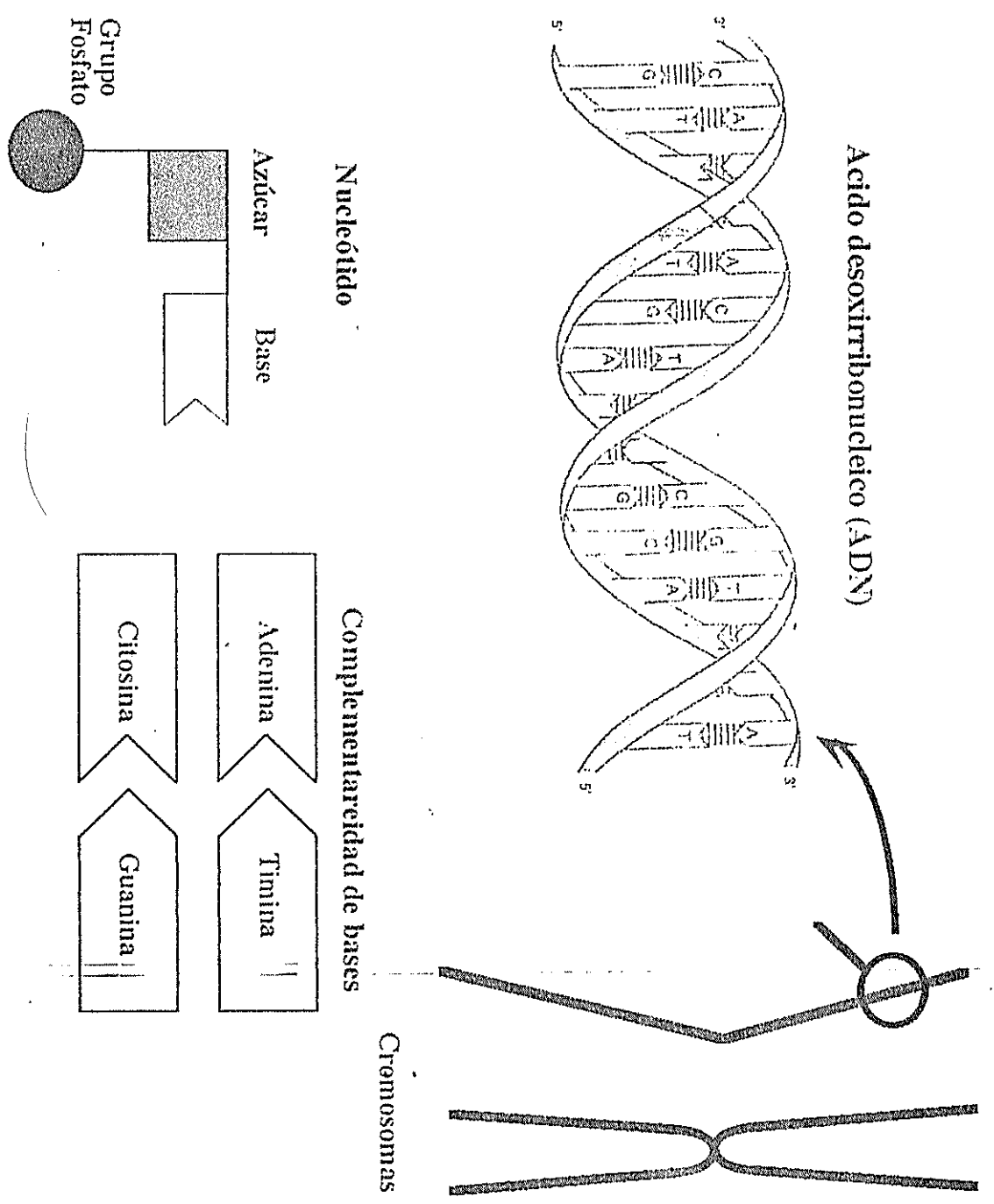


Figura 1: El cromosoma y la molécula de ADN.

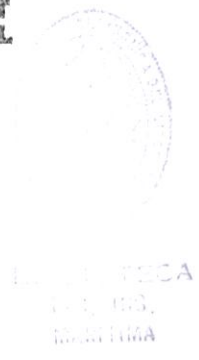
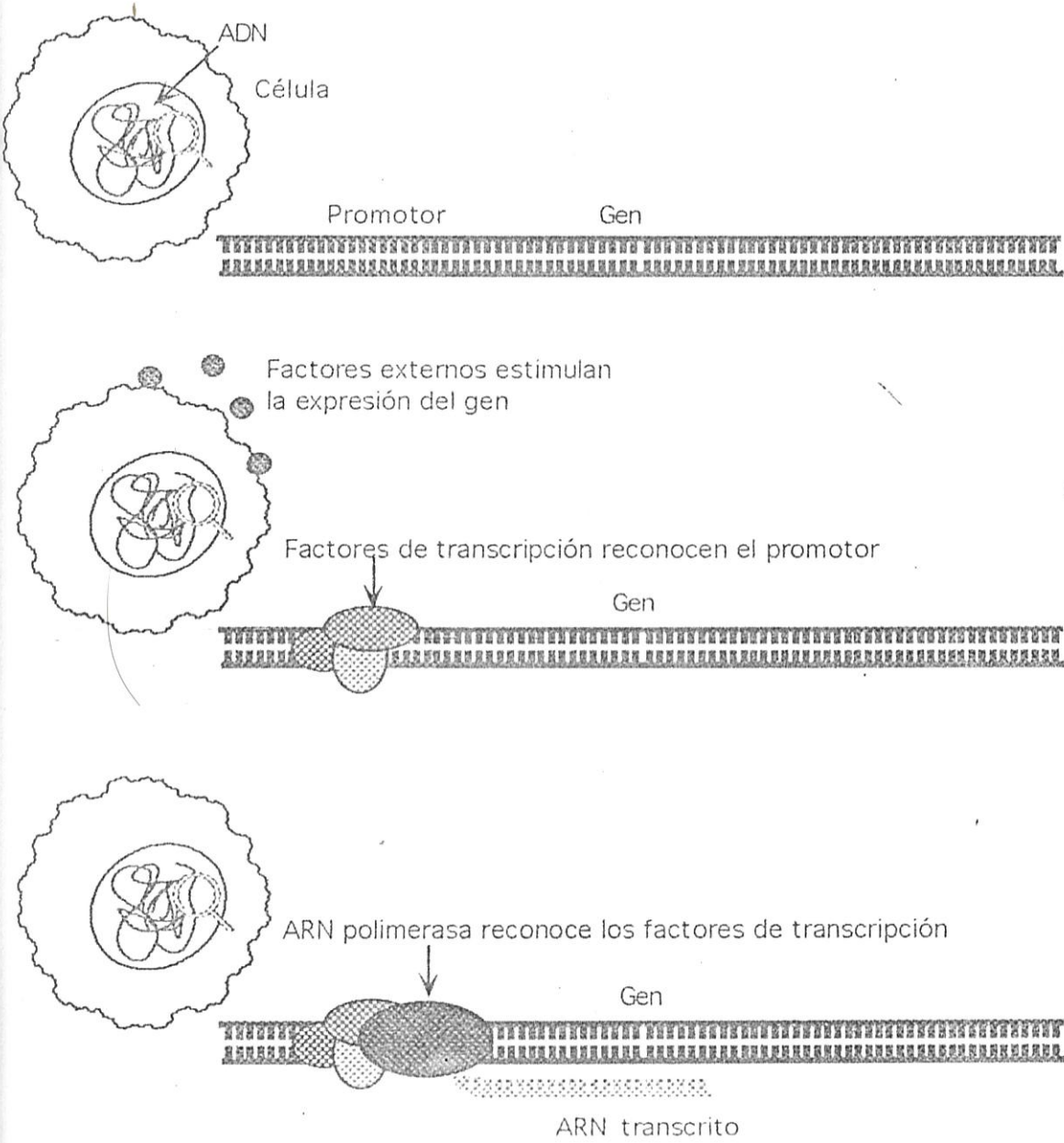


Figura 2: Regulación de la expresión de los genes a nivel de la transcripción.

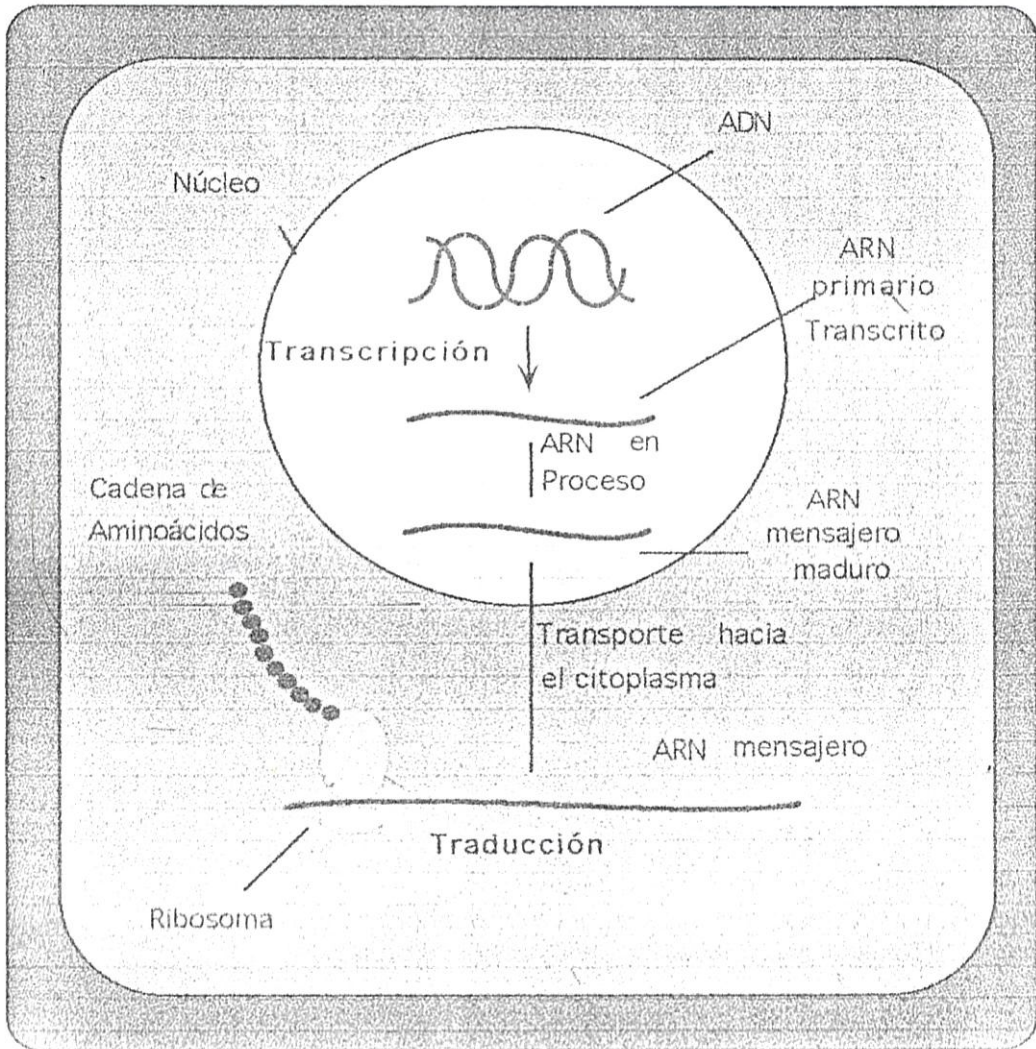
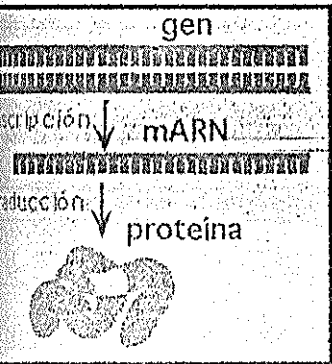


Figura 3: Transcripción y traducción de los genes.

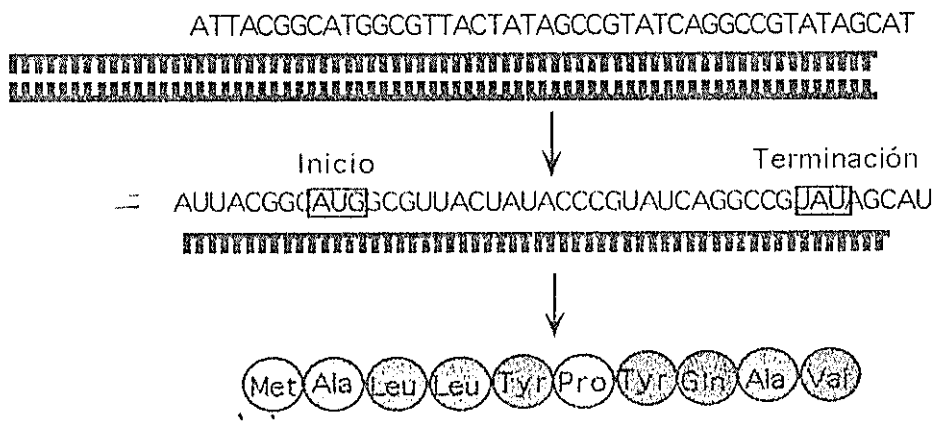
Segundo nucleótido

	U	C	A	G		
P r i m e r n u c l e ó t i d o	U U U U U U C U C U A U U C U	U C U U C C U C C A U C C G	U A U U A C U A A U A G U	U G U U C C U G A U G A U C C G	U C A G	T e r c e r n u c l e ó t i d o
	C U U C U C U A U C U	C C U C C U C C A U C C G	C A U C A C U C A A U C A G	C G U C C U C C A U C C G	U C A G	
	A U U A U C U A U A U G	A C U A C C U A C A U A C C	A A U A A C U A A U A A G	A G U A G C U A G A U A G C	U C A G	
	G U U G U C U G U A U G U C	G C U C C U C C A U C C G	G A U G A C U G A A U G A C	G G U C C U G C C A U G G U C C G	U C A G	

El código genético: Cada aminoácido es codificado por más de un triplete de nucleótidos o codón



El gen codifica la síntesis de una proteína



La secuencia de nucleótidos en el gen determina la secuencia de aminoácidos en la proteína

Figura 4: El código genético



La relación gen-proteína-actividad es la base de los fenotipos monogénicos y por tanto relativamente fácil de establecer, partiendo del gen para llegar a la actividad o, inversamente, a partir de una actividad identificada poder caracterizar el gen. Las técnicas de biología molecular y las estrategias para la identificación de los genes y sus productos son descritas a continuación.

### 1.1.1. Técnicas.

La identificación y la caracterización de genes y sus productos se basan en tres tipos de técnicas, que corresponden a las sondas nucleicas, a las sondas inmunológicas y las pruebas de actividad.

#### 1.1.1.1. Sondas nucleicas.

Una sonda nucleica es un fragmento monocatenario de un ácido nucleico (ADN o ARN) marcado que tiene la propiedad de hibridarse, por complementaridad de sus bases nucleotídicas, con ADNs o ARNs complementarios (Figura 5). De esta forma, es posible detectar la presencia de dicha cadena complementaria en una mezcla de moléculas diversas.

Las sondas nucleicas son herramientas de biología molecular que permiten detectar genes en el genoma intacto o previamente digerido con enzimas de restricción. En el primer caso la técnica utilizada es el dot blot (Figura 6), mientras que en el segundo caso la técnica es el Southern blot (Figura 7). Se puede utilizar una sonda correspondiente a un gen de una especie para detectar el gen equivalente en otra especie (sonda heteróloga), con la condición de que estos genes tengan suficientes similitudes entre ellos.

Las sondas son igualmente utilizadas, mediante la técnica de colony blot, para detectar los clones de interés en librerías de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc) (Figura 8). La expresión de los genes, en términos del tipo y cantidad de ARNms, puede ser analizada gracias a sondas nucleicas mediante la técnica de northern blot (Figura 9).

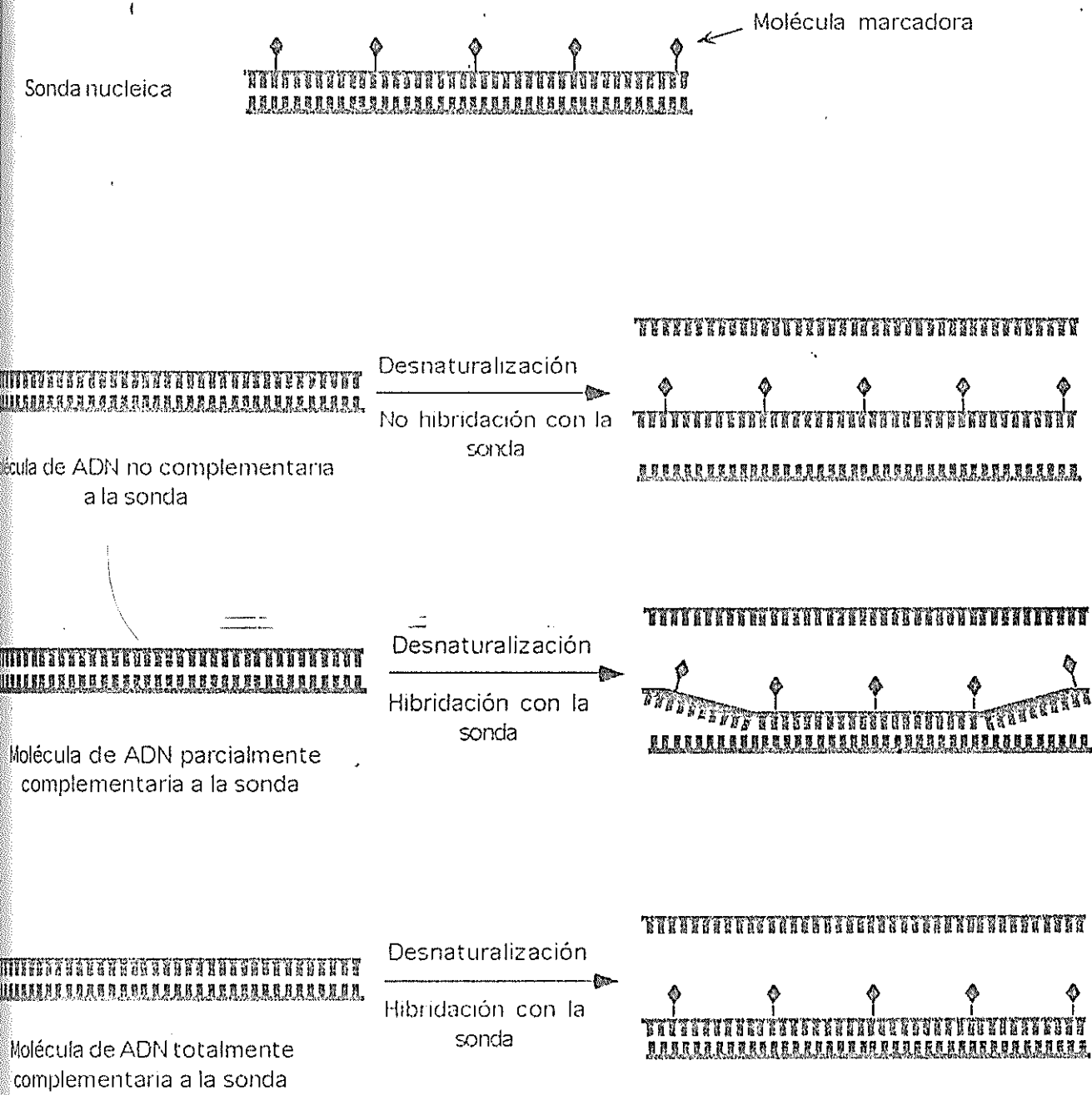
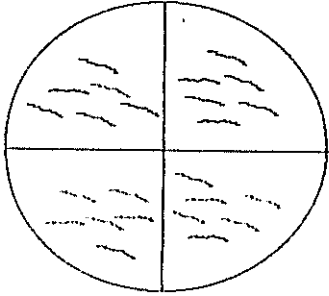
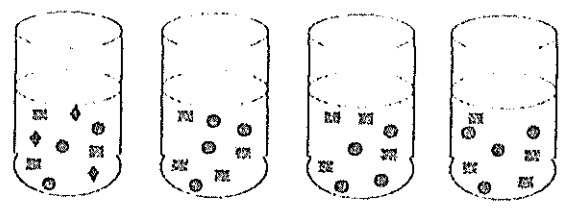
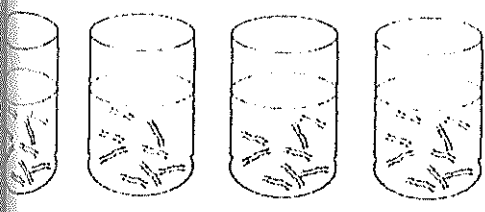


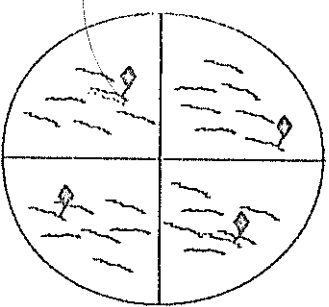
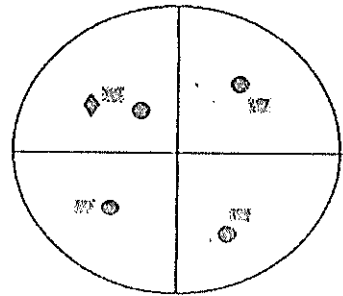
Figura 5: Hibridación de las sondas nucleicas al ADN blanco.

Muestras: mezclas de moléculas de ADN

Muestras: mezclas de antígenos

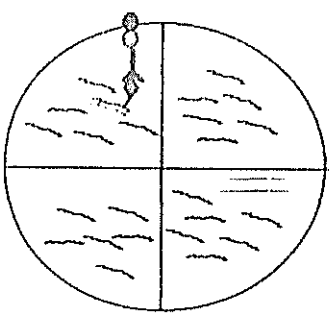
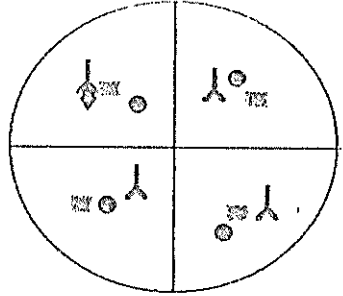


Fijación de las muestras sobre membranas de nitrocelulosa



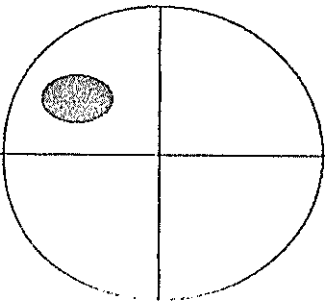
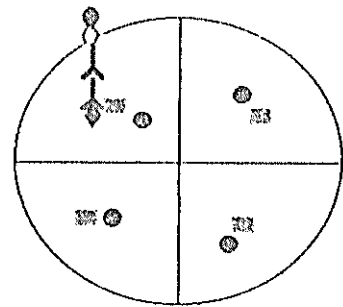
Adición de la sonda específica

sonda nucleica      anticuerpo monoclonal



Eliminación de la sonda no hibridada y revelado

anticuerpo anti- $\blacklozenge$  + molécula reveladora      anticuerpo anti- $\blacktriangle$  + molécula reveladora



Reacción de color indicando presencia de la molécula blanco

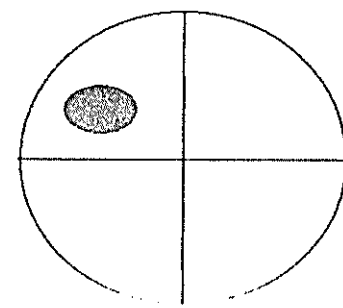


Figura 6: Técnica de dot blot

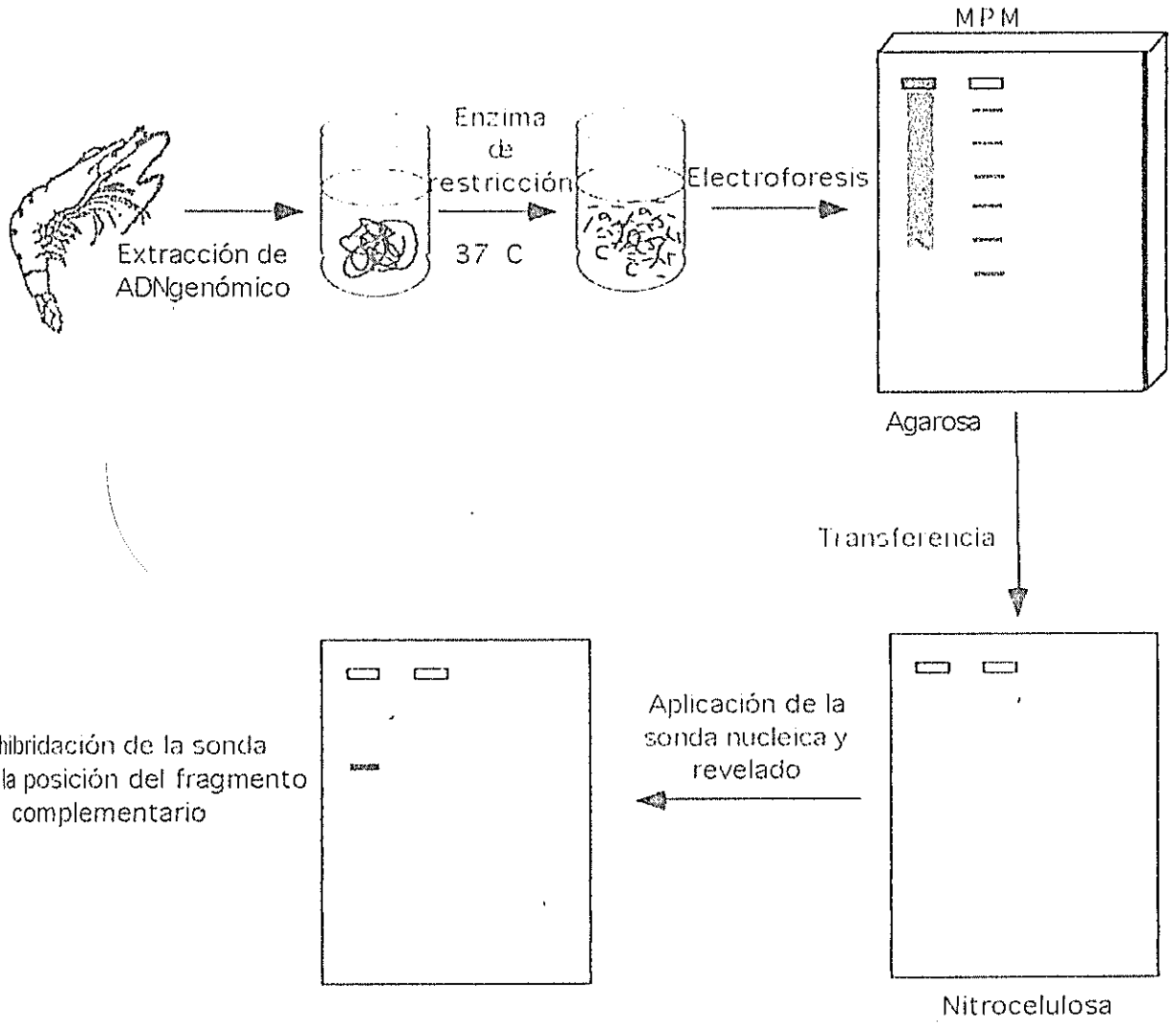


Figura 7: Técnica de Southern blot.

Sondas oligonucleotídicas, así llamadas por referencia a su número de nucleótidos, pueden ser utilizadas en parejas como iniciadores en la reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction), que permite amplificar un fragmento de ADN correspondiente a la secuencia localizada entre los dos iniciadores (Figura 10). Esta reacción corresponde a una amplificación exponencial, lo que permite detectar con una gran sensibilidad un gen.

#### 1.1.1.2. Sondas inmunológicas.

Moléculas o microorganismos (bacteria, virus, parásito) introducidos natural o artificialmente en un vertebrado son generalmente reconocidos como elementos extranjeros o antígenos (Ag), y conducen a la producción de anticuerpos (Ac) específicos que son inmunoglobulinas secretadas por los linfocitos B. Los anticuerpos se fijan específicamente sobre los antígenos correspondientes, lo que conlleva a la formación de un complejo Ag/Ac (Figura 11) (Padlan, 1977; Paul, 1993). Las proteínas constituyen excelentes antígenos y su inyección en animales de laboratorio, tales como ratones o conejos, permite obtener fácilmente inmunoseros con una concentración elevada de anticuerpos específicos.

Se pueden obtener dos tipos de anticuerpos. El primer tipo de anticuerpos, llamados policlonales, corresponden al suero del animal inmunizado que contiene una gran variedad de inmunoglobulinas, una parte de las cuales reconoce diferentes componentes del antígeno (epitopes) (Figura 12). Los epitopes de un mismo antígeno, por ejemplo de una proteína, pueden entonces ser reconocidos por una variedad de anticuerpos policlonales específicos de ella. Debido a esta múltiple reactividad, los anticuerpos policlonales pueden reconocer otras proteínas relacionadas o proteínas equivalentes de otra especie si ellas tienen epitopes similares. El segundo tipo de anticuerpos, llamados monoclonales, corresponde a inmunoglobulinas estrictamente específicas de un epitope. Tales anticuerpos monoclonales son generalmente producidos por células llamadas hibridomas, que resultan de la fusión de un linfocito con un mielocito por medio de la

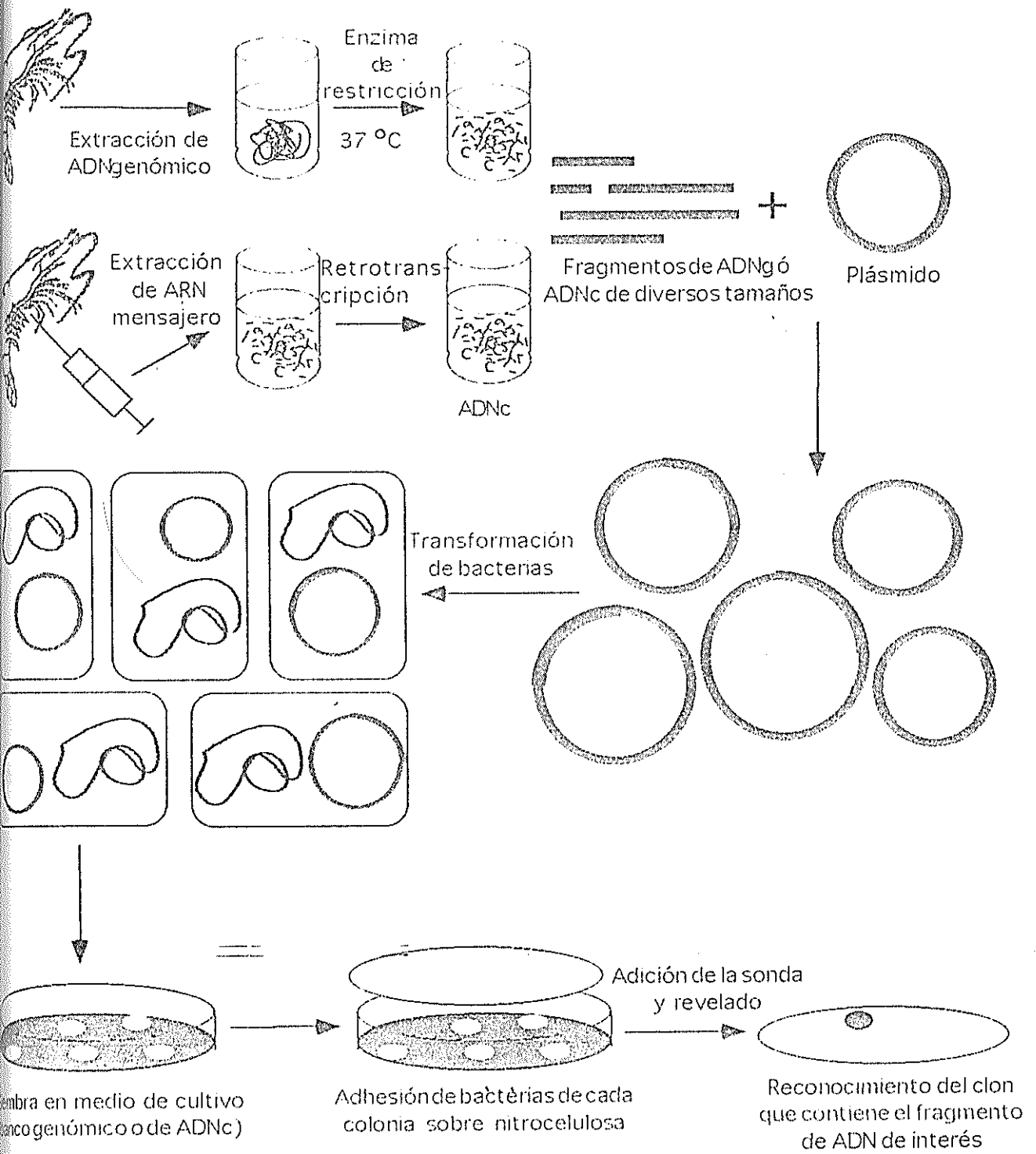
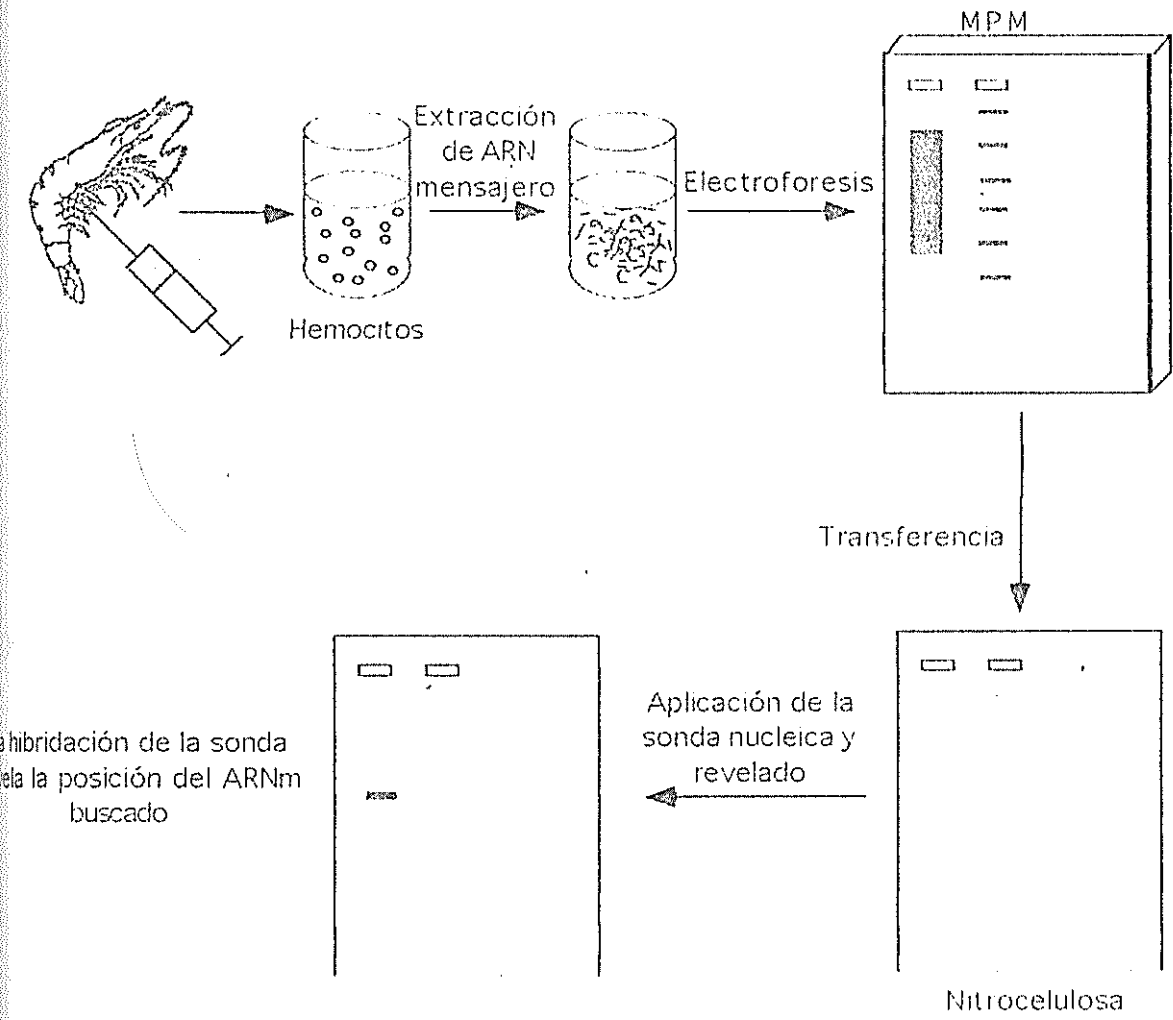


Figura 8: Selección de clones en bancos de ADNg y ADNc.



UNIVERSIDAD  
DE LA  
CIENFUEGA

Figura 9: Técnica de northern blot.

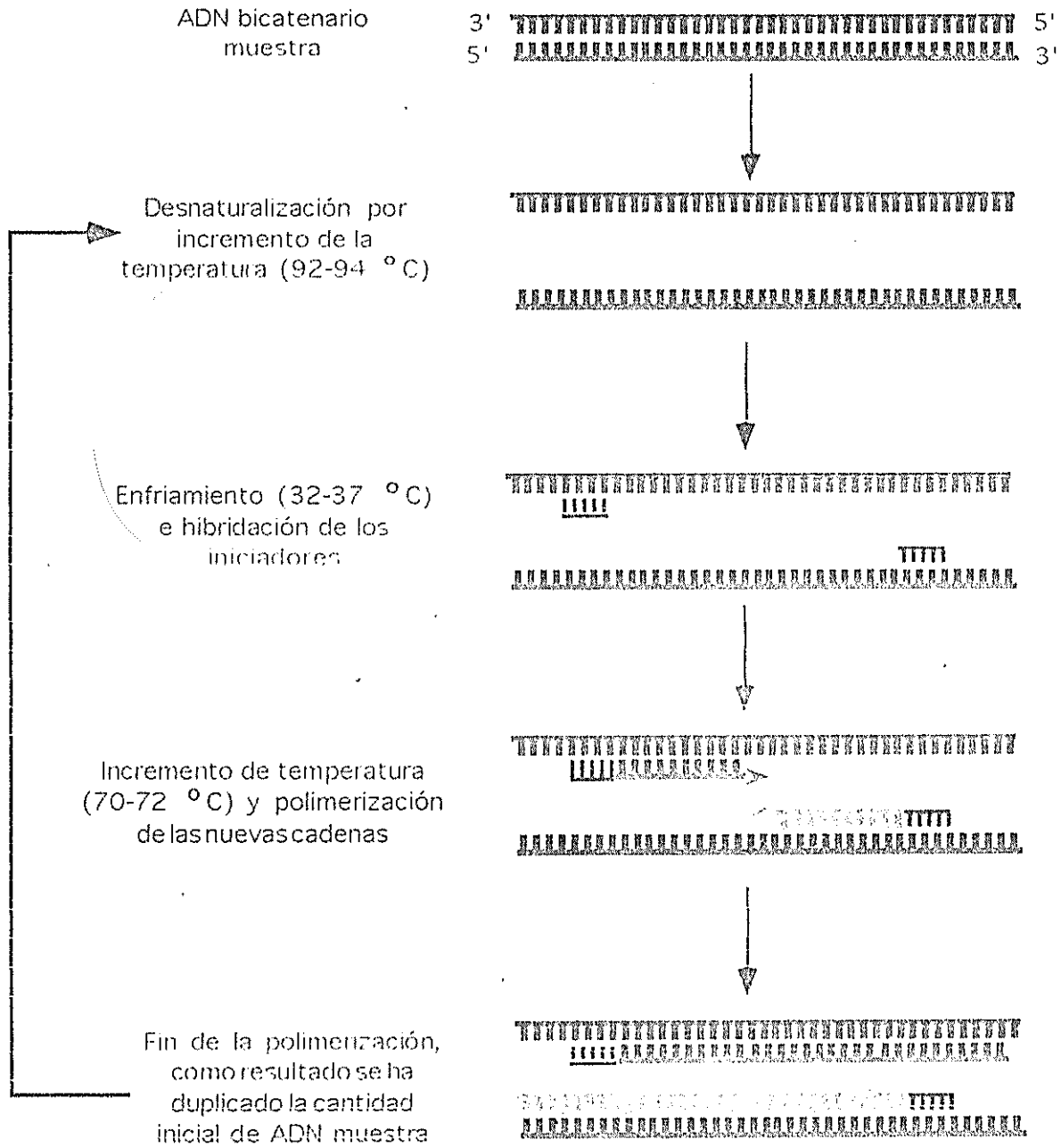
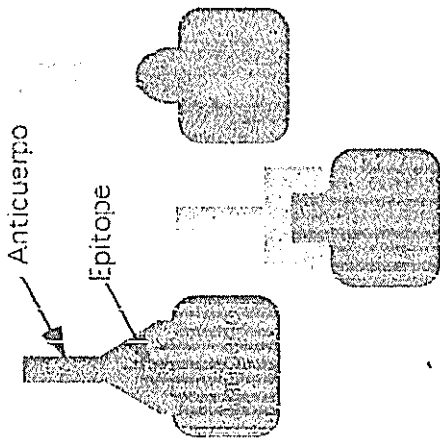
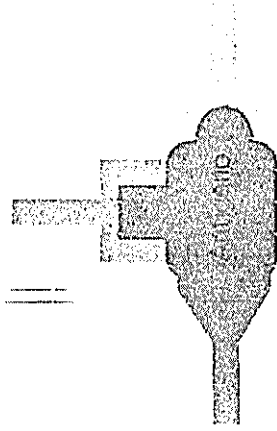


Figura 10: Principio de la PCR.





Cada anticuerpo reconoce únicamente una porción de un antígeno llamada epitope



Varios anticuerpos pueden reconocer simultáneamente sus epitopes en un antígeno

Figura 11: Relación antígeno-anticuerpo.

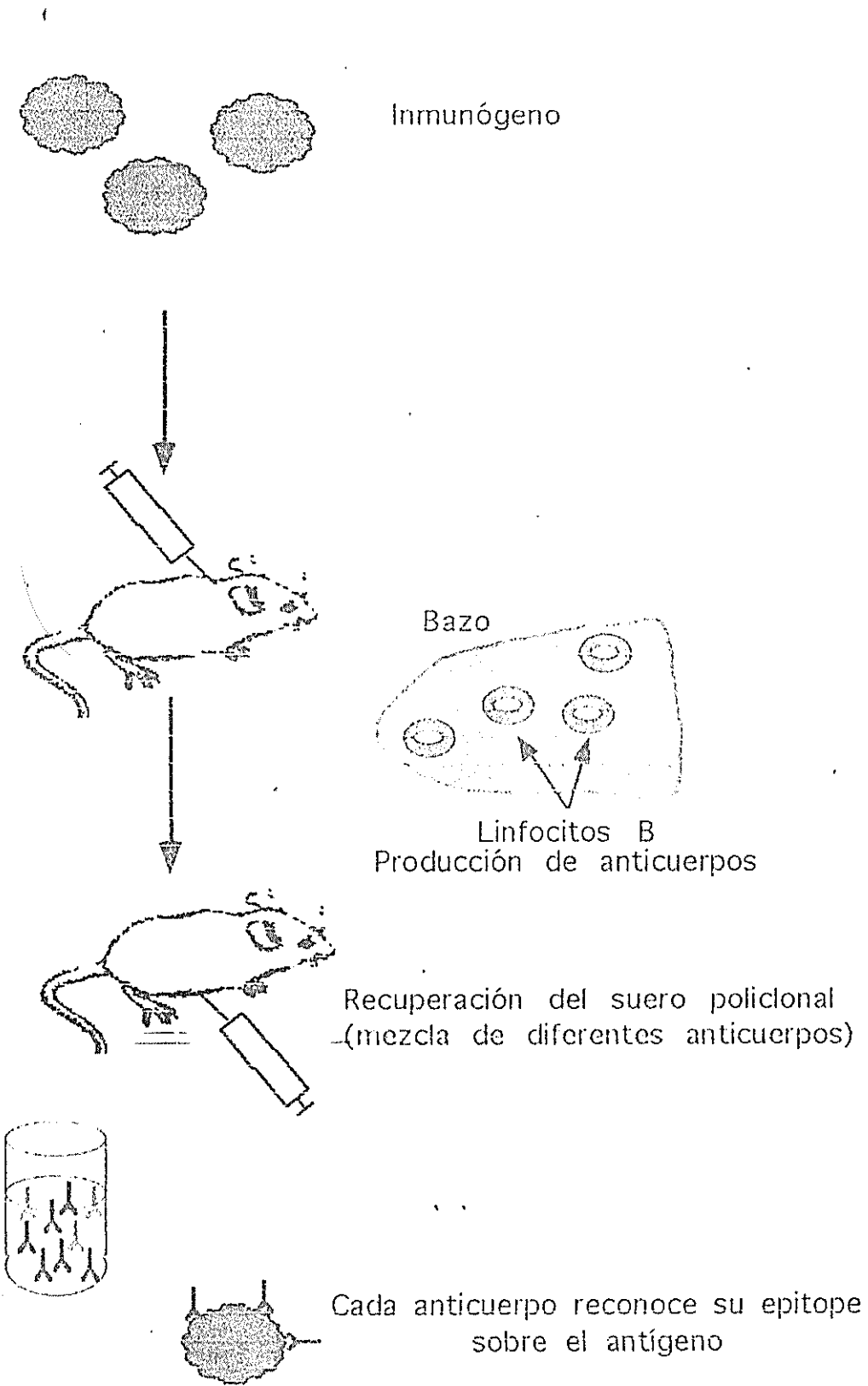


Figura 12: Producción de anticuerpos policlonales.

tecnología de hibridación linfocitaria (Figura 13). Los Ac monoclonales pueden distinguir epítopes que difieren únicamente en un aminoácido (Figura 14).

Los anticuerpos pueden ser utilizados como reactivos para detectar una proteína mediante diferentes técnicas que dependen del tipo de marcador acoplado a la inmunoglobulina. Los marcadores más frecuentemente utilizados son moléculas fluorescentes o enzimas, siendo las técnicas aplicadas la inmunofluorescencia (IF) (Figura 15) y la inmunoenzimología (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) respectivamente (Figura 16). Así, la expresión de un gen puede ser analizada en términos de sitio de expresión (inmunohistología) y niveles de expresión (inmunodosificación).

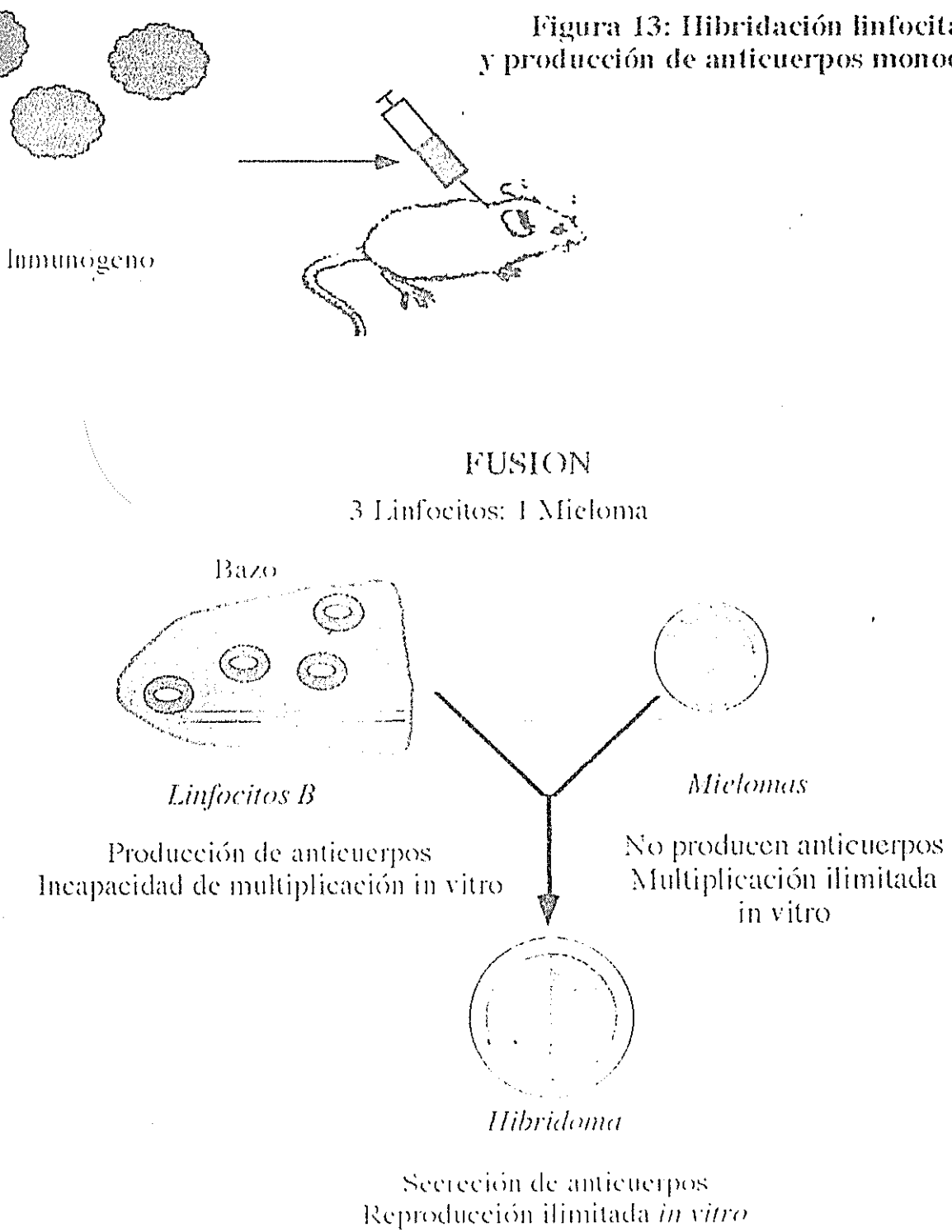
Los anticuerpos pueden también ser utilizados para purificar una proteína mediante la tecnología de cromatografía de afinidad o para detectar la proteína entre las diferentes fracciones protéicas previamente separadas por electroforesis (técnica de Western blot) o por cromatografía (técnica ELISA). Además permiten, mediante la técnica de colony blot, analizar librerías de ADN<sub>g</sub> o de ADN<sub>c</sub> preparadas en vectores de expresión (Figura 17).

Finalmente los anticuerpos, en particular los monoclonales, se presentan como reactivos muy bien adaptados para la caracterización de fenotipos y génotipos, ya que permiten poner en evidencia la presencia de una proteína y reconocer cambios cualitativos relacionados con la existencia de alelos o mutaciones.

#### 1.1.1.3. Pruebas de actividad.

Cada proteína ejerce una función específica al interior o al exterior de la célula. Mientras que algunas proteínas son estrictamente estructurales, otras tienen una actividad, por ejemplo de tipo enzimático o de tipo receptor. La actividad de algunas proteínas puede ser detectada y cuantificada mediante el desarrollo de pruebas más o menos específicas y de esta manera informar sobre la expresión del gen correspondiente. Es posible que ciertas pruebas indiquen la actividad resultante de algunas proteínas reflejando así la expresión conjunta de diferentes genes.

Figura 13: Hibridación linfocitaria y producción de anticuerpos monoclonales



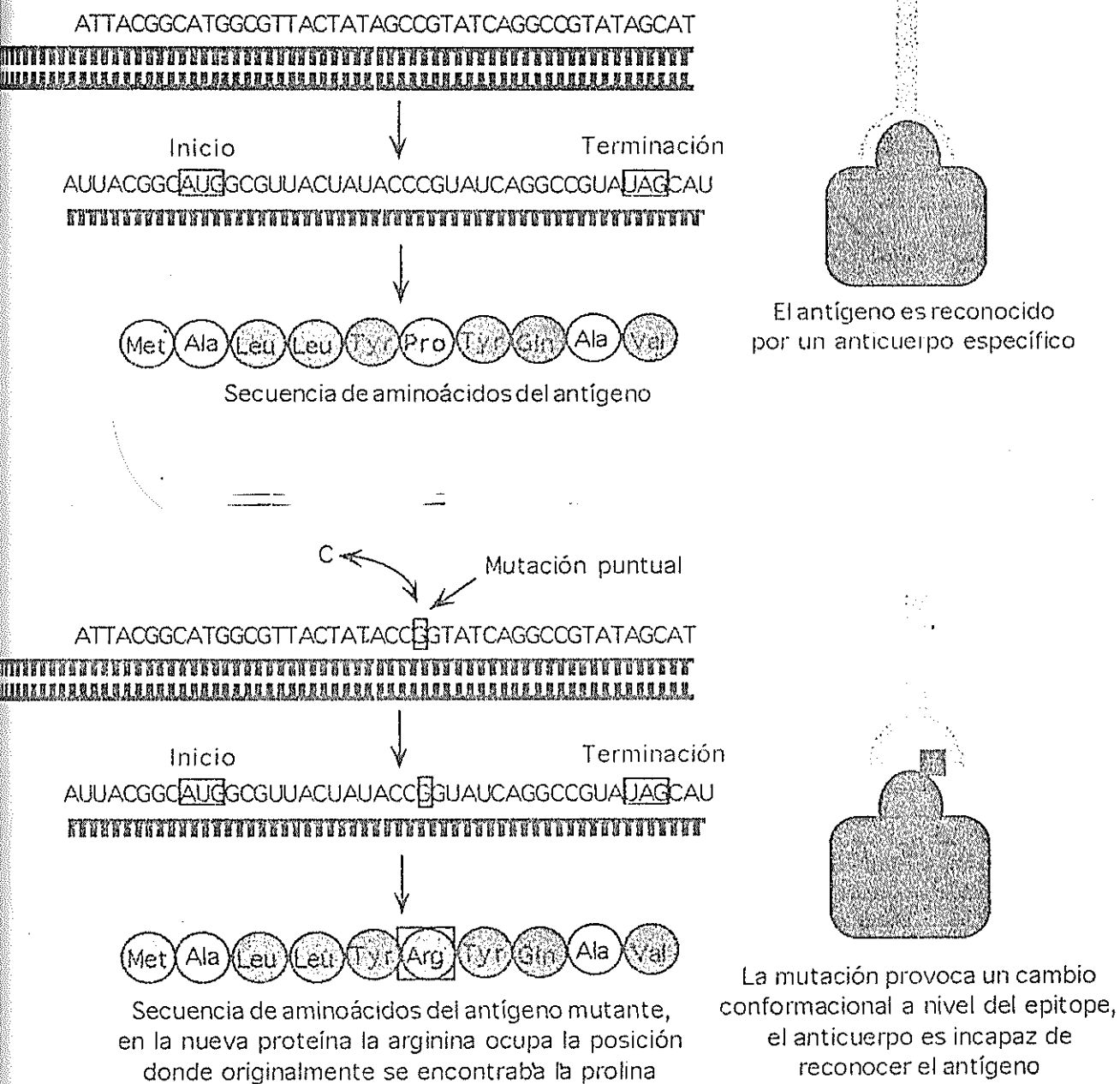
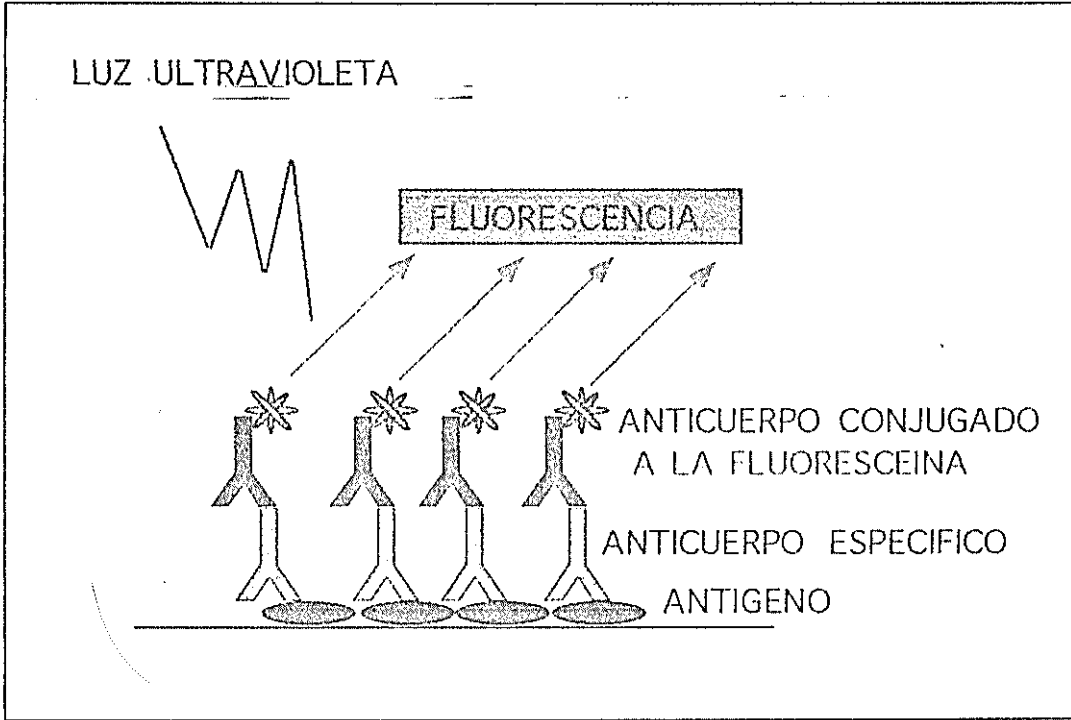
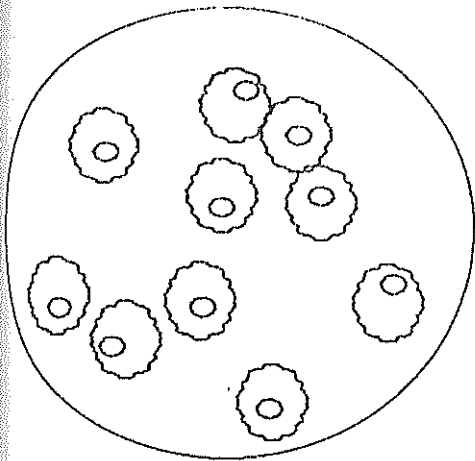


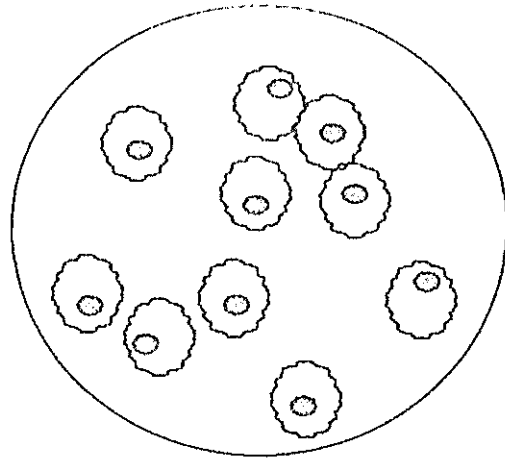
Figura 14: Especificidad de los anticuerpos.



PRINCIPIO DE LA INMUNOFLUORESCENCIA



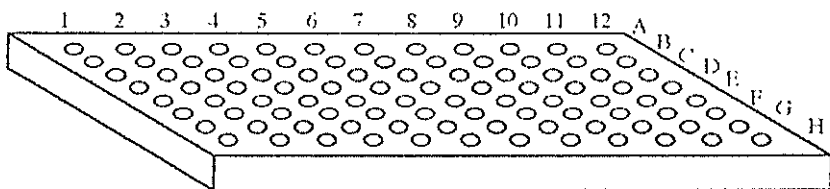
Vista microscópica de hemocitos de camarón



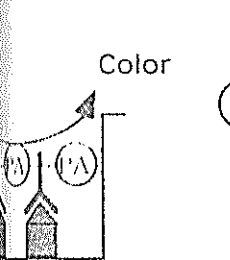
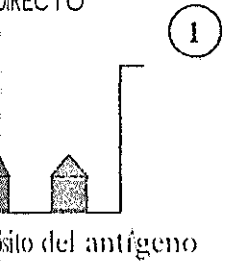
Observación con dispositivo de fluorescencia después de tratar con anticuerpo específico de proteína del núcleo

Figura 15: La inmunofluorescencia.

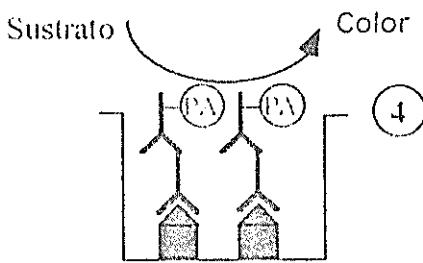
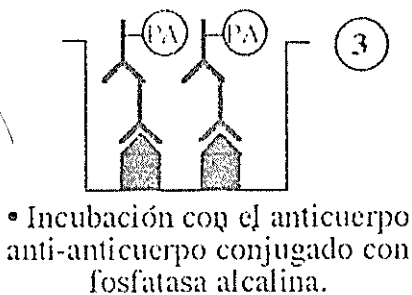
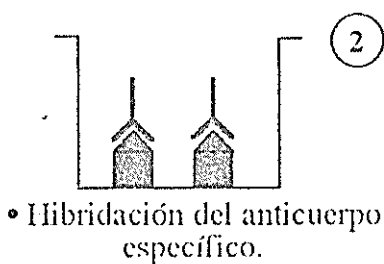
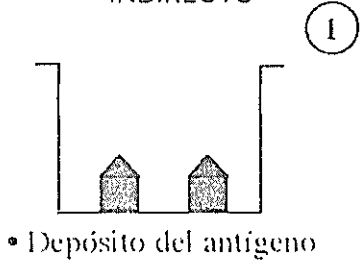
Figura 16: Técnica de ELISA



ELISA DIRECTO



ELISA INDIRECTO



ELISA TIPO SANDWICH

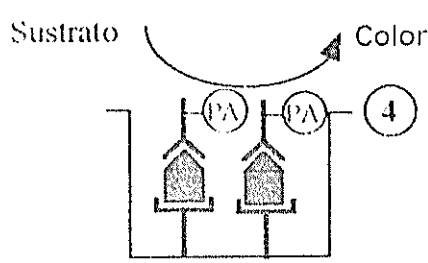
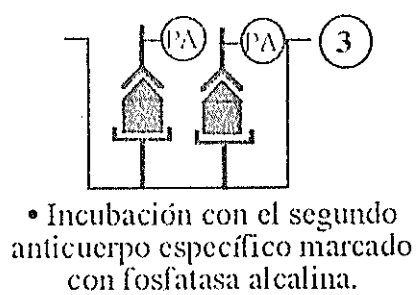
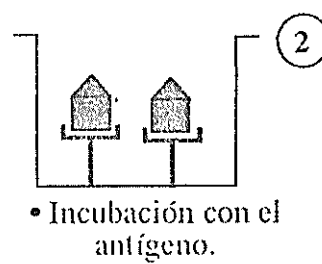
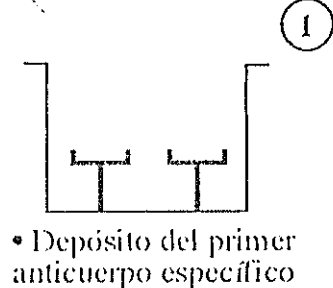
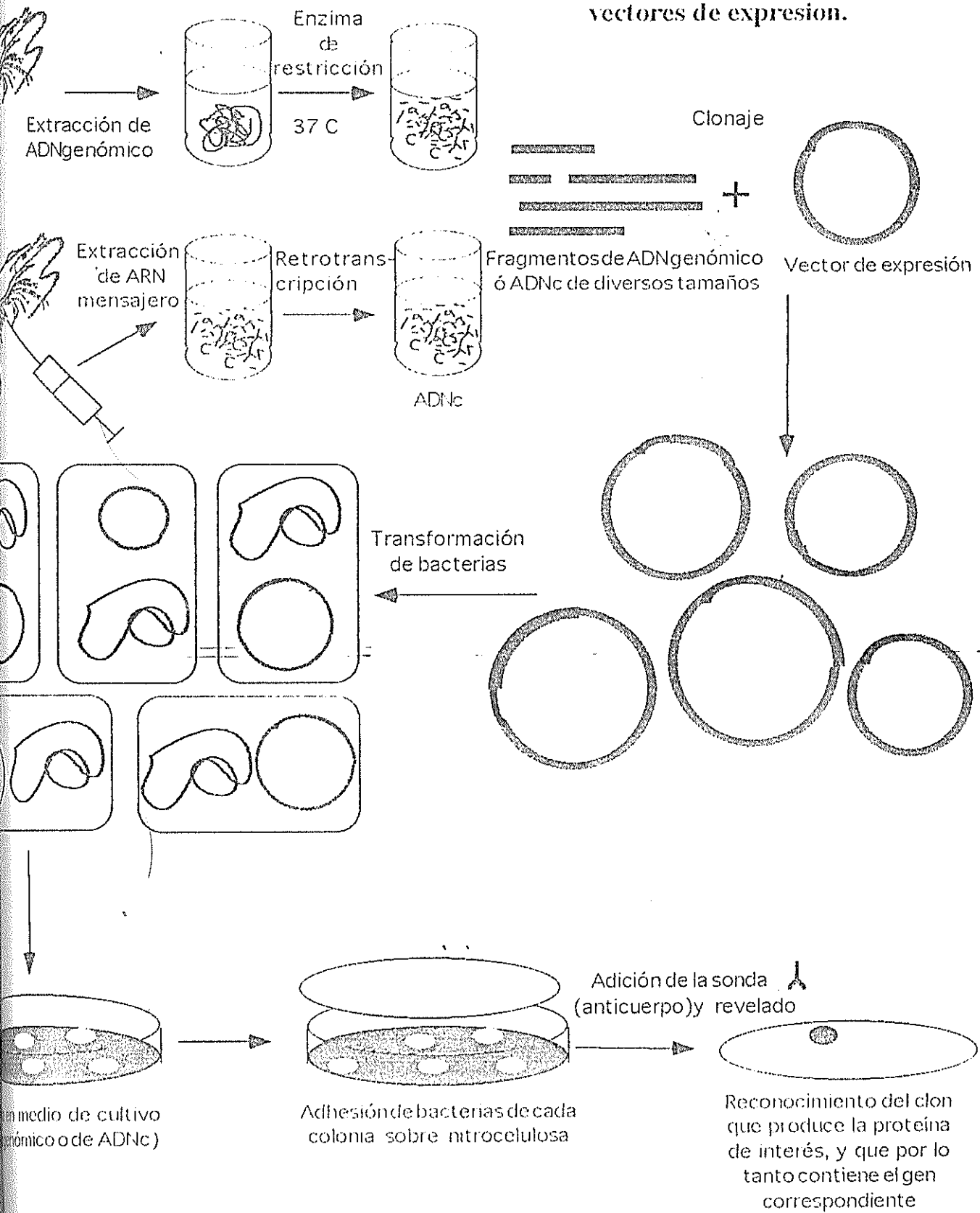


Figura 17: Selección de clones de interés en un banco de ADN construido en vectores de expresión.





La actividad de una proteína confiere al organismo un carácter fenotípico que depende por tanto del genotipo y de factores que influyen en la expresión del gen, entre ellos los factores endógenos (hormonas, etc.) y los exógenos (efecto del medio).

### 1.1.2. Estrategias.

Clásicamente se siguen diferentes estrategias de trabajo para identificar y caracterizar genes y sus productos, siendo la elección de la estrategia dependiente del tipo de información y de los reactivos disponibles (Figura 18). En la práctica, la estrategia puede ser iniciada a partir del gen, de la proteína o de la actividad. En lo que concierne a los camarones, existe en la actualidad muy poca información sobre la identificación y la caracterización de genes y sus productos, constituyendo los genes inmunitarios el tema más desarrollado.

#### 1.1.2.1. A partir del gen.

La identificación y la caracterización de un gen pueden ser fortuitas, resultantes del análisis de secuencias nucleotídicas de fragmentos del ADN, ya sea a partir de librerías de ADNg o de ADNc, o de productos de amplificación por PCR. Estos análisis están basados en comparaciones con bancos de secuencias nucleicas que actualmente contienen información sobre miles de secuencias de organismos eucariotes, procariotes y virales, siendo la similitud de dichas secuencias bastante útil para proporcionar información sobre la naturaleza del gen identificado. Además existen programas informáticos eficaces que permiten analizar cualquier secuencia y determinar así numerosas características del gen, por ejemplo la presencia de intrones y enhancers.

La identificación de un gen puede también resultar de la utilización de una sonda nucleica heteróloga disponible y que corresponda a un gen equivalente caracterizado en otra especie. La similitud entre secuencias del gen previamente caracterizado y del gen buscado debe ser suficiente para que la sonda heteróloga pueda hibridarse. Esta reactividad es evaluada generalmente, en primera instancia, en base a la técnica de

Southern blot y, en segunda instancia, en base a la técnica de colony blot para detectar clones interesantes en librerías de ADNg o ADNc.

La identificación de un gen puede finalmente resultar de la amplificación específica por PCR, utilizando iniciadores correspondientes a secuencias "consensus", que son altamente conservadas entre los genes del mismo tipo pero caracterizados en diferentes organismos.

A partir de la información sobre la secuencia de genes se puede deducir la secuencia de aminoácidos y, subsecuentemente sintetizar péptidos utilizados para inmunizar ratones y producir anticuerpos monoclonales específicos. La disponibilidad de estos anticuerpos, mediante una prueba de tipo ELISA, permite hacer la dosificación de la proteína y así evaluar la expresión del gen considerado. En base a técnicas de inmunohistología, como la IF, se puede determinar en cualquier tipo de células el gen expresado.

Paralelamente, el clonaje del gen en un vector de expresión bacteriano o eucariote permite la producción de la proteína en gran cantidad y, subsecuentemente, analizar su función mediante pruebas existentes para el mismo tipo de proteína o mediante el desarrollo de pruebas específicas.

#### 1.1.2.2. A partir de la proteína.

Proteínas purificadas mediante técnicas de electroforesis o de cromatografía pueden constituir el punto de partida para la identificación y la caracterización de un gen y su producto.

A partir de alrededor de 1µg de proteína purificada, se puede obtener fácilmente la secuencia de aminoácidos por medio de un sistema automático. Esta información conduce a la deducción de una secuencia aproximada de nucleótidos en base al código genético. Subsecuentemente el trabajo consiste, por una parte, en analizar la secuencia por referencia

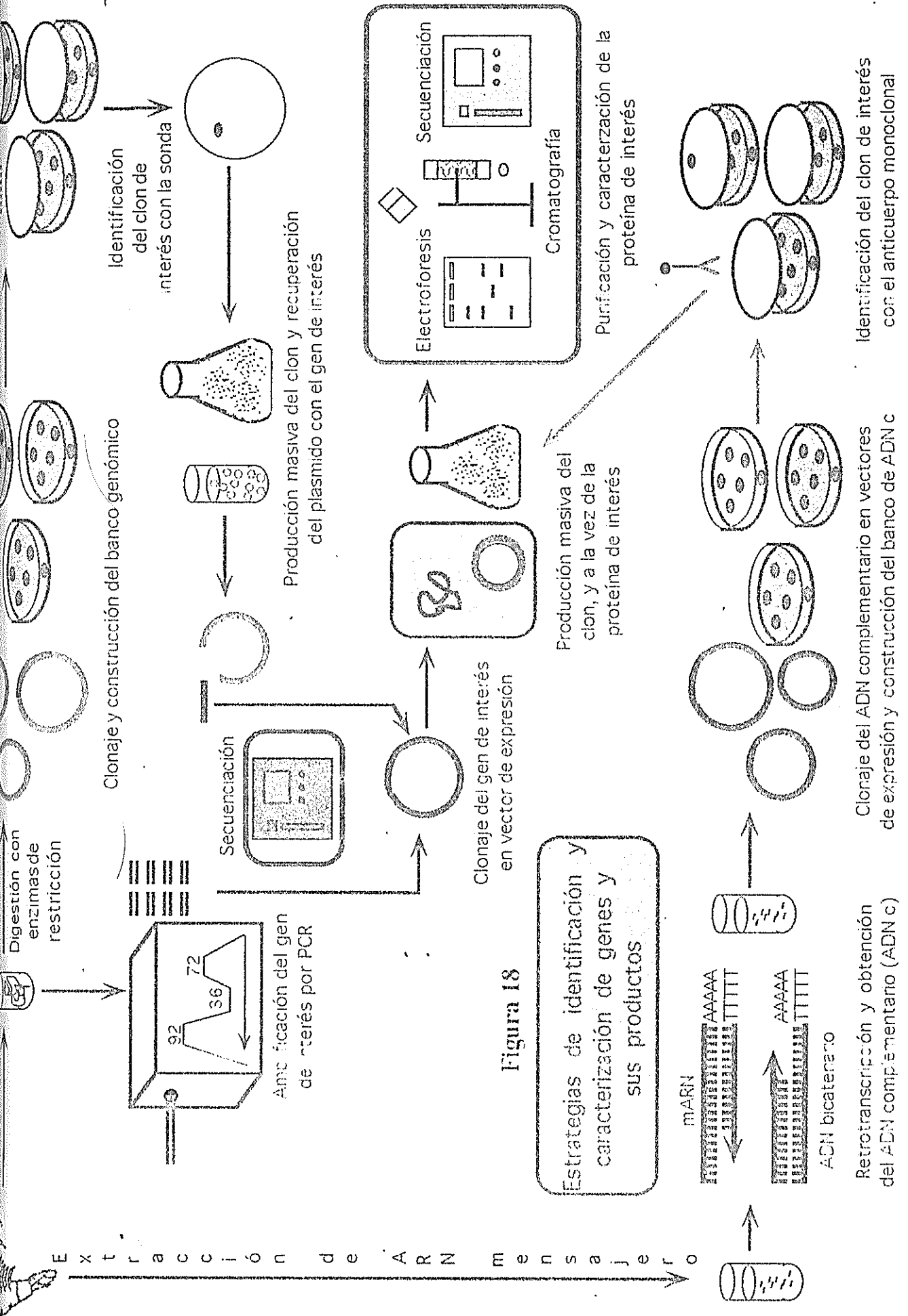
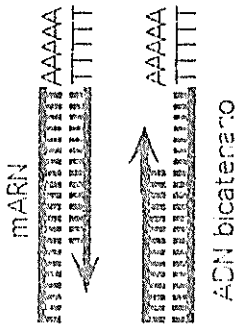


Figura 18

Estrategias de identificación y caracterización de genes y sus productos



Retrotranscripción y obtención del ADN complementario (ADN c)

a bancos de secuencias y determinar homologías con proteínas relacionadas y, por otra parte, en sintetizar iniciadores oligonucleotídicos.

Con estos iniciadores, basándose en la técnica de PCR, se pueden amplificar los ADN<sub>g</sub> y ADN<sub>c</sub> para caracterizar el gen y su ARNm respectivamente, lo que permite determinar con precisión la organización del gen (promotor, intrones, enhancer, etc.).

Los productos de amplificación pueden ser utilizados como sondas nucleicas para analizar la expresión del gen desde el punto de vista espacio-temporal, aplicándose la técnica de northern blot para detectar y cuantificar los ARNms.

Paralelamente, se pueden preparar fácilmente anticuerpos específicos por medio de la inmunización de ratones, siendo estos anticuerpos útiles para estudiar la función de la proteína inicialmente purificada.

#### 1.1.2.3. A partir de la actividad.

La actividad de una proteína puede constituir la base para la identificación y la caracterización de un gen y sus productos, siendo el trabajo mucho más complejo si se trata de una actividad resultante de algunas proteínas y de hecho de algunos genes. En efecto, en el primer caso la actividad es de tipo monogénico mientras que en el segundo se trata de un fenotipo poligénico, por lo que es generalmente más fácil buscar marcadores genéticos que intentar identificar el conjunto de genes involucrados.

En la práctica, la disponibilidad de una prueba para detectar y cuantificar la actividad de una proteína permite emprender su purificación. En efecto esta prueba es utilizada para analizar todas las fracciones obtenidas durante el proceso de separación y purificación. Una vez que la proteína ha sido purificada, la estrategia es la misma que se describió previamente.

En lo que concierne a los camarones, recientemente fue posible purificar, a partir de una actividad antibacteriana del plasma detectable con una simple prueba

espectrofotométrica, algunos péptidos antibacterianos (Destoumicux *et al.*, 1997). La caracterización de los genes y sus productos respectivos está casi concluída.

## 1.2. Marcadores genéticos.

Los caracteres cuantitativos corresponden generalmente a fenotipos poligénicos basados en sistemas complejos genes-proteínas-actividades. En este caso, la relación fenotipo-genotipo es difícil de establecer a nivel de los genes y, como alternativa, se puede buscar una relación fenotipo-genotipo basada en marcadores a nivel del genoma.

Los marcadores genéticos son utilizados en selección como herramientas para evaluar la variabilidad genética a nivel de poblaciones de organismos, para identificar precoz e inequívocamente individuos con características económicamente interesantes y, subsecuentemente, para aumentar notablemente la eficiencia de los programas de mejoramiento genético (Carbonell *et al.*, 1992; Chalmers *et al.*, 1992; Lande & Thompson, 1990; Tassanakajon *et al.*, 1997). En plantas, por ejemplo, se han identificado marcadores genéticos asociados con la resistencia al ataque de hongos y bacterias (Gowda *et al.*, 1995; Marti *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1996).

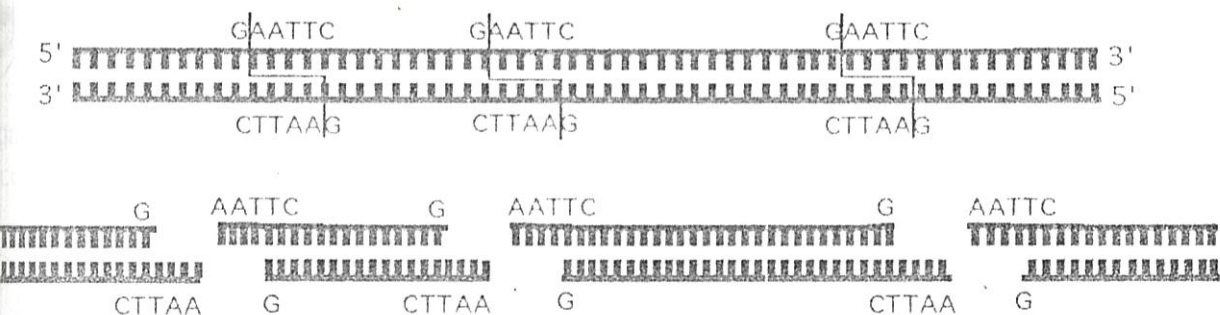
Anteriormente se utilizaron técnicas para analizar la variabilidad genética a nivel de las proteínas, como es el caso de las alozimas. Estas técnicas han sido progresivamente abandonadas debido a que permiten detectar variabilidad, de una parte, únicamente en algunos tipos de proteínas enzimáticas y, de otra parte, sólo si el cambio de aminoácidos conduce a cambios en la movilidad electroforética. Más recientemente, con el adelanto de la biología molecular, se han desarrollado varias técnicas para obtener marcadores para el material genético (Kantanen *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1995; Welsh & McClelland, 1990).

### 1.2.1. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP: Restriction Fragments Length Polimorphism).

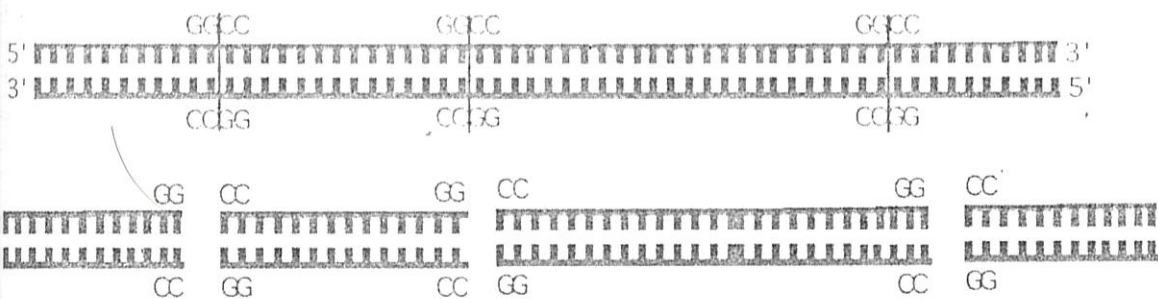
Este tipo de análisis consiste básicamente en la digestión del ADN con endonucleasas de restricción, que son enzimas que cortan el ADN bicatenario a nivel de secuencias nucleotídicas específicas (Figura 19). La presencia de secuencias repetidas conduce a la visualización de bandas de mayor intensidad en el gel de electroforesis con coloración en bromuro de etidio. El perfil de estas bandas, conocido como perfil de restricción, puede ser utilizado para caracterizar el polimorfismo de los organismos considerados a nivel infra o supra-específico (Figura 20).

Frecuentemente, luego de la electroforesis se realiza una transferencia de los fragmentos de restricción sobre una membrana para seguidamente efectuar una hibridación con una sonda nucleica de especificidad conocida. Esta hibridación permite determinar el número y los tamaños de los fragmentos correspondientes a la sonda. Gracias a la tecnología de RFLP se puede determinar el polimorfismo de manera más confiable. Sin embargo su interés se ve limitado debido a la necesidad de utilizar una sonda que permite reconocer solamente fragmentos correspondientes a ella, lo que puede ser inadecuado en términos de marcadores genéticos para caracterizar un fenotipo de interés.

En cambio, en base al RFLP se han construido mapas genéticos para varias especies (Barua *et al*, 1993; Paterson *et al*, 1988; Peltier *et al*, 1994; Redoña & Mackill, 1996; Yu *et al*, 1996) y se ha detectado variabilidad genética en poblaciones de camarones con sondas correspondientes a genes del ADN mitocondrial (ADNmt) (Alcivar-Warren *et al*, 1994 *fide* García *et al*, 1994). En comparación con técnicas más tradicionales como la electroforesis de alozimas, el RFLP es más económico y puede ser aplicado a mayor cantidad de muestras (Hartl & Clark, 1989).



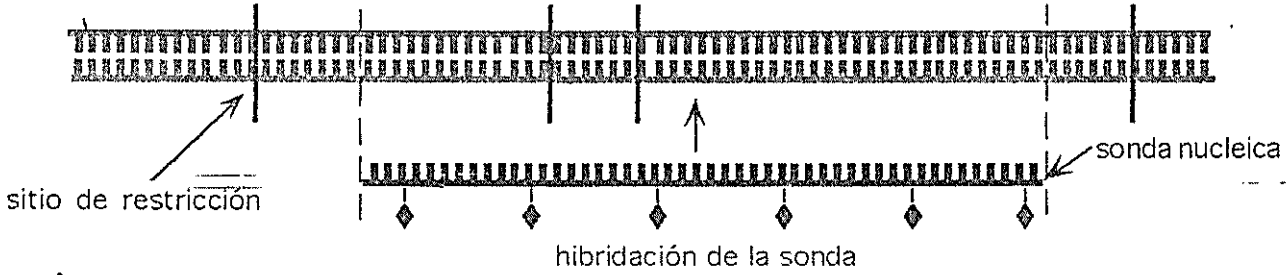
Ciertas enzimas de restricción como Eco RI generan fragmentos de ADN con extremos cohesivos



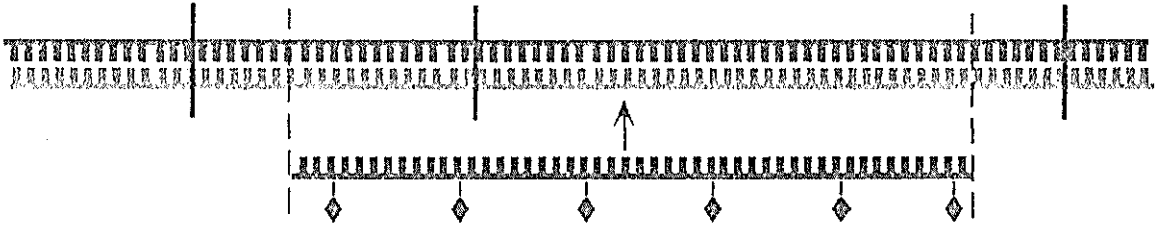
Otras enzimas de restricción como Hae III generan fragmentos de ADN con extremos romos

Las enzimas de restricción cortan fragmentos bicatenarios de ADN reconociendo secuencias específicas de entre 4 y 8 nucleótidos denominadas sitios de restricción

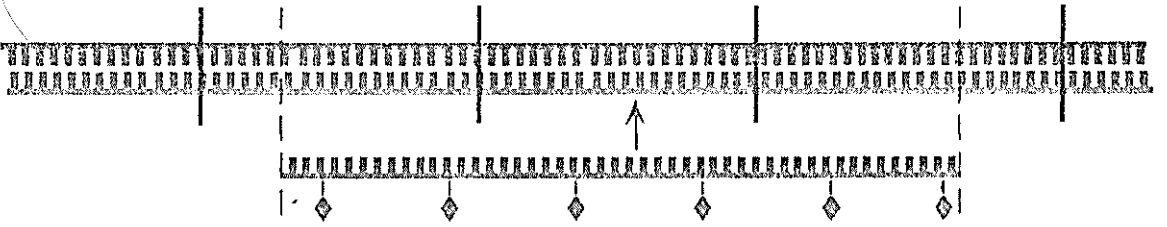
Figura 19: Acción de las enzimas de restricción.



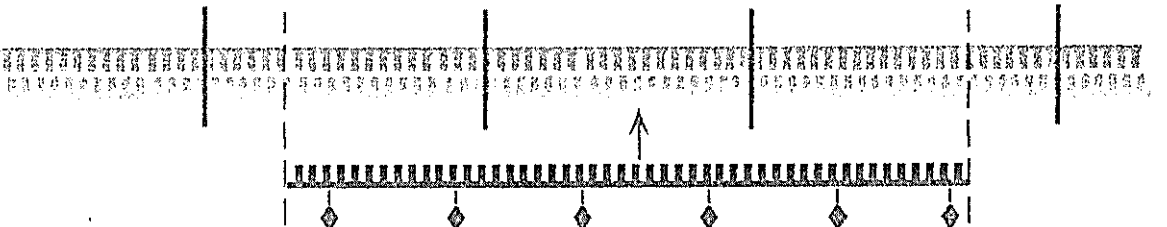
organismo A  
con enzima



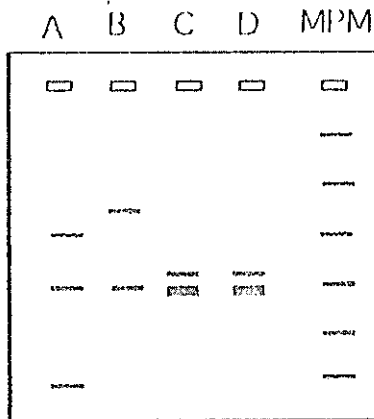
organismo B  
con enzima



organismo C  
con enzima



organismo D  
con enzima



MPM=Marcador de  
Peso Molecular

Patrones de restricción  
determinados mediante  
Southern Blot

Figura 20: Polimorfismos en la  
longitud de fragmentos de  
restricción.



### 1.2.2. ADN mitocondrial (ADNmt).

En la células eucariotas se encuentran las mitocondrias que contienen material genético constituido por una molécula de ADN circular cuya talla varía entre 16 y 35 kb y cuya secuencia es bien conservada. Este organelo es transmitido por vía materna a través del ovocito (Figura 21).

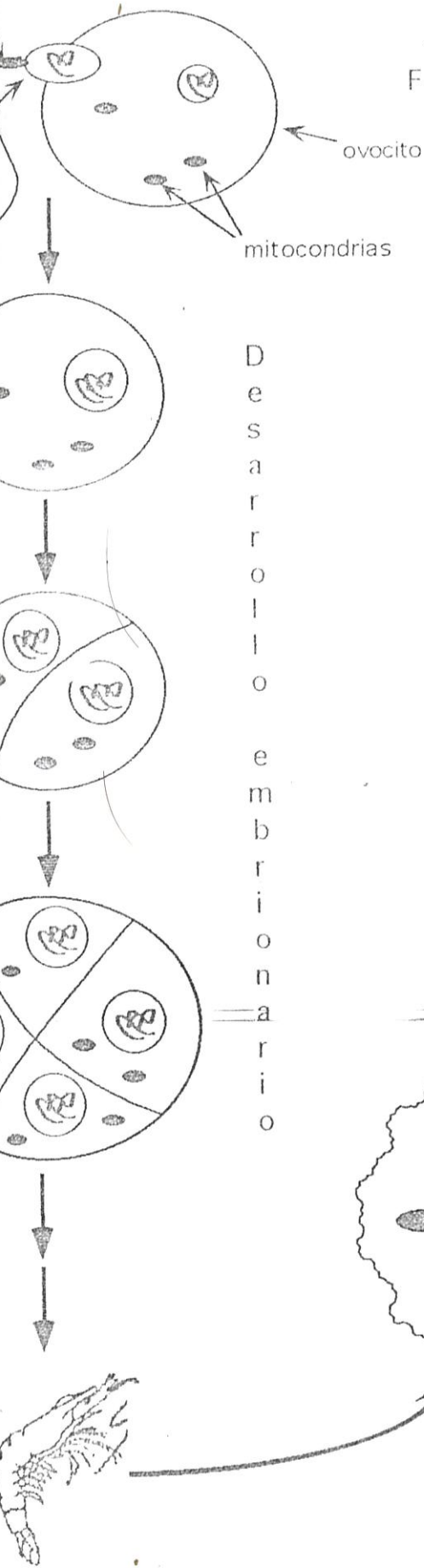
Debido a que se trata de ADN extracromosómico, los marcadores del ADNmt están *a priori* mal adaptados para caracterizar los genotipos de animales con fenotipos de interés, los cuales están relacionados con genes cromosómicos. En cambio, debido a la transmisión materna de las mitocondrias, los marcadores genéticos del ADNmt pueden ser extremadamente útiles para caracterizar líneas en programas de selección.

El polimorfismo del ADNmt ha sido utilizado en camarones para determinar la variabilidad genética a nivel de poblaciones (Palumbi & Benzie, 1991 *vide* García *et al.*, 1994).

### 1.2.3. Microsatélites.

Los microsatélites son cortas secuencias nucleotídicas, generalmente menores de cinco pb, presentes en el genoma bajo la forma de repeticiones contiguas en número muy variable, hasta algunas decenas (Figura 22). Estas repeticiones están presentes en el genoma en diferentes números de copias (Haymer, 1994).

Las secuencias que flanquean los microsatélites son frecuentemente muy conservadas, lo que permite sintetizar oligonucleótidos correspondientes a estas secuencias para utilizarlos como iniciadores en amplificaciones por PCR del ADN genómico. Los productos de amplificación de los microsatélites tienen varios tamaños en función de sus numerosas repeticiones. Los perfiles de estos productos de amplificación son extremadamente útiles como marcadores de polimorfismo al nivel individual.



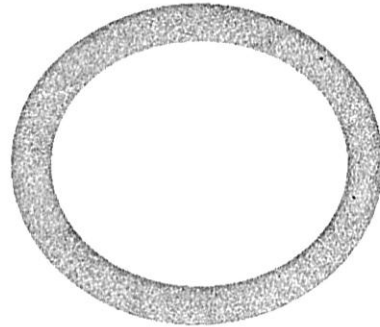
Fertilización

ovocito

mitocondrias

D  
e  
s  
a  
r  
r  
o  
l  
l  
o  
  
e  
m  
b  
r  
i  
o  
n  
a  
r  
i  
o

**Figura 21: Aporte materno del ADN mitocondrial.**



ADN mitocondrial

Corte transversal de una mitocondria

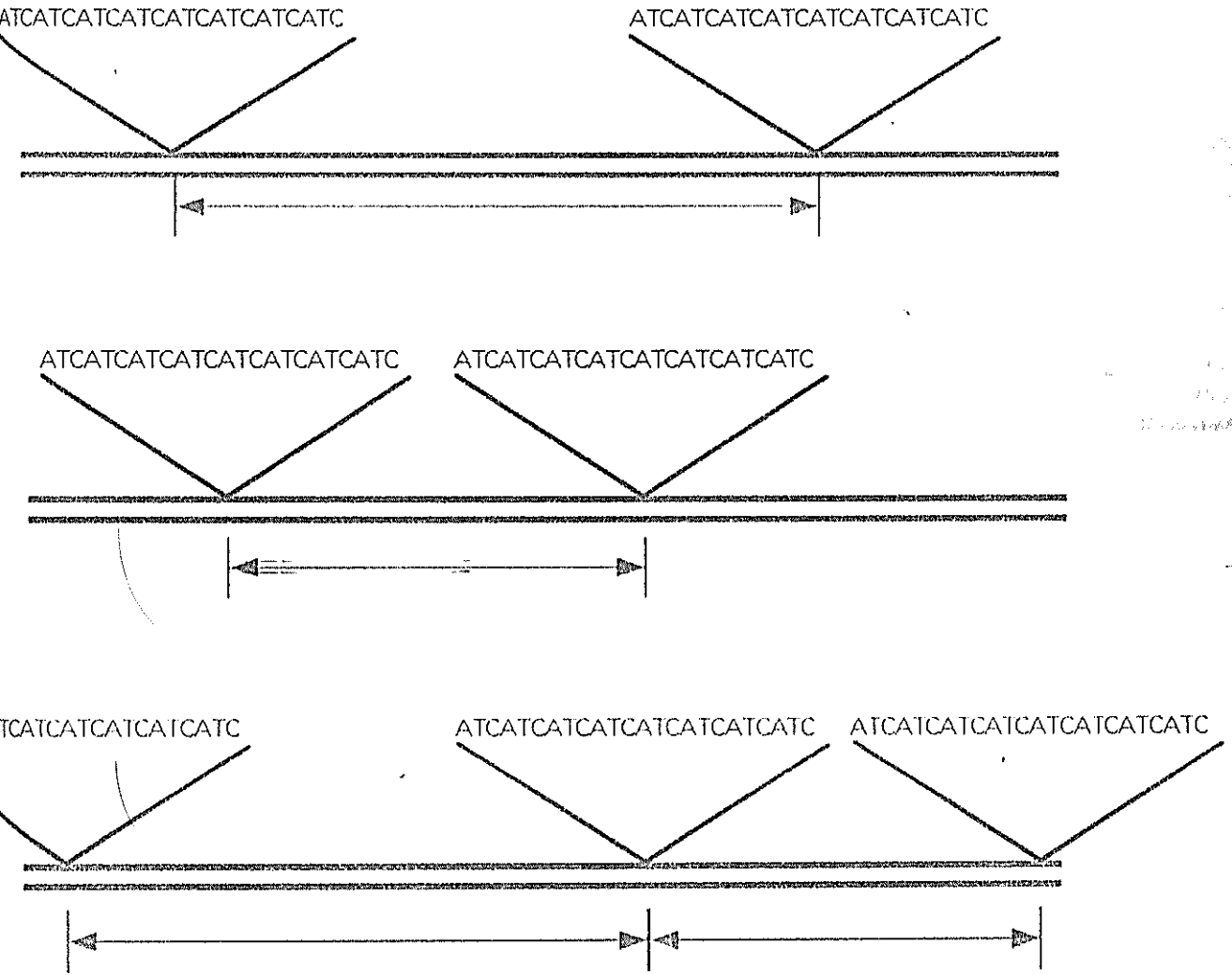
membrana interna

ADN mitocondrial

membrana externa

mitocondrias

Célula somática



series de repeticiones sucesivas de pequeñas secuencias (microsatélites) encontradas a lo largo del genoma eucariote. Las diferencias en la distribución de estas series constituyen polimorfismos genéticos que pueden ser detectados fácilmente con el uso de enzimas de restricción y posterior análisis de Southern Blotting con sondas correspondientes a los microsatélites.

Figura 22: Los microsatélites

Alternativamente, las secuencias microsatélites pueden ser detectadas en ADN digerido con enzimas de restricción mediante la técnica de Southern blot con sondas oligonucleotídicas "microsatélites" (Müller *et al*, 1995). Los marcadores de microsatélites están siendo ampliamente utilizados en estudios de genética poblacional para determinar variabilidad genética, mostrando en algunos casos un mayor nivel de polimorfismo que los RFLPs (Akkaya *et al*, 1992 *fide* Yu *et al*, 1996). Esto parece lógico si se considera que el análisis de microsatélites incluye una mayor proporción del genoma (Haymer, 1994; Yu *et al*, 1996)

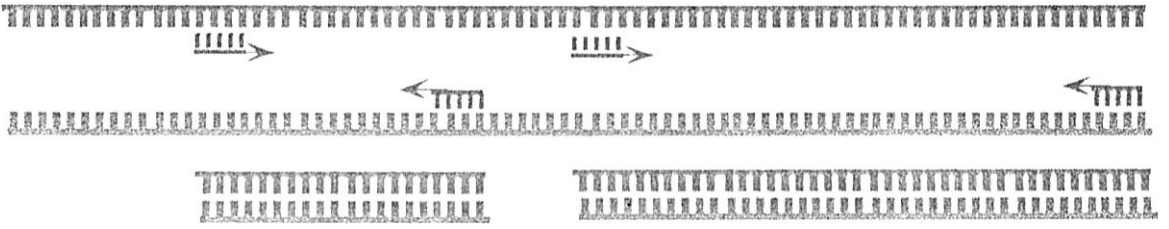
#### 1.2.4. AP-PCR (Alleatory primed polymerase chain reaction).

La técnica de AP-PCR fue desarrollada por Welsh & McClelland y Williams *et al* en 1990 como una variante de la PCR. La particularidad de la AP-PCR es el uso de iniciadores cortos (10-15 pb) con secuencias aleatorias para amplificar segmentos del genoma. Los productos de amplificación aleatoria permiten establecer perfiles electroforéticos específicos de cualquier genoma sin necesidad de tener información previa sobre él (Figura 23) (Welsh & McClelland, 1990). Esta técnica permite, por una parte, obtener tantos marcadores como se requiera simplemente multiplicando el número de iniciadores y, por otra parte, obtener estos marcadores a partir de una cantidad mínima de ADN (alrededor del microgramo o menos). De esta manera es fácil buscar marcadores hasta obtener algunos que sean característicos del fenotipo de interés.

Actualmente, la AP-PCR es una de las técnicas de marcaje genético de mayor aplicación por sus cualidades y también por su simplicidad y economía (Davis *et al*, 1995; Meijer *et al*, 1994; Wolff *et al*, 1993). Su utilización sin embargo, requiere de protocolos bien estandarizados y de condiciones estrictas de trabajo para evitar las variaciones por artefactos y contaminantes (Ayliffe *et al*, 1994; Kernodle *et al*, 1993; Melena, 1997; Schierwater & Ender, 1993).



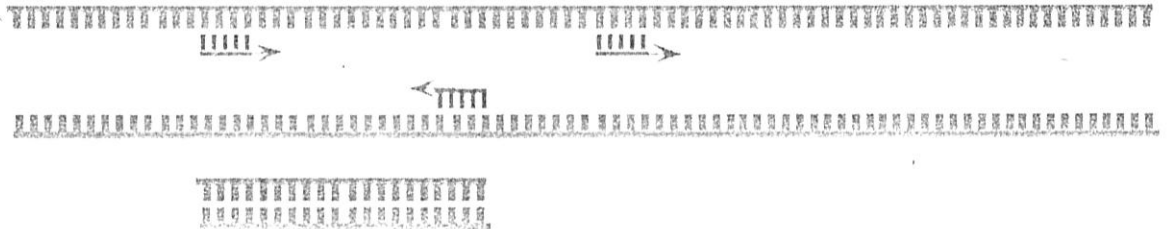
organismo A



organismo B



organismo C



organismo D.

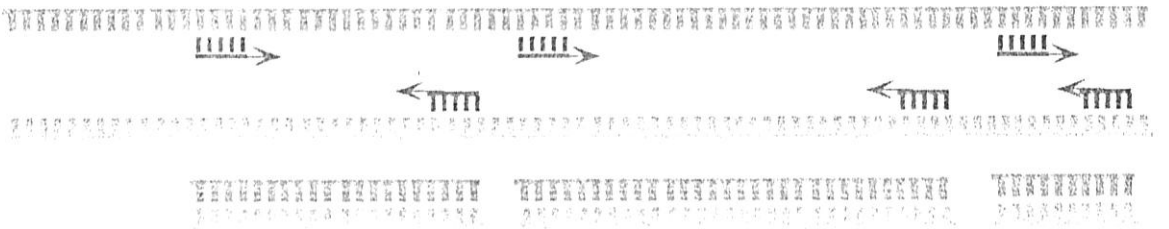
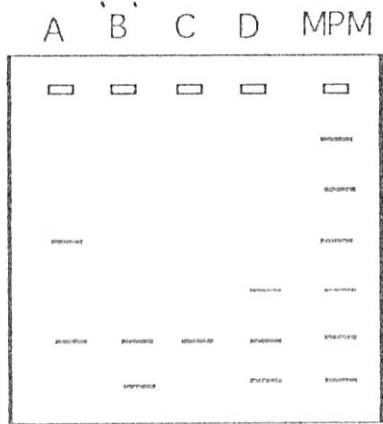


Figura 23: Principio de la AP-PCR para la obtención de perfiles de RAPD.



MPM=Marcador de Peso Molecular  
RAPDs

La técnica de AP-PCR ha sido ya utilizada en variedad de organismos para estudios de variabilidad genética (Brummer *et al*, 1995; Chalmers *et al*, 1992; Meijer *et al*, 1994), relaciones filogenéticas (Abo-elwafa *et al*, 1995; Khalid *et al*, 1993; Kresovich *et al*, 1992; Liu *et al*, 1994) y determinación de marcadores útiles en selección, especialmente en plantas (Barua *et al*, 1993; Martín *et al*, 1991; Pè *et al*, 1993). En estudios de variabilidad genética, la AP-PCR se ha mostrado más eficiente que otras técnicas para poner en evidencia la variabilidad (Baruffi *et al*, 1995; Meijer *et al*, 1994).

En lo que respecta a organismos acuícolas, el interés por el uso de marcadores genéticos es creciente en relación con programas de selección. Los esfuerzos han sido volcados mayoritariamente a especies de peces (Dinesh *et al*, 1996; Leong Foo *et al*, 1995) y, en algún grado, a moluscos (Hu & Foltz, 1996), mientras que hasta ahora poca es la información existente al respecto en camarones. Sin embargo se han aplicado ya técnicas moleculares de caracterización en peneidos (García *et al*, 1994; Garcia *et al* 1996; Melena, 1997; Tassanakajon *et al*, 1997).

Los marcadores de tipo RAPD, al igual que los marcadores de tipo microsatélite, son más y más utilizados para identificar los cromosomas asociados a los caracteres de interés, sea esto por la vía de técnicas de hibridación *in situ* realizadas en cariotipos o por la vía del análisis de la segregación de marcadores cruzando líneas; los marcadores llevados por un mismo cromosoma segregarán de manera conjunta más frecuentemente. Teniendo en cuenta la existencia de fenómenos de crossing over entre las cromátidas correspondientes a un par de cromosomas es sin embargo posible que marcadores asociados a un mismo cromosoma puedan segregarse separadamente en el curso de la meiosis. En estas condiciones, mientras más cerca se encuentre un marcador a un gen implicado en un fenotipo, más frecuentemente será observado en asociación con el fenotipo, lo que corresponde al concepto de QTL (Quantitative Trait Locus) (Edwards *et al*, 1987; Paterson *et al*, 1988). La identificación de marcadores de un QTL abre por lo tanto la vía a la caracterización molecular del locus y subsecuentemente a la identificación

del gen responsable del caracter, o más precisamente responsable en parte del caracter, ya que de hecho varios QTLs corresponden generalmente a un caracter cuantitativo.

### **1.3. Marcadores inmunitarios del camarón.**

Mientras que las cualidades de crecimiento fueron consideradas desde la antigüedad para la domesticación y la selección de animales domésticos, los criterios inmunitarios han sido tomados muy poco en cuenta, esencialmente porque los procesos infecciosos e inmunitarios fueron desconocidos.

En lo que concierne a programas más recientes de selección de animales domésticos, la capacidad inmunitaria no ha sido tampoco considerada debido a que es posible obtener resistencia a enfermedades por medio de la vacunación. En el caso de las plantas, inicialmente los programas de selección fueron dirigidos básicamente al criterio de crecimiento, lo que condujo sin embargo a problemas de contraselección con sensibilidad a insectos y patógenos. Debido a problemas de resistencia a insecticidas, fungicidas y bactericidas, y teniendo en cuenta la imposibilidad a tratar las virosis, existe actualmente un creciente esfuerzo de investigación con numerosas aplicaciones en el campo de la selección de cepas resistentes.

En el camarón se han desarrollado varios ensayos para evaluar la respuesta inmunitaria (Muñoz, 1996; Tapia, 1997); estos indicadores o marcadores inmunitarios podrían ser criterios de selección muy objetivos y fácilmente aplicables en programas de selección, sobretodo al relacionarlos con marcadores genéticos.

#### **1.3.1. Hemogramas.**

Los tipos hemocitarios pueden ser definidos en base a criterios estructurales, citoquímicos, antigénicos y funcionales. En los crustáceos existen tres tipos de hemocitos morfológicamente distintos que pueden ser clasificados como hialinos, semigranulosos y granulosos (Figura 24) (Rodríguez *et al*, 1995; Söderhall & Smith, 1983; Tsing, 1987).

La cantidad en que los hemocitos se encuentran en la hemolinfa varía de acuerdo a procesos naturales como cambios fisiológicos, el ciclo de muda o el sexo y, consecuentemente, pueden constituir un marcador del estado fisiológico e inmunitario de los camarones (Tsing, 1987). Esta cantidad podría ser un factor determinante en la capacidad de defensa del camarón. Existen evidencias en este sentido en moluscos, en los que poblaciones caracterizadas por su alto contenido hemocitario han mostrado resistencia a enfermedades (Mialhe, com. per.).

### 1.3.2. Cuantificación del anión superóxido.

La fagocitosis es la más común de las reacciones de defensa celular y constituye, junto con otros componentes humorales, la línea de defensa inicial cuando un elemento extraño ha sobrepasado la barrera física de la cutícula (Söderhall & Cerenius, 1992). (Figura 25).

Además de los procesos digestivos enzimáticos propios de la fagocitosis, se observan en las células fagocitarias otros fenómenos que conducen a la formación de radicales de oxígeno, altamente reactivos y tóxicos. Este proceso oxidativo es conocido como choque respiratorio y se caracteriza por el incremento de la actividad metabólica de los fagocitos como respuesta a estímulos provocados por partículas foráneas. Durante el choque respiratorio el oxígeno es reducido parcialmente en anión superóxido, que por un proceso de dismutación, puede ser convertido en peróxido de hidrógeno; otras reacciones formarían el singlet de oxígeno, el radical hidroxilo e hipohalógenos. Estos radicales son tóxicos y tienen la capacidad de destruir microorganismos (Klein, 1982).

El anión superóxido producido durante el choque respiratorio por los hemocitos fagocitarios provoca *in vitro* la reducción de un compuesto conocido como Nitro Blue Tetrazolium (NBT) a una forma insoluble y de color azul oscuro llamada Formazán. La cantidad de Formazán producida puede ser determinada por espectrofotometría y utilizada como indicador de la cantidad de anión superóxido producida por los macrófagos. Este



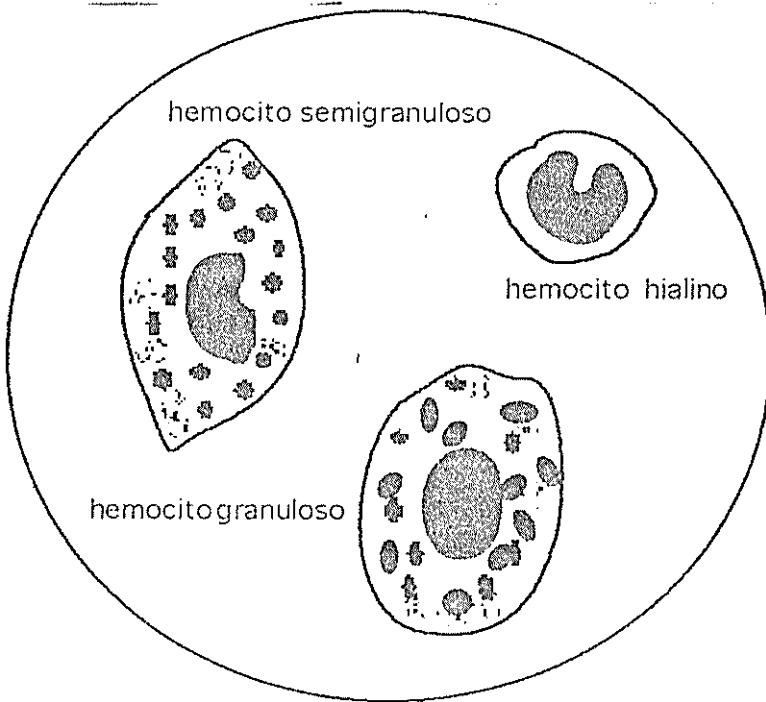


Figura 24: Los tipos hemocitarios del camarón.

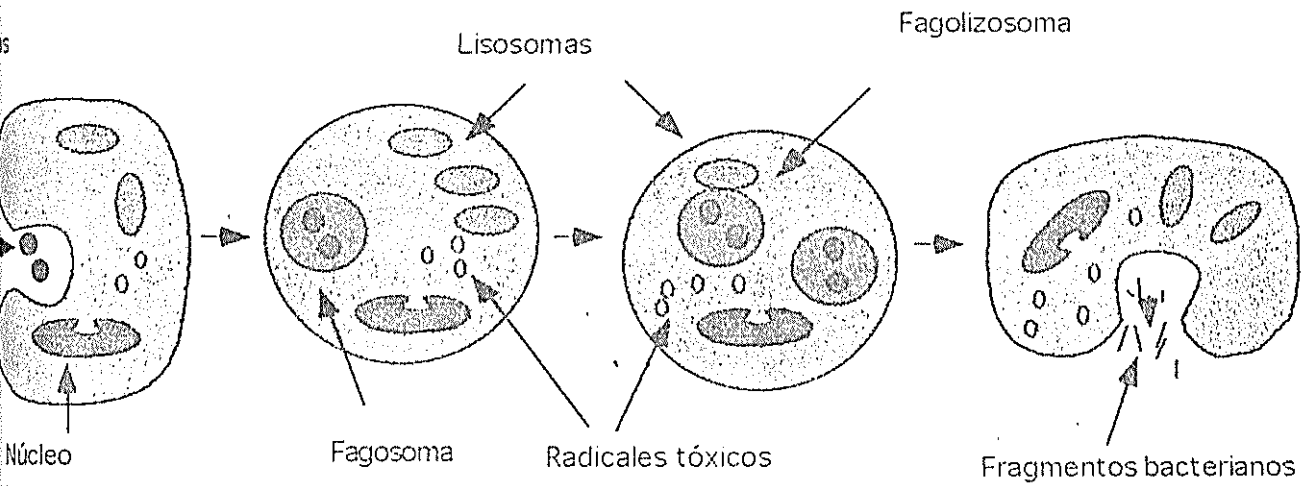


Figura 25: La fagocitosis.

principio es utilizado para evaluar la actividad oxidativa de macrófagos y células fagocíticas en diferentes animales (Müller *et al*, 1989) y ha sido implementado en *P. vannamei* (Muñoz, 1996) con los mismos fines (Figura 26).

### 1.3.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma.

La hemolinfa de muchos invertebrados posee factores encargados de la destrucción directa de bacterias por medio de mecanismos poco conocidos (Figura 27). En los insectos y el limulus, varios péptidos y proteínas con esta función han sido aislados y caracterizados (Hoffman *et al*, 1992; Mitaya *et al*, 1989; Nakamura *et al*, 1988). Una fuerte actividad microbicida ha podido ser evidenciada en la hemolinfa de diferentes crustáceos (Chisholm & Smith, 1995; Noga *et al*, 1994) y recientemente se ha caracterizado una nueva familia de péptidos microbicidas en hemocitos de *P. vannamei*. (Destoumieux *et al*, 1997).

Se han desarrollado técnicas para cuantificar el efecto bactericida del plasma en *P. vannamei* (Tapia, 1997). De particular utilidad resulta un método que mide el efecto del plasma sobre la turbidez de suspensiones bacterianas, y que permite estimar la inhibición del crecimiento bacteriano con relativa sencillez y precisión.

### 1.3.4. Inmunodosificación de factores plasmáticos.

En el plasma de los crustáceos y otros artrópodos existen una serie de factores involucrados en los varios mecanismos de la inmunidad. Algunos de ellos han sido aislados y caracterizados para diversas especies de crustáceos (Kopacek *et al*, 1993; Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; Rodríguez *et al*, 1995). Entre ellos podemos encontrar las aglutininas, opsoninas, macroglobulinas, péptidos antimicrobianos, factores de coagulación y enzimas implicadas en el sistema profenoloxidasa.

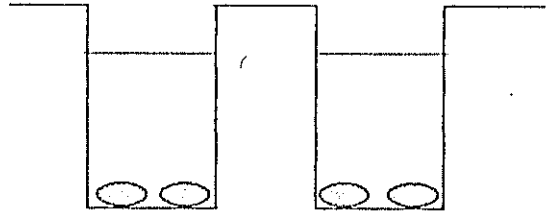
Las aglutininas son proteínas o glicoproteínas con capacidad de unirse a carbohidratos y son consideradas como moléculas que podrían participar en el

Figura 26: Principio de la cuantificación del anión superóxido (Tomado de Muñoz, 1996)

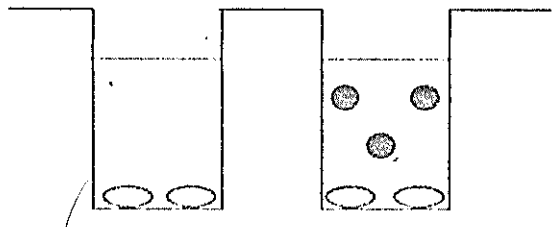
Reacción para la obtención de formazán a partir del anión superóxido ( $O_2^-$ )



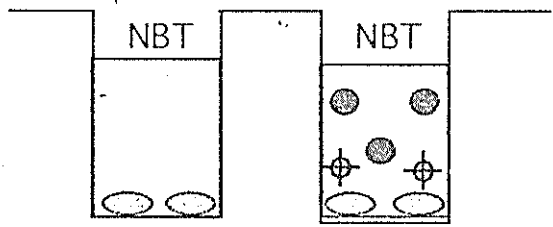
Se añaden las células.



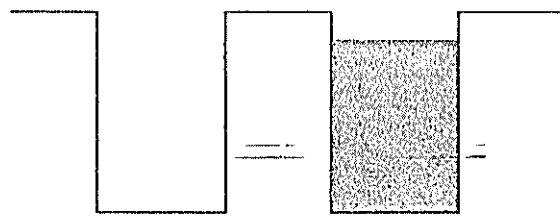
Se añade el estimulante.







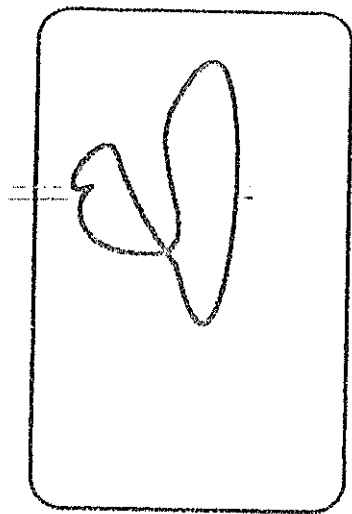
Reacción de NBT con el anión superóxido producido por las células.



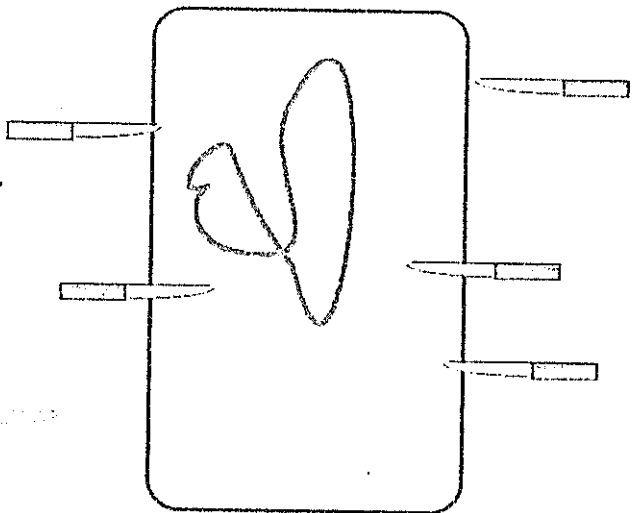
Formazán solubilizado



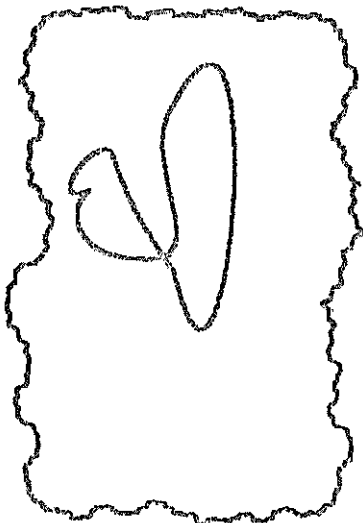
-  Células fijas.
-  Anión superóxido
-  Estimulante
-  Formazán solubilizado



Bacteria viva presente en el organismo huésped



La bacteria es atacada por péptidos antibacterianos que provocan daños letales en la membrana



La bacteria muere

Figura 27: Mecanismo de acción de algunos péptidos microbicidas en insectos.

reconocimiento de partículas extrañas por parte de los hemocitos (en Söderhäll & Cerenius, 1992) (Figura 28). Adicionalmente, las aglutininas son capaces de causar fenómenos de aglutinación celular al unirse a carbohidratos específicos en la superficie de dos células. Se han producido anticuerpos monoclonales contra proteínas con capacidad de aglutinación en *P. japonicus*, los cuales han mostrado reconocer factores similares en *P. vannamei* (Rodríguez, 1994).

La alfa2-macroglobulina es una proteína plasmática presente tanto en crustáceos como en mamíferos, es reconocida como un factor importante en varios procesos inmunitarios y se cree que actúa en forma similar a los complementos de los vertebrados (en Muta & Iwanaga, 1996). Se le atribuye participación en procesos citolíticos en *Limulus* (Enghild *et al*, 1990 *fide* Muta & Iwanaga, 1996) y funciona como un inhibidor de proteasas durante reacciones inmunitarias (Figura 29). Se han preparado anticuerpos monoclonales que reconocen una forma monomérica de 70kDa en el plasma de *P. japonicus* (Rodríguez, 1994); la caracterización de dicha proteína sugiere fuertemente que se trata de una alfa-2-macroglobulina, que es también reconocida en *P. vannamei* (Rodríguez, 1994).

Diferentes factores involucrados en la coagulación han sido identificados como componentes del sistema inmunitario de los crustáceos (Figura 30). En *Limulidae* se conocen cinco de estos factores (Muta & Iwanaga, 1996) y es justamente en este grupo en donde más extensivamente se ha estudiado el proceso de coagulación (Söderhäll & Cerenius, 1992). Estos mecanismos resultan de singular importancia en organismos que, como los crustáceos, tienen un sistema circulatorio abierto (Söderhäll & Cerenius, 1992). En *P. japonicus* se ha detectado la presencia de una proteína plasmática de 180 kDa en condiciones reducidas, que ha sido identificada como un factor de coagulación y que se encuentra también en *P. vannamei* (Rodríguez, 1994).

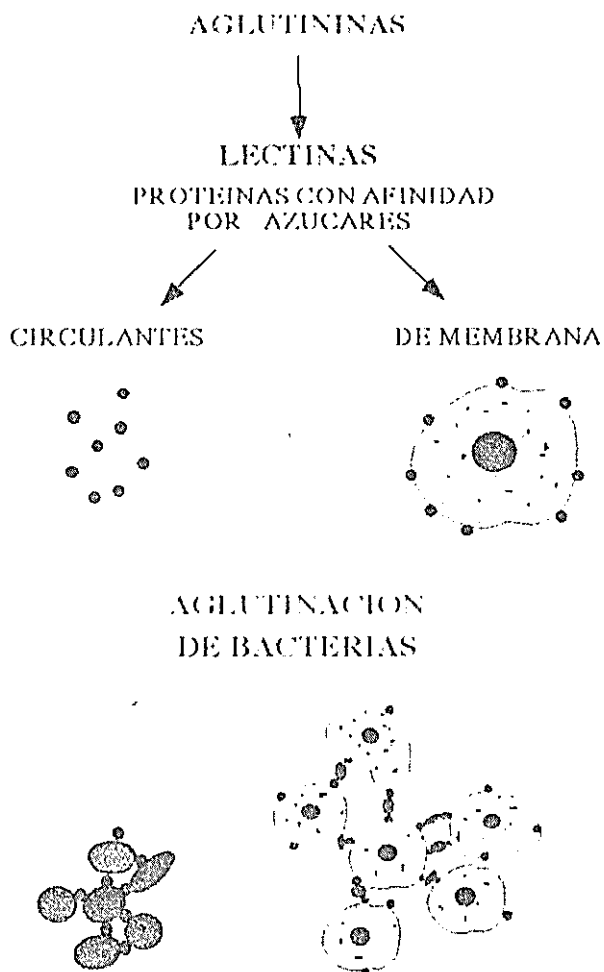
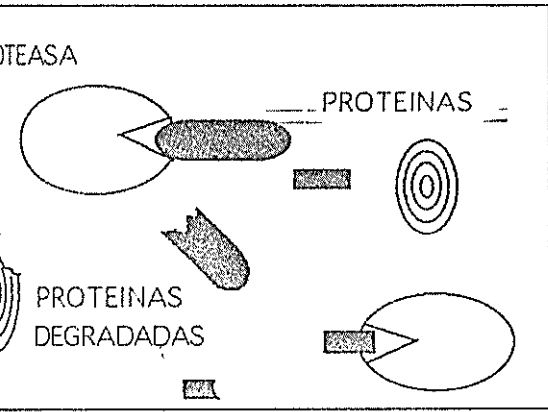
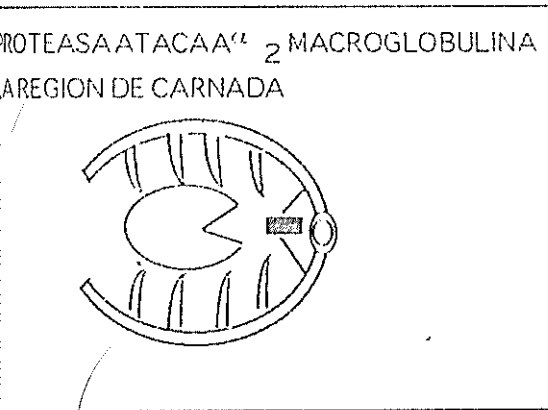
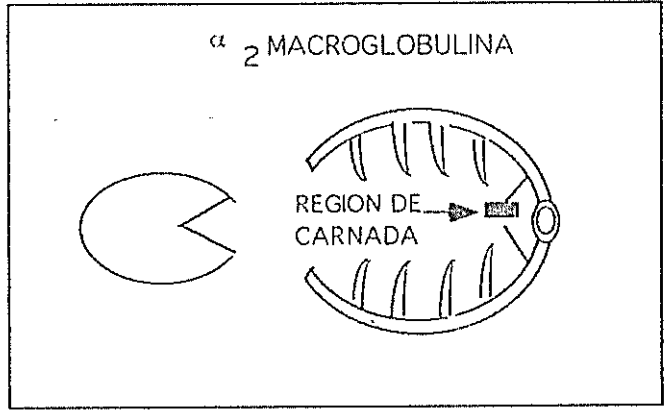


Figura 28: Función de las aglutininas (Tomado de Tapia, 1996).



2)



4)

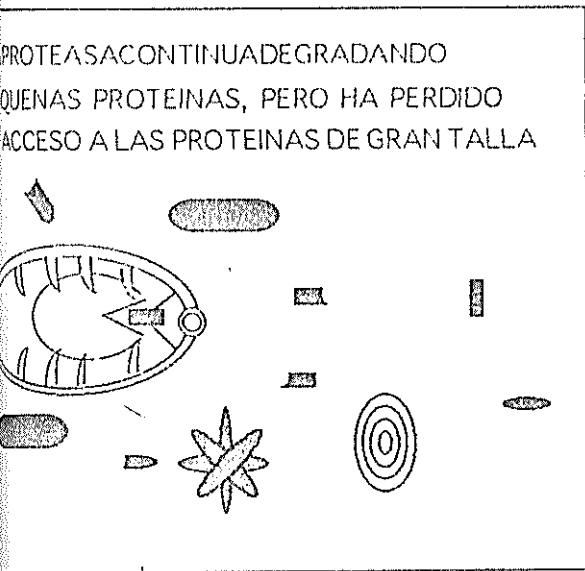
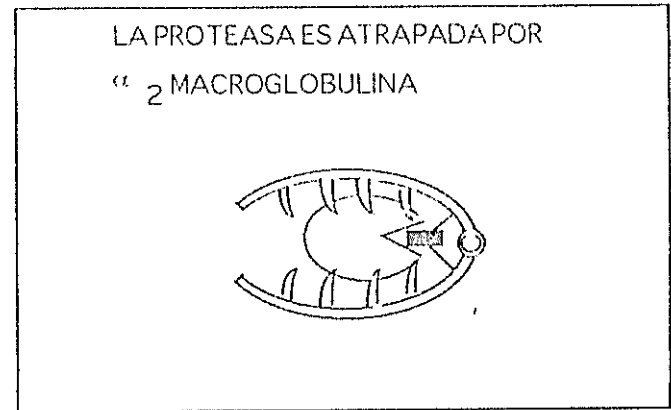
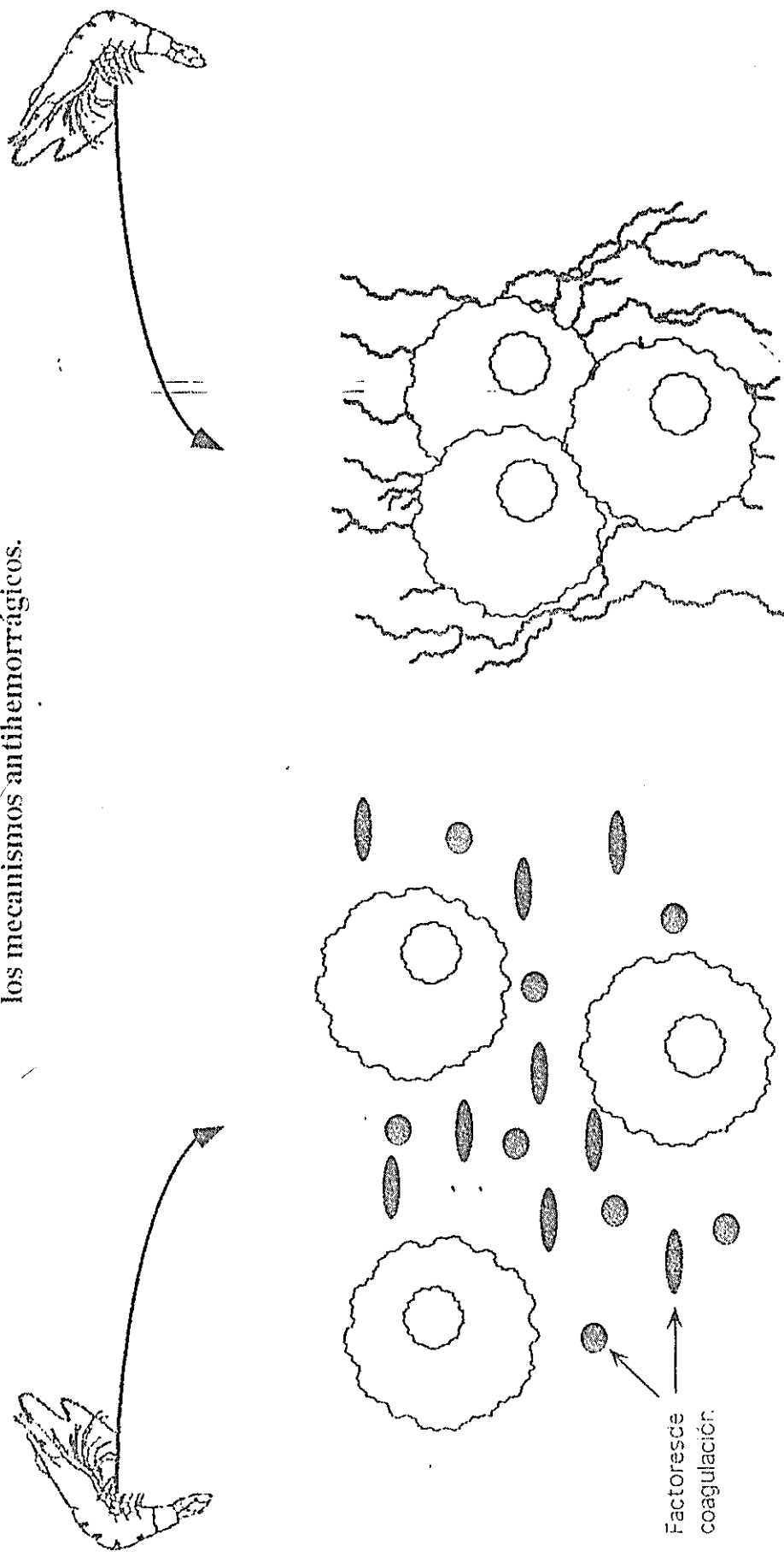


Figura 29: Función inhibitoria de proteasas por parte de la alfa-2-macroglobulina.

Figura 30: El rol de los factores de coagulación en los mecanismos antihemorrágicos.



Cuando no hay lesiones los factores de coagulación permanecen inactivos

Al producirse la lesión, los factores de coagulación son activados por la enzima transglutaminasa y se fibrilan para conformar el coágulo



La disponibilidad de anticuerpos monoclonales que reconocen los factores plasmáticos antes mencionados ha permitido poner a punto técnicas de inmunodosificación simplificadas tipo dot blot en *P. vannamei* (Rodríguez & Valenzuela, com. per.).

#### 1.4. Selección por genética cuantitativa.

En lo que concierne a la selección por genética cuantitativa hay que considerar como primer punto importante que si bien en la mayoría de los casos los caracteres cuantitativos son resultantes de la acción de varios genes en diferentes loci, es decir poligénicos, en una minoría es posible encontrar caracteres cuantitativos que son el resultado de la acción de un solo gen, es decir monogénicos.

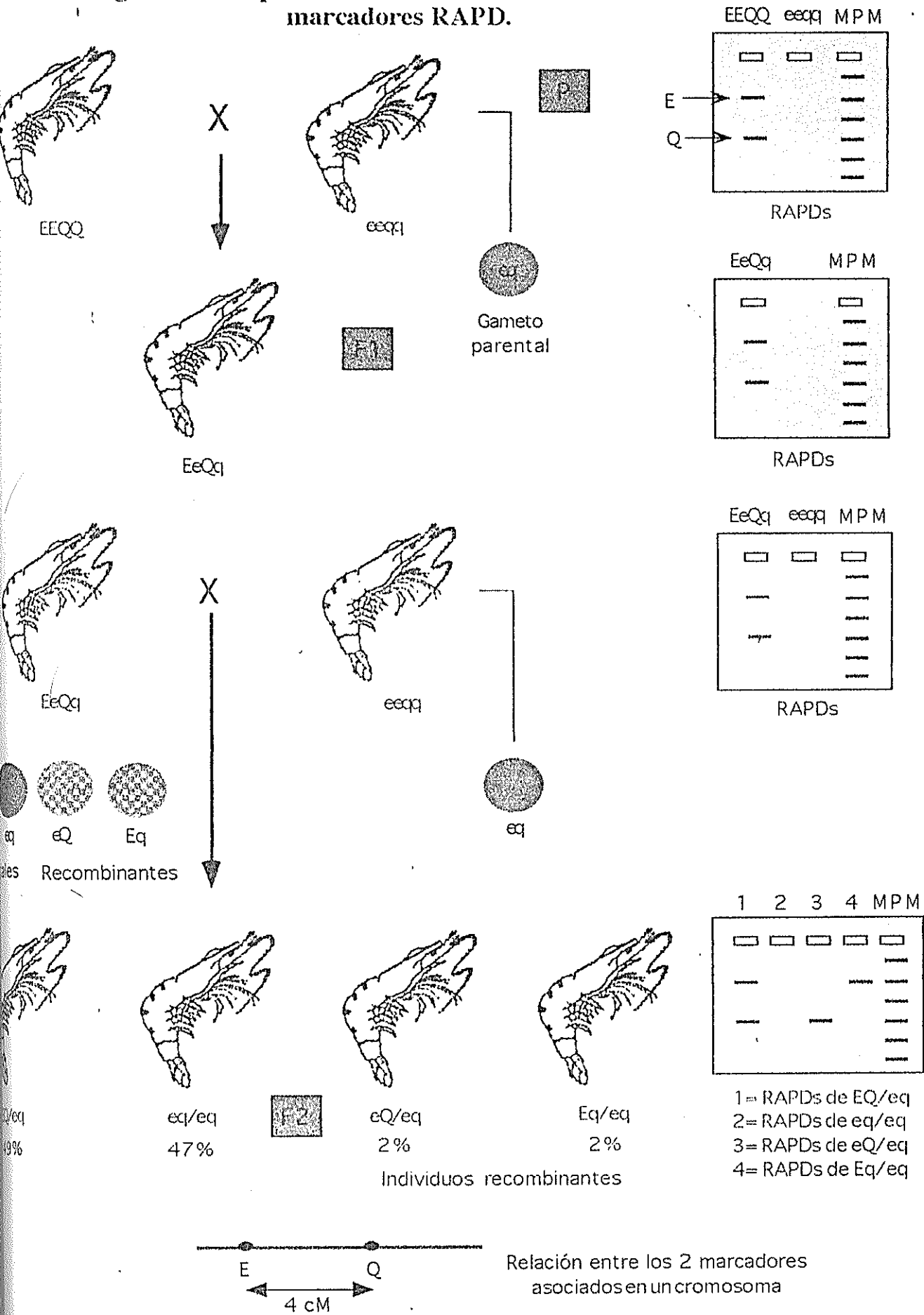
Para un caracter cuantitativo de origen monogénico, se puede considerar por ejemplo el caso de una enzima, en la que la diferencia de funcionalidad está relacionada con variación en la secuencia de su promotor o de la parte codificante del gen. Una primera situación corresponde entonces a la posibilidad de caracterizar el gen, como se ha explicado previamente, ya sea a través de la actividad y/o de la proteína, o a través de sondas heterólogas. Una vez caracterizado el gen es fácil determinar los mecanismos correspondientes al fenotipo de interés y sobretodo es fácil disponer de sondas útiles como marcadores de selección según el concepto de selección asistida por marcadores (SAM) (Lande & Thompson, 1990).

Muy frecuentemente un caracter cuantitativo puede ser desconocido desde el punto de vista de sus bases genéticas, ya sea éste de naturaleza monogénica o, más probablemente, poligénica. En esta condición la identificación y la utilización de marcadores genéticos va a permitir caracterizar individuos y luego líneas con los caracteres de interés. El mejoramiento progresivo de las características de estas líneas es facilitado en gran medida por la disponibilidad de estos marcadores (Figura 31) (SAM). Esta selección asistida por marcadores será más fácil mientras más corta sea la distancia entre el marcador y el locus, ya que su segregación común será más frecuente durante la meiosis de una

generación a la otra en el curso del proceso de selección. En el caso de un marcador correspondiente estrictamente a un locus, lo que corresponde al concepto de QTL, se vuelve posible clonar el locus y secuenciarlo a fin de identificar y caracterizar el gen implicado total o parcialmente en el carácter fenotípico.

Mientras que en las plantas todos estos conceptos están ampliamente desarrollados y han encontrado aplicaciones de interés económico (Bonierbale *et al*, 1993; Edwards *et al*, 1987; Pé *et al*, 1993; Weller *et al*, 1988; Xiao *et al*, 1995), en lo que concierne al camarón la selección genética se encuentra en sus inicios, considerando la identificación de marcadores para distinguir individuos que tengan fenotipos de interés y, a partir de estos individuos, establecer líneas a fin de poder emprender programas de selección.

Figura 3I: Esquema de cruces controlados utilizando marcadores RAPD.



## II. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. Material Biológico.

#### 2.1.1. Camarones.

Se utilizaron 100 camarones *Penaeus vannamei* (entre 24 y 56 g), de los cuales cincuenta (25 machos, 25 hembras) fueron provenientes de camaronera y los restantes (25 machos, 25 hembras) provenían de medio natural. Los animales fueron mantenidos en un tanque del departamento de maduración de un laboratorio privado (PLAYAESPEC) ubicado en Palmar, Península de Santa Elena. Fueron alimentados con una mezcla de ostra, calamar, mejillón, scallop y balanceado (50% de proteína) a una razón del 15% de la biomasa.

#### 2.1.2. Control del ciclo de muda y extracción de hemolinfa.

Después de las 72 horas de permanencia en el tanque se marcaron los animales con un anillo en el pedúnculo ocular y una etiqueta adherida al cefalotórax, con el fin de controlar la muda individualmente.

Diariamente se revisaba el tanque y se registraban la mortalidad y la muda. Cuatro o cinco días después de cada muda se realizaron extracciones de hemolinfa utilizando jeringuillas de 1 ml de capacidad con 150  $\mu$ L de anticoagulante (citrato de sodio al 10%). La hemolinfa fue extraída del sinus ventral, obteniéndose entre 200 y 500  $\mu$ L de cada camarón. Luego de cada extracción se colocaba una nueva etiqueta en el cefalotórax.

### 2.2. Caracterización del genoma.

#### 2.2.1. Protocolo de extracción de ADN genómico.

•Se colocó la hemolinfa (volumen variable) en un microtubo Eppendorf (capacidad de 1.5 ml) y se centrifugó (5000 rpm, 6 min) en una microcentrífuga (Biofuge 13, Heraeus

sepatech).

- Se eliminó el sobrenadante, manteniendo 100  $\mu$ L de plasma para resuspender los hemocitos. En este punto se pueden guardar las muestras a -80 grados C durante varias semanas. Se añadieron 300  $\mu$ L de solución salina (NaCl 0.9%) y se centrifugó (5000 rpm, 6 minutos).

- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 300  $\mu$ L de solución hipotónica (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA). Se centrifugó (4000 rpm, 10 min) y se eliminó el sobrenadante.

- Se añadió 1 mL de reactivo DNazol (guanidina) mezclando con una micropipeta y se centrifugó (10000 rpm, 10 min).

- Se recuperó el sobrenadante (conteniendo el ADN) y se adicionaron 500  $\mu$ L de etanol al 100%. Se mezcló la muestra invirtiendo el tubo varias veces, se dejó en incubación a temperatura ambiente (1-3 min).

- Se centrifugó (4000 rpm, 2 min) y se realizaron dos lavados con 0,8-1 ml de etanol al 95%. Cada lavado consiste en suspender el ADN en el etanol invirtiendo el tubo 3-6 veces, para luego permitir que el ADN se asiente colocando el tubo en posición vertical durante 0,5-1 minutos.

- Se removió el etanol con una micropipeta y se secó el alcohol remanente colocando el tubo abierto en un desecador conectado a una bomba de vacío.

- Finalmente se resuspendió el ADN en 200  $\mu$ L de agua destilada.

### **2.2.2. Condiciones de AP-PCR (Alleatory Primed Polymerase Chain Reaction).**

Para determinar las condiciones de la AP-PCR se partió de los protocolos propuestos por Melena (1997) y Tassanakajon (1997).

Se preparó un volumen de reacción de 50 uL por muestra, según la siguiente tabla:

COMPONENTE	CANTIDAD/CONCENTRACION
Tampón de reacción (PROMEGA)	1X
MgCl <sub>2</sub> (PROMEGA)	2 mM
Taq polimerasa (PROMEGA)	1 U
dNTPs (PROMEGA)	200 uM (cada uno)
Iniciador (EUROGENETICS)	1000 ng
ADN	entre 100 y 10 ng
Agua	qsp 50 µL

•Se adicionó a cada tubo 50 µL de aceite mineral.

Diversas pruebas demostraron que los parámetros tiempo y temperatura influenciaban en gran medida los perfiles resultantes (presencia y/o ausencia de bandas). Los trabajos condujeron a la optimación de un protocolo más reproducible (ver Resultados). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Ericomp. DeltaCycler I.

### 2.2.3. Iniciadores.

Se utilizaron dos iniciadores decaméricos (Tassankajon *et al.*, 1997) para las reacciones de AP-PCR:

Primer #174: 5' AACGGGCAGG 3'

Primer #456: 5' GCGGAGGTCC 3'

#### 2.2.4. Determinación de perfiles de RAPD.

Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados en electroforesis de agarosa (1.5%) por tinción con bromuro de etido (SIGMA) y comigrados con marcadores de peso molecular (1 Kb ladder, PROMEGA) para la determinación de las tallas respectivas. Se obtuvieron así dos perfiles RAPD para cada uno de los 12 camarones que fueron completamente analizados, tanto en términos genéticos como inmunitarios.

### 2.3. Cuantificación de efectores inmunitarios.

#### 2.3.1. Determinación del hemograma (Muñoz, 1996).

- Para facilitar el conteo de los hemocitos, mantenerlos con un buen aspecto morfológico y evitar la agregación celular, se diluyeron 15  $\mu$ L de hemolinfa en 15  $\mu$ L de formaldehído al 10%: Las muestras pueden ser almacenadas a 4°C un máximo de 24 horas en recipientes bien cerrados para impedir la evaporación.

- El conteo de los hemocitos fue realizado en un hemocitómetro (Neubauer, Erma), utilizando un microscopio óptico provisto de un dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2, objetivo A20 PL).

#### 2.3.2. Cuantificación del anión superóxido (Muñoz, 1996).

- Se colocaron las muestras de hemolinfa recién extraídas (50  $\mu$ L) en los respectivos hoyos de una placa de microtitulación. En cada hoyo se adicionó un volumen igual de MHBSS 2X ( $\text{Ca}^{++}$  12 mM,  $\text{Mg}^{++}$  26 mM).

- Se dejó incubar durante 30 minutos para permitir la fijación de las células en la microplaca.

- Una vez que las células se fijaron a la placa se eliminó el sobrenadante y se adicionó, cuidadosamente, 50  $\mu$ L de MHBSS 1X ( $\text{Ca}^{++}$  6 mM,  $\text{Mg}^{++}$  13 mM) en cada hoyo.

•En los hoyos que servían de control para evaluar la actividad básica de los hemocitos se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de MHBSS 2X. En los hoyos que servían para evaluar la respuesta de las células a un estimulante se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de PMA (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) preparado en MHBSS 2X.

•Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de NBT al 0,24% (preparado en MHBSS 1X sin cloruro de Ca y Mg) en todos los hoyos. La concentración final de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , era de 6 mM y 13 mM respectivamente.

•Se incubaron las placas a temperatura ambiente, durante 2 horas (tiempo requerido para la reducción del NBT) en un lugar protegido de la luz debido a que el NBT es fotosensible.

•Se eliminó el sobrenadante de la microplaca adicionando luego 200  $\mu\text{L}$  de metanol en cada hoyo para detener la reacción y realizar un primer lavado. Se realizaron dos lavados más con 200  $\mu\text{L}$  de metanol al 70 %.

•Se permitió luego secar completamente la placa a temperatura ambiente.

•Para solubilizar el formazán intracelular se utilizaron 120  $\mu\text{L}$  de KOH (hidróxido de potasio) 2M y 140  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Utilizando una micropipeta se disolvía completamente el formazán.

•Se midió la densidad óptica de las placas en un espectrofotómetro de microplacas (Labsystems Multiskan Bichromatic 348) a una longitud de onda de 620 nm, esto permite cuantificar la cantidad de formazán intracelular obtenido por acción del anión superóxido.

### 2.3.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana (Tapia, 1997).

•En una microplaca (Corning Glass Work, Round Bottom, 25850) se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de plasma ( 5  $\mu\text{L}$  de plasma y 5  $\mu\text{L}$  de anticoagulante) con 10  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana de *Escherichia coli* D31 (0,03 D.O. a 540 nm) en medio LB (Lennox L Broth Base, Gibco BRL)



- Se dejó incubar por 1 hora a TA.
- Es necesario llevar un control de crecimiento bacteriano sustituyendo la hemolinfa por 10  $\mu\text{L}$  de una solución de agua de mar al 70%, esterilizada mediante filtración (Gelman Sciences 4320, 0,2 m) e igualada volumen a volumen con anticoagulante.
- También se consideró un control del plasma para cada muestra con 10  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo LB reemplazando la suspensión bacteriana.
- Después de la incubación se añadió a todos los pozos 200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo, completando un volumen final de 220  $\mu\text{L}$  por hoyo.
- Se efectuó inmediatamente la lectura en el espectrofotómetro de microplacas (Labsystems Multiskan Bichromatic 348) a una longitud de onda de 540 nm, esta medición era considerada como el tiempo 0 equivalente al blanco, el mismo que era restado de la lectura obtenida luego de 8 horas de crecimiento bacteriano.
- Mediante un cálculo simple se obtenía el porcentaje de crecimiento bacteriano de cada muestra, considerando al control bacteriano como el 100% del crecimiento. El porcentaje de inhibición de las muestras se obtenía de la diferencia entre el crecimiento bacteriano de la muestra y del control.

#### **2.3.4. Inmunodosificación de factores plasmáticos (protocolo de dot blot, CENAIM).**

- Se depositaron 2  $\mu\text{L}$  de plasma (diluído 1/100) en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se secaron a TA (30 min).
- Se incubó con PBS (NaCl 150 mM, KCl 3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,5 mM, pH 7,2) -leche descremada 5% (p/v) dejando en agitación suave (60 min, TA).
- Posteriormente se realizaron 3 lavados (3 min c/u) con PBS-Tween 20 (0,1%)

- Se depositó el primer anticuerpo (monoclonal) y se dejó en incubación (60 min. TA).
- Se aplicaron 3 lavados (3 min c/u) con PBS-Tween 20 (0,1%)
- Se depositó el anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (dilución 1/10.000 en PBS-Tween-0,1%-Leche 0,5 %) y se incubó (45 min, TA).
- Se aplicaron nuevamente 3 lavados (3 min c/u) con PBS-Tween 20 (0,1%).
- Se incubó con la solución sustrato preparada en el momento:
  - 33  $\mu$ L de BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolylfosfato en 0,5 ml de dimethylformamida)
  - 66  $\mu$ L de NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada)
  - 10 ml de tampón Fosfatasa Alcalina (NaCl 5,84 g/l, MgCl<sub>2</sub> 0,5 g/l, Tris base 12,11 g/l, pH 9,5).

Nota: Cuando la intensidad de la respuesta es perfectamente visible en los controles positivos, la reacción enzimática es detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM (50  $\mu$ L de EDTA 0,5 M diluído en 25 ml de PBS).

• Concentración de los anticuerpos monoclonales (primer anticuerpo) utilizados para cada factor:

- Anti alfa-2 macroglobulina (purificado): 1,4 ng/ $\mu$ L
- Anti factor de coagulación (purificado): 84 ng/ $\mu$ L
- Anti aglutinina (sobrenadante de cultivo) 1858 ng/ $\mu$ L

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

El trabajo fue iniciado con un grupo de 100 animales considerando la mortalidad crónica que es clásicamente observada en los laboratorios en la actualidad, y que se ubica en alrededor del 2% por día. Así, previendo análisis de parámetros inmunitarios en tres períodos de intermuda sucesivos, la duración de la experimentación debía ser de alrededor de seis semanas, con una tasa de supervivencia de aproximadamente el 45%. En la práctica esta tasa llegó apenas al 30%; esta ligera diferencia podría imputarse al estrés adicional provocado por la manipulación periódica de los animales, lo que incluía la punción para la recolección de hemolinfa. Sólo en 12 camarones fue posible determinar los seis parámetros inmunitarios en tres ocasiones, debido a dificultades técnicas que se presentaron para la determinación del hemograma y de la actividad antibacteriana en algunos animales. Consecuentemente la caracterización genética por AP-PCR fue realizada únicamente en estos 12 animales.

#### 3.1. Protocolo optimizado de AP-PCR.

La AP-PCR permitió obtener perfiles de RAPD de los 12 animales con un volumen de muestra de entre 200 y 500  $\mu$ L de hemolinfa. La etapa de polimerización fue programada con cuatro escalas de temperatura para evitar que el iniciador sufra un calentamiento demasiado brusco lo que, debido a su reducido número de nucleótidos, podría ocasionar una deshibridación prematura. Las escalas permiten la elongación preliminar de los iniciadores que, una vez extendidos, permanecen hibridados de manera mucho más estable.

Se encontraron varias dificultades técnicas, las más importantes ligadas a la calidad del agua utilizada para las diferentes reacciones. En efecto, el agua destilada producida en el laboratorio o algunas aguas para inyección compradas en farmacias bajo la forma de ampollas condujeron a la aparición de productos de amplificación en los controles negativos, lo que sugiere la presencia de ADN bajo la forma de trazas contaminantes. La

adquisición de agua de calidad ultrapura (PROMEGA) permitió resolver estos problemas de productos de amplificación contaminante. Otra dificultad correspondió a los numerosos cortes eléctricos locales que perturban la programación del termociclador, lo que a menudo condujo a la pérdida de ciertas experimentaciones.

Luego de numerosas series de experiencias se obtuvieron perfiles de RAPD sin problemas de contaminación, lo que requirió también prestar una atención particular a la cuantificación del ADN. La baja concentración de las soluciones de ADN obtenidas a partir de muestras individuales de hemolinfa limitó la confiabilidad de la cuantificación espectrofotométrica, por lo que se aplicó un método de estimación por observación directa en UV luego de coloración con bromuro de etidio (Maniatis *et al.*, 1989). La importancia de la cantidad de ADN utilizada en las reacciones de AP-PCR ha sido bien demostrada por Melena (1997).

Considerando la nueva información experimental y lo previamente publicado por Melena (1997) y Tassanakajon *et al.* (1997), se estableció la programación del termociclador tal como se describe a continuación:

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (seg)
Predesnatura. (1)	94	30
Desnaturalización	94	5
Hibridación	36	45
Polimerización escala 1	46	15
Polimerización escala 2	56	15
Polimerización escala 3	66	15
Polimerización escala 4	72	90

Polimerizac. final (2)	72	600
Mantenimiento (3)	4	id

1= Sólo para el primer ciclo.

2= Sólo para el último ciclo

3= Después de 40 ciclos

id= Indefinido, hasta retirar las muestras.

### 3.2. Perfiles de RAPD de los camarones analizados.

En base al programa de AP-PCR optimizado, se establecieron los perfiles de RAPD para los 12 camarones para los que fue posible determinar tres veces el conjunto de las seis pruebas inmunitarias. En las figuras 32a y 32b se muestran los perfiles RAPD utilizando los iniciadores #174 y #456.

Los perfiles de RAPD incluyen bandas mayores, observadas de manera reproducible para cada animal considerado, y bandas menores, cuya observación es fluctuante para una misma muestra de ADN de una reacción de AP-PCR a la otra. Por este hecho, sólo los productos de amplificación mayores han sido considerados como marcadores genéticos, siendo su talla respectiva determinada por referencia a los marcadores de peso molecular (Tablas 1a y 1b). Se identificaron dos tipos de bandas en función de su intensidad, fuerte o reducida, lo que podría deberse a la presencia de la secuencia correspondiente en el genoma del animal, ya sea bajo la forma de homocigoto o de heterocigoto, respectivamente. Por otra parte, algunas secuencias podrían ser más accesibles que otras a la hibridación de los iniciadores, lo que explicaría la presencia de más producto de amplificación en algunas bandas.

Tanto para los iniciadores #174 y #456 ciertas bandas fueron observadas en casi todos los camarones analizados, lo que indica la tendencia monomorfa de estos marcadores. Sin embargo, también se detectaron marcadores polimorfos, que permiten

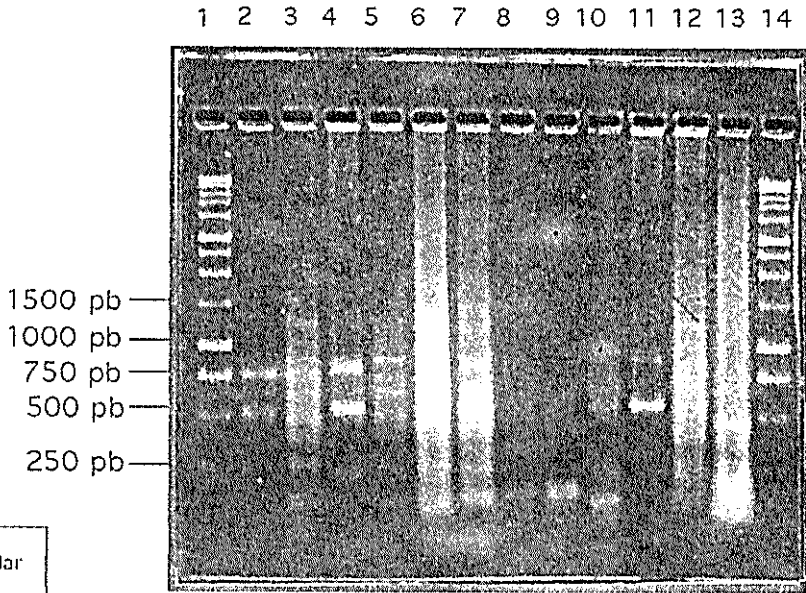


Figura 32a: Perfiles RAPD de los 12 camarones analizados utilizando el primer #174

- a 1: Marcador de peso molecular
- a 2: 7Hsil
- a 3: 11Hsil
- a 4: 14Hsil
- a 5: 12Msil
- a 6: 19Msil,
- a 7: 25Msil
- a 8: 12Hcam
- a 9: 17Hcam
- a 10: 25Hcam
- a 11: 5Mcam
- a 12: 11Mcam
- a 13: 12Mcam
- a 14: Marcador de peso molecular

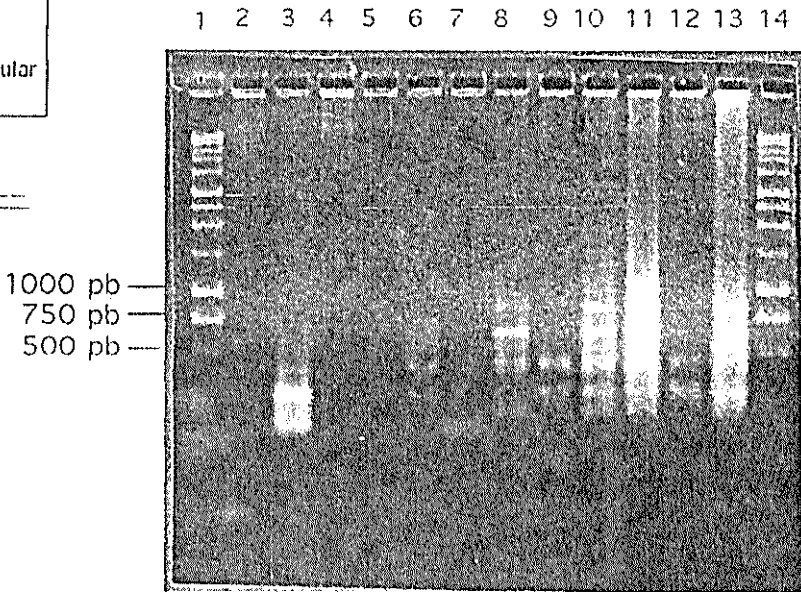


Figura 32b: Perfiles RAPD de los 12 camarones analizados utilizando el primer #456

Tabla 1a: Descripción de los perfiles de RAPD de los 12 camarones analizados, primer #174.

7Hsil	11Hsil	14Hsil	12Msil	19Msil	25Msil	12Hcam	17Hcam	25Hcam	5Mcam	11Mcam	12Mcam
	1000-1500			1000-1500	1000-1500						
				<del>1000-1500</del>	1000-1500					1000-1500	
				1000						1000	
750	750-1000	<del>750-1000</del>	750-1000		750-1000				750-1000	750-1000	
	750		750	750							
			500-750								
500-750	500-750		500-750	500-750	<del>500-750</del>			500-750	<del>500-750</del>		
	500		500	<del>500</del>	500						
	250-500		250-500	250-500	250-500						<del>250-500</del>
	250		250	250		250-500		250			250
			<del>250</del>								
<250	<250	<250	<250	<250	<250	<250	<250	<250			<250

Tabla 1b: Descripción de los perfiles de RAPD para los 12 camarones analizados, primer #456.

7Hsil	11Hsil	14Hsil	12Msil	19Msil	25Msil	12Hcam	17Hcam	25Hcam	5Mcam	11Mcam	12Mcam
								<u>1500</u>	1500		
250-500						<u>750-1000</u>		<u>750-1000</u>	750-1000		<u>750-1000</u>
250-500	250-500					500-750		500-750	500-750		500-750
<250	<250					250-500	250-500	250-500	250-500	250-500	250-500
						250-500	250-500	250-500	250-500	250-500	250-500
						<250	<250	<250	<250	<250	<250

**Subrayado:** Bandas de intensidad fuerte.

Las bandas que se representan al mismo nivel tienen efectivamente la misma talla.



distinguir prácticamente cada camarón a partir de un solo perfil RAPD obtenido con un iniciador dado.

### **3.3. Valores individuales de los efectores inmunitarios.**

Los análisis de los efectores inmunitarios fueron practicados tres veces a fin de evaluar su variabilidad temporal, siendo el objetivo determinar si es posible reconocer camarones con valores inmunitarios permanentemente superiores. Tal superioridad podría ser de naturaleza genética y, por consecuencia, corresponder a criterios para emprender una selección de tipo cuantitativa para camarones con mejor capacidad defensiva.

En la práctica, las muestras de hemolinfa fueron obtenidas la primera ocasión para 80 camarones, la segunda para 53 y la tercera para los 30 animales supervivientes. En efecto, como se indicó anteriormente, la tasa de mortalidad de la experimentación fue ligeramente superior a la clásicamente observada en los laboratorios, alcanzándose una supervivencia final del 30%. Los resultados de la producción de anión superóxido y hemograma de los animales muertos en el curso del ensayo se presentan en el anexo I: únicamente estas dos pruebas se aplicaron a ellos con el fin de economizar, ya que son las únicas realizadas inmediatamente después de tomada la muestra. Finalmente, sólo fue posible para 12 camarones determinar en cada ocasión los 6 valores de los efectores inmunitarios. Todos los valores son presentados en el anexo II, pero la información referente a los citados 12 camarones constituye el objeto central del presente análisis.

A fin de poder integrar los valores de los diferentes tipos de pruebas, los resultados de cada una de ellas fueron transformados en porcentajes para ser expresados de manera homogénea en forma de un índice de capacidad inmunitaria (Tabla 2). Además se expresó numéricamente la variabilidad tanto individual como temporal de cada prueba en forma de dos coeficientes: el coeficiente de variabilidad individual (CVI), correspondiente a la razón entre la desviación estándar y la media tomando como datos las medias de los tres valores de cada animal, y el coeficiente de variabilidad temporal (CVT) para cuyo cálculo se obtuvo

Tabla 2: PORCENTAJE RELATIVO(1) DE SEIS PRUEBAS INMUNTARIAS PARA 30 REPRODUCTORES SUPERVIVIENTES DURANTE TRES CICLOS DE MUDA.																			
CLAVE	NBT1	NBT2	NBT3	HEM01	HEM02	HEM03	AB1	AB2	AB3	ALFA1	ALFA2	ALFA3	CLOT1	CLOT2	CLOT3	AGLU1	AGLU2	AGLU3	INDICE GLOBAL
5Mcam	33	5	4	30	8	32	28	52	46	75	25	100	0	25	25	75	25	75	662.72
7Mcam	0	37	20	43	50	46	NC	50	44	25	25	75	0	50	50	25	50	75	704.14
11Mcam	15	3	44	31	12	100	38	22	55	75	25	25	25	25	50	100	0	100	745.63
12Mcam	46	82	10	40	3	34	25	12	40	75	25	75	25	25	25	75	0	25	641.69
16Mcam	71	35	16	53	27	0	NC	15	39	50	50	50	25	25	75	25	75	50	721.64
22Mcam	10	4	4	39	12	30	NC	NC	59	50	50	100	25	50	25	0	50	50	627.66
24Mcam	0	92	19	28	40	NC	NC	55	41	50	50	25	0	25	25	50	25	25	619.93
2Hsil	1	20	16	20	34	NC	61	70	74	100	75	75	50	50	50	75	75	50	949.74
7Hsil	0	100	11	30	51	35	100	100	100	100	75	50	50	50	75	75	25	100	1127.39
10Hsil	16	58	43	29	51	100	NC	55	51	75	75	100	50	25	25	25	25	100	956.93
11Hsil	100	28	5	37	24	6	62	58	50	75	75	75	50	50	0	100	25	25	844.31
14Hsil	0	27	0	30	45	30	40	34	48	75	75	25	50	50	25	25	50	50	678.28
17Hsil	0	89	73	24	34	37	NC	52	50	75	100	50	50	25	25	100	25	100	961.86
18Hsil	14	29	32	24	18	NC	51	68	56	100	100	75	25	50	25	25	75	75	890.35
20Hsil	35	15	32	55	42	NC	54	55	58	75	100	75	25	50	25	75	25	25	869.38
21Hsil	41	1	11	50	34	NC	71	49	46	100	75	75	25	25	25	50	25	50	797.04
3Hcam	0	34	29	10	87	20	NC	56	NC	100	75	50	50	75	25	25	25	0	743.73
8Hcam	23	63	0	42	69	NC	28	73	59	75	100	50	50	25	0	100	25	25	853.92
12Hcam	33	0	0	25	41	31	81	55	52	75	100	50	50	50	50	25	25	25	767.45
17Hcam	11	49	11	36	36	16	61	24	0	75	75	75	75	50	50	25	25	25	720.55
18Hcam	25	27	0	14	74	NC	NC	55	14	75	100	100	50	25	0	50	50	25	769.01
25Hcam	10	0	24	21	36	42	53	52	41	75	75	100	25	25	25	25	75	75	778.58
4Msil	0	0	99	22	34	NC	54	62	53	50	100	75	50	25	50	100	75	100	1004.15
10Msil	8	56	8	43	67	NC	54	40	57	75	25	75	25	25	25	75	75	50	827.46
12Msil	54	0	0	57	98	22	60	88	68	75	75	75	50	25	50	100	50	50	998.43
14Msil	0	3	0	24	45	33	NC	73	41	75	50	50	50	50	0	75	50	50	707.08
19Msil	24	16	59	29	74	51	54	61	59	75	75	75	25	25	25	100	75	100	1002.51
21Msil	68	57	8	73	34	34	NC	59	NC	75	100	75	25	50	50	50	50	50	965.38
24Msil	39	25	0	23	27	NC	66	63	61	75	100	50	50	50	25	100	50	50	904.46
25Msil	0	43	43	44	54	40	64	68	72	50	75	50	50	25	25	100	75	50	928.08

(1)=Calculado en base a los valores máximos y mínimos de cada prueba

en primer lugar un coeficiente para cada animal (desviación estándar/media) tomando como datos los valores correspondientes a cada ciclo de muda y, posteriormente, se obtuvo la media de todos estos coeficientes, que correspondía al CVT.

### 3.3.1. Determinación del hemograma.

El hemograma fue considerado de manera simplificada, evitándose cuantificar los diferentes tipos hemocitarios y limitándose a la determinación del número total de hemocitos. Tal simplificación responde al hecho de que el reconocimiento de los tipos celulares requiere una observación meticulosa y una gran experiencia del operador.

Los hemogramas mostraron frecuentemente aumentos y reducciones drásticos del número de hemocitos en lapsos de 15 días ( $CVT=0.48$ ), lo que corresponde a la duración promedio de cada ciclo de muda durante el ensayo. El promedio global encontrado fue de 20 millones de hemocitos por mL. El conteo promedio de hemocitos por ciclo permaneció relativamente estable, aproximadamente 18 millones por mL para el primero, 22 millones por mL para el segundo y 20 millones por mL para el tercer ciclo de muda. Los conteos fueron expresados como porcentajes considerando el menor valor (1,000,000 hemocitos/mL) como el 0% y el mayor (51,400,000 hemocitos/mL) como el 100%. Un valor extremo de 66,800,000 hemocitos/mL no fue establecido como límite del rango ya que, en base a la información disponible, se consideró como una cantidad excepcionalmente alta.

Nueve animales tuvieron, para los tres análisis, una media superior a la media poblacional (7Mcam, 11Mcam, 7Hsil, 10Hsil, 3Hcam, 12Msil, 19Msil, 21Msil, 25Msil). Los camarones 7Mcam y 25Msil mantuvieron un número de hemocitos alto y relativamente estable. El camarón 10Hsil presentó, en promedio, el mayor número de hemocitos, destacándose un conteo superior a 66 millones de hemocitos por mL luego de la tercera muda. Se obtuvieron resultados para 20 animales (Figura 33), debido a que para los otros 10 supervivientes no se pudieron realizar los tres conteos por problemas ocasionales de

aglutinación celular. El Análisis de Rangos Múltiples de Duncan (ARMD) (Anexo III) no reveló diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 20 animales, encontrándose un  $CVI = 0.32$ .

### 3.3.2. Cuantificación del anión superóxido.

El anión superóxido es uno de los radicales de oxígeno producidos por los hemocitos en el curso del proceso de fagocitosis. Su cuantificación está basada en la reducción del NBT, realizándose las lecturas por espectrofotometría comparativamente entre dos muestras de hemocitos: estimulados y no estimulados. El ratio entre los dos valores es utilizado para determinar un índice, que corresponde a la tasa de estimulación. Los valores próximos a 1 corresponden a animales cuyos hemocitos no reaccionaron a la estimulación. Esta prueba es complementaria y, *a priori*, ligada con el hemograma.

Los valores máximos obtenidos fueron relativamente bajos comparados con aquellos observados en otras circunstancias y en animales de la misma talla (Rodríguez, com. pers.). Para uno de los animales (11Hsil) la tasa medida en el primer ciclo fue de 4.55, sin embargo este valor no fue tomado en cuenta para establecer el rango de la prueba por ser extremada e inusualmente alto. En lo que concierne a los animales analizados en el presente trabajo, la producción de anión superóxido no se mostró directamente relacionada con el hemograma (Figura 42), al menos considerando el número de hemocitos sin distinción de sus tipos: hialinocitos, granulocitos y semi-granulocitos.

Como se indicó anteriormente, el índice correspondiente a cada animal fue expresado luego en un porcentaje, considerando 1 y 1.79 como 0 y 100% respectivamente. Esto significa que se consideró *a priori* como mejor en términos de capacidad inmunitaria, un índice alto que un índice bajo. Este criterio resulta lógico si se considera que una mayor producción de anión superóxido permite matar más eficazmente microorganismos, lo que constituye la base de pruebas análogas practicadas en vertebrados.

Entre los treinta animales analizados en tres ocasiones (Figura 34), diez presentaron tasas promedio superiores a la media poblacional de 1.21 (12Mcam, 16Mcam, 24Mcam, 7Hsil, 10Hsil, 11Hsil, 17Hsil, 20Hsil, 19Msil, 21Msil). Según el ARMD (Anexo III) la comparación del índice de cada animal con el de los otros 29 camarones reveló que en trece casos había un índice significativamente superior ( $p < 0.05$ ); el CVI fué de 0.53, mientras que el CVT fué de 1.19.

### 3.3.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana para cada camarón es estimada espectrofotométricamente en base a la comparación de suspensiones bacterianas control y de suspensiones bacterianas incubadas con una muestra de plasma. Si las dos suspensiones tienen la misma densidad óptica esto significa que el plasma carece de actividad antibacteriana, mientras que la ausencia de crecimiento bacteriano en presencia del plasma corresponde a una inhibición total. De esta manera una tasa de inhibición comprendida entre 0 y 100% será determinada para cada animal, considerándose este porcentaje de inhibición como el índice de actividad antibacteriana.

Es importante considerar que esta prueba se basa no en la utilización de una bacteria patógena del camarón, sino de la bacteria *Escherichia coli*, escogida en razón de su extrema sensibilidad a los péptidos antimicrobianos (Tapia, 1996). La elección de *E. coli* no debe tener consecuencias en la presente aplicación pues parece que los péptidos antibacterianos de invertebrados son activos contra un gran espectro de bacterias. Además, es importante precisar que las bacteriosis de camarones son más comúnmente síndromes que afectan el sistema digestivo. No se debe subestimar sin embargo la importancia de la actividad antibacteriana del plasma, ya que corresponde a un elemento primordial del sistema inmunitario anti-infeccioso que protege al animal de septicemias originadas por lesiones externas o internas. Adicionalmente se debe recordar que ciertos péptidos antibacterianos de invertebrados tienen también actividades antifúngicas y/o antivirales, por ejemplo en el caso de las limulas (Muta & Iwanaga, 1996).

Veinte camarones pudieron ser analizados durante sus 3 mudas (Figura 35), 13 presentaron una inhibición media igual o mayor que la media poblacional (alrededor del 53%) (2Hsil, 7Hsil, 11Hsil, 18Hsil, 20Hsil, 21Hsil, 8Hcam, 12Hcam, 4Msil, 12Msil, 19Msil, 24Msil, 25Msil). Para un animal (7Hsil) la actividad antibacteriana fue en cada ocasión del 100%, mostrando el ARMD (Anexo III) que la diferencia en la actividad microbiciada entre este camarón y los otros es significativa ( $p < 0.05$ ). Se encontraron niveles interesantes de variabilidad individual (CVI=0.39) siendo además esta prueba la que mayor estabilidad temporal presentó (CVT=0.28). La imposibilidad de determinar todos los índices antibacterianos en los 30 animales estuvo relacionada con perturbaciones de la lectura espectrofotométrica, ya sea por una fuerte melanización o por presencia de bacterias contaminantes en el plasma.

#### 3.3.4. Inmunodosificación de la alfa 2 macroglobulina.

La disponibilidad de un anticuerpo monoclonal específico de la alfa-2-macroglobulina, así como de una técnica de inmunodosificación de tipo dot blot permitió efectuar cuantificaciones de esta proteína, que interviene en la regulación de diversos factores inmunitarios.

Este tipo de prueba es semicuantitativo en la medida en que es posible apreciar cinco grados de intensidad de la reacción (0, 1, 2, 3, y 4) por referencia al color del producto precipitado en la membrana. Estos valores fueron luego expresados en porcentajes, 0%, 25%, 50%, 75% y 100% correspondiendo a 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

La inmunodosificación fue realizada en los 30 animales que sobrevivían aún al tercer análisis (Figura 36). Se observó que varios animales tuvieron índices estables, 19 animales con una respuesta promedio mayor a la media de la población, que fue de 2.81 (2Hsil, 7Hsil, 10Hsil, 11Hsil, 17Hsil, 18Hsil, 20Hsil, 21Hsil, 3Hcam, 8Hcam, 12Hcam, 17Hcam, 18Hcam, 25Hcam, 4Msil, 12Msil, 19Msil, 21Msil, 24Msil). Los camarones

18Hsil y 18Hcam fueron los que presentaron mayores cantidades de alfa 2 macroglobulina. Según el ARMD (Anexo III), 18Hsil y 18Hcam no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) de 21Msil, 10Hsil, 2Hsil, 20Hsil y 21Hsil que son los animales con los mayores índices luego de 18Hsil y 18Hcam. Con respecto a los demás camarones, los índices de estos dos animales si son significativamente superiores ( $p < 0.05$ ). Esta fué la prueba que menor variabilidad mostró (CVI=0.17, CVT=0.28)

### 3.3.5. Inmunodosificación del factor de coagulación.

El factor de coagulación, que es un elemento primordial del sistema inmunitario del camarón para evitar las hemorragias, fue cuantificado igualmente vía dot blot, gracias a la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal apropiado. Al igual que para la alfa-2-macroglobulina, los valores de intensidad observados en la reacción del anticuerpo, fueron expresados en forma de porcentajes (Figura 37).

El promedio de todos los valores fue de 1.41. En base a sus promedios individuales, correspondientes a los tres análisis, once camarones (16Mcam, 2Hsil, 7Hsil, 14Hsil, 3Hcam, 12Hcam, 17Hcam, 4Msil, 12Msil, 21Msil, 24Msil) tuvieron una calificación mayor que la media global. Los camarones con los valores más altos fueron 7Hsil y 17Hcam. El ARMD (Anexo III) mostró que el 7Hsil no difiere significativamente ( $p < 0.05$ ) de 17Hcam, pero sí de los demás animales. La variabilidad tanto individual como temporal de la prueba fue medianamente marcada en relación con las otras (CVI=0.37, CVT=0.32)

### 3.3.6. Inmunodosificación de una aglutinina.

El plasma del camarón *P.vannamei* contiene una aglutinina, que es una proteína de reconocimiento de microorganismos, facilitando la fagocitosis de estos últimos por los hemocitos. Esta proteína puede ser cuantificada gracias a la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal específico, siendo la inmunopueba utilizada igualmente de tipo dot blot, como se describió previamente. De la misma manera, se estableció visualmente un

índice correspondiente al grado de coloración del dot blot, siendo luego el índice transformado en porcentaje (Figura 38).

Catorce camarones tuvieron una calificación mayor que la media general que fue de 2.13 (5Mcam, 11Mcam, 2Hsil, 7Hsil, 17Hsil, 18Hsil, 25Hcam, 4Msil, 10Msil, 12Msil, 14Msil, 19Msil, 24Msil, 25Msil). 19Msil y 4Msil presentaron las mayores calificaciones; 19Msil resultó ser significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) de todos los animales, excepto de 4Msil. La variabilidad individual encontrada fue similar a la del factor de coagulación (CVI=0.37), presentándose además niveles considerables de variación temporal (CVT=0.48).

Cada uno de los factores plasmáticos inmunodosificados vía dot blot corresponde a un carácter monogénico, ya que su determinación se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos; ellos pueden resultar de la expresión de una o varias copias del gen correspondiente. La técnica utilizada fue escogida debido a su simplicidad, pero hay que considerar que condujo a una cuantificación apenas aproximada, limitada a una escala de cinco niveles. En términos de su aplicación sin embargo, resulta más relevante contar con herramientas de este tipo que utilizar técnicas eventualmente más informativas, pero evidentemente más costosas y laboriosas.

### **3.4. Análisis integrado de los efectores inmunitarios y los perfiles de RAPD.**

Cada factor inmunitario fue cuantificado en base a un tipo de prueba, conduciendo a valores o índices expresados de manera diversa. Se realizó la transformación ulterior de estos valores en porcentajes, teniendo en cuenta los rangos de los valores a fin de tener una homogeneidad de los resultados que permita integrarlos en un índice global, característico de cada animal, y que refleje su capacidad inmunitaria. De esta manera debería ser posible identificar animales con mayor capacidad inmunitaria. Además, el hecho de que este índice individual corresponda a análisis realizados en tres intervalos de muda, permite considerar





Figura 33: Porcentajes relativos de hemogramas determinados en tres ciclos de muda para 20 camarones.

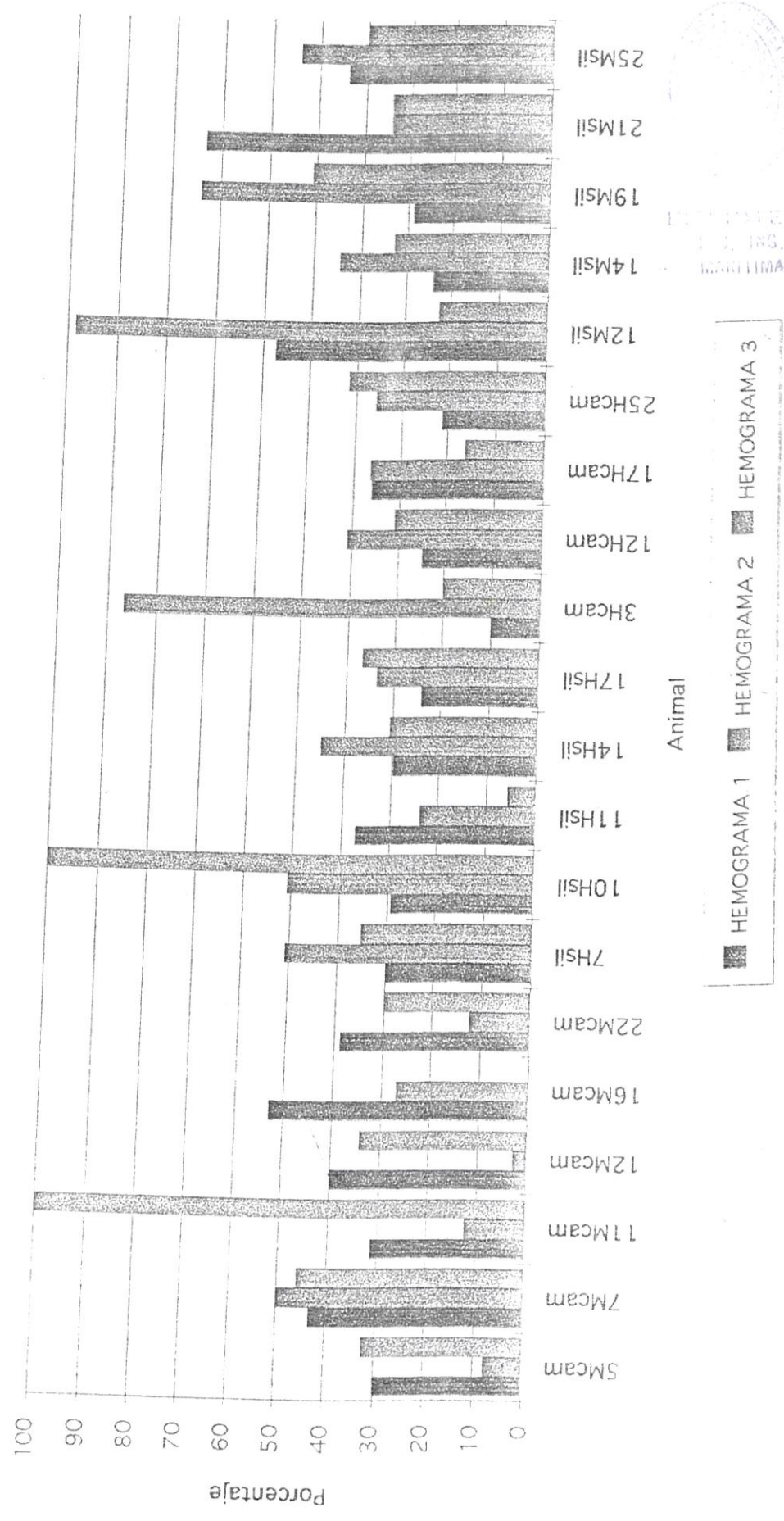


Figura 34: Porcentajes relativos de los índices de producción de anión superóxido (tasa NBT) determinados en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.

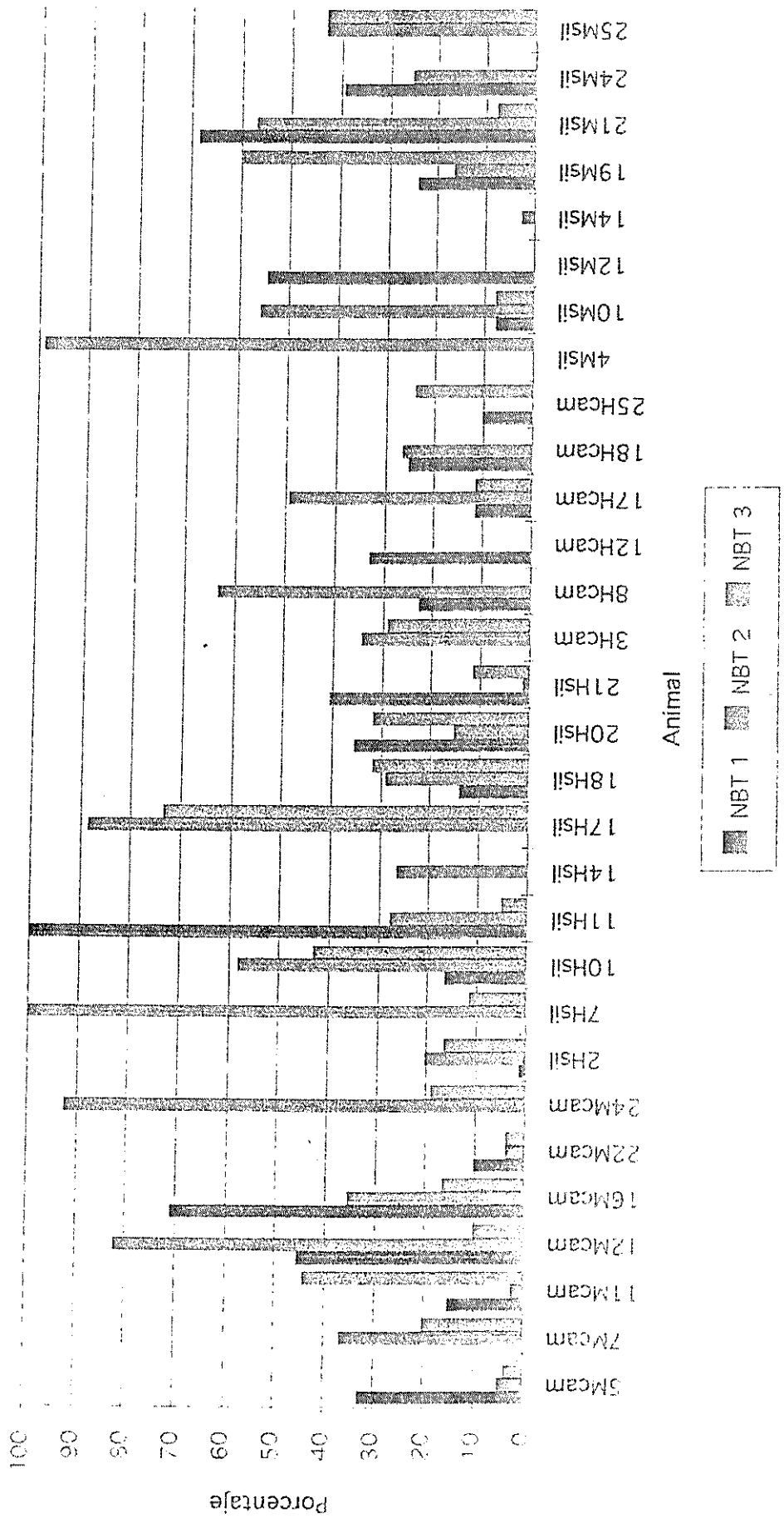


Figura 35: Porcentajes relativos de la actividad antibacteriana del plasma determinada en tres ciclos de muda para 20 camarones.

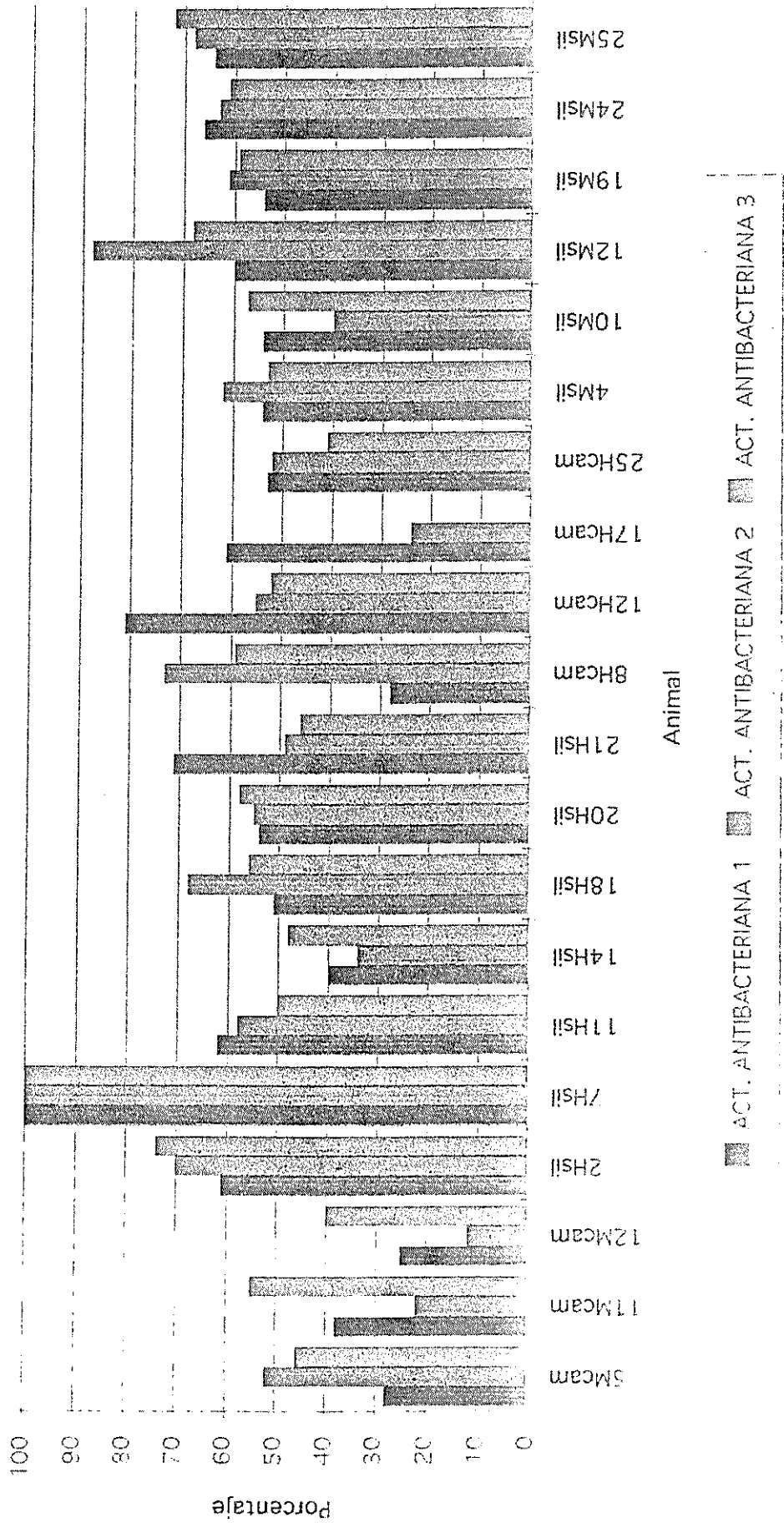


Figura 36: Porcentajes relativos de la cantidad de alfa-2-macroglobulina determinada en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes

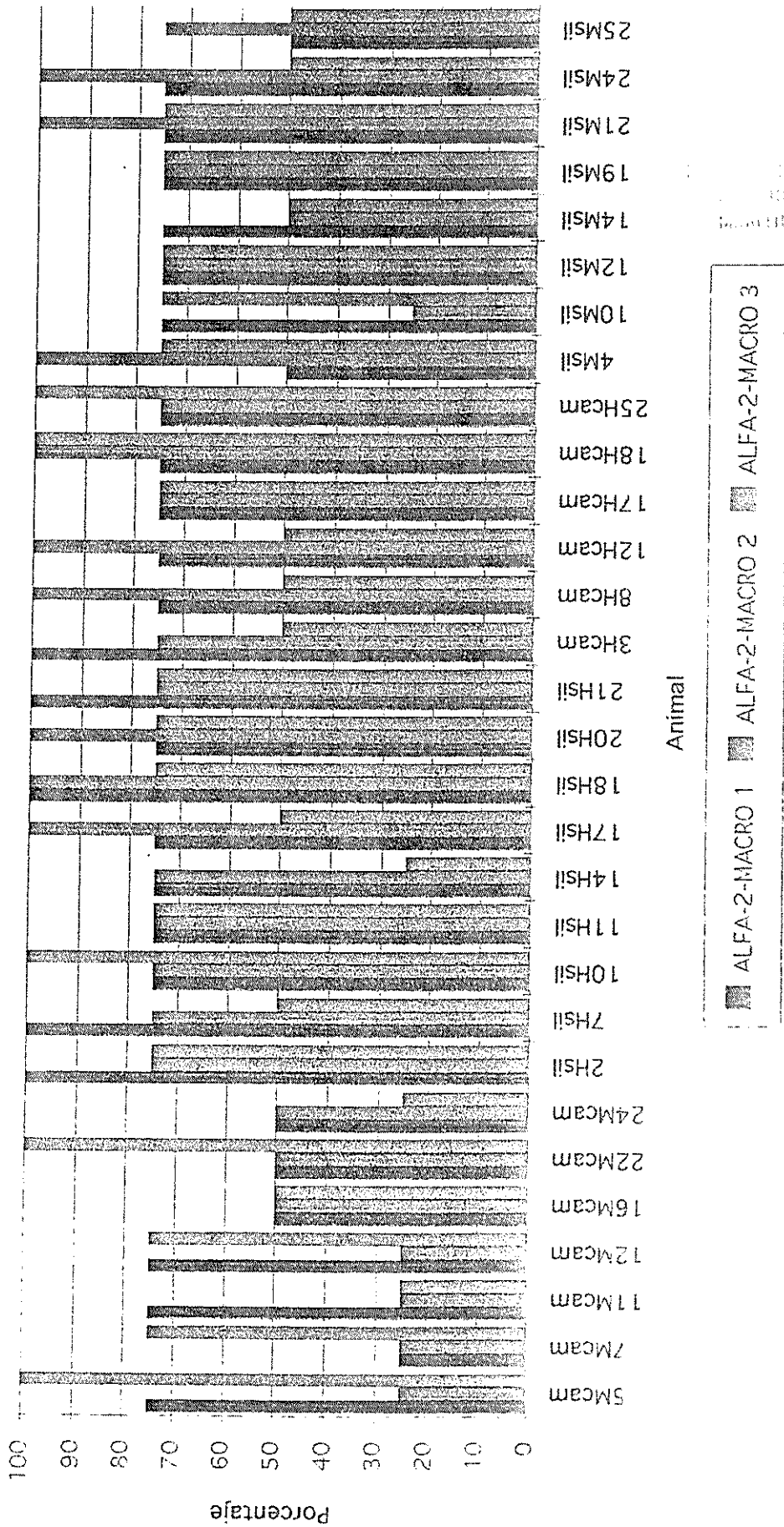


Figura 37: Porcentajes relativos de la cantidad de coagulación determinada en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.

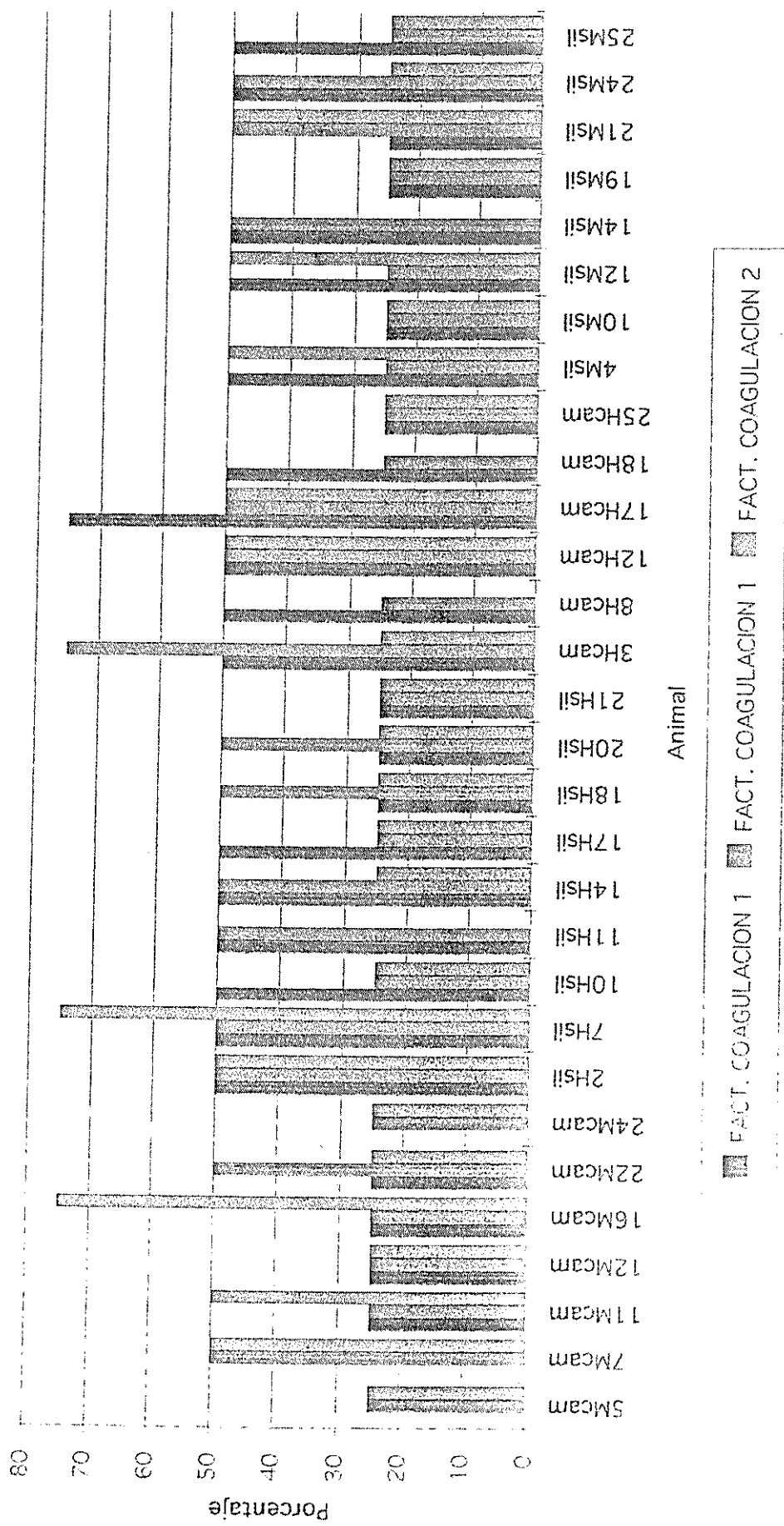
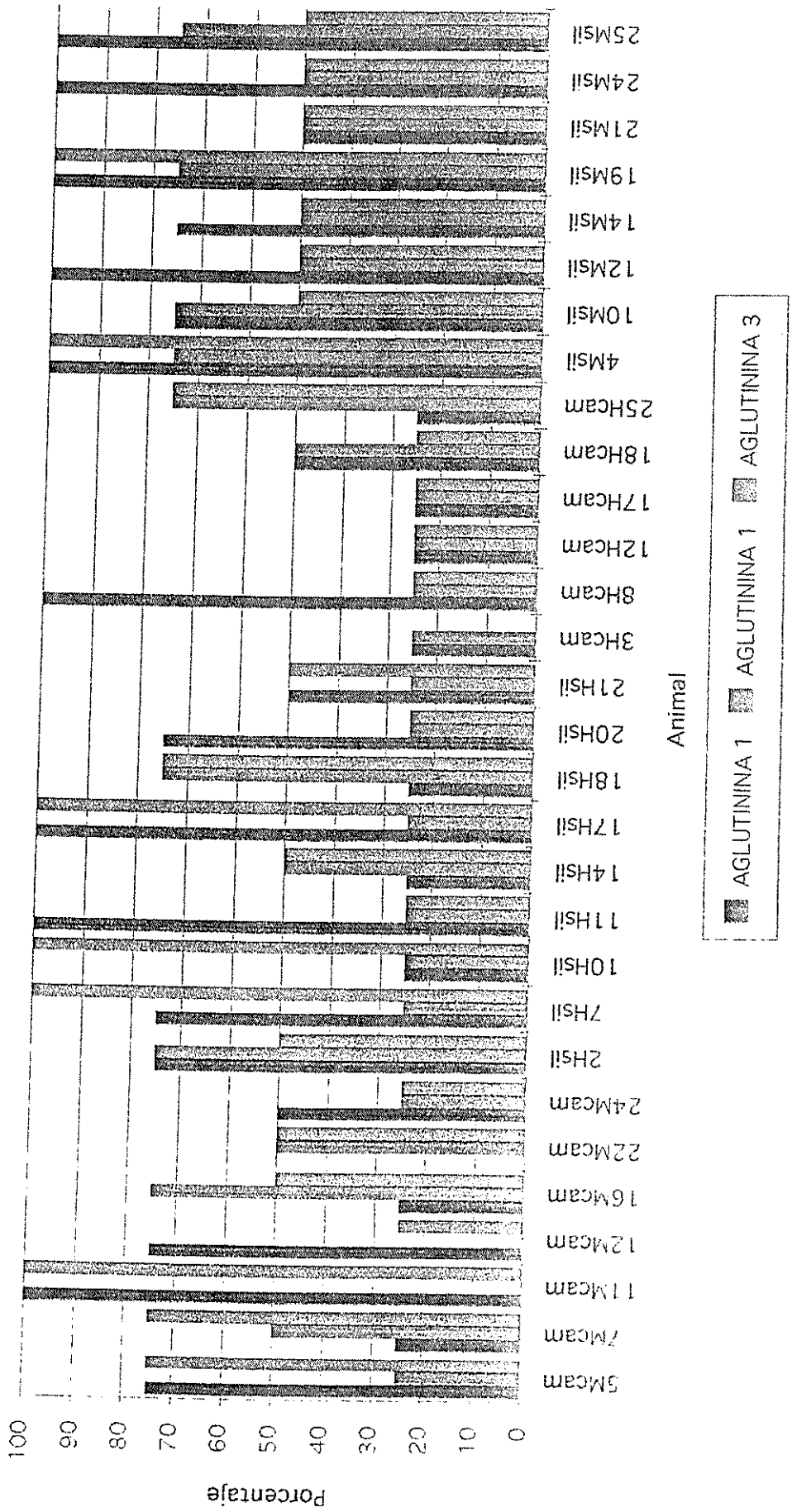


Figura 38: Porcentajes relativos de la cantidad de aglutinina determinada en tres ciclos de muda para los 30 camarones supervivientes.



que esta superioridad sea en parte de origen genético. El peso, único factor que podría considerarse variable para los animales analizados, no presentó una relación evidente con el llamado índice inmunitario global (Anexo IV).

Este índice inmunitario fue primeramente concebido adicionando los porcentajes correspondientes a cada una de las seis pruebas en cada uno de los tres análisis. De esta manera para cada animal se estimaron tres índices inmunitarios parciales. Teniendo en cuenta que cada prueba puede corresponder a un porcentaje máximo del 100%, los índices inmunitarios parciales pueden estar comprendidos entre 0 y 600. Estos índices parciales permiten apreciar la variabilidad temporal de la capacidad inmunitaria de cada camarón.

Se consideró además un segundo índice inmunitario llamado índice global, que corresponde a la adición de los tres índices parciales de cada animal. Así, los índices inmunitarios globales pueden estar comprendidos entre 0 y 1800. Estos índices permiten apreciar la variabilidad individual de la capacidad inmunitaria de los camarones.

Es importante considerar que este doble concepto de índice se basa en la hipótesis de que, independientemente de la prueba, el porcentaje máximo corresponde a una condición óptima para el efector inmunitario, considerado desde el punto de vista de la capacidad inmunitaria del camarón. La validez de esta hipótesis dependerá en gran medida de la determinación de rangos normales o característicos de la especie, netamente en relación con el estado de desarrollo, procesos fisiológicos tales como la muda y condiciones de estrés.

Los índices parciales de los 12 animales en los que se realizaron todos los análisis son presentados en la figura 39. Estos índices se mostraron, para la mayoría de los animales, variables a lo largo del ensayo. Entre los pocos individuos que tienen índices parciales estables, uno de ellos (7Hsil) presenta además índices parciales superiores. La superioridad de este animal, en términos de capacidad inmunitaria, se aprecia claramente en el histograma de los índices globales (Figura 40). El ARMD (Anexo II) revela diferencias

significativas ( $p < 0.05$ ) entre este camarón (7Hsil) y los tres camarones con los índices globales menores (5Mcam, 12Mcam y 14Hsil). El perfil RAPD del camarón 7Hsil está caracterizado por 2 bandas mayores con el iniciador #174 ( $\approx 750$  y  $500$  pb) y por 2 bandas mayores con el iniciador #456 ( $\approx 400$  y  $250$  pb). En conjunto, estos cuatro marcadores permiten diferenciar a este camarón de todos los demás.

Considerando por una parte el hemograma, la producción del anión superóxido y la actividad antibacteriana y, por otra parte el grupo de pruebas tipo dot blot con anticuerpos monoclonales correspondientes a la alfa-2-macroglobulina, la aglutinina y el factor de coagulación, se obtuvieron para cada animal dos subíndices globales por la adición de los porcentajes respectivos de cada prueba. Cada uno de los dos subíndices globales así estimados reflejan, al igual que el índice global, la capacidad inmunitaria de cada animal (Figura 41). Consecuentemente, la variabilidad de la capacidad inmunitaria en los 12 camarones estudiados se puede apreciar considerando cualquiera de los dos subíndices. Esta observación sugiere que la determinación de un subíndice global podría ser suficiente para evaluar la capacidad inmunitaria de un camarón.



Figura 39: Índices inunitarios parciales calculados para los 12 camarones analizados.

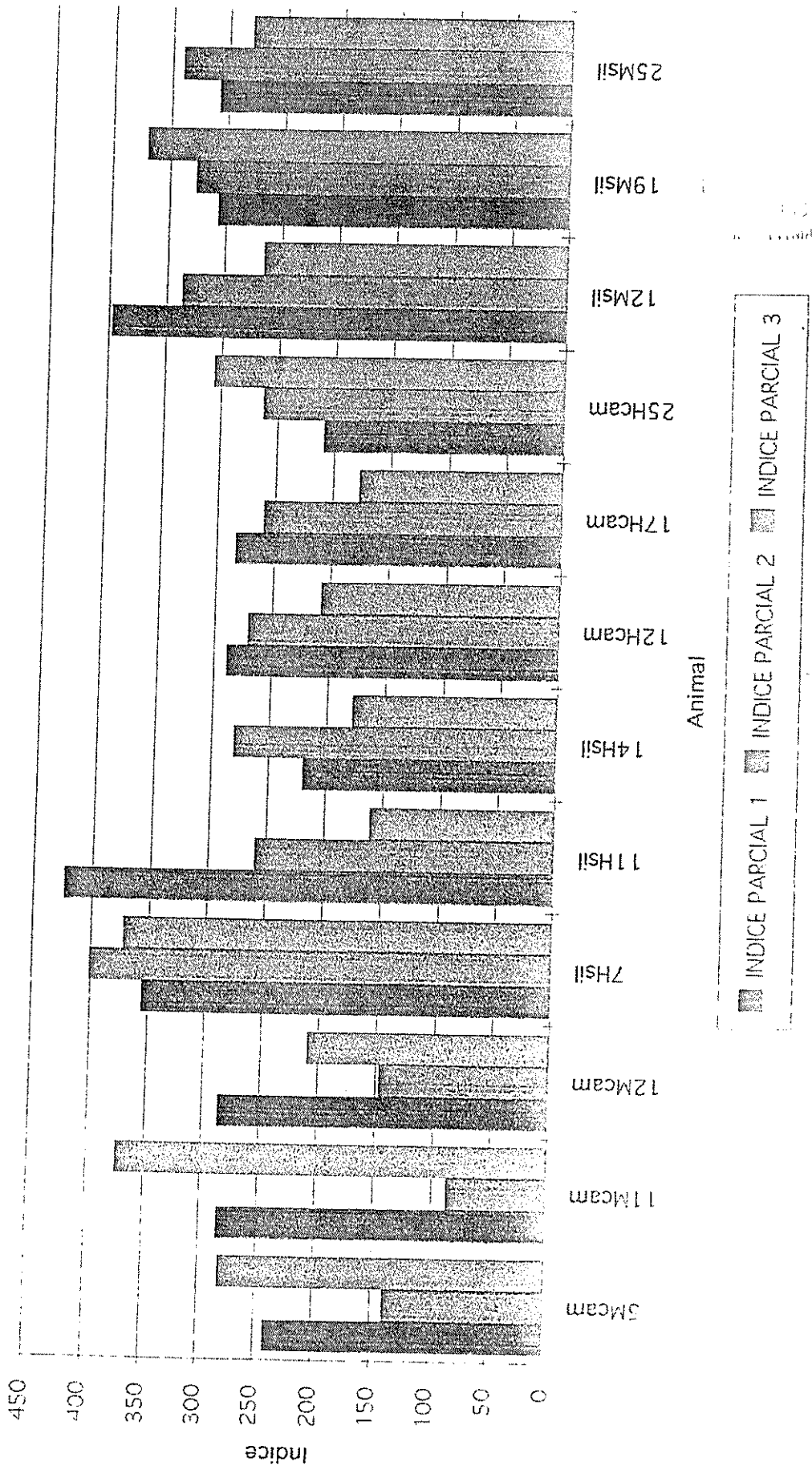


Figura 40: Índice inmunitario global calculado para los 12 camarones analizados.

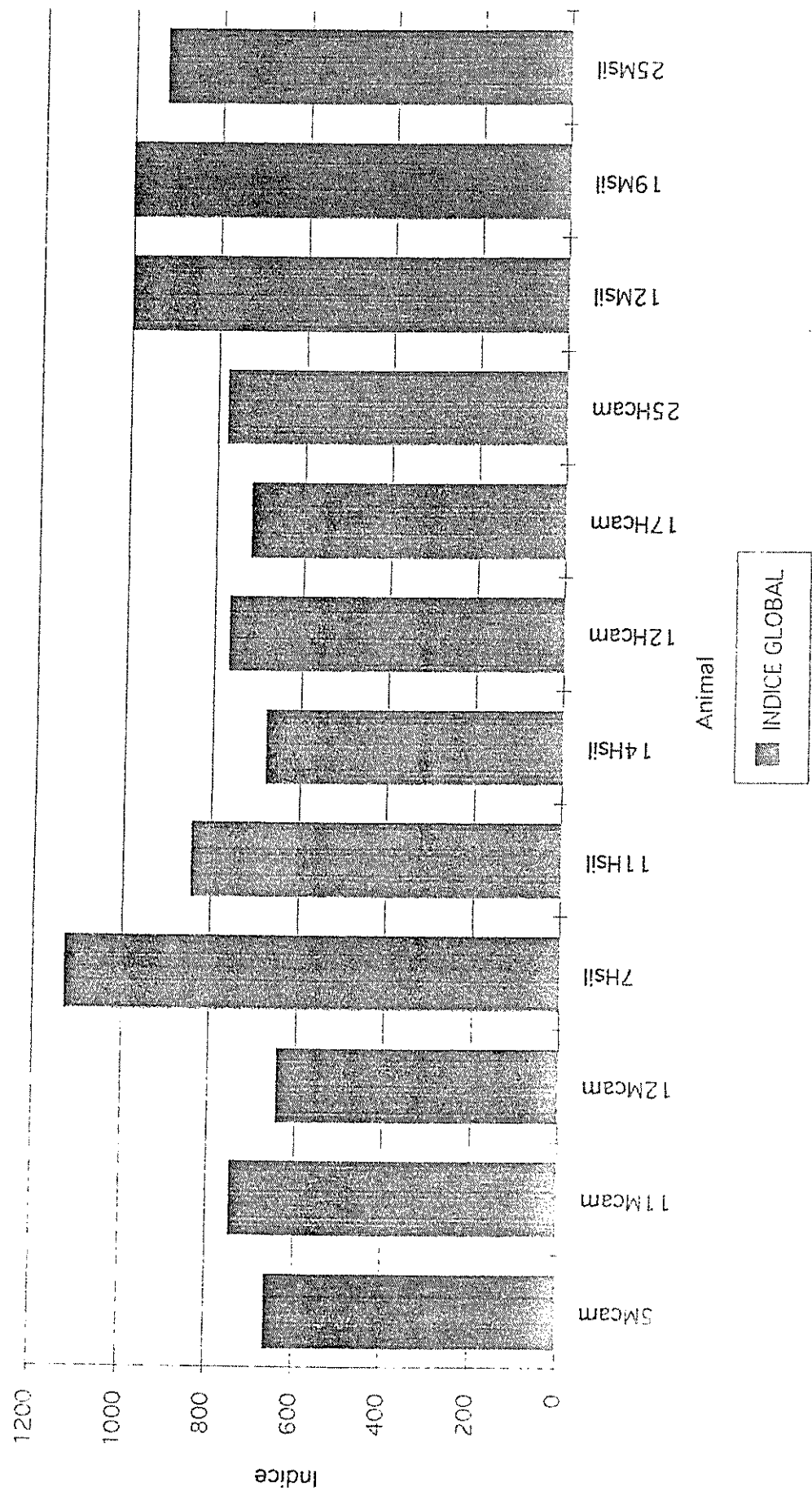


Figura 41: Variación individual del índice inmunitario global y de los subíndices correspondientes a las pruebas cuantificadas vía dot blot y vía otras pruebas en los 12 camarones analizados.

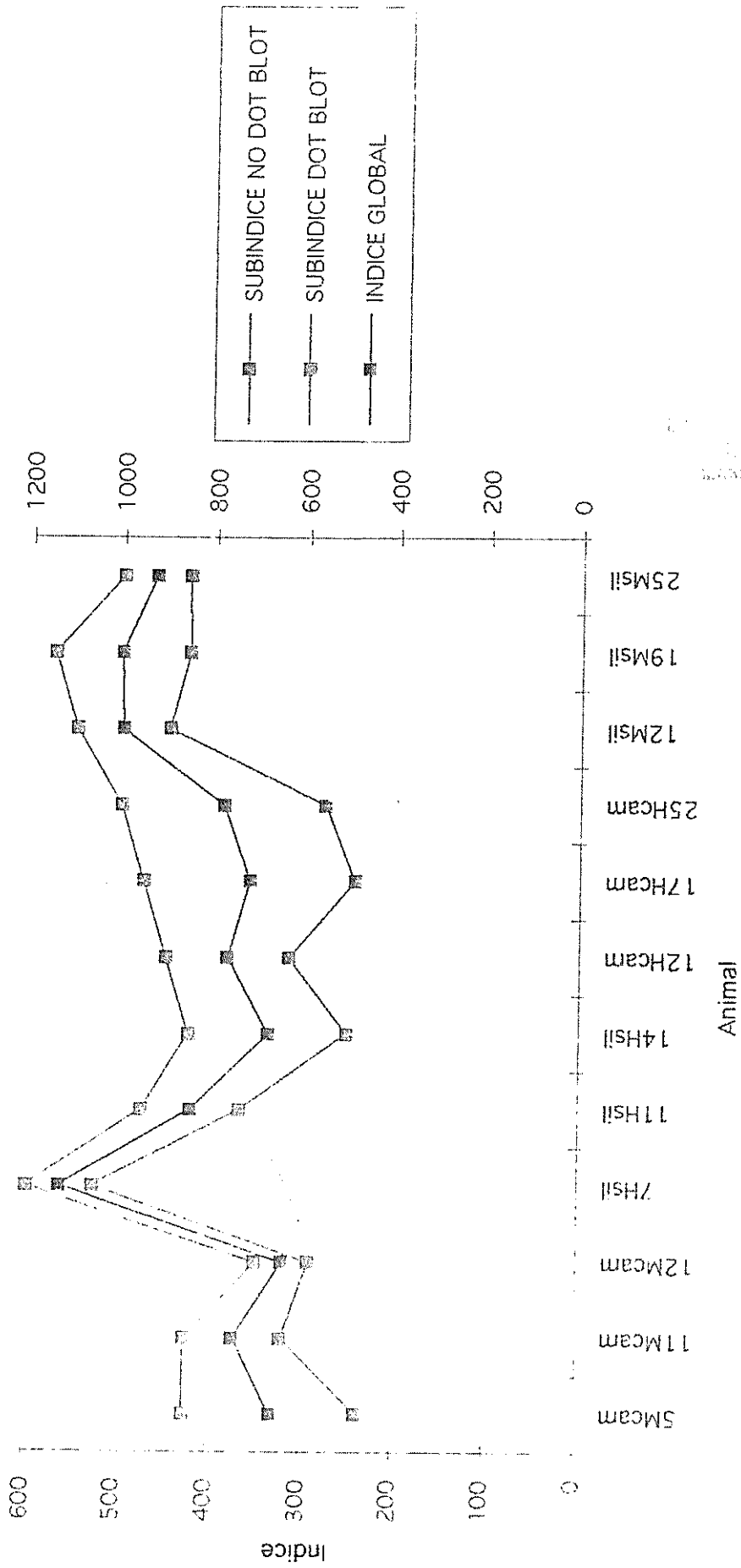
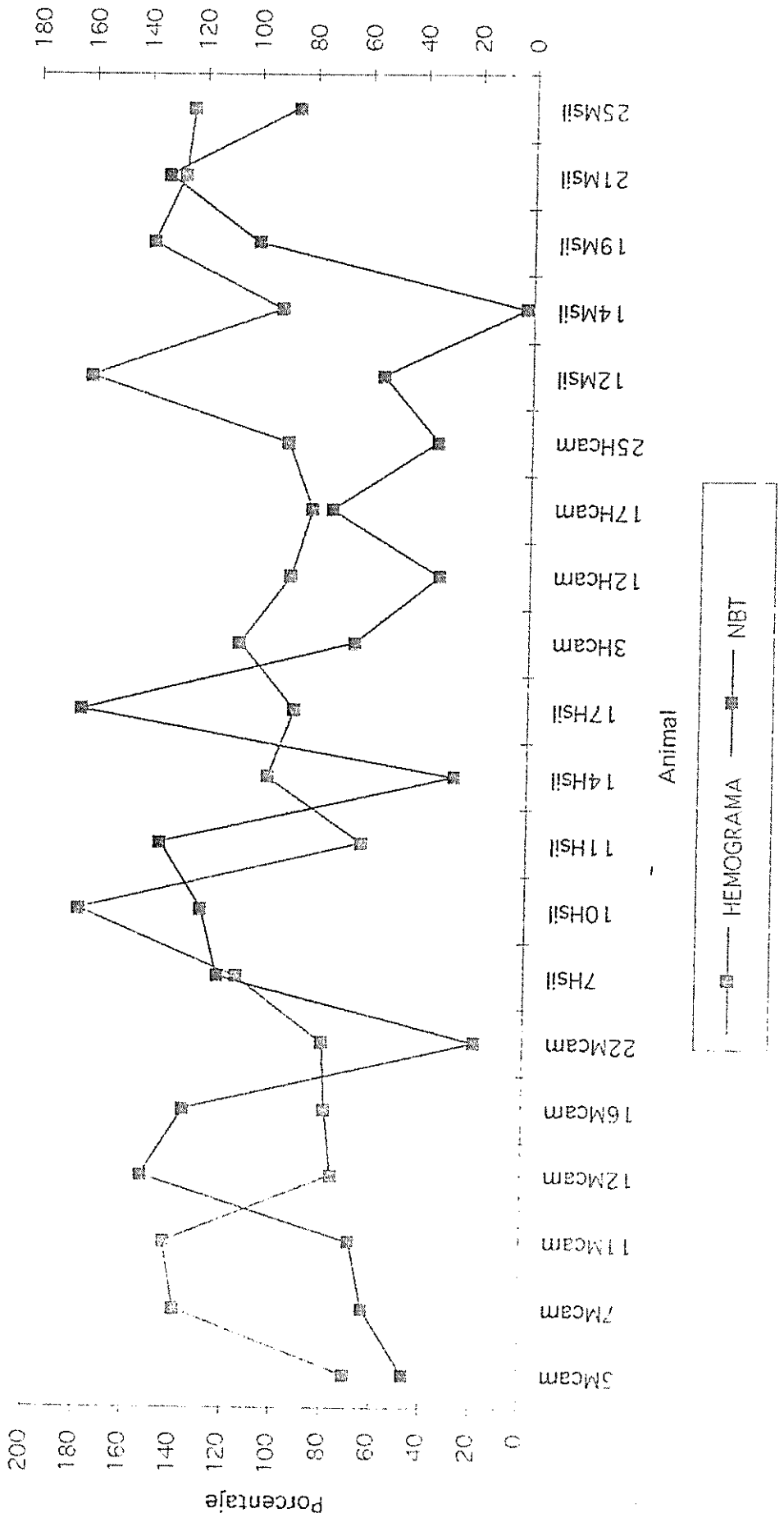


Figura 42: Variación individual de los porcentajes relativos para hemograma y tasa de producción de anión superóxido en 20 camarones.



## CONCLUSIONES

- El presente trabajo constituye el primer estudio que considera simultáneamente la caracterización de marcadores genéticos y la cuantificación de algunos efectores y actividades inmunitarios en el camarón *Penaeus vannamei*.
- Se ha demostrado la factibilidad técnica de realizar simultáneamente la caracterización genética e inmunitaria de camarones adultos a partir de pequeñas muestras de hemolinfa (200-500  $\mu$ L). La originalidad del trabajo resulta de la disponibilidad, por una parte, de la técnica de AP-PCR, que permite caracterizar el perfil RAPD de un camarón a partir de pocos hemocitos (Melena, 1997) y, por otra parte, de una serie de pruebas cuantitativas desarrolladas para evaluar la capacidad inmunitaria del camarón igualmente a partir de pocos hemocitos o de pequeños volúmenes de plasma (Muñoz, 1996; Tapia, 1996; Rodríguez *et al.*, en prep.).
- La utilización de la técnica de AP-PCR permitió obtener perfiles RAPD para 12 animales en estudio, lo que confirma su utilidad para caracterizar genéticamente animales a nivel infraespecífico, sin contar con ninguna información previa sobre el genoma. A pesar de los problemas de contaminación y reproductibilidad, es posible distinguir algunos productos característicos que son obtenidos regularmente y que pueden por tanto ser considerados como marcadores.
- La aplicación de la AP-PCR deberá orientarse a la distinción de camarones a nivel individual y a nivel de líneas, así como de los productos de cualquier cruce, volviéndose factible evaluarlos fenotípicamente después de ser cultivados a gran escala bajo las mismas condiciones ambientales (e.g. en el mismo estanque).
- Debido a la detección de ciertos niveles de variabilidad individual, pero mayormente por su importancia en términos inmunológicos, el hemograma es un parámetro interesante desde el punto de vista de selección. La considerable variabilidad temporal sin embargo, dificultaría

su explotación en términos de identificación y elección de reproductores. El interés del hemograma deberá entonces ser considerado tomando en cuenta los tipos hemocitarios y conjuntamente con las otras pruebas inmunitarias.

-La variabilidad individual de la producción de anión superóxido se mostró más marcada que aquella de los contajes hemocitarios, probablemente porque ciertos tipos hemocitarios están más implicados en la producción de anión superóxido. La prueba NBT aparecería como una herramienta a elegir ya que permite analizar un elemento importante del sistema inmunitario anti-infeccioso, que además parece muy variable a escala individual. Desafortunadamente, esta variabilidad es también temporal, lo que impone la realización de pruebas en varios intervalos de tiempo para integrar los dos niveles de variabilidad y poder explotarlos en términos de selección.

-Al igual que la producción de anión superóxido, la actividad antibacteriana se mostró muy variable individualmente. La variabilidad temporal es relativamente baja, lo que es ventajoso para seleccionar animales sin tener que multiplicar el número y la frecuencia de análisis. Se puso en evidencia que un camarón (7Hsil) tenía en cada análisis una actividad del 100%, constituyéndose en un animal evidentemente interesante desde el punto de vista de selección de líneas resistentes.

-La inmunodosificación de la alfa-2-macroglobulina mostró una variabilidad particularmente baja comparativamente a los otros parámetros considerados. Esto, y el hecho de que esta proteína no tiene aparentemente un rol directo frente a agentes patógenos, reduce su interés en términos de selección de animales resistentes.

-La variabilidad individual de la albuginina fué medianamente marcada en comparación con aquella del anión superóxido, sin embargo se presentó apenas menos variable que la actividad antibacteriana. Su importancia en los procesos de opsonización y reconocimiento bacteriano y la presencia de niveles interesantes de variabilidad individual conllevan a incluirla como un potencial criterio de selección de animales resistentes, sin embargo los

altos niveles de variabilidad temporal podrían constituir una limitante en este sentido y su aplicación deberá ser complementada con otras pruebas.

-El factor de coagulación se mostró medianamente variable desde el punto de vista temporal e individual. El rol de esta proteína, más bien relacionada con los mecanismos antihemorrágicos indica que probablemente no debería ser considerada como prioritaria en términos de selección de animales resistentes a enfermedades. Es importante sin embargo no subestimar su importancia como factor de defensa ante daños mecánicos.

-Considerados en conjunto, parecería que la capacidad de los hemocitos para producir anión superóxido, la actividad antibacteriana del plasma, la aglutinina, el factor de coagulación y finalmente el hemograma constituyen en orden decreciente los parámetros con mayor variabilidad individual (Tabla 3 y Figura 43). Son por lo tanto estos parámetros los que deberán ser considerados prioritariamente para emprender trabajos de selección de camarones con mejor capacidad inmunitaria. Conviene evidentemente confirmar primero estos resultados, que deben ser considerados como preliminares por el número limitado de animales que fueron analizados. Convendrá también evaluar la validez de las hipótesis planteadas, que consistieron en considerar que los valores más elevados corresponden a condiciones óptimas desde el punto de vista de la capacidad inmunitaria.

-La aplicación de estos análisis en programas de selección a gran escala impondrá la realización de un número extremadamente elevado de pruebas, para escoger entre varios miles de camarones aquellos con mejor índice inmunitario. Un aspecto práctico crucial para la factibilidad de tales programas podría consistir en reducir el número de pruebas, ya que la simplificación técnica fue ya tomada en cuenta durante su desarrollo y optimización. Teniendo en cuenta las primeras informaciones sobre la variabilidad de los parámetros, sería factible abandonar inicialmente la inmunodosificación de la alfa-2-macroglobulina.

-Desde un punto de vista estratégico, la domesticación de camarones y simultáneamente la selección de líneas con mejor capacidad inmunitaria podrían ser focalizadas en la resistencia

a bacterias, ya que los criterios de selección pueden ser cuantificados y han presentado una cierta variabilidad. En términos de investigación, estos caracteres implicados en la resistencia a bacterias deberán ser objeto de estudios de genética cuantitativa; en algunos de ellos considerando un origen poligénico e indeterminado (genes de enzimas implicadas en el metabolismo respiratorio de los hemocitos), y en otros un origen monogénico cuya determinación ya está en curso, como es el caso del gen de la aglutinina y los genes de péptidos antimicrobianos de la recientemente caracterizada familia peneidinae (Destomieux *et al.* 1997). La importancia de esta estrategia en términos económicos es evidente, ya que las bacteriosis devastan las producciones de laboratorios y camarónicas. La obtención de líneas resistentes a bacterias permitirá también reducir o detener la utilización de antibióticos, cuyos residuos contaminan el medio marino y contribuyen a la aparición de cepas bacterianas resistentes a estos productos.



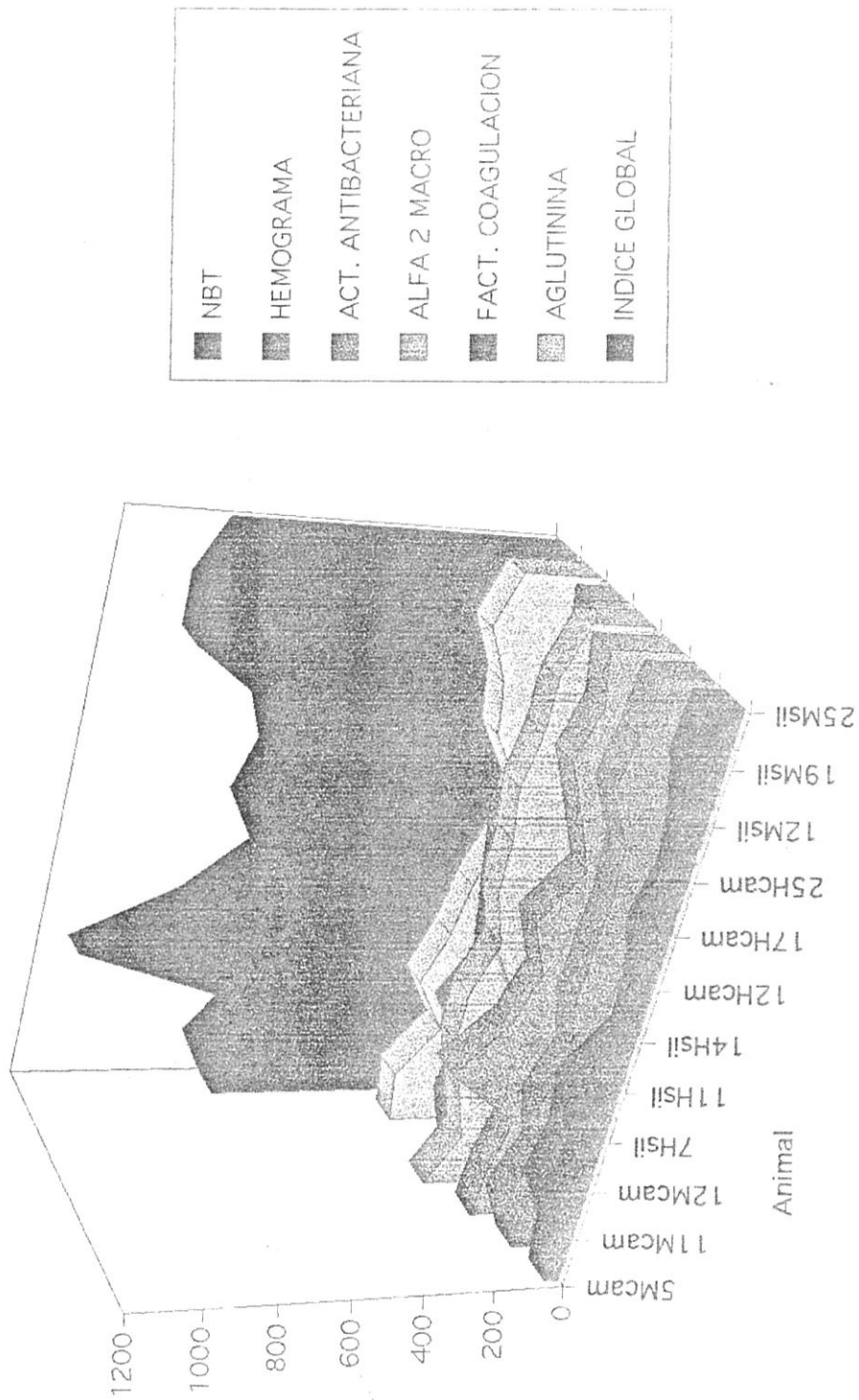
Tabla 3: Medias y desviaciones estándar para las seis pruebas inmunitarias determinadas en 12 camarones.

ANIMAL	NBT		HEMOGRAMA		ANTIBACTERIANO		ALFA 2		FACT. COAGULACION		AGLUTININA	
	Media	Desviación St.	Media	Desviación St.	Media	Desviación St.	Media	Desviación St.	Media	Desviación St.	Media	Desviación St.
5Mcam	14	16.46	23	13.50	42	12.49	67	38.19	17	14.43	58	28.87
11Mcam	21	21.42	48	46.12	38	16.50	42	28.87	33	14.43	67	57.74
12Mcam	46	36.08	26	20.02	26	14.01	58	28.87	25	0.00	33	38.19
7Hsil	37	54.74	39	10.82	100	0.00	75	25.00	58	14.43	67	38.19
11Hsil	44	49.56	22	15.85	57	6.11	75	0.00	33	28.87	50	43.30
14Hsil	9	15.35	35	8.59	41	7.02	58	28.87	42	14.43	42	14.43
12Hcam	11	19.00	32	8.15	63	15.95	75	25.00	50	0.00	25	0.00
17Hcam	24	21.92	29	11.66	28	30.73	75	0.00	58	14.43	25	0.00
25Hcam	11	12.08	33	10.48	49	6.66	83	14.43	25	0.00	58	28.87
12Msil	18	31.43	59	38.04	72	14.42	75	0.00	42	14.43	67	28.87
19Msil	33	22.97	51	22.65	58	3.61	75	0.00	25	0.00	92	14.43
25Msil	29	24.85	46	7.21	68	4.00	58	14.43	33	14.43	75	25.00
TOTAL	25	13.05	37	11.84	53	20.86	68	11.70	37	13.51	55	20.55
C.V.I.	0.53		0.32		0.39		0.17		0.37		0.37	
C.V.T.	1.19		0.48		0.28		0.28		0.32		0.48	

C.V.= Coeficiente de variación=desviación estándar/media



Figura 43: Variación individual de los seis efectores inmunitarios en relación con el índice inmunitario global en los 12 camarones analizados.



## RECOMENDACIONES

- 1.- En base al presente trabajo se recomienda emprender un estudio a mayor escala a fin de, por una parte, conocer mejor la variabilidad individual y temporal de caracteres inmunitarios y, por otra parte, caracterizar mejor y más extensivamente los genomas de camarones utilizando un mayor número de iniciadores. En base a estos resultados, minimizar el número de pruebas inmunitarias y seleccionar los iniciadores más informativos.
- 2.- Emprender, en base a una colaboración productores-científicos, un programa de selección de camarones con una mejor capacidad de crecimiento y de resistencia. Las modalidades experimentales dependerán de los socios, pero el esquema de selección podría partir de una preselección de un gran número de camarones en base a sus tasas de crecimiento. Considerando los índices inmunitarios se podrán identificar animales candidatos para iniciar esquemas de cruzamiento y establecimiento de líneas. Simultáneamente, la obtención de perfiles RAPD permitirá caracterizar las líneas a nivel genético, controlar los cruces y buscar marcadores moleculares asociados a los fenotipos de interés.
- 3.- Emprender estudios acerca de la regulación de la expresión de genes de péptidos antibacterianos recientemente identificados en el genoma de *P. vannamei*, así como del gen de la aglutinina para la cual un anticuerpo monoclonal está disponible. Este estudio deberá conducir a identificar animales en los que los niveles de transcripción y traducción de los genes considerados sean más elevados que el promedio. Se abrirían así las vías a un trabajo de selección de genética cuantitativa para el cual los genes y sus productos de expresión serían bien conocidos. La caracterización completa de los genes y sus secuencias regulatorias revelaría información sobre los mecanismos moleculares de la expresión genética en el camarón, lo que podría ser de gran utilidad en el desarrollo de sistemas de transformación genética.

## REFERENCIAS

- ABO-ELWAFFA, A., MURAI, K., SHIMADA, T. 1995. Intra-and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor appl Genet*, 90: 335-340.
- AYLIFFE, M., LAWRENCE, G., ELLIS, J., PRYOR, J. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nuc. Ac. Research*, 22:1632-1636.
- BARUA, U. M., CHALMERS, K. J., THOMAS, W.T.B., HACKETT, C. A. 1993. Molecular mapping of genes determining height, time to heading, and growth habit in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36: 1080-1087.
- BARUFFI, L., DAMIANI, G., GUGLIELMINO, C., BANDI, C., MALACRIDA, A., GASPERI, G. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*., comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, 74: 425-437.
- BONIERBALE, M., PLAISTED, R., PINEDA, O., TANKSLEY, S. 1994. QTL Analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor. appl. Genet.*, 87: 973-987.
- BRUMMER, E., BOUTON, J., KOCHERT, G. 1995. Analysis of annual medicago species using RAPD markers. *Genome*, 38: 362-367.
- CARBONELL, E. A., GERIG, T. M., BALANSARD, E., ASINS, M. J. 1992. Interval mapping in the analysis of nonadditive quantitative trait loci. *Biometrics* 48: 305-315.
- CHALMERS, K. J., WAUGH, R., SPRENT, J.I., SIMONS A. J. & POWELL. W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472

- CHISHOLM, J.R.S., SMITH, V.J., 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110A: 39-45.
- DAVIS, T., YU, H., HAIGIS, K., MCGOWAN, P. 1995. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. *Theor appl Genet.*, 91: 582-588.
- DESTOUMIEUX, D., BULET, P., LOEW, D., VAN DORSSELAER, A., RODRIGUEZ, J., BACHERE, E. 1997. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. biol. Chem.* (accepted).
- 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. *Aquacult. intern.* 4: 19-30.
- EDWARDS, M. D., STUBER, C. W., WENDEL, J. F. 1987. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, 116: 113-125.
- GARCIA, D. K., DHAR, A., ALCIVAR-WARREN, A. 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol. marine Biol. Biotech.*, 5: 71-83.
- GARCIA, D. K., FAGGART, M. A., RHOADES L., ALCIVAR-WARREN, A., WYBAN, J. A., CARR, W. H., SWEENEY, J. N., EBERT, K. M. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol. mar. Biol. Biotech.*, 3: 270-280
- GOWDA, P.; XU, G.; FREDERIKSEN, R.; MAGILL, C.. 1995. DNA markers for downy mildew resistance genes in sorghum. *Genome*, 38: 823-826.
- HARTL, D., CLARK, A. 1989. Principles of population genetics (Hartl D. y Clark A.

- Eds.), Sinauer Ass. Inc. Publ., Sunderland, USA. pp. 1-682.
- HAYMER, D. S. 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Entomol. Soc. America*, 87: 717-722.
- HOFFMAN, J., DIMARCQ, J., BULET, P. 1992. Les peptides antibactériens inductibles des insectes. *Médecine/Sciences*, 8: 432-439.
- HU, Y., FOLTZ, D. 1996. Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*). Part I: Characterizing the inheritance of polymorphisms in controlled crosses. *Mol. mar. Biol. Biotech.*, 5: 123-129.
- 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.
- KERNODLE, S. P., CANNON, R. E., SCANDALIOS, J. G. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques*, 14:362-363.
- KHALID, S., SERIEYS, H., LAMBERT, P., ZAHARIEVA, M., PELTIER, D., BELHASSEN, E., BERVILLE, A. The use of RAPD markers to discriminate sections and species belonging to *Helianthus*. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 7: 21-31.
- KLEIN, J. 1982. Immune responses dominated by cells of the monocytic series: phagocytosis and related phenomena en "Immunology: the science of self-nonsel self discrimination". A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, pp 424-428.
- KOPACEK, P., HALL, M., SÖDERHALL K. 1993. Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifiscatus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.*, 213: 591-597.

- KRESOVICH, S., WILLIAMS, J., McFERSON, J., ROUTMAN, E., SCHAAL, B. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor appl Genet*, 85: 190-196.
- LANDE, R., THOMPSON, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124: 743-756.
- LEONG-FOO, C., DINESH, K.R., LIM, T.M., CHAN, W.K. & PHANG, V.P.E. 1995. Inheritance of RAPD markers in the guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Zool. Science*, 12: 535-541.
- LIU, Z., JARRET, R., DUNCAN, R., KRESOVICH, S. 1994. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Genome*, 37: 1011-1017.
- MARTIN, G.; WILLIAMS, J.; TANKSLEY, S., 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2336-2340.
- MEIER, G., MEGNEGNEAU, B., LINDERS, E. 1994. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycol. Res.*, 98:267-276.
- MELENA, J. 1997. Implementación de la técnica de AP-PCR (Alleatory-primed Polymerase Chain Reaction) para el estudio del polimorfismo del ADN genómico de *Penaeus vannamei*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Tesis de Acuicultura. pp. 1-79.
- MIYATA, T., TOKUNAGA, F., YONEYA, T., YOSHIKAWA, K., IWANAGA, S., NIWA, M., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y 1989. Antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes, Tachyplesin II and Polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.*, 106: 663-668.

- MULLER, R., PASBERG-GAUHL, C., GAUHL, F., KAEMMER, D., KAHL, G. Tracing microsatellite polymorphisms within the Nigerian population of *Mycosphaerella fijiensis*. INFOMUSA, 4: 1.
- MÜLLER, F., ROLLAG, H., FRØLAND, S. 1989. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Apmis* 97: 490-496.
- MUÑOZ, M., 1996. Desarrollo e implementación de ensayos para evaluar el estado inmunitario de los camarones *Penaeus vannamei*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, tesis de Acuicultura, pp. 1-139.
- MUTA, T., IWANAGA, S. 1996. Clotting and immune defense in *Limulidae*. en "Progress in Molecular and Subcellular Biology", 15: 154-189.
- NAKAMURA, T., FURUNAKA, H., MIYATA, T., TOKUNAGA, F., MUTA, T., IWANAGA, S. 1988. Tachyplesin, a class of antibacterial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). *J. Biol. Chem.*, 263: 16709-16713.
- NOGA, E.; ENGELS, D.; ARROLL, T.; MACKENNA, G.; DADIVIAN, N., 1994. Low serum antibacterial activity coincide with increased prevalence of shell disease in blue crab *Callinectes sapidus*. *Dis. aquatic Org.*, 19: 121-128.
- PADLAN, E.A., 1997. Structural basis for the specificity of antibody-antigen reactions and structural mechanisms for the diversification of antigen-binding specificities. *Per. Biophys*, 10:35.
- PATERSON, A. H., LANDERT, E. S., HEWITT, J. D., PETERSON, S., LINCOLN, S.E., TANKSLEY, S. D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*. 335: 721-726.
- PAUL, W.E., 1993. *Fundamental Immunology*, Third Edition, pp. 2-5.



PE, E., GIANFRANCESCHI, L., TARAMINO, G., TARCHINI, R., ANGELINI, P., DANI, M., BINELLI, G. 1993. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Gibberella zae* infection in maize. *Mol. Gen. Genet.*, 241: 11-16.

PELTIER, D., FARCY, E., DULIEU, H., BERVILLE, A. 1994. Origin, distribution and mapping of RAPD markers from wild petunia species in *Petunia hybrida* Hort. lines. *Theor appl Genet.*, 88: 637-645.

POWELL, M., MEADE, M. WATTS, S. 1995. Identification of six commercially cultured crayfish species using total protein separation by isoelectric focusing. *J. crust. Biol.*, 15: 763-770.

RATANAPO, S., CHULAVATNATOL 1990. Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem Physiol.*, 97B: 515-520.

REDOÑA, E. D., MACKILL, D. J. 1996. Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. *Theor appl Genet* 92: 395-402.

RODRIGUEZ, J. 1994. Contribution a l'étude du système immunitaire de la crevette péneïde *Penaeus japonicus* (Crustacea-Decapoda). Thèse Doctorale. Université Blaise Pascal, France, pp. 1-139

RODRIGUEZ, J., VOULO, V., MIALHE, E., BACHERE, E. 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J. cell. Science.* 108: 1043-1050.

SHIERWATER, B., ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nuc. Acid Res.*, 21: 4647-4648.

SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L. 1992. Crustacean immunity. *Ann. Rev. Fish. Dis.*: 3-23.

SÖDERHÄLL, K., SMITH, V. J. 1983. Separation of the hemocyte populations of

*Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. comp. Immunol., 7: 226-239.

TAPIA, 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducibilidad de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, tesis de Acuicultura, pp. 1-75.

TASSANAKAJON, A., PONGSOMBOON, S., RIMPHANITCHAYAKIT, V., JARAYABHAND, P., BOONSAENG, V. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Mol. mar. Biol. Biotechnol., 6: 110-115.

TSING, A., 1987. Reserches sur les hémocytes et l'immunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate 1991). Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et techniques du Languedoc, option Sciences biologiques "Immunologie et Hématologie", Montpellier, pp. 1-350.

WELLER, J., SOLLER, M., BRODY, T. 1988. Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. Genetics, 118: 329-339.

WELSH, J., McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nuc. Acid. Res., 18: 7213-7218.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Acids Res., 18: 6531-6535.

WOLFF, K., SCHOEN, E., PETERS-VAN RIJN, J. 1993. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. Theor appl Genet, 86: 1033-1037.

XIAO, J., LI, J., YUAN, L., TANKSLEY, S. 1995. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics*, 140: 745-754.

YU, Y. G., SAGHAI MAROOF, M. A., BUSS, G. R. 1996. Divergence and allelomorphic relationship of a soybean virus resistance gene based on tightly linked DNA microsatellite and RFLP markers. *Theor appl Genet*, 92: 64-69.



UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY  
DIVERSITY

# ANEXOS

## Valores de anión superóxido y hemogramas de los camarones provenientes de camaronera durante tres ciclos de muda\*

CLAVE	NBT1	NBT2	NBT3	HEMOGRAMA1	HEMOGRAMA2	HEMOGRAMA3
1Mcam	1.09	M	M	NC	M	M
3Mcam	1.35	0.88	M	1800000	5517000	M
4Mcam	1.25	1.28	M	NC	24520000	M
5Mcam	1.26	1.04	1.03	15872000	4900000	17200000
6Mcam	1.13	1.4	M	17981000	17000000	M
7Mcam	1	1.29	1.16	22578000	25950000	24000000
8Mcam	1.1	M	M	22000000	M	M
9Mcam	1.29	1.03	M	30600000	24600000	M
10Mcam	1.07	0.74	M	21800000	NC	M
11Mcam	1.12	1.02	1.35	16600000	7200000	51400000
12Mcam	1.36	1.65	1.08	21000000	2356000	18000000
15Mcam	1.04	1.31	M	NC	NC	M
16Mcam	1.56	1.28	1.13	27482000	14400000	1000000
17Mcam	0.91	M	M	16480000	M	M
18Mcam	1.15	0.82	M	NC	9400000	M
19Mcam	1.1	1	M	NC	NC	M
20Mcam	1.24	M	M	16600000	M	M
22Mcam	1.08	1.03	1.03	20400000	7200000	16000000
23Mcam	1.23	M	M	18200000	M	M
24Mcam	0.94	1.73	1.15	15127000	21200000	NC
25Mcam	1.39	M	M	1800000	M	M
1Hcam	0.89	M	M	17400000	M	M
21Hcam	1.24	1.37	M	26200000	13400000	M
3Hcam	0.86	1.27	1.23	6000000	44400000	11000000
6Hcam	1.02	M	M	NC	M	M
7Hcam	1.11	M	M	13400000	M	M
81Hcam	1.18	1.5	0.92	21800000	35400000	NC
10Hcam	0.97	1.4	M	24400000	13000000	M
11Hcam	1.23	M	M	9000000	M	M
12Hcam	1.26	0.99	0.68	13400000	21467000	16400000
13Hcam	0.93	M	M	7200000	M	M
15Hcam	1.24	M	M	23800000	M	M
16Hcam	0.97	1.4	NC	64600000	21600000	16000000
17Hcam	1.09	1.39	1.09	19000000	19200000	9000000
18Hcam	1.2	1.21	1	7832000	38000000	NC
19Hcam	1.34	1.32	M	NC	53600000	M
20Hcam	NC	1.21	1.25	NC	96000000	32600000
211Hcam	1.27	M	M	7600000	M	M
22Hcam	1.15	M	M	5800000	M	M
231Hcam	1.49	M	M	7400000	M	M
251Hcam	1.08	0.84	1.19	11600000	18800000	21800000

\* No se incluyen los animales muertos antes de la toma de la primera muestra; NC=no cuantificado; M=muerto; HEMOGRAMA=hemocitos/ml

Valores de anión superóxido y hemogramas de los camarones provenientes del mar durante tres ciclos de muda\*

CLAVE	NBT1	NBT2	NBT3	HEMOGRAMA1	HEMOGRAMA2	HEMOGRAMA3
3Msil	1.28	0.94	M	16640000	NC	M
4Msil	0.97	0.88	1.78	11825000	17991000	NC
7Msil	0.98	1.04	M	4300000	38200000	M
10Msil	1.06	1.44	1.06	22400000	34400000	NC
12Msil	1.43	1	1	29600000	50200000	12200000
14Msil	1	1.02	0.94	12971000	23261000	17400000
16Msil	1.02	M	M	10825000	M	M
18Msil	1.06	M	M	8800000	M	M
19Msil	1.19	1.13	1.47	15357000	38000000	26400000
20Msil	1.26	M	M	28600000	M	M
21Msil	1.54	1.45	1.06	37600000	18000000	18000000
22Msil	1.1	1.11	M	29412000	8400000	M
23Msil	1.13	0.92	M	17600000	26800000	M
24Msil	1.31	1.2	0.93	12400000	14428000	NC
25Msil	0.86	1.34	1.34	23000000	28000000	21000000
2Hsil	1.01	1.16	1.13	11200000	17800000	NC
6Hsil	NC	M	M	18600000	M	M
7Hsil	0.98	1.79	1.09	16000000	26400000	18600000
9Hsil	0.86	0.93	M	23800000	16667000	M
10Hsil	1.13	1.46	1.34	15623000	26400000	66800000
11Hsil	4.55	1.22	1.04	19600000	12800000	3800000
12Hsil	1.25	M	M	6200000	M	M
13Hsil	1.61	1.17	M	21400000	26600000	M
14Hsil	0.97	1.21	0.93	15750000	23400000	16200000
16Hsil	1.3	M	M	15400000	M	M
17Hsil	0.92	1.7	1.58	13000000	17800000	19400000
18Hsil	1.11	1.23	1.25	12800000	9800000	NC
19Hsil	NC	1.27	1.44	NC	35800000	37200000
20Hsil	1.28	1.12	1.25	28600000	21800000	NC
21Hsil	1.32	1.01	1.09	25800000	18000000	NC
23Hsil	1.05	1.27	M	11680000	NC	M

\* no se incluyen los animales muertos antes de la toma de la primera muestra; NC=no cuantificado; M=muerto; HEMOGRAMA=hemocitos/ml

ANEXO II: RESULTADO DE LAS SEIS PRUEBAS INMUNITARIAS DURANTE TRES CICLOS DE MUEDA EN 30 REPRODUCTORES SUPERVIVIENTES.

ANIMAL	NBT1	NBT2	NBT3	HEMO1	HEMO2	HEMO3	ABI	AB2	AB3	ALFA1	ALFA2	ALFA3	CLOT1	CLOT2	CLOT3	AGLU1	AGLU2	AGLU3
5Mcam	1.26	1.04	1.03	15,872	4,900	17,200	28	52	46	3	1	4	0	1	1	3	1	3
7Mcam	1	1.29	1.16	22,578	25,950	24,000	NC	50	44	1	1	3	0	2	2	1	2	3
11Mcam	1.12	1.02	1.35	16,600	7,200	51,400	38	22	55	3	1	1	1	1	2	4	0	4
12Mcam	1.36	1.65	1.08	21,000	2,356	18,000	25	12	40	3	1	3	1	1	1	3	0	1
16Mcam	1.56	1.28	1.13	27,482	14,400	1,000	NC	15	39	2	2	2	1	1	3	1	3	2
22Mcam	1.08	1.03	1.03	20,400	7,200	16,000	NC	NC	59	2	2	4	1	2	1	0	2	2
24Mcam	0.94	1.73	1.15	15,127	21,200	NC	NC	55	41	2	2	1	0	1	1	2	1	1
2Hsil	1.01	1.16	1.13	11,200	17,800	NC	61	70	74	4	3	3	2	2	2	3	3	2
7Hsil	0.98	1.79	1.09	16,000	26,400	18,600	100	100	100	4	3	2	2	2	3	3	1	4
10Hsil	1.13	1.46	1.34	15,623	26,400	66,800	NC	55	51	3	3	4	2	1	1	1	1	4
11Hsil	4.55	1.22	1.04	19,600	12,800	3,800	62	58	50	3	3	3	2	2	0	4	1	1
14Hsil	0.97	1.21	0.93	15,750	23,400	16,200	40	34	48	3	3	1	2	2	1	1	2	2
17Hsil	0.92	1.7	1.58	13,000	17,800	19,400	nc	52	50	3	4	2	2	1	1	4	1	4
18Hsil	1.11	1.23	1.25	12,800	9,800	NC	51	68	56	4	4	3	1	2	1	1	3	3
20Hsil	1.28	1.12	1.25	28,600	21,800	NC	54	55	58	3	4	3	1	2	1	3	1	1
21Hsil	1.32	1.01	1.09	25,800	18,000	NC	71	49	46	4	3	3	1	1	1	2	1	2
3Hcam	0.86	1.27	1.23	6,000	44,400	11,000	NC	56	NC	4	3	2	2	3	1	1	1	0
8Hcam	1.18	1.5	0.92	21,800	35,400	NC	28	73	59	3	4	2	2	1	0	4	1	1
12Hcam	1.26	0.99	0.68	13,400	21,467	16,400	81	55	52	3	4	2	2	2	2	1	1	1
17Hcam	1.09	1.39	1.09	19,000	19,200	9,000	61	24	0	3	3	3	3	2	2	1	1	1
18Hcam	1.2	1.21	1	7,832	38,000	NC	nc	55	14	3	4	4	2	1	0	2	2	1
25Hcam	1.08	0.84	1.19	11,600	18,800	21,800	53	52	41	3	3	4	1	1	1	1	3	3
4Msil	0.97	0.88	1.78	11,825	17,991	NC	54	62	53	2	4	3	2	1	2	4	3	4
10Msil	1.06	1.44	1.06	22,400	34,400	NC	54	40	57	3	1	3	1	1	1	3	3	2
12Msil	1.43	1	1	29,600	50,200	12,200	60	88	68	3	3	3	2	1	2	4	2	2
14Msil	1	1.02	0.94	12,971	23,261	17,400	nc	73	41	3	2	2	2	2	0	3	2	2
19Msil	1.19	1.13	1.47	15,357	38,000	26,400	54	61	59	3	3	3	1	1	1	4	3	4
21Msil	1.54	1.45	1.06	37,600	18,000	18,000	nc	59	nc	3	4	3	1	2	2	2	2	2
24Msil	1.31	1.2	0.93	12,400	14,428	NC	66	63	61	3	4	2	2	2	1	4	2	2
25Msil	0.86	1.34	1.34	23,000	28,000	21,000	64	68	72	2	3	2	2	1	1	4	3	2

Hsil=hembra silvestre; Msil=macho silvestre; Hcam=hembra de camaronera; Mcam=macho de camaronera; HEMO=hemocitos/ml x 1000; NC=no cuantificado. Todos los valores expresados en las unidades en que fueron cuantificados.

PRUEBA	GRUPO MAYOR	GRUPO MENOR	NO HUBO DIFERENCIAS	TODOS DIFIRIERON
NBT	7Hsil	14Msil		
HEMOGRAMA			X	
ACT. BANTIBÁCTERIANA				X
ALFA-2-MACROBLOBULINA	18Hsil; 18Hcam	25Msil; 14Hsil		
FACT. DE COAGULACION	7Hsil	nd		
AGLUTININA	19Msil	nd		

nd=No hay datos



Anexo IV: Relación entre el peso y el índice inmunitario global en 28 camarones analizados durante tres ciclos de muda

