



EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA INMUNE EN HEMOCITOS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA

Teresa Gollas-Galván¹, Gloria Yepiz-Plascencia¹ y Jorge Hernández-López²

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. PO Box 1735, Hermosillo, Son., 83000, México. ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Avenida Centenario Norte # 53, Hermosillo, Son., 83000, México.

Palabras clave: Camarón, genoteca, sistema inmune, mancha blanca

Introducción. El cultivo de camarón es una actividad de gran importancia económica. Desafortunadamente, el crecimiento de esta actividad también ha aumentado la aparición de enfermedades, sobre todo virales, que reducen significativamente la producción por las mortalidades tan altas que producen. En la actualidad, el virus que produce el síndrome de la mancha blanca (WSSV) es el más devastador que se ha conocido en la historia de la acuicultura de camarón.

El WSSV es un virus de DNA de doble cadena con un genoma de 305 Kb, el componente importante para la infección es una proteína llamada VP28 que es la responsable de la unión al receptor celular. Sin embargo, a pesar de que se conocen algunas proteínas involucradas en la defensa de camarón, no se conoce cual es la participación de estas en la defensa contra virus. En este trabajo se realizó el análisis de genes provenientes de una genoteca obtenida de hemocitos de camarón infectado con WSSV, además buscó conocer la participación de varias proteínas involucradas en la defensa del camarón a través de evaluación de los transcritos expresados en camarones infectados experimentalmente con WSSV, con el objeto de detectar marcadores moleculares de diagnóstico temprano y generar las bases para el uso de la genómica en la prevención de enfermedades virales en camarón.

Metodología. Se inocularon 10 camarones un macerado de músculo de camarón infectado con WSSV, en cada uno de aparentemente sanos con talla promedio de 10 ± 2 g. Todos los organismos fueron sangrados a 1.5, 3, 6 y 12 horas post-inoculación, se aisló el RNA total utilizando Trizol. Se construyó una genoteca usando el kit comercial SMART cDNA library construction. Esta genoteca generó varias secuencias EST, de estos, se eligieron 5 a genes involucrados en la defensa de camarón y uno viral, para el análisis de expresión a través de PCR y usando como templado los cDNA obtenidos de hemocitos infectados con WSSV y obtenidos a diferentes horas después de la inoculación.

Resultados y discusión. Se secuenciaron un total de 310 clones se obtuvieron 204 secuencias diferente, 36 secuencias eran repetidas por lo menos una vez. De las 204 secuencias 34 eran relacionadas con genes de sistema inmune de camarón, incluyendo proteína de coagulación, enzimas antioxidantes, peneidinas, crustinas, lisozima, HSP70, transglutaminasa, proeínas del sistema de la profenoloxidasa, inhibidores de serin porteaasa y péptidos antimicrobianos. De la misma forma se obtuvieron varios genes pertenecientes al WSSV. En general los genes obtenidos fueron clasificados en 9 categorías, presentadas en la figura 1.

Para calcular el nivel de transcritos, en todos los casos se utilizó igual cantidad de cDNA y se usó el gen de la proteína ribosomal L13 como transcrito constitutivo para normalizar los resultados. Uno de los transcritos interesantes en este ensayo fue el de la proteína VP230 perteneciente a WSSV el cual mostró un alto nivel de transcripción desde las 3 horas post-inoculación, lo que demuestra que es un gen de expresión temprana y puede usarse como diagnóstico temprano de infección.

La infección por WSSV afectó significativamente la supresión genes como peneidina, HSP70 y TGasa pero tuvo un efecto contrario en genes de crustina (figura 2).

Conclusiones. El conocimiento de genes utilizando genotecas u otras herramientas biotecnológicas, permite conocer el genoma completo de diferentes individuos, esta información puede utilizarse con diferentes fines entre ellos la manipulación genética, para mejoramiento genético de especies de importancia comercial como el camarón. El análisis de expresión de genes, evidencio la participación de HSP 70, peneidina y lisozima como moléculas activas en la infección viral, pudiéndose utilizar, en un futuro como posibles marcadores de salud.

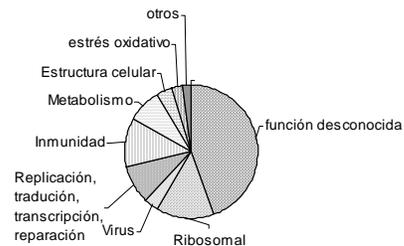


Figura 1:
Clasificación de genes obtenidos de hemocitos de camarón infectados con WSSV.

Agradecimiento. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Gobierno de Nayarit, proyecto 9622 y SEP-CONACyT proyecto 45964.

1. **Bibliografía** Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*;25:3389-3402.
2. Lightner D. V. (1996). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev Sci Tech*;15:579-601
3. Gollas-Galván T., Hernández-López J. and Vargas-Albores F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B*;122B:77-82
4. Rojinnakorn J., Hirono I., Itami T., Takahashi Y. and Aoki T. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. (2002) *Fish and Shellfish Immunology*;13:69-83.
5. Yang F., He J., Lin X., Li Q., Pan D., Zhang X. and Xu X. Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. *Journal of Virology* 2001;75:11811-11820.