

IDENTIFICACIÓN DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN *Litopenaeus vannamei* POR INOCULACIÓN CON *Vibrio harvey*

Cedano-Thomas Yenelli, Olmos Soto Jorge

Laboratorio de Microbiología Molecular, área de Biotecnología Marina.

Km 107, carretera Tijuana-ensenada, B.C., México 22860 ycedano@cicese.mx

Palabras clave: Expresión diferencial, sistema de defensa.

Introducción: El camarón es una especie comercialmente importante ya que se cotiza tanto en el mercado nacional como en el internacional. Sin embargo, la gran cantidad de enfermedades que han diezmando los cultivos han promovido la utilización de técnicas genéticas y de biotecnología para estudiar los sistemas de defensa de Invertebrados, ya que existe una falta de información en cuanto a su biología. La inmunología del camarón esta basada en las reacciones celulares, como son fagocitosis, nodulación y encapsulación; reacciones humorales y de sistemas multienzimáticos como son los de la coagulación y de melanización. Se ha observado que varios de estos sistemas contribuyen juntos a la eliminación de microorganismos patógenos. (Södelhäll *et al*, 1996). Este trabajo tiene como objetivo identificar las reacciones inmunológicas involucradas en el sistema de defensa de camarones inoculados con *Vibrio harvey*, utilizando técnicas de expresión diferencial con oligos específicos para los genes en cuestión.

Metodología: Se diseñaron los oligos basándose en las secuencias de genes que codifican para las proteínas del sistema de defensa de invertebrados, que ya han sido reportadas. Se realizaron bioensayos con *Litopenaeus vannamei*, se inocularon con una cepa patógena identificada molecularmente como *Vibrio harvey* (Z3) (Hernández y Olmos 2002) y se sangraron a diferentes tiempos. Después de la inoculación se aisló el mRNA de los hemocitos y se obtuvo el cDNA de los camarones tratados y de los controles (inyectados con PBS). Una vez obtenido esto, se realizaron las reacciones de PCR con los oligos específicos y se secuenciaron los productos para su identificación.

Resultados y discusiones: En este estudio se diseñaron oligos específicos para 7 genes que codifican para diferentes proteínas del sistema de defensa, entre las que destacan, proteínas de reconocimiento, de adhesión celular, antibacterianas, péptidos antimicrobianos y proteínas que forman parte de sistemas multienzimáticos. Una vez diseñados los oligos, se inocularon los camarones con la cepa patógena, se sangraron y a partir de los hemocitos se obtuvo el cDNA. La expresión diferencial que se observó utilizando los oligos específicos; fue muy evidente que en la mayoría de los casos, un ejemplo de esto se observa en la figura 1, en donde la banda que se aprecia corresponde al cDNA que codifica para una proteína de adhesión celular, la cual anteriormente no había sido identificada en *Litopenaeus vannamei*. Los resultados que se obtuvieron con los oligos específicos fue de una inducción inicial a las 4 hrs después de

la inoculación comparando con los organismos control, seguida de una disminución a las 8 hrs y en algunos casos se observó otro aumento en la expresión a las 12 hrs y 24 hrs pos infección. Contrariamente, en los organismos control el aumento de la expresión solo se presentó a las 4 y 8 hrs. Esto puede ser resultado de la inoculación con un agente abiótico (PBS), que no continua estimulando el sistema de defensa. En los organismos inoculados con *Vibrio harvey* se observó la estimulación en el sistema de defensa, aumentando los niveles de expresión a las 12 y 24 hrs pos infección. También se identificaron en este estudio genes que son expresados constitutivamente.

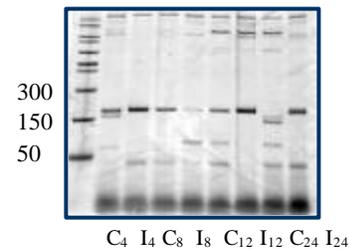


Figura 1: bioensayo con oligos específicos para proteína de adhesión celular

Conclusiones: Se diseñaron oligos específicos y se estandarizaron las condiciones de PCR para observar diferencias en la expresión de los camarones tratados con *Vibrio harvey* comparando contra los controles. Se identificó la inducción de los genes que codifican para las principales proteínas del sistema de defensa en *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos. También se identificaron genes que son expresados constitutivamente. Así como se identificaron genes de proteínas que aun no han sido reportadas en esta especie. Se pudo observar que la mayoría de las proteínas del sistema de defensa del camarón son inducibles por un bacteria patógena, también se pudo demostrar que el estrés pon punción genera una respuesta temprana y la inoculación por un agente patógeno genera dos respuestas, una inicial y una tardía (12 hrs) esta ultima con mayor intensidad.

Bibliografía:

- 1.-Hernández Zarate G. and Olmos Soto J. (2003) Molecular characterization of *Vibrio harvey* strains pathogenic for shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using specie-specific oligonucleotides and RAPDs. (in press)
- 2.-Soderhall, K., L. Cerenius, and M. W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating systems in invertebrates, p 229–253. In K. Soderhall, S.Iwanaga, and G. R. Vasta (ed.), New directions in invertebrate immunology. SOS Publications, Fair Haven, N.J.