

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN EMBRIONES DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

LAURA ANGÉLICA IBETH ÁLVAREZ LEE

LA PAZ, B.C.S., ENERO DE 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de	La Paz, B.C.S.,	siendo las	12:00	horas del día	24 del mes de
Junio del	2019 se reunieron	los miembros	s de la Con	nisión Revisora	a de Tesis designada
	Profesores de Estud				CICIMAR
para examinar la t					
	"INDUCCIÓN DE L	A RESPUESTA I	NMIINE EN	EMBRIONES DE	
		N BLANCO Lito			
Presentada por el	alumno:				
ALVAREZ	LEE		AURA ANGÉ		
Apellido patern	o mate		nombre		
		(Con registro	B 1 4	0 7 3 1
Aspirante de:					
	DOCTO	DRADO EN CIEN	ICIAS MARIN	IAS	
DR. SERGIO	gentes.	COMISION I	REVISORA Tesis DR. CÉ		esis
DR. JESUS N		ra TE DEL COLEG	well.	Morro	
		7	1	PIRECO	



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

El (la) que suscribe	M en C. LAURA ANGÉLICA IBETH ÁLVAREZ LEE Alumno (a) del Programa
	DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro	.B140731 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor	(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. SERGIO	FRANCISCO MARTÍNEZ DIAZ Y DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX
y cede los derechos del	trabajo titulado:
	"INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN EMBRIONES
	DE CAMARÓN BLANCO Litopenaeus vannamei"
al Instituto Politécnico	Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.
Los usuarios de la infor	mación no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo
sin el permiso expreso	del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la
siguiente dirección:	pikssolee@hotmail.com - sergiofranciscomarinez@gmail.com - ccardona.felix@gmail.com
Si el permiso se otorga,	el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del
mismo.	

M en C. LAURA ANGÉLICA IBETH ÁLVAREZ LEE

Nombre y firma del alumno

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, del departamento de Desarrollo de Tecnologías del Centro Intedisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz y el Dr. César Salvador Cardona Félix.

Este trabajo fue financiado por la Secretaria de Investigación y Posgrado del IPN, como parte de los proyectos:

- 20160504 Análisis del potencial de un consorcio probiótico como alternativa para mejorar la supervivencia de larvas de peces marinos.
- 20181316 Evaluación de la aplicación de arroz fermentado en cultivos de camarón; sobre los parámetros de calidad ambiental.
- 20196097 Estudio de la eficiencia antibacteriana de fitobióticos, ácidos orgánicos y aminopéptidos para prevenir la descomposición de alimentos peletizados de camarón.

Además del soporte financiero de los proyectos CONACyT 247842 y 222100.

La alumna fue becaria CONACyT con el CVU 440824 y becaria PIFI en el periodo de enero 2016 a febrero 2019 a excepción del año 2017.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
ANEXO I	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	13
GLOSARIO	15
RESUMEN	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 Generalidades	20
1.2 Sistema inmune innato en <i>L. vannamei</i>	20
1.2.1 Sistema inmune humoral	21
1.2.2. Sistema Inmune Celular	23
1.3 Memoria innata en invertebrados	23
1.3.1 Priming en el desarrollo	24
2. ANTECEDENTES	26
2.1. Priming en crustáceos	26
2.1.1. Desarrollo y respuesta inmune en estadios tempranos de <i>L. vannamei</i>	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVO GENERAL	31
Objetivos particulares	31
6. MATERIAL Y METODOS	32
6.1. Material biológico	32
A) Estandarización de la expresión génica en el modelo de L. vannamei	32
B) Respuesta Inmune Innata	32

Cepas bacterianas ATCC	32
Manejo del material biológico	33
6.2. Diseño experimental	33
6.2.1. Estandarización de la expresión génica a través del desarrollo de	e <i>L</i>
vannamei	33
6.2.2. Expresión de genes del desarrollo utilizando diferentes genes	de
referencia	34
6.2.3. Entrenamiento inmune en embriones de <i>L. vannamei</i>	35
I. Efecto del estímulo bacteriano sobre la eclosión en embriones de	; <i>L</i>
vannamei	35
II. Efecto del estímulo bacteriano sobre la supervivencia de nauplios de	e L
vannamei	37
6.3. Técnicas	39
6.3.1. Extracción de ARN y síntesis de cADN	39
6.3.2 . Selección de genes y diseño de oligonucleótidos	39
6.3.3. RT-qPCR	43
6.3.4. Purificación del producto de PCR	43
6.3.5. Eficiencia de Amplificación	43
6.3.6. Estabilidad de la expresión de los genes candidatos a ser genes	de
referencia	44
6.3.7. Conteo de bacterias	45
6.3.8. Análisis Estadístico	45
7. RESULTADOS	45
7.1 Estandarización de la expresión génica del modelo de estudio L. vanna	me
45	
7.2. Evaluación de la respuesta inmune innata en embriones de camarón	5 1
7.2.1. Perfil transcriptómico de los embirones estimulados.	54
8. DISCUSIÓN	63
8.1. Estandarización de la expresión génica	63
8.2. Respuesta inmune	68

9. CONCLUSIONES	75
10. Referencias	76
Citas de internet	88
Anexo I	91
Material Suplementario	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de hemocitos en crustáceos.	23
Tabla 2. Selección de genes de respuesta inmune y desarrollo.	41
Tabla 3. Selección de genes candidatos para ser gen de referencia.	¡Error!
Marcador no definido.	
Tabla 4. Estabilidad de genes candidatos a lo largo del ciclo larvari	o en <i>L</i> .
vannamei basado en 4 algoritmos.	48
Tabla 5. Eficiencia de amplificación de genes candidatos.	49
Tabla 6. Eficiencia de genes de respuesta inmune.	55
ANEXO I	
Sppl. Tabla 1. Datos descriptivos de los genes candidatos.	97
Sppl. Tabla 2. Valores de estabilidad asignados por geNorm.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología para el proceso de validación de genes de referencia.

Durante el proceso de validación se (1) seleccionan genes constitutivos (ver Tabla 2 en la sección de técnicas) como posibles candidatos a ser genes de referencia; (2) se evalúa la expresión por qPCR en los tejidos en los que realizará el estudio, es decir todo el ciclo larvario. Una vez obtenidos los datos (3) se evalúa su estabilidad por medio de algoritmos: geNorme, normFinder, Bestkeeper y RefFinder para seleccionar los genes con mayor estabilidad a través del ciclo larvario. (4) Se determinó la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos, dato necesario para evaluar la (5) expresión de los genes problema (genes de desarrollo) y así poder concluir cuál gen es el que de empleará para la normalización de la expresión.

- Figura 2. Área de bioensayos. Las unidades experimentales (1L) se mantuvieron con aireación a saturación durante todo el ensayo. El cuarto se mantuvo a una temperatura constante de 30°C.

 31
- Figura 3. Diseño experimental 1. Se colocaron 4,500 huevos por unidad experimental. Los inóculos de extracto bacteriano (1) *E. coli* ATCC 25922, (2) *S. aureus* ATCC 25923, (3) *B. subtilis* ATCC6051 y (4) *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 tuvieron una concentración final de 1.5 × 106 UFC/mL por unidad experimetal. Se tuvieron dos series de estimulación: la serie A fue destinada la recolección de los nauplios para medir la inmunocompetencia en base a un reto de infección, mientras que la serie B se utilizó para cuantificar el porcentaje de eclosión a las 12 h de tratamiento. Para ambas series se incluyeron unidades con huevos sin tratamiento que fueron los controles o testigos fisiológicos del experimento. Los nauplios provenientes del experimento 1 y se sometieron a un reto infeccioso con el patógeno V. parahaemolyticus durante 24 h. Al final se cuantificó el porcentaje (%) de supervivencia de cada unidad experimental.
- **Figura 4. Diseño experimental 2.** Cinética de estimulación de expresión de genes de RI. Se colocaron 4,500 huevos por unidad experimental. Se

- realizaron 3 series, la serie A (*V. parahemolitycus*) y B (*B. subtilis*) una para cada extracto bacteriano con una concentración final de 1.5 × 106 UFC/mL por unidad experimetal. La serie C corresponde al testigo. Para cada serie se tomaron muestras (en ARN later) cada tres horas hasta las 12 h, tomando como tiempo cero el momento en que se adicionó el extracto bacteriano a las unidades experimentales.
- Figura 5. Expresión de los genes candidatos. En los estadios larvarios de L. vannamei (n=3 mezclas compuestos por 50 organismos respectivamente).
 Nauplio V (Nv), Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Zoea III (ZIII), Mysis I (MI) Mysis II (MII), Mysis III (MIII) y Postlarva (PL).
- Figura 6. Expresión relativa de Ubx, Mef-2 y Twist. Se utilizaron los tres genes más estables (Sub F0, EF1α y GAPDH) y su combinación (media geométrica). Las barras representan ± 1 SD y los letras indican diferencias significativas en la expresión de genes por estadio (p<0.05). Nauplio V (Nv), Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Zoea III (ZIII), Mysis I (MI) Mysis II (MII), Mysis III (MIII) y Postlarva (PL).
- Figura 7. Efecto de PAMP's y MAMP's sobre la eclosión de los embriones de L. vannamei (p<0.05).
- Figura 8. Morfología de las larvas nauplio al momento de la eclosión. Las larvas observadas en la parte superior provienen de un desarrollo embrionario estimulado con las bacterias *B. subtilis* y *V. parahaemolyticus* respectivamente. El esquema de la parte inferior nos permitió identificar el subestadio I de desarrollo del estadio nauplio.
- Figura 9. Supervivencia de larvas con entrenamiento inmune durante el desarrollo embrionario. Se realizó un reto de infección con *V. parahaemolyticus* durante 24 h con las larvas provenientes de los desarrollos embrionarios estimulados con bacterias muertas (p<0.05).
- Figura 10. Morfología de las larvas después del reto de infección con V. parahaemolyticus. Todas las fotografías fueron tomadas con el aumento 10X. El esquema de la parte inferior derecha, permitió identificar el subestadio V del desarrollo de la larva nauplio.

- Figura 11. Perfil transcripcional del "priming" a través del desarrollo embrionario del L. vannamei hasta la eclosión. Se realizó una cinética de estimulación desde el tiempo inicial y hasta las 3, 6, 9 y 12 h que comprende desde el desove hasta la eclosión del nauplio. Se realizaron dos tratamientos (*B. subtilis* y *V. parahaemolyticus*) de exposición a extractos bacterianos durante todo el desarrollo y un grupo testigo.
- Figura 12. Expresión relativa de los receptores TLR y DScam. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento). 54
- Figura 13. Expresión relativa de los genes de regulación génica. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento). 55
- Figura 14. Expresión relativa de los AMP's. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento). 56
- Figura 15. Respuesta inmune innata en nauplios. Son larvas provenientes de diferentes tratamientos (Vibrio y Bacillus) durante su desarrollo embrionario y el control sin tratamiento, antes de tener el reto infeccioso con Vibrio. 59

ANEXOS

Sppl. Figura 1. Detección del gen SubF0 en los estadios larvarios de L
vannamei. PCR tiempo final en cada unos de los estadios del desarrollo
larvario. 91
Sppl. Figura 2. Detección del gen SubF0 de referencia durante el desarrollo
embrionario hasta la eclosión.
Sppl. Figura 3. Ejemplo de gráficas de Eficiencia. Es la representación de la
gráfica de eficiencia del par de oligonucleótidos de PEN-2.
Sppl. Figura 4. Curvas de desnaturalización de los amplicones. Se muestra su
especificidad al solo observar un pico de desnaturalización de acuerdo a
tamaño del producto de PCR.
Sppl. Figura 5. Conteo de bacterias (V. parahaemolyitcus) durante e
experimento de infección de nauplios.
Sppl. Figura 6. Determinación de la combinación del número óptimo de
genes de referencia con base en algoritmo basado en geNorme. GeNorm
V representa la selección de los genes más estables en diferentes
combinaciones para obtener el número óptimo de genes de referencia (valo
de geNorme V debajo de 0.15). Cada barra representa la variabilidad entre los
factores de normalizadores secuenciales (basados en que n y n+1 presentar
menos variabilidad).
Sppl. Figura 7.Capacidad antimicrobiana del extracto crudo de huevos de $\it L$
vannamei. Ensayo de la determinación de la MIC (del inglés minima
inhibitory concentration) por el método avalado por la NCCLS 2019.
Sppl. Figura 8. Actividad lítica sobre la pared celular de <i>V. parahaemolitycus</i>
El testigo positivo es una endolisina (LysPA26) específica para Vibrio y e
liofilizado es la muestra del extracto crudo de huevos de camarón (1 mg

liofilizado/mL- NaCl 0.9%)

101

ABREVIATURAS

Ag Antígeno (*del inglés* antigen) Ak Arginina cinasa (*del inglés* arginine kinase) ALF Factor Antipolisácrido (*del inglés a*nti-lipopolysaccharide factors) AMP Péptido antimicrobiano (*del inglés* microbial anti-peptide) Cq Ciclo de cuantificación (*del inglés* quantification cycle) CRUS Crustatina(del inglés crustatin) Cyt-c Citocromo C (del inglés cytochrome C) Patrones moleculares asociados a daño (del inglés damage-**DAMP** associated molecular patterns) DScam del inglés down syndrome cell adhesion molecule **EMB** Agar Azul de Metileno (*del inglés* eosin methylene blue agar) Factor 5 iniciador de la traducción (*del inglés* eukaryotic EIF translation initiation factor 5) Proteínas relacionadas a fibrinógeno (del inglés fibrinogenrelated **FREP** proteins) Gliceraldehído 3 Fosfato deshidrogenasa (del inglés GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase) Proteína de unión a lipopolisácarido y β-1, 3 glucano (*del inglés* LGBP lipopolysaccharide- and β-1, 3-glucan-binding protein) LPS Lipopolisacárido (*del inglés* lipopolysaccharide) Patrones moleculares asociados a microorganismos (del inglés **MAMP** microbial-associated molecular patterns) Manganeso superóxido dismutasa (del inglés manganese-MnSOD superoxide dismutase) NOS Oxído nitiríco sintasa (del inglés nitric oxide syntasa) Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés PAMP pathogen-associated molecular patterns) Reacción en cadena de la polimerasa (*del inglés* polymerase PCR chain reaction)

Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (del inglés **PGRP** peptidoglycan recognition proteins) PK Piruvato cinasa (*del inglés* piruvate kinase) Pen Penaedina (*del inglés* penaedin) **ProPO** Pro-fenoloxidasa (*del inglés* prophenoloxidase) PO Fenol oxidasa (del inglés phenoloxidase) Receptores de patrones de reconocimiento (del inglés pattern PRR recognition receptors) RI Respuesta Inmune Especies reactivas de oxígeno (del inglés reactive oxygen ROS species) Especies reactivas del nitrógeno (del inglés reactive nitrogen RNS species) SNC Sistema nervioso central SM Sal manitol SubF0 Subunidad F0 de la ATP sintasa TBP Proteína de unión a TATA (del inglés TATA binding protein) **TCBS** Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa Receptor de factor de necrosis tumoral asociado al factor 6 (del Traf-6 inglés tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6) **TSA** Agar soya tripticaseína (*del inglés* tryptic soy agar)

GLOSARIO

ANERGÍA: Estado por el cual una célula o un individuo es incapaz de responder a un antígeno. Cuando se refiere a células o un clon implica que la célula está presente pero que no responde.

ANTÍGENO: Toda sustancia capaz de inducir una respuesta inmune y de reaccionar específicamente con los productos desarrollados en dicha respuesta.

CITOCINAS: Proteínas producidas por las células en respuesta a una gran variedad de estímulos y que son capaces de alterar de alguna manera el comportamiento de otras células. La naturaleza de las células sobre las que ejercen su efecto viene determinado por la presencia de receptores específicos. Estos pueden localizarse en la superficie de las células que las producen (efecto autocrino), de células vecinas (efecto paracrino) o en otros órganos y tejidos (efecto semejante a las hormonas).

CINASAS: Enzimas encargadas de la fosforilación de proteínas. Básicamente existen dos tipos dependiendo de su actividad fosfotransferasa, que se manifiesta fosforilando proteínas en aminoácidos serina/treonina o bien en aminoácidos tirosina.

INMUNIDAD: Estado de capacidad de defensa de un individuo en principio sensible frente a sustancias antigénicas, adquirido de forma activa o pasiva.

INMUNIZACIÓN: Conjunto de procesos que conducen a la formación de inmunidad. Se puede adquirir de forma activa dando por resultado una respuesta inmune primaria y formación de memoria o pasiva en la que no se forma memoria.

INMUNOCOMPETENCIA: Capacidad de responder al contacto con un antígeno mediante una reacción inmune específica.

INMUNOGENICIDAD: Conjunto de propiedades que capacitan a una sustancia para inducir en organismos o células inmunocompetentes una inmunidad celular y/o humoral.

PRIMING: Un desafío que activa la respuesta inmune y que puede favorecer el reconocimiento de la molécula del huésped.

IMMUNE PRIMING: Protección mejorada del hospedador en términos de respuesta inmunitaria, eliminación de parásitos y supervivencia después de haber podido responder a un parásito, patógeno o desafío inmunitario después de una primera exposición específica; reconocido dentro y entre generaciones.

MEJORAMIENTO DE LA RESPUESTA: Una condición en la que una respuesta inmune se activa mediante métodos artificiales, como agregar probióticos o la

exposición a moléculas inmunoestimulantes que no dañan, generar una respuesta inmunitaria sobre los niveles fisiológicos o mantener controlados a los patógenos (efecto de la microbiota en muchos patógenos) pero sin tener especificidad ni memoria. Esto puede ocurrir dentro y entre generaciones, y la protección contra un segundo desafío después de un primer desafío podría deberse a una respuesta inmune sostenida o una respuesta bifásica no específica.

ESPECIFICIDAD: En biología de invertebrados, es difícil determinar la especificidad contra un epítopo de un antígeno dado. Sin embargo, muchas moléculas reconocen patrones moleculares como los receptores del Scavenger, los receptores tipo Toll y los receptores tipo Nod (NLR), que unen y transducen señales específicas sin mostrar una alta especificidad como inmunoglobulinas de vertebrados. A nivel funcional, la protección inmunológica debería ocurrir, por ejemplo, en desafíos homólogos (similares) con la misma especie o cepa de parásitos o patógenos en lugar de desafíos heterólogos (diferentes). Esto significa que la respuesta secundaria solo debe ser provocada por desafíos homólogos o debe ser más fuerte y más rápida que en los desafíos heterólogos.

RESPUESTA NO ESPECÍFICA: Las respuestas humoral y celular no están vinculadas directamente a la estructura de un patógeno dado. Por ejemplo, un primer desafío con un hongo puede proteger contra bacterias Gram-positivas, nematodos o levaduras.

TRADE OFF: En biología, existe un trade off cuando un rasgo no puede aumentar sin una disminución en otro (o viceversa).

RESUMEN

La respuesta inmune en invertebrados marinos de importancia acuícola, es ampliamente estudiada para generar estrategias de prevención y control de enfermedades virales y bacterianas. Dadas las nuevas tendencias de la industria acuícola hacia la sustentabilidad, gran parte del esfuerzo se centra en la inmunomodulación a través del "entrenamiento inmunológico", de los organismos de cultivo, ayudando a la prevención y control de infecciones. En este trabajo se propone el "entrenamiento inmune", desde el periodo de desarrollo embrionario hasta la eclosión del camarón blanco Litopenaeus vannamei. Para ello se indujeron desoves masivos en condiciones controladas en un laboratorio de producción de larvas (GAM). Los huevos se colocaron en las unidades experimentales de 700 mL con agua de mar 28 ppm (4,500 huevos por unidad) y se mantuvieron con temperatura controlada de 30°C y aireación constante durante todo el experimento. Se hicieron 3 replicas biológicas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en la inoculación de una cepa bacteriana muerta por calor por unidad experimental: Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Bacillus subtilis (ATCC 6051), Vibrio parahaemolyticus (ATCC 17802) y se mantuvo un grupo testigo sin aplicación de bacterias. Se identificó que Vibrio y Bacillus promueven un alto porcentaje de eclosión y supervivencia de nauplios, que fueron sometidos a un reto con parahaemolyticus. Con base en estos resultados se realizó una cinética de estimulación de la respuesta inmune durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión, para evaluar la expresión de genes de la respuesta inmune y desarrollo durante la estimulación. Los resultados de expresión génica son contundentes al obtener patrones de expresión diferenciales en el desarrollo y respuesta inmune innata durante el desarrollo embrionario con los tramientos de Vibrio y Bacillus. En el presente estudio se comprobó, que el entranamiento inmunológico es posible durante la estimulación desde el desarrollo embrionario, teniendo como consecuencia la mejora de la inmunocompentecia de las larvas eclosionadas.

ABSTRACT

The immune response in marine invertebrates of aquaculture importance is widely studied to generate strategies for prevention and control of viral and bacterial diseases. Given the new trends in aquaculture industry towards sustainability, many efforts are focused on immunomodulation through the "immune training" in culture organisms, helping to prevent and control infections. In this work, we propose the "immune training" during period of embryonic development, until the hatching of the white shrimp Litopenaeus vannamei. Massive spawnings were induced in controlled conditions in a commercial laboratory (GAM). Eggs were placed in experimental units of 700 mL with 28 ppm seawater (4,500 eggs per bioassay) and kept at a controlled temperature (30°C) and constant aeration throughout. Three biological replicates were made per treatment. The treatments consisted in the inoculation of one bacterial strain inactivated by heat treatment per experimental unit: Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Bacillus subtilis (ATCC 6051), Vibrio parahaemolyticus (ATCC 17802) and a control group were maintained without application of bacteria. It was identified that Vibrio and Bacillus promote a high percentage of hatching and survival of nauplii after challenge with *V. parahaemolyticus*. Based on these results, a kinetic of stimulation of the immune response was carried out during embryonic development until hatching and to determine the expression of the genes involved in the immune response and development during stimulation. The expression results are conclusive when identifying the differential expression of developmental genes and effectors of the innate immune response during embryonic development with the different bacteria. Nauplii subjected to the challenge had a greater survival compared to the control of both bacterial stimuli. So, in the present study, it was found that priming can be generated by different activation routes depending on the strain used (pathogenic and non-pathogenic). For immunological training and this stimulation can be carried out from embryonic development, resulting in improvement of the inmunocompetence of the hatched larvae.

1. INTRODUCCIÓN

La acuacultura es el sector de producción animal que satisface la demanda alimenticia de la población, con un tiempo corto de producción. Además de ser una actividad económicamente importante en nuestro país. En particular, el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es la principal actividad de producción acuícola nacional y de exportación en México (FAO.org, 2018).

El cultivo de camarón se ha visto afectado por enfermedades virales y bacterianas; en consecuencia, se generan importantes pérdidas económicas (Hauton, 2012; Stentiford *et al.*, 2012). A lo largo del tiempo se han implementado diversas estrategias de control y prevención de estas enfermedades, las cuales han ido evolucionando hasta tener la visión de fomentar el cultivo sustentable de camarón (Comisión Nacional de la Acuacultura & Pesca, 2019; Flegel, 2019).

El objetivo principal de las granjas acuícolas, es la producción de camarones libres de patógenos y con un desarrollo más eficiente. Esto va de la mano con la mejora genética de los organismos para seleccionar familias de rápido crecimiento, tolerantes a variaciones ambientales y resistentes a enfermedades. Sin embargo, no todas las estrategias emergentes son aprobadas para su aplicación en la prevención o control de enfermedades. Por lo tanto, una de las estrategias en los últimos años, se ha enfocado en desarrollar métodos a través del estudio de la interacción huésped-patógeno.

El estudio de las interacciones entre hospederos y patógenos, incluye la caracterización de la respuesta inmune. La mayoría de estos estudios se han realizado en modelos de organismos adultos, dónde se han estudiado los aspectos primordiales de la repuesta inmune innata como es la fagocitosis, estrés oxidativo, generación de memoria innata (DScam), ET's (redes extracelulares de ADN), producción y caracterización de AMP's (péptidos antimocrobianos), cascadas de coagulación y estirpes celulares (hemocitos) (Amparyup, Charoensapsri & Tassanakajon, 2013; Chen *et al.*, 2016; Deepika *et al.*, 2015; Leekitcharoenphon *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013), así como

recientemente se comenzó el estudio de la respuesta a lo largo de su ciclo de vida (Jiravanichpaisal *et al.*, 2007; Leekitcharoenphon *et al.*, 2010; Quispe *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2014).

El estudio de un organismo metamórfico y de ciclo de vida corto como es *L. vannamei*, implica una serie de cambios fisiológicos abruptos en cada estadio. Además de verse influenciado por las diversas condiciones ambientales tales como: temperatura, luz, pH, presencia de patógenos y salinidad. Debido a esto, los organismos están sujetos a una estricta regulación energética, a esta regulación se le denominada "trade off". El trade off se define como el direccionamiento de la energía hacía el evento fisiológico prioritario para la vida del organismo (Ardia *et al.*, 2012). Por ejemplo, el desarrollo se puede aplazar para responder a una infección de cualquier etiología. Esto es importante a considerar para una estrategia de inmunomodulación dirigida y no afectar el desarrollo de manera negativa.

Los organismos que llevan a cabo metamorfosis comienzan el "trade off" desde los estadios embrionarios, dirigiendo todos los recursos energéticos hacia el desarrollo del primer estadio larvario de vida libre. Esto nos lleva a la pregunta ¿Es posible generar inmunocompetencia dirigida con un sistema inmune inmaduro? La fisiología de los estadios embrionarios mantiene el balance entre respuesta inmune y desarrollo. Por lo tanto, la inmunomodulación puede dar origen a larvas con una respuesta inmune preventiva para el control de infecciones. No obstante, esta hipótesis no había sido probada hasta el momento.

1.1 Generalidades

1.2 Sistema inmune innato en *L. vannamei*

El modelo biológico de este trabajo es el camarón blanco *L. vannamei* (Boone, 1931), el cual tiene una importancia económica primordial en México y en el mundo (Norzagaray *et al.*, 2012). La respuesta inmune de los crustáceos es protagonizada por la inmunidad innata, que a su vez se divide en respuesta

inmune humoral y respuesta inmune celular (Vázquez *et al.*, 2009; Cerenius *et al.*, 2010; Xian-Wei & Jin-Xin, 2015).

1.2.1 Sistema inmune humoral

El componente humoral de la respuesta inmune son móleculas con actividades específicas como el sistema de coagulación, enzimas antioxidantes como son la SOD (del inglés super oxide dismutase), peróxidasas, catalasas y NOS (del inglés nitric oxide synthase), proteínas con capacidad líticas como lisozima, fosfatasa ácida y alcalina, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y los AMP's (del inglés antimicrobial peptides) que son dirigidos al control de hongos, parásitos, bacterias y virus (Amparyup et al., 2013).

Los péptidos antimicrobianos son moléculas de naturaleza proteica (15-200 aa) y lipídica; con características anfipáticas y/o propiedades catiónicas, lo que permite interaccionar con la membrana celular de los patógenos, teniendo como resultado la desestabilización de la misma (Yount et al., 2006). Los AMP's se dividen en 4 familias: Crustatinas. penaeidinas, lisozimas v los ALF's antilopolysacharide factors) (Tassanakjon et al., 2017). La expresión de estos AMP's está regulada por medio de las vías de señalización de TLR's (del inglés toll like receptor) y la vía IMD (del inglés immune deficiency) (Deepika et al., 2015). La señalización ocurre a través de la vía de la familia de NFκβ que activa los factores de transcripción perteneciente a la familia de proteínas Rel. Los factores de transcripción activados por esta vía son Dorsal y Relish. Fujun et al. (2014) demostraron que la vía de señalización por la vía de TLR es activada por las bacterias Gram (+) y Gram (-) y la vía IMD por bacterias Gram (-) principalmente además de estar relacionada con la vía de transcripción de las proteínas ALF's.

Los TLR's a lo largo de la evolución han conservado los dominios proteicos que los caracterizan y son: la región extracelular que corresponde a la región con dominios ricos en leucinas conocidas como LRR (*del inglés* leucine-rich-repeat), región citoplasmática con un dominio de señalización homólogo al receptor de la Interleucina 1 (IL-1R) y por último el dominio homólogo TIR de la región terminal

(Li-Shi *et al.*, 2007). Los TLR's encontrados hasta el momento en *L. vannamei* son LvToll-1, LvToll-2, LvToll-3 y se localizan en membrana y citoplasma por igual a excepción de LvToll-2 que solo está restringido a la región del citoplasma (Pei-Hui *et al.*, 2012) de los cuales aún se desconoce el ligando y participación específica de la respuesta inmune.

El reconocimiento de LPS (*del inglés* lipopolysaccharide), peptidoglicanos y azúcares, entre otros componentes bacterianos por PRR's (*del inglés* pattern recognition receptors) que activan la cascada de serin-proteasas como el POS (*del inglés* phenoloxidase system), comienza con la activación del zimógeno proPO (*del inglés* prophenoloxidase) hacia la PO (*del inglés* phenoloxidase). Esta enzima medía la transformación de *O*-fenoles a quinonas, formando intermediarios tóxicos hasta llegar a melanina como producto final. El POS da como resultado moléculas señalizadoras que desencadenan la fagocitosis, encapsulación, melanización, citotoxicidad, formación de nódulos y como efectos secundarios daño a tejidos y muerte celular (Amparyup *et al.*, 2013; Xian-Wei & Jin-Xing, 2015). En otros reportes se detectó una alta actividad enzimática del sistema PO en estadios de nauplio, por lo tanto, se puede inferir que esta proteína estaba preformada e inactiva en las etapas de huevo pero en el momento de la eclosión se activa el sistema PO (Martín *et al.*, 2012).

Los crustáceos tienen moléculas con dominios de inmunoglobulinas que reconocen específicamente a los patógenos (Zhang et al., 2004; Hung et al., 2013; Tze et al., 2014). Éstas existen en dos formas en el organismo: una con dominio citoplásmico y la otra en circulación, tienen la capacidad de maduración de la afinidad por medio de re-arreglos génicos (Chiang et al., 2013), conocidas como DScam (del inglés down syndrome cell adhesion molecule) y culminan con la activación del factor transcripcional Dorsal (Armitage et al., 2015; Tze et al., 2014) para la producción de efectores de la respuesta.

1.2.2. Sistema Inmune Celular

La inmunidad celular como su nombre lo indica, involucre células especializadas responsables del reconocimiento y eliminación de los Ag (*del inglés* antigen) por medio de fagocitosis, encapsulación, formación de ET's (*del inglés extracelullar traps*) (Tze *et al.*, 2013; Tze *et al.*, 2015) y producción de siARN (He *et al.*, 2015). Este último mecanismo se ha descrito como parte de la inmunidad antiviral, lo que indica que este proceso no queda restringido a una sola estirpe celular.

Las células responsables de la vigilancia inmunológica en circulación son los hemocitos, que a su vez se clasifican por medio de características morfológicas y funcionales que se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de hemocitos en crustáceos.

Tipo celular	Función	Morfología	Abundancia en circulación
Hialina	Fagocitosis, ET's	SG H	+
Semigranular	Encapsulación, fagocitosis, almacena y libera proteínas propias del sistema proPO, citotoxicidad, ET's, AMP's		++
Granular	Almacena y libera proteínas propias del sistema proPO, citotoxicidad, ET's, AMP's	800	+++

Tomado de Giulianini *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2009; Cerenius *et al.*, 2010; Tze *et al.*, 2015.

1.3 Memoria innata en invertebrados

El concepto de memoria inmunológica o "priming" imunológico, es definido como la habilidad del sistema inmune de preservar o simplemente usar información sobre

un primer encuentro con antígenos de cualquier etiología y usar esa información en un segundo encuentro (Multinovic & Kurtz, 2016).

Actualmente el "priming inmunológico" es visto como una solución alternativa a los problemas de enfermedades acuícolas a nivel mundial, abriendo nuevas oportunidades en el campo de la investigación (Hauton *et al.*, 2015).

Los invertebrados marinos como la oreja de mar (*Haliotis tuberculata*) (Dubief *et al.*, 2017), el ostión japonés (*Crassostrea gigas*) (Lafont *et al.*, 2019; Lafont *et al.*, 2017) y *Artemia sp.* (Norouzitallab *et al.*, 2016) responden a un entrenamiento inmunológico que les genera una memoria de protección. Sin embargo, el mecanismo molecular de generación de la memoria inmunológica no ha sido descrita aún. Little (2004) propone que cada taxón posee un mecanismo propio para la generación de memoria innata, ajustándose a cada ciclo vida. La memoria inmune innata o "priming" inmunológicose identifica con tres características que son presentadas en todos los organismos: (1) resistencia específica, (2) duradera, es decir de un estadio al otro o por meses y (3) presentar una respuesta efectora bifásica que sugiere un incremento en la respuesta en un primer reto, regreso a niveles basales y un nuevo incremento en un segundo reto (Lanz-Mendoza & Garduño-Contreras, 2018).

1.3.1 Priming en el desarrollo

Los estudios de memoria innata que se han llevado a cabo durante el desarrollo en un organismo metamórfico, han sido con larvas en el modelo de insectos. Demostrando la memoria innata transgeneracional y la generación de "priming" por exposición propia del individuo (Schulz *et al.*, 2019). Los organismos que presentan priming transgeneracional, por ejemplo, el escarabajo de la harina (*Tenebrio molitor*) cuando la madre es expuesta a los antígenos, los huevos presentan una mayor actividad antimicrobiana, especialmente hacía bacterias Gram (+) sin importar la naturaleza del agente etiológico (bacterias Gram (-), Gram (+) y hongos), con el que se obtuvo el "priming" en las madres (Dubuffet *et al.*, 2015). Esto no prueba si estos efectores en el huevo provienen de la madre o son

producidos en el huevo. Dhinaut *et al* (2017) evaluaron la RI de una generación de adultos de *T. molitor* que provienen de un priming transgeneracional. Las utilizadas en este trabajo fueron bacterias patógenas y no patógenas de diferente Gram. El resultado obtenido fue que la respuesta efectora confiere una protección diferencial dependiendo de la naturaleza del antígeno. Y el "priming" con bacterias Gram (+) tiene un mayor impacto sobre la capacidad de respuesta frente a las infecciones subsecuentes.

Otro estudio en el escarabajo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*), demostró la generación de "priming" desde estadios larvarios, usando dos vías de inoculación. La primera por medio de inyección intramuscular de la bacteria muerta por calor (*Bacillus thurigensis*) y la segunda por vía oral con el sobrenadante del cultivo de estas bacterias. Los resultados mostraron que las larvas que fueron inyectadas presentaron un retraso en su desarrollo para llegar a adulto y las que se inocularon por vía oral tuvieron un retraso en el desarrollo de la descendencia. Interesantemente, ambas condiciones generaron protección en las siguientes generaciones que probablemente se deba a cambios epigenéticos que prevalecen a lo largo de las generaciones (Schulz *et al.*, 2019).

Los trabajos antes mencionados prueban que el "priming" en estadios tempranos pueden afectar el desarrollo del individuo y/o de la progenie y que la respuesta efectora efectiva depende de la naturaleza del agente etiológico con que se realiza el "priming".

Existen diversas publicaciones que han propuesto mecanismos en invertebrados (insectos) como: 1) la activación sostenida de los mecanismos inmunes regulatorios (uniones ligando-receptor como: TLR y/o PRR con subsecuente activación de la familia NFκβ) (Boutros *et al.*, 2002); 2) a través del reconocimiento de peptidoglicano y lectinas (Steiner, 2004); 3) un cambio en la cantidad de poblaciones celulares y 4) la generación de diversidad a través de FREP (*del inglés* fibrinogenrelated proteins), DScam y PGRP's (*del inglés* peptidoglycan recognition proteins) que podría generar mutaciones en el genoma y procesos de

recombinación (Zang et al., 2004; Ghosh et al., 2011). Ninguno de estos ha sido suficientemente sólido para explicarla memoria innata en invertebrados. La propuesta más reciente para generación de memoria innata es por medio de endoreplicación, sugiriendo que es un mecanismo conservado a lo largo de la evolución desde invertebrados hasta humanos (Cime-Castillos et al., 2018). A diferencia de los invertebrados, en vertebrados el mecanismo de la memoria innata es por medio de modificaciones epigenéticas a través de modificación de histonas, metilación de ADN, modulación por medio de miARN y expresión de ARN no codificante en macrófagos, células NK (del inglés natural killer) y monocitos (Netea et al., 2015). Es un hecho que existe la memoria innata a través de las especies, pero no significa que compartan el mismo mecanismo, en especial por el repertorio inmune celular y humoral con el que cuenta cada especie, y las diferencias en su ciclo de vida que da como resultado la adaptación para la sobrevivencia en la naturaleza.

2. ANTECEDENTES

2.1. Priming en crustáceos

El "priming" inmunológico en crustáceos como *L. vannemei*; *Penaeus monodon*; *Procambarus clarkii*; *Mundochthonius japonicus* mediante esquemas de vacunas hechas con patógenos específicos (virus y bacterias) y bacterias no patógenas inactivadas. La mayoría de estos estudios evalúan el efecto protector. Las vacunas se han enfocado en la protección contra las vibrosis causadas por el género bacteriano *Vibrio* con diferentes especies: *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio anguillarum*. La vía de inoculación propuesta es intramuscular y el efecto protector se evalúa mediante un reto infeccioso con la misma cepa con la que fue hecha la vacuna. Los resultados muestran, un aumento en la sobrevivencia, conteo de hemocitos, fagocitosis y producción de AMP's (Lin *et al.*, 2013; Hettiarachchi *et al.*, 2005; Maftuch *et al.*, 2013). Encontrando una mejora en la respuesta inmune en todos los retos subsecuentes después del priming, con una larga duración hasta por 21 días (Chang *et al.*, 2018).

El "priming" con cepas patógenas para la especie tanto en insectos como en crustáceos, provee de efectores de la respuesta en circulación que los protege de infecciones subsecuentes de diferente etiología. Ya que estos efectores de la RI no son específicos como AMP's. Sino que son zimógenos pertenecientes a la cascada de activación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y cascada de coagulación entre otros (Maftuch *et al.*, 2013; Sadd & Schmid-Hempel, 2006).

Norouzitallab *et al* (2016) demostró que sí existe el "priming" transgeneracional en crustáceos tomando como modelo a *Artemia*. El modelo de *Artemia* genera resistencia a la infección de *V. campelli* en las primeras dos generaciones con una alta tasa de sobrevivencia. Sin embargo, en la tercera generación decae la supervivencia. La sensibilización se hizo con la bacteria viva durante 3 días continuos. Por lo tanto, hay una tasa creciente de estimulación con microorganismos con el mismo número de animales, representando un estímulo continuo en el sistema.

Esta evidencia permite generar la pregunta ¿Desde qué etapa del desarrollo larvario en crustáceos es posible el "priming" que le permita generar un estado de inmuncopetencia sin agotamiento?

2.1.1. Desarrollo y respuesta inmune en estadios tempranos de *L. vannamei*

Las etapas del desarrollo embrionario del camarón comienzan desde la formación del cigoto, blástula, gástrula, aparición de extremidades del embrión y larva envuelta en membrana que culmina en la eclosión del nauplio. Existen seis formas naupliares durante las primeras 12 h (horas) de desarrollo después de la eclosión, seguidas de tres estadios de zoea, tres de misis y varios estadios postlarvales hasta llegar a adultos (Hertzler *et al.*, 2009).

Haug *et al* (2002) demostró la actividad antimicrobiana en huevos del camarón boreal o nórdico (*Pandalus borealis*) y en el cangrejo ermitaño (*Pagurus bernhardus*) contra bacterias Gram (+) y Gram (-). Los estudios de respuesta inmune durante las etapas metamórficas de *L. vannamei*, muestran que desde el

desove ya existe una actividad catalítica enzimática provenientes del estrés oxidativo como ProPO (pro-fenoloxidasa), MnSOD (*del inglés* manganese-superoxide dismutase) y Peroxidasa (Martín *et al.*, 2012). Wei *et al.* (2014) realizaron estudios moleculares aportando evidencia de que hay mayor actividad transcripcional durante el desarrollo embrionario hasta nauplio. Y que alrededor del 3% de los genes son asociados a respuesta inmune y el 30% a desarrollo en condiciones óptimas; libres de estimulación de patógenos y probióticos.

Hasta el momento no se han realizado estudios para conocerla etapa más temprana de desarrollo para generar una inmunodulación, y obtener una mejora en la respuesta inmune frente a las infecciones mediante la memoria innata. La respuesta inmune durante el desarrollo embrionario no solo se debe centrar en el estrés oxidativo, si no en la expresión diferencial de efectores de la respuesta con actividad antimicrobiana, los cuales dependerán del entorno, teniendo un entrenamiento inmunológico que preparará al organismo para la vida libre.

El primer supuesto a considerar, es si al emplear bacterias específicas en la estimulación inmunológica de los huevos de camarón se generará un "entrenamiento inmunológico" durante el desarrollo embrionario. Por tal razón, se infiere que los mecanismos de la respuesta inmune innata serán afectados frente a un estímulo previo a la eclosión. El objetivo principal de este trabajo es generar evidencia acerca de la inmunomodulación en huevos durante el desarrollo embrionario. Y evaluar el efecto en las larvas provenientes de una inmunomodulación, esperando una respuesta inmune mejorada después de la eclosión. Tomando en cuenta que los huevos de los camarones son liberados en ambientes con cargas microbianas altas, se hace el supuesto que el organismo es capaz de identificar el tipo de microorganismos que se encuentran en el medio ambiente antes de eclosionar, por lo que le permite prepararse frente a los retos.

3. JUSTIFICACIÓN

La generación de conocimiento básico acerca de la inmunofisiología de los mecanismos de memoria innata en los crustáceos, puede ser la clave para la modulación y direccionamiento de la respuesta inmune desde etapas tempranas del desarrollo. Siendo estas más vulnerables a una infección por su desarrollo incompleto. Este conocimiento tiene un impacto en la industria acuícola para la prevención y control de infecciones con un cultivo autosustentable. Además de tener la oportunidad del fortalecimiento académico, que eventualmente derivará en desarrollos biotecnológicos que busquen soluciones de manera integral a la problemática actual en los sectores acuícolas.

4. HIPÓTESIS

Si el fenómeno de "priming" sucede desde la etapa de huevo en camarón, entonces los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata se verán afectados, generando un estado de inmucompetencia al momento de la eclosión de los huevos, lo cual brindará un efecto protector frente a las infecciones.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer una estrategia para la generación de inmunocompetencia en larvas de camarón blanco *L. vannamei*, por medio de la inmunomodulación de la respuesta inmune innata en etapa embrionaria.

Objetivos particulares

- 1. Estandarizar la expresión génica del modelo de estudio *L. vannamei*, a lo largo del ciclo de vida.
- 2. Evidenciar y evaluar la capacidad de respuesta inmune en embriones a través de una inmunomodulación por bacterias durante el desarrollo embrionario.
- 3. Evaluar la inmunocompetencia de las larvas provenientes de un desarrollo embrionario estimulado con bacterias por medio de un reto.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Material biológico

A) Estandarización de la expresión génica en el modelo de L. vannamei

Los estadios larvarios de *L. vannamei* fueron colectados durante la producción comercial de la granja acuícola "Acuacultura Marh". Ubicada en el puerto de Pichilingue, La Paz, B.C.S., durante los meses de mayo y junio del año 2016. La identificación de los estadios se realizó por morfología en un estereoscopio (Stemi 508, Zeiss). Las muestras consistieron en un mezcla de 50 organismos por estadio: Nauplio V (Nv), Zoea (ZI, ZII, ZIII), Mysis (MI, MII, MIII) y Postlarva (PL) con sus respectivos subestadios.

B) Respuesta Inmune Innata

Los embriones fueron obtenidos en los desoves masivos de *L. vannamei* realizados en el laboratorio de larvas del Grupo Acuícola Mexicano (GAM) ubicado en la carretera a San Juan de la Costa, a 40 km de la Paz B.C.S. Las muestras fueron recolectadas en las madrugadas aproximadamente a la 1:00 am. Los desoves comenzaban a las 10:00 pm, pero se debía dejar pasar por lo menos media hora en el estanque después de la puesta para evitar que los huevos se lisaran. Las recolectas fueron durante los meses de mayo a septiembre del año 2018. Cada una con un estimado de 15 días entre cada recolecta ajustándose al calendario de producción de la granja acuícola.

Cepas bacterianas ATCC

Las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo y en los ensayos de estimulación y capacidad antimicrobiana fueron: EC-*Escherichia coli* (ATCC 25922), SA-*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), BS-*Bacillus subtilis* (ATCC 6051) y VP-*V. parahaemolyticus* (ATCC 17802).

Manejo del material biológico

Las muestras destinadas al análisis de expresión génica, se mantuvieron en ARN later (Sigma) hasta su procesamiento. Mientras que las muestras destinadas a análisis de actividad proteico, se congelaron a -80°C para su posterior liofilización y preservación de su actividad catalítica.

6.2. Diseño experimental

Los experimentos se realizaron de manera secuencial y por triplicado en eventos independientes. A continuación, se describe la marcha metodológica que se siguió en este trabajo.

6.2.1. Estandarización de la expresión génica a través del desarrollo de *L.* vannamei

El primer reto del trabajo fue realizar la validación de los genes de referencia, que se utilizaron para obtener la expresión relativa de los genes de interés con el objetivo de lograr una adecuada interpretación biológica. La **Figura 1** describe el diseño experimental de la validación de los genes de referencia, utilizados para normalizar los datos de expresión génica que se determinaron en este trabajo.



Figura 1. Metodología para el proceso de validación de genes de referencia. Durante el proceso de validación se (1) seleccionan genes constitutivos (ver Tabla 2 en la sección de técnicas) como posibles candidatos a ser genes de referencia; (2) se evalúa la expresión por qPCR en los tejidos en los que realizará el estudio, es decir todo el ciclo larvario. Una vez obtenidos los datos (3) se evalúa su estabilidad por medio de algoritmos: geNorme, normFinder, Bestkeeper y RefFinder para seleccionar los genes con mayor estabilidad a través del ciclo larvario. (4) Se determinó la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos, dato necesario para evaluar la (5) expresión de los genes problema (genes de desarrollo) y así poder concluir cuál gen es el que de empleará para la normalización de la expresión.

6.2.2. Expresión de genes del desarrollo utilizando diferentes genes de referencia

Se seleccionaron tres genes involucrados en el desarrollo del camarón (*Ubx, Twist* y *Mef-2*) para comparar los patrones de expresión obtenidos con los genes de referencia candidatos. El gen *Ubx* (Ultrabiothorax) pertenece a la familia Hox de factores de transcripción involucrados en la especificación del plan corporal, mientras que *Twist* y *Mef-2* participan en el desarrollo muscular y diferenciación celular (Wei *et al.*, 2016). Los niveles de expresión génica se normalizaron con cuatro genes de referencia candidatos (SubF0, GAPDH, EF1α) individualmente o en combinación (media geométrica). El nivel de expresión se determinó utilizando muestras de cADN (n = 3 para todas las etapas larvales) mediante RT-qPCR. Los

niveles de expresión relativos durante los estadios larvales se calcularon mediante el método 2^{-- Ct} tomando en cuenta la eficiencia de cada par de oligonucleótidos (Livak & Schmittgen, 2001).

6.2.3. Entrenamiento inmune en embriones de *L. vannamei*

I. Efecto del estímulo bacteriano sobre la eclosión en embriones de *L.* vannamei

La modulación de la respuesta inmune (RI) se realizó por medio de antígenos bacterianos durante el desarrollo embrionario se llevaron a cabo en un ambiente controlado (**Figura 2**), con unidades experimentales de 1 L con un volumen a 700 mL de agua de mar ajustada a 28 ppm, aeración continua a saturación, temperatura ambiente de 30°C. El agua se sometió a tratamientos con UV y ozono para y se esterilizó por calor húmedo a 121°C y 1 atm de presión por 15 min.



Figura 2. Área de bioensayos. Las unidades experimentales (1L) se mantuvieron con aireación a saturación durante todo el ensayo. El cuarto se mantuvo a una temperatura constante de 30°C.

La densidad de huevos por unidad experimental fue de 6 huevos/mL. Es decir, 4,500 huevos por unidad. Los tratamientos consistieron en la adición de bacterias atenuadas por calor (calor húmedo a 121°C, 1 atm de presión por 15 min)

previamente ajustadas en solución de 0.9% NaCl a una OD_{600nm} = 0.5 equivalente a 1.5 × 10⁸ CFU/mL alcanzando una concentración final por unidad de 1.5 × 10⁶ UFC/mL por unidad experimetal. Los grupos bacterianos evaluados fueron dos Gram positivas y dos Gram negativas dividas en dos categorias: bacterias asociadas al medio marino (VP-*V. parahaemolyticus* como patógeno y BS-*B. subtilis* normalmente usado como probiótico) y no asociadas al ambiente marino (SA-*S. aureus* y EC-*E. coli*). El tiempo de incubación de cada tratamiento fue de 12 h que contempló todo el desarrollo embrionario hasta la eclosión (**Figura 3**), tomando como tiempo cero el momento en el que se adcionaron las bacterias a los embriones en la unidad experimental.

Durante el bioensayo se monitoreó la viabilidad de los huevos a través de la observación morfológica microscópica de los diversos estadios embrionarios hasta el final del experimento. Todos los tratamientos 3 replicas biológicas y 3 replicas por experimento.

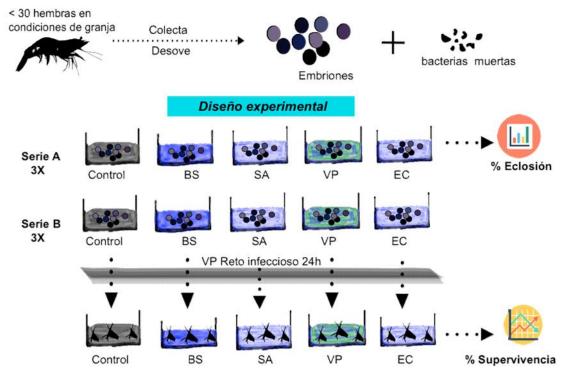


Figura 3. Diseño experimental 1. Se colocaron 4,500 huevos por unidad experimental. Los inóculos de extracto bacteriano (1) *E. coli* ATCC 25922, (2) *S. aureus* ATCC 25923, (3) *B. subtilis* ATCC6051 y (4) *V. parahaemolyticus* ATCC

17802 tuvieron una concentración final de 1.5 × 10⁶ UFC/mL por unidad experimetal. Se tuvieron dos series de estimulación: la serie A fue destinada la recolección de los nauplios para medir la inmunocompetencia en base a un reto de infección, mientras que la serie B se utilizó para cuantificar el porcentaje de eclosión a las 12 h de tratamiento. Para ambas series se incluyeron unidades con huevos sin tratamiento que fueron los controles o testigos fisiológicos del experimento. Los nauplios provenientes del experimento 1 y se sometieron a un reto infeccioso con el patógeno *V. parahaemolyticus* durante 24 h. Al final se cuantificó el porcentaje (%) de supervivencia de cada unidad experimental.

Al final de bioensayo se contó los nauplios y embriones para conocer el porcentaje de eclosión de cada unidad experimental y establecer la reproducibilidad del fenómeno biológico.

II. Efecto del estímulo bacteriano sobre la supervivencia de nauplios de L. vannamei

La siguiente evaluación fue diseñada para conocer el efecto de las 4 bacterias sobre la inmunocompetencia (**Figura 4**) de las larvas provenientes de un desarrollo embrionario estimulado con extracto de bacterias (EC, VP, BS y SA). Después de la eclosión se recolectaron los nauplios y se colocaron en nuevas unidades con las mismas condiciones experimentales. Después fueron infectados con *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802). La cepa patógena fue ajustada a una $OD_{600nm} = 0.5$ equivalente a 1.5×10^8 CFU/mL alcanzando una concentración final por unidad de 1.5×10^6 UFC/mL por unidad experimetal. Se tomó en cuenta un bioensayo "blanco" que no tuvo estimulación bacteriana ni reto de infección, con el objetivo de conocer la sobrevivencia de las larvas durante el tiempo de experimentación. Al final se contabilizó la supervivencia de las larvas a las 24 h.

Una vez evidenciado que sí existe una diferencia asociada a los tratamientos en la sobrevivencia de los organismos, se los tratamientos (extractos bacterianos) con mayor porcentaje de eclosión y sobrevivencia durante la infección para llevar a cabo una cinética de estimulación. Este experimento se realizó por triplicado y los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 9 y 12 h con las bacterias: *B. subtilis* Gram (+) y

V. parahaemolyticus Gram (-) (**Figura 4**). Estas muestras se procesaron y se cuantificó la expresión de genes seleccionados de respuesta inmune. A cada gen seleccionado (**Tabla 2**) se le determinó la eficiencia de amplificación (*ver* secc. 3.4 y 3.5) y se determinó la expresión por medio del método 2⁻ Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

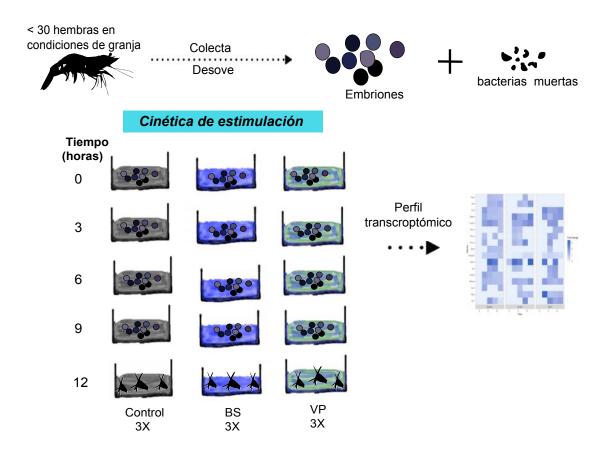


Figura 4. Diseño experimental 2. Cinética de estimulación de expresión de genes de RI. Se colocaron 4,500 huevos por unidad experimental. Se realizaron 3 series, la serie A (V. parahemolitycus) y B (B. subtilis) una para cada extracto bacteriano con una concentración final de 1.5 × 10^6 UFC/mL por unidad experimetal. La serie C corresponde al testigo. Para cada serie se tomaron muestras (en ARN later) cada tres horas hasta las 12 h, tomando como tiempo cero el momento en que se adicionó el extracto bacteriano a las unidades experimentales.

6.3. Técnicas

6.3.1. Extracción de ARN y síntesis de cADN

La extracción del ARN total, se realizó con Trizol™ (Invitrogen) de acuerdo al protocolo de manufactura. La concentración de ARN se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop UV/Vis 2000 (Thermo Scientific). Solo las muestras que presentaron valores por arriba de 1.8 en la relación 260/280 fueron utilizadas en este trabajo. Las muestras fueron tratadas enzimáticamente con ADNsa I (10 U/mL) (Sigma) para remover las trazas de ADN genómico y posteriormente precipitar con 4 M de LiCl de acuerdo a Walker y Lorsch (2013). El ARN fue resuspendido con agua libre de nucleasas. La integridad del ARN fue verificada por medio del corrimiento en un gel de agarosa al 1.5% con una tinción de Bromuro de Etidio (BrEt). Finalmente se tomó 1 µg de ARN total de cada muestra y se sintetizó su cADN usando oligo (dT) y el kit de transcripción reversa Improm II (Promega), siguiendo el protocolo de manufactura. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

6.3.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos fueron diseñados usando el software Primer 3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi). Para el control de calidad de cada par de oligonucleótidos, adicionalmente se verificó la secuencia en la página web de IDT (https://www.idtADN.com/calc/analyzer) y Multiple primer analyzer (https://www.thermofisher.com). Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 2**. Para la estandarización de la expresión molecular se seleccionaron genes constitutivos (**Tabla 3**) para ser evaluados y tomarlos como genes de referencia. Los criterios de selección fueron los siguientes: 1) detección en todos los estadios larvarios; 2) Valores de Cq (*del inglés* quantification cycle) con mínimas variaciones entre las replicas y 3) Valores de Cq con mínima variación entre los estadios. Una vez seleccionados se utilizaron tres genes de desarrollo de expresión diferencial a lo largo del desarrollo.

La selección de genes asociados al sistema inmune, fue con base en la expresión de genes clave de las principales rutas de respuesta frente a un estímulo. En la **Tabla 2** se describen las secuencias de oligonucleótidos sentido y anti-sentido para cada gen seleccionado. En **Tabla 3** de enlistan todos los genes constitutivos seleccionados que fungen como candidatos para ser genes de referencia.

Tabla 2. Selección de genes de respuesta inmune y desarrollo.

LVTLR-R	ID	Función	Nombre	Secuencia 5'- 3'	GenBank ID	Product 0	
LVTLR-R	LvTLR-F	December	TI D***	CTATTGTGGTGCTTTCGT	KT372179.	133	
LVLyss-R	LvTLR-R	Receptor	ILK""	TCTCGTCCAACTCGCTCT	1		
LVCrus-R LVCrus-R LVCrus-R LVCrus-R LVPEN4-F LVPEN4-F LVPEN4-R LVPEN3-R LVPEN3-F LVPEN2-F LVPEN2-F LVALF-F LVALF-F LVALF-F LVALF-F LVDorsal-F LVDorsal-R LVPEN5-F LVDorsal-R LVPEN5-R LVDEScam-F F LVDorsal-R LVPEN5-R LVPEN5-R LVPEN5-R LVDORSAI-R RECEPTOR LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R RECEPTOR LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R RECEPTOR R RECEPTOR LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R RECEPTOR LVDORSAI-R LVDORSAI-R LVDORSAI-R RECEPTOR R RECEPTOR LVDORSAI-R RCCCTTCACCGCTTACACACTTCTGT GCACCGCTTTGCTCTGGTGGG TC CCTACCATTCTTGTCTGGTGGG TC CACTGGTACTCTTGTCTGGTGGG TC CACTGGTACTCTTGTCTGGTGGG TC CACTGGTACTCTTGTCTGGTGGG TC CACTGGTACTCTTGTCTGGTGGGGGT TC CACTGGTACTCTTGTCTGGTGGGGGGGGGG	LvLys-F	AMD	Lvo	GCCATAAACCGCAACAGAAA	AF425673.	100	
LVCrus-R	LvLyss-R	AIVIF	Lys	AACATGGGATTTTGCAGACG	1	109	
LVPEN4-F	LvCrus-F	AMD	Crue	GGCGGAGTAGGTGTTGGT	AY486426.	233	
LVPEN4-R AMP 4 ATCCTTGCAACGCATAGACC 1 216 LVPEN3-R AMP Penaedina GCATGGATTCACTTCCTCGT DQ206403 176 LVPEN2-F AMP Penaedina GCATCAAGTTCGGAAGCTGT DQ211699 183 LVPEN2-R AMP Factor CGCTTCACCGTCAAACCTTAC GQ227486 195 LVALF-F AMP Factor de transcripci of on Factor de transcripci of on CGCTTCACCGTCAAACCTTAC GQ227486 195 LVDorsal-F Factor de transcripci of on FT-Dorsal** CACTGGTACTCTGTGTGGTGG TC FJ998202. 162 LVRelish-F Factor de transcripci of on FT-Relish** GGCTGCAAGTCTTGCTGGTGGTGTCTGG GGTGCAAGTCTTCCG FJ416145. 131 LVDscam-F Receptor PScam ACAAGCCAAGGCACCAGACT GQ154653 174 LVNOS-F Transducc ion de señales Oixido nitrico sintasa GCTTTGACGCTTCACACCA GQ429217 214 LVTwist-F Factor de transcripci on de tra	LvCrus-R	AIVIE	Cius	TGTGGGCAGTCGAGTATCTT	1	233	
LyPEN4-R4ATCCTTGCAACGCATAGACC1LyPEN3-RAMPPenaedinaGCATGGATTCACTTCCTCGTDQ206403176LyPEN2-FAMPPenaedinaCTCTGGCTTGGAATGGAT.1176LyPEN2-RAMPPenaedina2ACCCACATCCTTTCCACAAG.1183LvALF-FLvALF-FAMPFactor dentipolisac dridoGCCACCGCTTAGCATCTTGTGQ227486.1LvDorsal-FFactor de transcripci onFT-Dorsal**GCCACCGCTTAGCATCTGTT.1.1LvDorsal-RFactor de transcripci onFT-Relish**GGCTGGCAAGTCTTGTGTGGTGGT1LvDscam-FReceptorFT-Relish**GGCTGGCAAGTCGTTCTCGFJ4161451LvDscam-RReceptorDScamACAAGCCAAGGCACCAGACTGQ154653.1LvNOS-FTransducc ión de señalesOixido nitríco sintasaCTATGACAGCCTCCACACCAGQ429217.1LvTwist-FFactor de transcripci onCTGAAGCTGGATCACCCTACTGAAGCTGACCCCAKU317452.1LvTwist-RFactor de transcripci onCTGAAGCTGAAGCGCTCCCCAKU317452.1.1Lvmef2-FFactor de transcripci onMef2*AGATAGGGTCGACCCCAKU317455.1.1LvArgo-FMaduració on de miARNAGATAGGGTCGACCCCAAGATAGGGTCGACCCCAHM234690.1.158LvMef2-FCascadaTATGCTGCACTGACCCTGACCCCAHM531680.1.1.158Lvmef2-FCascadaTGAGTTGTGTGCGTTGACTHM581680.1.1Lvmef2-FCascada <td< td=""><td>LvPEN4-F</td><td>ΔΜΡ</td><td>Penaedina</td><td>ACAGCTCGACTTTGCTGCTT</td><td>AF390149.</td><td>216</td></td<>	LvPEN4-F	ΔΜΡ	Penaedina	ACAGCTCGACTTTGCTGCTT	AF390149.	216	
LVPEN3-F AMP 3 CTCTGGCTTGTGGAATGGAT .1 176 LVPEN2-F AMP Penaedina GCATCAAGTTCGGAAGCTGT DQ211699 183 LVALF-F AMP Factor antipolisac arido CCCTTCACCGTCAAACCTTAC GQ227486 195 LVALF-R AMP Factor de transcripci on of of consol** GCCACCGCTTAGCATCTTGTT .1 195 LVDorsal-F Factor de transcripci of of consol** FT-transcripci of consol** GATGGAATGATAGAATGGAAG CTCTGGTGGTGGTCTCTGGTGGTGGTCTCTGGTGGTGGTCTCTGGTGG	LvPEN4-R	Alvii	4	ATCCTTGCAACGCATAGACC	1	210	
LyPEN3-FJCTCTGGCTTGTGGAATGGAT.1LyPEN2-FAMPPenaedinaGCATCAAGTTCGGAAGCTGTDQ211699.1LyALF-FAMPFactor antipolisac áridoGCCACCGCTTACACCTTACGQ227486.1LyDorsal-FFactor de transcripci ónFT- transcripci ónGCACCGCTTAGCATCTTGTT CACAGGCATCGTTGCTGGTGG TC.1195LyRelish-F 	LvPEN3-R	AMP	Penaedina	GCATGGATTCACTTCCTCGT	DQ206403	176	
LVPEN2-R LVALF-F LVALF-F LVALF-R AMP AMP Factor antipolisac árido CGCACCGCTTAGCATCTTGTT AMP LVDorsal-F LVDorsal-F LVDorsal-F LVDorsal-F LVDorsal-R EVRelish-F LVRelish-F LVDScam-F F LVDScam-F LVNOS-R LVNOS-F LVNOS-R LVTWist-F LVTwist	LvPEN3-F	7 (1711	3	CTCTGGCTTGTGGAATGGAT	.1	170	
LVALF-R LVALF-R AMP	LvPEN2-F	AMP		GCATCAAGTTCGGAAGCTGT	DQ211699	183	
LvALF-R LvDorsal-F LvDorsal-F LvRelish-F LvRelish-F LvDoscam-F R LvDoscam-R LvNOS-F LvNOS-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-R LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-R LvTwig-F LvT	LvPEN2-R	7 (17)1			.1	100	
LvDorsal-FR LvDorsal-FR LvDorsal-FR LvDorsal-FR LvDorsal-FR LvDorsal-R LvRelish-F LvRelish-R LvDoscam-FR LvDoscam-R LvNOS-F LvNOS-F LvNOS-R Evranscripci on DScam LvTwist-F LvTw	LvALF-F	AMD		CGCTTCACCGTCAAACCTTAC	GQ227486	105	
LvDorsal-R LvDorsal-R LvRelish-F LvRelish-F LvDocam-R LvDoscam-R LvNOS-F LvNOS-R LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-R LvTwist-R LvMef2-R LvMef2-R LvArgo-F LvArgo-F LvMef2-R LvMef2-R LvMef2-R LvMef2-R LvDorsal** CACTGGTACTCTGGTGGTGGTGTCTCG CTACATTCTGCCCTTGACTCTGTTCTGGTGGTGGTGTCTCGTCTCGTCTCGTCTCTCGTC	LvALF-R	AIVIE	•	GCCACCGCTTAGCATCTTGTT	.1	195	
LvDorsal-R LvRelish-F LvRelish-F LvDscam- R LvNOS-F LvNOS-R LvTwist-F LvTwist-F LvTwist-R LvTwist-R Lvmef2-F LvMef2-R Lvmef2	LvDorsal-F		FT-	GATGGAATGATAGAATGGGAAG C	FJ998202.	100	
LVRelish-RTranscripci ónFT- Relish**GFJ416145.131LVDscam-F LVDscam-RReceptorDScamACAAGCCAAGGCACCAGACT CTGTGCGAGTCAAGGTAGCAGQ154653 	LvDorsal-R				_	162	
LVReish-ROnGGCTGGCAAGTCGTTCTCGLVDscam-RReceptorDScamACAAGCCAAGGCACCAGACTGQ154653 .1.1LVDScam-RTransducc ión de señalesOixido nitríco señalesCTATGACAGCCTCCACACCA GCGTGTTATTTGCTCCCATCGQ429217 .1214LVTwist-FFactor de transcripci ónTwistCTGAAGCTGGCTATCCGCTA CCAGACGTTGAAGGCGTAACKU317452 .1129LVmef2-FFactor de transcripci ónMef2*AAGACTACACCCTGACCCCA AGATAGGGTCGAGTGCCTCCKU317455 .1129LvArgo-FMaduració n de miARNArgonauta*GCTGCTCCAGAAACCAGAAC TATGCTGCACTGACGTAGCCHM234690 .1158Lvmef2-FCascada de señalizaci ón TLRTraf-6TGTAGCTGCGTGGCTTTCAHM581680 .1.1		transcripci		G	FJ416145.	131	
F LvDscam- Receptor Receptor R Receptor R Receptor R Receptor R Receptor R R R Receptor R R R R R R R R R R R R R R R R R R R		ón	- tollon	GGCTGGCAAGTCGTTCTCG	•		
LvDscam-RReceptorDScamCTGTGCGAGTCAAGGTAGCA.1174LvNOS-FTransducc ión de señalesOixido nitríco sintasaCTATGACAGCCTCCACACCAGQ429217.1LvTwist-FFactor de transcripci on Lvmef2-FTwistCTGAAGCTGGCTATCCGCTAKU317452.1LvTwist-RFactor de transcripci on Lvmef2-RFactor de transcripci on de miARNAAGACTACACCCTGACCCCAKU317455.1LvArgo-FMaduració n de miARNArgonauta*GCTGCTCCAGAAACCAGAACHM234690.1Lvmef2-FCascada de señalizaci on TLRTGAGTTGTGTGCGTGACTHM581680.1LvProPO-FGCCTTGGCAACGCTTTCA.1189		_					
LvNOS-Rión de señalesnitríco sintasaGCGTGTTATTTGCTCCCATC.1214LvTwist-FFactor de transcripci ónTwistCTGAAGCTGGCTATCCGCTA CCAGACGTTGAAGGCGTAACKU317452 .1129Lvmef2-FFactor de transcripci ónAGACTACACCCTGACCCCA kranscripci ónKU317455 .1129LvMef2-RMef2*AGATAGGGTCGAGTGCCTCC n de miARNArgonauta*GCTGCTCCAGAAACCAGAAC TATGCTGCACTGACGTAGCCHM234690 .1158Lvmef2-FCascada de señalizaci ón TLRTraf-6TGTAGCTGCGTGTGACT TGTAGCTGCGTGGCTTTCAHM581680 .1189	LvDscam-	Receptor	DScam	CTGTGCGAGTCAAGGTAGCA		174	
LvNOS-RIon de señalesInitrico sintasaGCGTGTTATTTGCTCCCATC.1214LvTwist-FFactor de transcripci on Lvmef2-FTwist on Lvmef2-FCCAGACGTTGAAGGCGTAACKU317452 .1129Lvmef2-RFactor de transcripci on LvArgo-FMef2*AAGACTACACCCTGACCCCA AGATAGGGTCGAGTGCCTCCKU317455 .1129LvArgo-FMaduració n de miARNArgonauta*GCTGCTCCAGAAACCAGAAC TATGCTGCACTGACGTAGCCHM234690 .1158Lvmef2-FCascada de señalizaci on TLRTraf-6TGAGTTGTGTGCGTGTGACT TGTAGCTGCGTGGCTTTCAHM581680 .1189	LvNOS-F			CTATGACAGCCTCCACACCA	GQ429217		
LvTwist-R transcripci on Lvmef2-F Factor de transcripci on LvArgo-F Maduració n de LvArgo-R miARN Lvmef2-R cascada de Lvmef2-R señalizaci on TLR transcripci on TLR transcripci on Twist CCAGACGTTGAAGGCGTAAC	LvNOS-R	señales		GCGTGTTATTTGCTCCCATC		214	
LvTwist-RónCCAGACGTTGAAGGCGTAAC.1Lvmef2-FFactor de transcripci onAGATAGGGTCGAGTGCCTCKU317455LvMrgo-FMaduració n de miARNGCTGCTCCAGAAACCAGAACHM234690LvMrgo-RMiARNTATGCTGCACTGACGTAGCC.1Lvmef2-FCascada de señalizaci on TLRTraf-6TGTAGCTGCGTGGCTTGTAAHM581680LvProPO-FGCCTTGGCAACGCTTTCA.1	LvTwist-F		Turiet	CTGAAGCTGGCTATCCGCTA	KU317452	400	
Lvmef2-R transcripci on	LvTwist-R		TWIST	CCAGACGTTGAAGGCGTAAC	.1	129	
Lvmef2-RónAGATAGGGTCGAGTGCCTC.1LvArgo-FMaduració n de miARNGCTGCTCCAGAAACCAGAACHM234690Lvmef2-FCascada de Lvmef2-RTraf-6TGAGTTGTGTGCGTGTGACTLvmef2-RSeñalizaci ón TLRTGTAGCTGCGTGGCTTGTAAHM581680LvProPO-FGCCTTGGCAACGCTTTCA.1	Lvmef2-F	Factor de		N4~40*	AAGACTACACCCTGACCCCA	KU317455	400
LvArgo-FMaduració n de miARNArgonauta*GCTGCTCCAGAAACCAGAACHM234690.1LvMef2-FCascada de señalizaci ón TLRTraf-6TGTAGCTGCGTGTGACT TGTAGCTGCGTGGCTTTCAHM581680 .1189	Lvmef2-R	•	ivieiz"	AGATAGGGTCGAGTGCCTCC	.1	129	
LvArgo-R in de miARN Argonauta* TATGCTGCACTGACGTAGCC .1 Lvmef2-F Cascada de señalizaci ón TLR Traf-6 TGTAGCTGCGTGTGACT HM581680 .1 LvProPO-F GCCTTGGCAACGCTTTCA	LvArgo-F	Maduració		GCTGCTCCAGAAACCAGAAC	HM234690		
Lvmef2-F Cascada de señalizaci ón TLR Traf-6 TGTAGCTGCGTGTGACT LvProPO-F GCCTTGGCAACGCTTTCA TGAGTTGTGTGCGTGACT HM581680 .1 189	LvArgo-R		Argonauta*	TATGCTGCACTGACGTAGCC		158	
Lvmef2-R señalizaci frat-o TGTAGCTGCGTGGCTTGTAA .1 LvProPO-E GCCTTGGCAACGCTTTCA	Lvmef2-F	Cascada		TGAGTTGTGTGCGTGTGACT			
LVProPO-E GCCTTGGCAACGCTTTCA	Lvmef2-R	señalizaci	Traf-6	TGTAGCTGCGTGGCTTGTAA	_	189	
LvProPO- R Estrés oxidativo ProPO CGCGCATCAGTTCAGTTTGT .1 68		Estrés	ProPO	GCCTTGGCAACGCTTTCA	EU284136 .1	68	

LvMnSOD- F	Estrés	MnSOD	CGTTGGAGTGAAAGGCTCTG	DQ029053	100	
LvMnSOD- R	oxidativo	MIISOD	GATTTGCAAGGGATCCTGGT	.1	100	

^{*}Tomado de Wei *et al.*, 2016; **Tomado de Hou *et al.*, 2014; ***Tomado de Taju *et al.*, 2017.

Tabla 3. Selección de genes candidatos para ser gen de referencia.								
ID	Función	Gen	Secuencia 5' a 3'	GenBank ID	Producto			
LvGAPDH- F	Metabolism o de	Gliceraldehíd o 3 fosfato	GTGTGTTCACCACCATCGAG	KT861451	150			
LvGAPDH- R	carbohidrato s	deshidrogena sa	CGTTGGACACCACCTTCA	.1				
LvEF1A-R	Factor de elongación	α-Factor de	CTCACATTGCCTGCAAGTTC	GU13622	474			
LvEF1A-R	en traducción	elongación	TACGATGCAGGAGTCACCAG	9.1	174			
LvActin-F	Proteína	O Action	CGAGAAATCGTTCGTGAC	AF300705	166			
LvActin-R	estructural	β-Actina	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT	.2				
LvPk-F	Metabolism o de	Piruvato	CCTGTTGTTGTGGTGACTGG	EF102105	470			
LvPk-R	carbohidrato	cinasa	CCAGTTCTCTGGTGCTCTCC	.1	179			
LvTA-BP-F	Factor de	Proteína de	CCTGGCATCGTACCACAGTT	FJ870977.	198			
LvTA-BP-R	transcripció n	unión a TATA GGCTCCTGTGCATACCATTT		1	100			
LvCla-F	Transporte de vesicular Clatrinas		ACGGGACAGATCAAGGAGGT	KU508425	229			
LvCla-R			CTGGCAGACGTGATGGATTT	.1	220			
LvCytc-F	Cadena de transporte		AGGGAAAGAAGCTGTTCGTG	DQ53454	100			
LvCytc-R	de electrones	Citocromo C	GTGATGCCCTTGGACTTGTT	3.1	160			
LvFo-F	Cadena de	ATP Sintasa	ATCTTGTTCCGCAAGGGACT	DQ39857				
LvFo-R	transporte de electrones	F0 subunidad 6	GCTGATAAGGAAGGACCAGTT C	3.1	169			
LvAK-F	Producción Arginina		CGCTGTGAACGAGATTGAGA	EU346737	150			
LvAK-R	de energía	cinasa	CTCAAGCTTCTCGCGGTTAG	.1				

6.3.3. RT-qPCR

Todas las muestras se normalizaron a 100 ng/mL antes de realizar el ensayo de RT-qPCR. Para el ensayo de RT-qPCR (SYBR® Green) tiempo real, se utilizó un temorciclador CFX96 (BIORAD Touch qPCR System). Las amplificaciones fueron hechas en placas de 96 pozos, con un volumen final por reacción de 12.5 L de SYBER green Master Mix (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix), mezcla de oligonucleótidos (concentración final de 0.4 M cada uno) y 100 ng/ L del templado de cADN. El protocolo de amplificación para la PCR tiempo real fue el siguiente: 95°C por 3 min, 95°C por 10 segundos y 60°C por 30 segundos durante 42 ciclos. Las curvas de desnaturalización fueron monitoreadas sistemáticamente (temperatura de gradiente de 0.5°C/10 segundos desde 55 a 94°C), al final del último ciclo de amplificación para confirmar la especificidad de reacción de amplificación. Cada muestra fue analizada por triplicado. Como control negativo (NTC) se utilizó agua libre de nucleasas para remplazar al templado cADN.

6.3.4. Purificación del producto de PCR

La clonación del producto de PCR se realizó con el objetivo de obtener una cantidad constante de ADN en los ensayos de eficiencia de amplificación, eliminando la variación de cADN de muestra a muestra. Se realizó una PCR tiempo final y se visualizó el producto en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El producto de PCR fue purificado con Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega), y la extracción del plásmido fue realizada con Wizard® Plus SV Minipreps (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3.5. Eficiencia de Amplificación

La eficiencia de amplificación fue evaluada con una curva estándar usando diluciones seriales con un factor de dilución (FD) 10 del ADN plasmídico. La eficiencia fue calculada de acuerdo a la pendiente de la regresión lineal (Rasmussen, 2001; Pfaffl, 2001, 2004) además de obtener el factor de

amplificación para realizar la conversión a porcentaje de eficiencia. Esta conversión fue obtenida con ayuda de una herramienta web de Thermo Scientific (https://www.thermofisher.com). Los valores de Ct y log de números de copias (Log Co), fueron obtenidos del análisis de las diluciones seriales. La eficiencia (E) y el coeficiente de correlación (R²) fueron calculadas para cada gen. Solo los valores por arriba de 1.9 factor de amplificación y E arriba de 90% con 0.99 de R² fueron aceptables.

6.3.6. Estabilidad de la expresión de los genes candidatos a ser genes de referencia

La estabilidad de los genes candidatos como genes de referencia fue determinada usando los algoritmos de geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), RefFinder (Xie et al., 2012) y Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004). Los cuatro algoritmos utilizan diferentes cálculos para seleccionar los genes más estables utilizando valores de Cq, así como la eficiencia de amplificación (Spiegelaere et al., 2015), proporcionado una jerarquización de los genes con base a su estabilidad. El programa geNorm es un método basado en datos para definir el número óptimo de genes de referencia en función de la variación por pares obtenida al comparar un gen específico (n), frente a todos los otros genes de referencia (n + 1) (valor M). Calcula un factor de normalización a partir de cada muestra basándose en la media geométrica de varios genes de referencia, y un bajo coeficiente de variación (CV) indica estabilidad (Hellemans et al., 2007; Guéninin et al., 2009). NormFinder clasifica un conjunto de genes de referencia candidatos según su estabilidad de expresión, al transformar los valores de Cq a una escala lineal. BestKeeper combina genes de referencia candidatos (media geométrica), en un índice utilizando correlaciones de pares. Mientras que RefFinder clasifica los genes de referencia según las desviaciones estándar de los valores de Cq. Una vez que se obtienen los valores de estabilidad adimensionales de cada programa, dónde el valor más bajo indica mayor estabilidad y conforme incrementa el valor la estabilidad es menor.

6.3.7. Conteo de bacterias

El conteo bacteriano de las muestras de agua se realizó al inicio del experimento y al final. Para la dilución de las muestras se hicieron diluciones seriadas con diferentes factores de dilución (1:10, 1:50 y 1:100) con la finalidad de sembrar las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en la etapa inicial y en la final 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Las muestras se sembraron en medios selectivos para hacer más eficiente el conteo de las bacterias de interés TCBS, SM (sal manitol), TSA y EMB (Los medios fueron preparados de acuerdo a las instrucciones de manufactura).

6.3.8. Análisis Estadístico

Los análisis de las diferencias estadísticas de cada ensayo se hicieron pruebas paramétricas ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías (p<0.05 y p<0.001) seguida de una prueba post-hoc Tuckey, basándose en los resultados de normalidad (prueba Kolmogorov-Smirnov y estadístico de homocedasticidad Levene's).

7. RESULTADOS

7.1. Estandarización de la expresión génica del modelo de estudio *L. vannamei*

La obtención de resultados confiables en la expresión génica, se basa en la selección y validación de un gen de referencia utilizado para normalizar los datos crudos de qPCR. El primer paso para la validación de un gen es la selección de genes constitutivos y diseño de oligonucleótidos. Posteriormente, se cuantifica la cantidad de mARN presente en las muestras de tejido en las que se llevará a cabo el análisis de expresión génica. En este trabajo se buscó un gen de referencia a lo largo del desarrollo larvario del camarón blanco. En la **Figura 5**, se graficó el promedio de Cq de cada gen por cada estadio (**Sppl. Tabla 1**). Esta representación gráfica basada en líneas nos permite visualizar qué genes tienen una expresión estable, es decir, con menos variación de valores de Cq entre estadios. Además de ser una expresión temprana (con valores de Cq entre 15-25)

a lo largo del ciclo larval. Con base a estas observaciones y cumpliendo los criterios de la sección 3.2, se seleccionaron para ser evaluados en los algoritmos de estabilidad.

La etapa de nauplio mostró los niveles más altos de variación, algunos genes de referencia no se detectaron en esta etapa. La expresión génica específica de etapa (

Figura 5 y Sppl. Tabla 1), muestra que SubF0 fue el gen más estable con baja variabilidad entre los valores de Cq (desviación estándar ± 0.90). Por otro lado, clatrinas, Cyt-c (del inglés cytochrome C) y TBP (del inglés TATA binding protein), mostraron una alta variabilidad (desviación estándar ± 12.703, ± 10.89 y ± 11.61 respectivamente), porque no se detectaron en la etapa de nauplio. Dos genes candidatos (PK- del inglés piruvate kinase y AK- del inglés arginine kinase) mostraron menos variabilidad (desviación estándar ± 3.52 y ± 3.62). Sin embargo, la amplificación tardía en la etapa de nauplio con valores de Cq altos significa una cantidad baja de mARN. Por otro lado, la β-actina y la EF1α (del inglés elongation factor) mostraron una baja variabilidad (± 1, 89 y ± 2, 56), donde la β-actina mostró una expresión tardía más que la EF1\alpha (Sppl. Tabla 1). Finalmente, GAPDH (del inglés glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), mostró una expresión constante pero con valores altos de Cq y con baja variabilidad (± 1.85) en comparación con β-actina y EF1α. Basados en este análisis, se seleccionaron tres genes de referencia conocidos y uno nuevo: EF1α, β-actina, GAPDH y SubF0. Todos los demás genes de candidatos no se incluyeron en el análisis posterior.

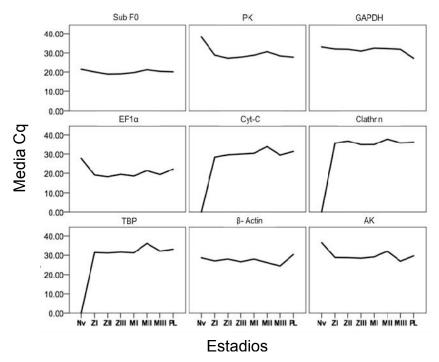


Figura 5. Expresión de los genes candidatos. En los estadios larvarios de *L. vannamei* (n=3 mezclas compuestos por 50 organismos respectivamente). Nauplio V (Nv), Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Zoea III (ZIII), Mysis I (MI) Mysis II (MII), Mysis III (MIII) y Postlarva (PL).

En la **Tabla 4** se observan los genes que cumplieron con los criterios (ver sección 3.2) ordenados por estabilidad con base en los diferentes algoritmos. El primer lugar en el orden de estabilidad, en todos los algoritmos es la subunidad F0 de la ATP sinstasa (Sub F0). NormFinder y geNorme son los únicos que sugieren combinaciones de genes para generar una media geométrica, para obtener el número de genes óptimos y generar un factor de normalización. NormFinder sugiere la media geométrica del primer y segundo gen más estable (SubF0+GAPDH), por una diferencia mínima esta en segundo lugar de estabilidad. GeNorme sugiere una media geométrica de 6 incluyendo genes que no cumplen con los criterios de selección (**Sppl. Figura 6**). Además, esta selección de genes se basa en la n y n+1 de los genes diana menos variables dando uno que arroja un factor denominado geNorme V (con valor V>0.15). Con esta base se sugieren

los genes con el menor valor de M (**Sppl. Figura 6** y **Sppl. Tabla 2**). En Bestkeeper y normFinder GAPDH es el segundo gen más estable y en geNorme y RefFinder es $EF1\alpha$.

Tabla 4. Estabilidad de genes candidatos a lo largo del ciclo larvario en *L. vannamei* basado en 4 algoritmos.

	NormFinder		BestKeeper			geNorm		RefFinder	
Clasificación	Genes	Valor de	Genes	SD	CV	Genes	Valor M	Genes	Valor de
	Genes	estabilidad	Genes	SD	CV	delles	vaiUi IVI	Genes	estabilidad
1	SubF0	0.008	SubF0	0.68	3.38	SubF0	1.403	SubF0	1.32
2	SubF0 and	0.009	GAPDH	- 1.34	4.29	EF1α	1.676	EF1α	2
	GAPDH		OAI DIT	1.04	4.25				
3	GAPDH	0.015	β-Actin	1.46	5.35	β–Actin	2.491	GAPDH	3.36
4	EF1α	0.027	EF1α	2.18	10.43	GAPDH	2.581	β–Actin	4.4
5	β–Actin	0.043					•		-

SD: Desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

El gen más inestable es β -Actina debido a que se encuentra en los últimos lugares de estabilidad en todos los programas. Por lo tanto, se escogieron los dos genes más estables de cada programa y sus combinaciones (medias geométricas), para normalizar los datos de expresión de los genes de desarrollo (Mef-2, Ubx y Twist). Una vez seleccionados los genes se clonaron y se realizó el cálculo de la eficiencia (*ver* sección 3.5, **Sppl. Figura 3**), en la **Tabla 5** se muestran los datos obtenidos y todas las eficiencias están en un rango de 90 a 108%, además se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos por medio de la curva de desnaturalización de los productos de PCR de cada gen (**Sppl. Figura 4**).

Tabla 5. Eficiencia de amplificación de genes candidatos.

	Gen	Pendiente	R ²	Factor de amplificación	Eficiencia (%)
	EF1α	-3.416	0.999	1.96	96.21
Genes de	GAPDH	-3.129	0.999	2.09	108.73
referencia	β-Actina	-3.545	0.998	1.91	91
	Sub F0	-3.550	0.999	1.92	91.72
Genes de desarrollo	Ubx	-3.502	0.998	1.93	93
	Mef-2	-3.553	0.998	1.91	91.16
	Twist	-3.461	0.994	1.95	94.5

La **Figura 6** tiene como objetivo enfatizar la importancia de la validación de los genes de referencia, para medir la expresión génica durante el desarrollo larvario del camarón blanco del Pacífico. Se cuantificó la expresión de tres genes de desarrollo (Ubx, Twist y Mef-2) en diferentes etapas. El análisis estadístico de los resultados se realizó por etapa para encontrar diferencias significativas en los niveles de expresión, dependiendo del gen de referencia utilizado para normalizar la expresión génica. Es posible observar que sí existen diferencias significativas de la expresión relativa, dependiendo del normalizador en ciertos estadios a lo largo del ciclo de vida. La interpretación de los datos de expresión de Twist y Mef-2 se basó en un reporte anterior (Wei *et al.*, 2016), mientras que para Ubx este es el primer reporte.

La expresión génica se comparó utilizando los tres genes de referencia más estables (SubF0, GAPDH y EF1α), de forma individual y en combinación. Esto debido a que actualmente se acepta que las variaciones en la estabilidad del gen de referencia, se pueden minimizar utilizando la media geométrica de varios (al menos dos), genes de referencia y así lograr resultados más precisos.

Genes de desarrollo

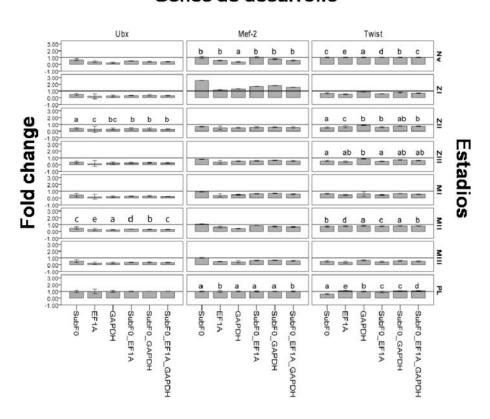


Figura 6. Expresión relativa de Ubx, Mef-2 y Twist. Se utilizaron los tres genes más estables (Sub F0, *EF1a* y *GAPDH*) y su combinación (media geométrica). Las barras representan ± 1 SD y los letras indican diferencias significativas en la expresión de genes por estadio (p<0.05). Nauplio V (Nv), Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Zoea III (ZIII), Mysis I (MI) Mysis II (MIII), Mysis III (MIII) y Postlarva (PL).

Los patrones de expresión génica durante el desarrollo larvario se compararon con genes de referencia individuales y combinados (**Figura 7**). Las variaciones fueron más evidentes cuando los genes de referencia se usaron individualmente que en combinación. Observándose diferencias significativas en los niveles de expresión en los tres genes de desarrollo, dependiendo del

gen de referencia utilizado para normalizar la expresión. Por ejemplo, Mef-2 fue la más sensible; se detectaron diferencias significativas en la expresión génica en todas las etapas del desarrollo, excepto en los casos de nauplio y postlarvas. La expresión de Twist mostró diferencias significativas en todas las etapas de zoea y en las postlarvas, mientras que la expresión de Ubx solo mostró diferencias significativas en la etapa de nauplio (**Figura 6**). En general, los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de los tres genes de referencia. Teniendo en cuenta estos resultados, junto con los valores de estabilidad genética se sugiere que la media geométrica de SubF0 + GAPDH + EF1α, proporciona los datos más precisos para medir la expresión génica durante el desarrollo del camarón.

7.2. Evaluación de la respuesta inmune innata en embriones de camarón

El primer experimento (**Figura 3**) el efecto de los patrones moleculares asociados a microorganismos de patógenos (PAMP's) y los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP'S) sobre la eclosión de los embriones de *L. vannamei* (**Figura 7**) tienen diferencias significativas entre los tratamientos (*ver* sección 2.1). Los tratamientos con BS y VP que tienen la mayor tasa de eclosión en comparación con los otros grupos.

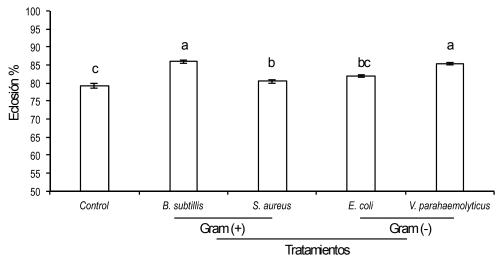


Figura 7. Efecto de PAMP's y MAMP's sobre la eclosión de los embriones de *L. vannamei* (p<0.05).

Los resultados de eclosión indican que existe una diferencia en la estimulación con bacterias asociadas al ambiente marino. También se realizaron observaciones morfológicas de las larvas provenientes de los diversos tratamientos (**Figura 8**) con mayor porcentaje de eclosión y no muestran diferencias aparentes. Al realizar el traslado de las larvas a las nuevas unidades de bionesyo se observó que las larvas provenientes del grupo control y tramamientos con VP y BS tenían movimientos natatorios normales, con fototropismo altamente activo, a diferencia de las larvas provenientes de los tratamientos de EC y SA.

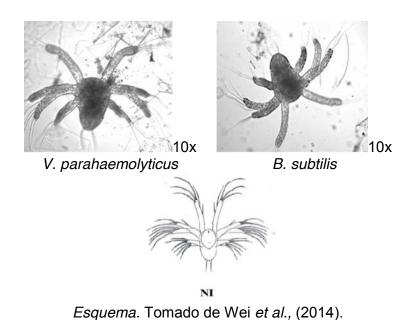


Figura 8. Morfología de las larvas nauplio al momento de la eclosión. Las larvas observadas en la parte superior provienen de un desarrollo embrionario estimulado con las bacterias *B. subtilis* y *V. parahaemolyticus* respectivamente. El esquema de la parte inferior nos permitió identificar el subestadio I de desarrollo del estadio nauplio.

Se pudo observar la misma tendencia durante el desafío VP en la supervivencia de las larvas obtenidas de embriones estimulados .De acuerdo con la prueba estadística, se identificaron tres grupos estadísticamente diferentes. Las larvas que provenían de embriones estimulados con BS y VP mostraron una mayor supervivencia que los controles después de una prueba de provocación de 24 h con *V. parahaemolyticus* (P≤0.05). Este resultado se consideró una evidencia indirecta de que la producción de efectores de la

respuesta inmune que se activaron. Adicionalmente se tuvo un control de viabilidad, es decir, larvas sin infección para conocer la tasa de muerte natural a lo largo del tiempo La tasa de viabilidad fue de 80% (±5%), por lo tanto la disminución de la población por la infección es aproximadamente de un 40 a 50% de la población (**Figura 9**).

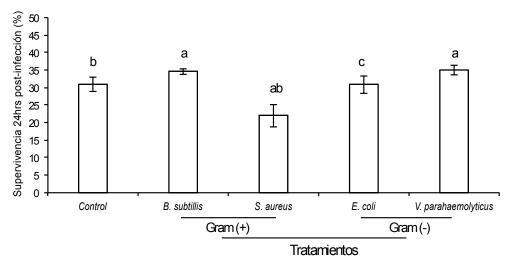


Figura 9. Supervivencia de larvas con entrenamiento inmune durante el desarrollo embrionario. Se realizó un reto de infección con *V. parahaemolyticus* durante 24 h con las larvas provenientes de los desarrollos embrionarios estimulados con bacterias muertas (p<0.05).

Al finalizar el reto se hicieron observaciones morfológicas de las larvas con el objetivo de detectar un retraso en el crecimiento. Al momento de la identificación de las larvas se econtraban en el subestadio V y las larvas provenientes del tratamiento con *Vibrio* tuvieron desarrollo en los segmentos abdominales, dónde se ubicará el intestino en los estadios subsecuentes y tenían aún el ojo naupliar (**Figura 10**). Las observaciones morfológicas muestran que no hubo un efecto eveidente por los tratamietos ni el reto infeccioso, sobre desarrollo de las larvas de *L. vannamei*. La duración del experimento desde la eclosión hasta la infección fue de 36 h sin alimentación.

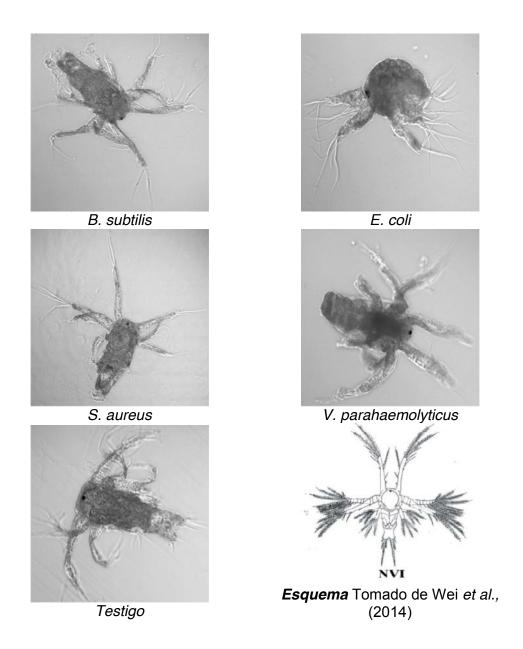


Figura 10. Morfología de las larvas después del reto de infección con *V. parahaemolyticus.* Todas las fotografías fueron tomadas con el aumento 10X. El esquema de la parte inferior derecha, permitió identificar el subestadio V del desarrollo de la larva nauplio.

7.2.1. Perfil transcriptómico de los embirones estimulados.

El perfil transcripcional de los genes seleccionados muestran una expresión molecular diferencial de los mecanismos y efectores de la respuesta inmune. En los resultados previos, los embriones y larvas desarrollaron una respuesta inmune duradera cuando se expusieron a los extractos de microorganismos. Entonces, el sigueinte paso fue la exploración del efecto de la exposición de los

embriones sobre la transcripción de los maracadores de vías de señalización y efectores de la respuesta inmune. La mayoría de estos genes (**Tabla 6**) (*ver* sección 6.3.2, 6.3.4 y 6.3.5) se expresan en algún momento del desarrollo de las larvas, diferenciando su activación por bacterias patógenas de aquellas que no son patógenas.

A cada gen seleccionado de la respuesta inmune se le determinó la eficiencia de amplificación obteniedo el rango de 91-113% (**Tabla 6**) y se correlacionó la curva desnaturalización del producto de pcr en todos los ensayos, para evitar resultados falsos positivos debido a la poca cantidad de mARN presente en las muestras (Anexo-material suplementario).

Tabla 6. Eficiencia de genes de respuesta inmune

	Gen	Pendiente	R ²	Factor de amplificación	Eficiencia (%)
Factor de	Dorsal	-3.562	0.999	1.91	90.87
transcirpción	Relish	-3.303	0.999	2.01	100.8
	Pen-2	-3.448	0.996	1.95	95
	Pen-3	-3.517	0.999	1.92	92.46
	Pen-4	-3.353	0.998	1.99	98.72
AMP	ALF	-3.362	0.991	1.98	98.35
	Lys	-3.273	0.998	2.02	102.08
	Crus	-3.034	0.998	2.14	113.6
	NOS	-3.341	0.999	1.99	99.21
Estrés	ProPO	-3.254	0.999	2.03	102.91
oxidativo	MnSOD	-3.467	0.999	1.94	94.28
Receptores	TLR	-3.296	0.997	2.01	101.09
riccoptorco	DScam	-3.464	0.997	1.94	94.39
Señalización	Argo	-3.54	0.998	1.92	91.64
	Traff	-3.474	0.998	1.94	94.02

Una vez realizado la validación de los primers se procedió al procesamiento de la muestras; los resultados se integran enla **Figura 11** (heatmap) dando una visión integral de la expresión de genes de la respuesta inmune; esta figura

esta compuesta por varios elementos: 1) parte inferior derecha hay una escala de color que es directamente proporcional a la cuantificación de la expresión de cada gen (Fold change); 2) parte superior se observa el seguimiento del desarrollo embrionario hasta la eclosión de la larva en el estadio de nauplio y 3) la representación central se encuentra el patrón transcripcional de la estimulación de los embriones durante su desarrollo con bacterias muertas por calor (autoclave).

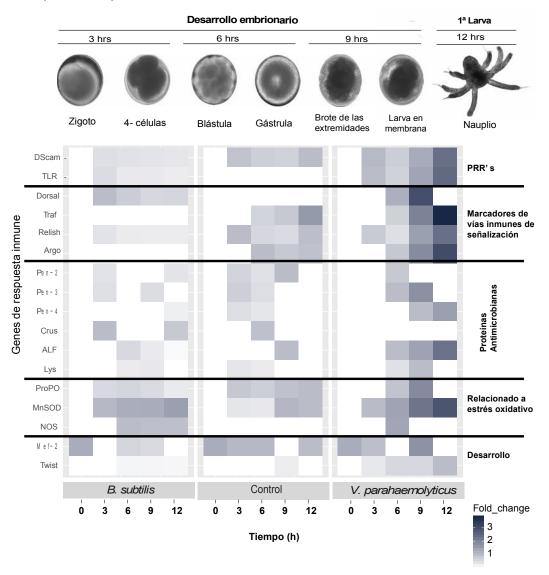


Figura 11. Perfil transcripcional del "priming" a través del desarrollo embrionario del *L. vannamei* hasta la eclosión. Se realizó una cinética de estimulación desde el tiempo inicial y hasta las 3, 6, 9 y 12 h que comprende desde el desove hasta la eclosión del nauplio. Se realizaron dos tratamientos (*B. subtilis* y *V. parahaemolyticus*) de exposición a extractos bacterianos durante todo el desarrollo y un grupo testigo.

Durante el estudio, se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados. Los principales cambios registrados por el grupo de genes se explican a continuación:

Receptores de reconocimiento de patrones. Los PRR son proteínas capaces de reconocer patrones molecualres que se encuentran en patógenos (PAMP's), biomoléculas asociadas a daño (DAMP's) y/o microorganismos (MAMP's) asociados a microbiota. Estos receptores controlan la activación y modulación de una respuesta inmune. En este trabajo se evaluó los receptores TLR y DScam. El gen del receptor TLR solo se expresó cuando se aplicó la estimulación con bacterias muertas por calor; principalmente en la estimulación con el tratamiendo con VP, se observó una expresión significativamente mayor después de 3 h (P <0,001). La expresión del gen DScam se registró después de 3 h y permaneció activa durante todo el desarrollo embrionario. En los tratamientos con VP, la DScam se sobreexpresó significativamente después de 9 h de tratamiento y con la bacteria BS hay un patrón de expresión similar a el control (Figura 12).

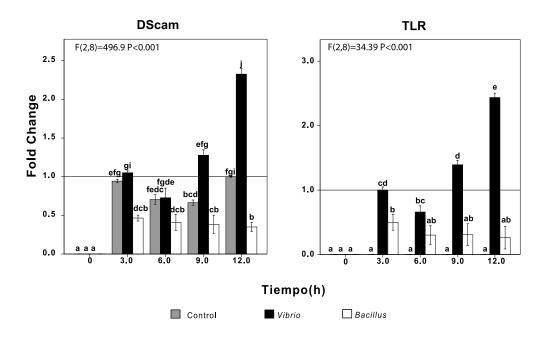


Figura 9. Expresión relativa de los receptores TLR y DScam. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento).

Marcadores de vías inmunes. En cada uno de los genes involucrados en la activación de la respuesta, se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión en los tratamientos con los extractos de bacterias a lo largo del tiempo. Los factores de transcripción tipo NF-kB tienen una expresión diferencial, el mARN de Relish se tuvo una detección después de 3 h y se mantuvó durante todo el desarrollo embrionario tanto en el control como con BS. A diferencia de la aplicación de VP que induce un aumento en su expresión de 9 h (P < 0.001). Y el mARN de Dorsal no se expresó en el control. mientras que en los tratamientos con bacterias muertas si se indujo una sobreexpresión significativa después de 3 h. El mayor efecto se observó con la aplicación de VP, donde la expresión relativa fue de hasta 3 a las 9 h de tratamiento. Finalmente Argo y Traf-6 tienen un comportamiento similar; ambos genes se expresan después de 6 h y su expresión aumenta progresivamente en el tratamiento con VP, con un aumento significativo después de 9 h (P <0.001). En ambos genes, la estimulación de BS parece inducir la represión de su expresión durante todo el desarrollo en comparación con el control (Figura 13).

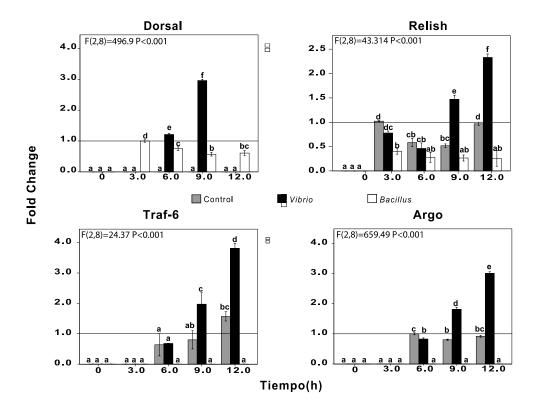


Figura 10. Expresión relativa de los genes de regulación génica. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento).

Proteínas antimicrobianas (AMP). Se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes AMP entre los tratamientos evaluados, aparentemente la respuesta está influenciada por el tipo de estímulo aplicado. Los genes de las penaeidinas PEN-2, PEN-3 y PEN-4 y el gen de lisozima (Lys) se expresaron a partir de 3 h en el control y su expresión se detuvo durante 9 h; en contraste, se observa que el tratamiento con células *Vibrio* indujo una sobreexpresión significativa (P <0.001). Los genes ALF y CRUS solo se expresan a partir de 9 y 6 h respectivamente, pero los tratamientos VP y BS (**Figura 14**).

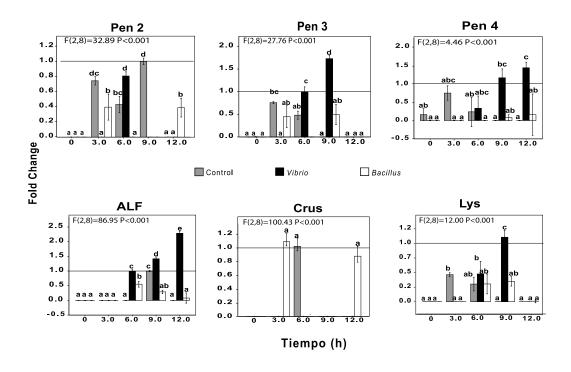


Figura 11. Expresión relativa de los AMP's. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento).

Relacionado con el estrés oxidativo. Los sistemas involucrados en la producción ROS y SRN son el Sistema PO (ProPO) y NOS. Y por el otro lado está la enzima antioxidante MnSOD que previene el daño incontrolado de la generación de ROS. En este estudio, la expresión de ProPO se detectó a partir de las 3 h después del comienzo del experimento y permaneció activa hasta la eclosión. La estimulación con bacterias muertas causó un aumento significativo en su expresión (P <0.001), particularmente en el caso del tratamiento con VP, donde se indujo un cambio en la expresión relativa de más de 1.5 veces, como MnSOD. Aparentemente, el gen NOS no se expresó en el control, pero su expresión se indujo a partir de las 6 h con los tramientos, principalmente con BS, donde permaneció con una expresión activa hasta la eclosión (Figura 15).

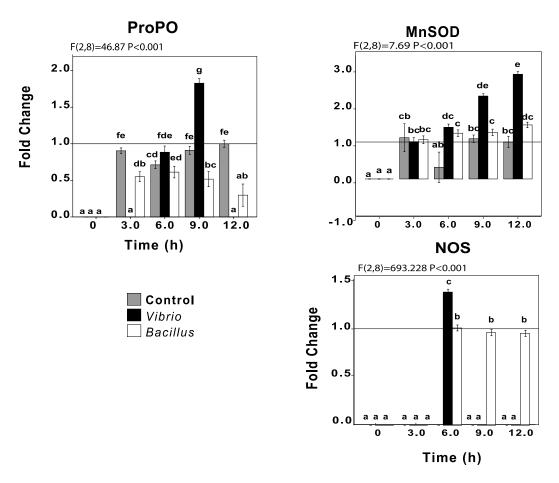


Figura 15. Expresión relativa de los genes asociados a estrés oxidativo. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento).

Desarrollo. La expresión del gen Mef-2 se detectó a las 0, 3 y 9 h en el control y se observa que la aplicación de estimulación con bacterias generó cambios significativos en cada uno de los tiempos (P<0.001). Sin embargo, no se observa un patrón definido de activación o represión (**Figura 16**). Con el gen Twist, se observaron altos niveles de variabilidad de expresión, por lo que no fue posible encontrar diferencias significativas en el control y los tratamientos con bacterias (**Figura 16**).

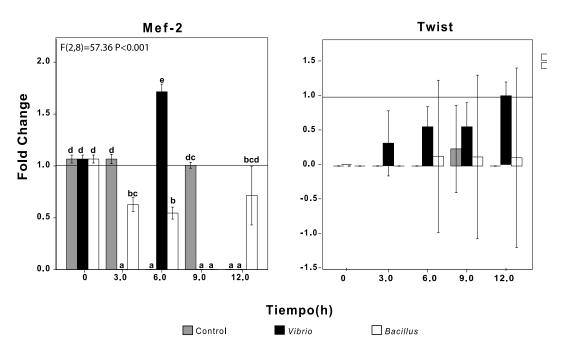
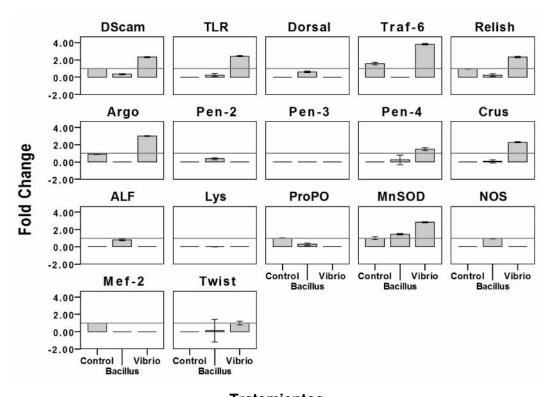


Figura 16. Expresión relativa de los genes asociados a desarrollo. ANOVA de dos vías (Tiempo/Tratamiento).

Al finalizar la estimulación las larvas presentan diferentes perfiles de transcripción (**Figura 17**) antes de enfrentar en el reto infeccioso, lo que les permitió la sobrevivencia por mecanismos distintos, esto sugiere una vía de activación diferente. Interesanetemente el tratamiento con BS tiene una expresión discreta de todos los efectores solubles (AMP's y estrés oxidativo), al igual que en los receptores DScam y TLR y el tratamiento con VP muestra una sobreexpresión en la mayoría de los genes evaluados evidenciando un estado de alerta.



Tratamientos

Figura 17. Respuesta inmune innata en nauplios. Son larvas provenientes de diferentes tratamientos (*Vibrio* y *Bacillus*) durante su desarrollo embrionario y el control sin tratamiento, antes de tener el reto infeccioso con *Vibrio*.

8. DISCUSIÓN

8.1 Estandarización de la expresión génica

Los estudios de expresión génica en *L. vannamei*, se han llevado a cabo en diferentes contextos para estudiar su crecimiento, inmunología, resistencia o tolerancia a enfermedades infecciosas (Lightner *et al.*, 2012; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). No obstante, todo esto se ha realizado sin la validación de genes de referencia (Lage *et al.*, 2017; Quispe *et al.*, 2016). Destacando la necesidad de validar el gen de referencia en el desarrollo de las larvas y ayudando a obtener resultados precisos.

Se han realizado algunos estudios de normalización en diferentes especies de crustáceos como en *P. monodon*, en dónde se evaluaron cuatro genes de referencia candidatos (18S rRNA, GAPDH, β-actina y EF1α) para la expresión

de genes en los órganos reproductores. Siguiriendose como normalizador EF1α (Hines et al., 2014); en Macrobrachium olfersii se evaluaron seis genes (β-actina, GAPDH, EF1α, RpL8, RpS6 y AK) en embriones y en tejidos de adultos (ganglios cerebrales, músculo y hepatopáncreas). Los genes más estables resultaron ser RpL8 y RpS6 (Jamarillo et al., 2017). En Penaeus stylirostris se examinó la estabilidad transcripcional del ARNr 18S, GAPDH, βactina y EF1α mientras se medía la expresión del ARNm de un gen durante un reto con el virus de la mancha blanca (WSV), el gen de control interno más estable fue GAPDH durante la infección por WSSV (Dhar et al., 2009). Mientras que en P. clarkii se determinó la estabilidad de la expresión de ocho genes de referencia candidatos (GAPDH, β -actina, EF1α, UB -Ubiquitina, β -tubulina, TBP, EIF y 18S rRNA) y los resultados mostraron que entre las diferentes muestras de tejido que EIF (del inglés eukaryotic translation initiation factor 5) y 18S rARN fueron los más estables expresadas, mientras que desde la etapa de desarrollo ovárico, TBP y EIF (Jiang et al., 2015). Todos estos trabajos nos indican que no existe un gen de referencia universal para todos los modelos y que se necesita realizar esta validación en cada etapa de la evaluación del modelo. Por lo tanto, este trabajo se incluye el estudio de la estabilidad de la expresión génica de varios candidatos durante las etapas metamórficas en un modelo ampliamente utilizado para la investigación molecular. estandarización durante el desarrollo es un desafío, debido a los cambios metabólicos repentinos que se producen durante la metamorfosis. Además de hacer hincapié en la necesidad de protocolos estandarizados.

Por ello, este trabajo propone los siguientes pasos que se deben tomar para lograr una adecuada validación y resultados confiables: 1) el uso del mismo número de organismos para la extracción de ARN por condición. En muchos casos, los autores usan el peso en lugar de número de organismos (ref), pero es importante tener en cuenta que la respuesta es individual y, por lo tanto, el número de organismos debería ser el mismo al realizar la evaluación de la respuesta en mezclas (pools) de cada condición; 2) cuantificación del ARN y el cADN, además de ajustar en todas las muestras de cADN a 100 ng/μL para minimizar las diferencias debidas a la extracción y la eficacia de la síntesis del cADN y 3) los genes de referencia deben seleccionarse cuidadosamente para

cuantificar la expresión génica relativa. La selección de genes de referencia candidatos debe considerar una baja variación del valor de Cq entre las muestras, así como altos niveles de expresión y eficiencia de amplificación.

Cuando los genes de referencia candidatos se analizaron en diferentes etapas del desarrollo larvario, la variabilidad puede asociarse a cambios fisiológicos durante la metamorfosis (histogénesis, transición de la dieta, desarrollo muscular y reconstrucción del exoesqueleto) (Wei et al., 2014). Por lo tanto, la selección de genes de referencia debe realizarse minuciosamente (Bustin et al., 2009), ya que los cambios relacionados con la fisiología en los niveles de expresión de los genes constitutivos pueden producir resultados inexactos. En este trabajo, se examinaron nueve genes de referencia candidatos. La selección de genes de referencia basándose en su función, conociendo que son esenciales para la viabilidad celular. La función génica se dividió en cuatro categorías, enzimas metabólicas (PK, AK y GAPDH), regulación génica y síntesis de proteínas (TBP y EF1\alpha), cadena respiratoria (Cyt-c y SubF0) y proteínas estructurales (Clatrinas y β -Actina). Algunos de estos genes se eliminaron después de la selección inicial porque mostraron una alta variabilidad entre etapas y una baja sensibilidad (por ejemplo, la falta de detección de la cantidad mínima de mARN en la muestra).

Es importante hacer énfasis en las razones fisiológicas por la que se seleccionan o se descartan los genes candidatos, con el fin ayudar a futuros trabajos de expresión génica y no se elijan genes constitutivos sin una validación previa.

Las enzimas metabólicas como GAPDH y PK participan en la glucólisis, aunque realizan otras funciones (Jung *et al.*, 2012). Se ha reportado que GAPDH es un buen gen de referencia en ensayos experimentales con camarones adultos (Darh *et al.*, 2009; Valenzuela-Castillo *et al.*, 2017), sin embargo, no fue la mejor opción para medir la expresión de genes en estadios larvales de *M. olfersii* (Jaramillo *et al.*, 2017). Esto podría estar relacionado con los cambios metabólicos que ocurren en las etapas metamórficas; por ejemplo, durante la etapa de inter-muda, las vías glucolíticas están activas. Sin embargo, se detienen cuando los animales entran a la etapa de pre-muda,

disminuyendo el requerimiento de proteína GAPDH (Gao *et al.*, 2017). Otros eventos fisiológicos que requieren cambios metabólicos son la respuesta al estrés oxidativo, la apoptosis, la autofagia, la señalización celular mediada por receptores, la regulación postranscripcional, la protección del ADN telomérico y el mantenimiento de la integridad del ADN (Sirover, 2011). En larvas de *L. vannamei*, GAPDH se desempeñó bien como gen de referencia, mostrando mejores resultados cuando se combina con otros genes de referencia.

AK es parte del metabolismo energético; transfiere un grupo fosfato entre el ATP y la L-arginina para almacenar energía, principalmente en las células musculares (Kotlyar *et al.*, 2000; Fang-Fang *et al.*, 2014). Este gen se descartó debido a la baja eficiencia de amplificación (86%); probablemente la cantidad de células musculares sea relevante para su expresión, y los estadios larvales (principalmente estadios tempranos) presentan un desarrollo muscular inicial. En cualquier caso, los datos de amplificación con los oligonucleótidos AK deben rectificarse con un análisis adicional (por ejemplo, repeticiones adicionales, rediseño de oligonucleótidos, ajustes en las condiciones de amplificación, etc.).

EF1α ha sido ampliamente utilizado como gen de referencia. Participa en el reclutamiento de aminoacil-tARN durante la síntesis de proteínas en cada célula (Alberts *et al.*, 2014), por lo que su expresión es constante y muestra una baja variabilidad. Por otro lado, la TBP; un regulador de la transcripción y parte de la maquinaria del complejo proteico de iniciación de la transcripción eucariótica, no mostró una expresión estable durante el desarrollo larvario; Su expresión era baja, casi indetectable. La expresión de TBP está estrechamente regulada y las células solo requieren pocas cantidades de proteínas para ser funcionales (Akhtar & Veenstra, 2011; Jonhson *et al.*, 2017).

Las clatrinas son proteínas de recubrimiento esenciales para la endocitosis y el tráfico vesicular (Royle, 2006), influye en la vida media de las proteínas y en el reciclaje. Sin embargo, su expresión fue baja y variable entre los estadios larvales. La β -actina forma parte del citoesqueleto, se requiere para la remodelación celular y la motilidad, y su expresión depende del ciclo celular (Jacinto & Baum, 2003; Bunnell *et al.*, 2011; Katz *et al.*, 2012). La proliferación

celular en etapas metamórficas es variable debido al crecimiento, la remodelación y la muda, por lo que la expresión de β-actina muestra variaciones relacionadas con la etapa y, por lo tanto, una baja estabilidad como gen de referencia.

El citocromo c (Cyt-c) es una proteína con grupo hemo, cuya función principal es la transferencia de electrones, la cual es necesaria para la muerte celular programada (Baddidt *et al.*, 2015). La metamorfosis implica eventos coordinados de proliferación y muerte celular debido a la remodelación del tejido. Por lo tanto, la expresión de Cyt-c puede variar en las etapas metamórficas, lo que reduce la estabilidad como gen de referencia.

Finalmente, la subunidad F0 (SubF0) pertenece a un complejo de proteínas que conforma la ATP sintasa. La maquinaria de la ATP sintasa muestra la expresión diferencial para cada subunidad y promueve la diferenciación de las células germinales (Witting *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2015). SubF0 fue el gen de referencia más estable probado en este estudio, seguido de la media geométrica de SubF0 y GAPDH, lo que sugiere que su expresión no está regulada por el desarrollo (Ardia *et al.*, 2012).

Una vez seleccionados los genes candidatos de acuerdo a los criterios de selección descritos en la secc. 6.3.2., se utilizaron algoritmos para determinar la estabilidad génica, es decir, la detección de un Cq poco variable entre estadios.

Los algoritmos utilizados en este estudio (*ver* secc. 6.3.4), sugieren posibles combinaciones de genes de referencia para obtener un factor de normalización con el error más bajo. El programa geNorm no pudo calcular el número óptimo de genes debido a la alta variabilidad entre las etapas. Sin embargo, NormFinder sugirió la media geométrica de SubF0 y GAPDH como la mejor combinación. Ambos genes mostraron patrones de expresión similares, pero SubF0 mostró una amplificación temprana. Por lo tanto, con valores de Cq más bajos. Los diferentes cálculos realizados por cada algoritmo proporcionan diferentes clasificaciones de estabilidad; en estas clasificaciones, SubF0 fue consistentemente el gen más estable (**Tabla 4**).

La estabilidad de SubF0, en combinación con GAPDH y EF1α fue evidente en la normalización de la expresión génica de los genes del desarrollo (Ubx, Mef2 y Twist). Los patrones de expresión de Mef-2 y Twist se compararon con un estudio previo (Wei et al., 2016), en el que se utilizó 18S rARN como gen de referencia, mostrando resultados similares excepto en las etapas nauplio y zoea. El gen 18S rARN se expresa en niveles altos mostrando valores de Cq bajos, dependiendo de la concentración de la muestra. Por lo tanto, puede ser necesario diluir las muestras para amplificar correctamente este gen en particular. No obstante, las muestras diluidas pueden no ser ideales para amplificar transcritos de baja abundancia. Por lo tanto, los genes de referencia ideales deberían presentar abundancias similares a los genes de interés. Los resultados de este estudio indican que SubF0 solo podría ser lo suficientemente estable como para el análisis de la expresión génica en larvas de camarón, sin embargo, la media geométrica de SubF0 + GAPDH o SubF0 + GAPDH + EF1α proporciona resultados más consistentes, por lo tanto, estas son las mejores opciones como genes de referencia para medir la expresión génica durante el desarrollo de larvas de camarón.

La propuesta de un solo gen de referencia como lo es SubF0, ofrece una ventaja metodológica en qPCR. Además, puede ser utilizado como control interno en otras técnicas que determinan la expresión génica como: Northernblot, microarreglos y pcr semicuantitativa. Todo este trabajo de validación para la selección de un gen de referencia para el ciclo larvario de *L. vannamei*; además de las consideraciones técnicas indispensables, tiene como objetivo obtener resultados confiables y reproducibles. Además de proponer una guía metodológica de manejo y procesamiento de muestras de todos los estadios metamórficos de camarón que permiten ser aplicable a otros modelos metamórficos.

8.2. Respuesta inmune

El estudio de la memoria inmune innata comenzó con el copépodo *Macrocyclops albidus* (Kurtz & Franz, 2003) con el fenómeno ahora llamado "priming transgeneracional". De aquí hasta la actualidad se inició el estudio en otros modelos de invertebrados y vertebrados el "priming individual" (Netea *et*

al., 2015), principalmente en organismos adultos (Lanz-Mendoza & Garduño-Contreras, 2018) y recientemente en larvas (Dhinaut *et al.*, 2017; Schulz *et al.*, 2019). Este trabajo aborda el priming individual desde etapas embrionarias, a través de diversos tratamientos.

El primer paso para la descripción del tipo de defensas con las que cuentan los embriones de camarón de *L. vannamei* fue conocer si tienen actividad antimicrobiana sin ningún estímulo minutos después del desove. Encontrando que si presenta actividad antimicrobiana contra Gram (+) y Gram (-) (**Sppl. Figura 7**), respaldando lo reportado por Haug *et al* (2002) en huevos del camarón *Pandalus borealis*. Esta actividad antimicrobiana es atribuida a la presencia de AMP's o proteínas generados de ROS (especies reactivas del oxígeno) como zimógenos de la cascada del sistema PO que se han detectado al comenzar el desarrollo (Martín *et al.*, 2012). Lo que sugiere que la primera de la respuesta de defensa es de origen materno, permitiendo así la maduración de su sistema inmune y la producción de sus propios efectores a lo largo de su ciclo de vida.

Esta es la primera evidencia en la que los embriones de camarón son capaces de generar una respuesta inmune activa para la producción de efectores. Anteriormente, Quispe *et al.* (2016) informaron la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune en embriones de *L. vannamei*, sin embargo, como la expresión no fue inducida por un estímulo específico, podrían interpretarse como parte de la actividad basal. La capacidad del embrión de camarón para responder dentro de unas pocas horas después de la fertilización está relacionada con su ciclo de vida y biología. En la naturaleza, las hembras del camarón desovan los huevos cerca de la superficie del océano (Medina-Reyna *et al.*, 1999); Como los huevos carecen de un sistema de flotación, precipitan rápidamente al fondo marino donde completan su desarrollo en contacto con el microbioma bentónico, lo que implica una constante estímulación y sensado de su ambiente.

La comunicación entre el ambiente y las células comienza mediante los receptores (PRR's) como por ejemplo TLR y DScam. La detección del mARN de TLR esta directamente relacionado con los tratamientos y su activación se

evidenció por medio de la expresión de TRAF6; proteína adaptadora asociada a Pelle corriente debajo de la cascada de señalización antes de la traslocación del factor de transcripción Drosal al núcleo (Agarwala *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Se esperaba que el comportamiento de expresión de TRAF6 tuviera una relación directamente proporcional a la expresión de TLR junto con Dorsal, lo cual solo ocurrió en el tramiento con VP. A diferencia del tratmaiento con BS dónde se dectectó la expresión de TLR y Dorsal pero no de TRAF6 sugiriendo que se promueve la presencia del receptor para una rápida señalización como medida precautoria de la respuesta inmune. Sin embargo se detectó el mARN de TRAF6 en el control sin la transcripcción activa de TLR lo que permite sugerir que participe en otras vías de señalización. La activación de la señalización de TLR no solo produce efectores de la RI, sino también promueve el desarrollo con la finalidad de vigilar el ambiente por medio de quimiosensores para la detección de agentes etiológicos diversos (Brandt & Ringstad, 2015).

Otro de los receptores principalmente estudiados por su participación en la respuesta inmune y carácter hipervariable por la aparente maduración de la afinidad en retos subsecuentes es DScam (Hung *et al.*, 2013), mostrando patrones de expresión opuestos entre los tratamientos de VP, BS y el control. Al parecer el aumento en la transcripción de DScam en el tratamiento con VP es por la generación de memoria que se debe a la patogenicidad y virulencia del agente etiológico detectado (Chiang *et al.*, 2013). Sin embrago, en las primeras etapas de desarrollo sus funciones podrían no estar limitadas solo a la detección, neutralización y opsonización (Ng *et al.*, 2015). Puede tener participación en el desarrollo, morfogénesis, auto reconocimiento y diferenciación como se informa en organismos superiores (Agarwala *et al.*, 2001; Fuerst *et al.*, 2010; Schmucker & Chen, 2009; Yimlamai *et al.*, 2005 ;).

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia de NF $\kappa\beta$ que se activan por diferentes vías asociadas al reconocimiento por PRR's, Dorsal por la vía de TLR y Relish se activa por medio de la vía IMD que se desencadena con bacterias Gram (-) y algunos *Bacillus* Gram (+) (Wang & Wang, 2013) o a través de la ruta TAK1/TGF- β (Wang *et al.*, 2013, 2015b y 2016) para la

producción de efectores de la RI. Estas cascadas de señales puede enlazarse con la activación de la ProPO (Tassanakajon *et al.*, 2017). Por lo tanto esto justifica la presencia de la transcripción de Relish tanto en el control como en los tratamientos sugiriendo que este factor de transcripción es responsable de la respuesta basal por medio de la detección de su medio. Incluso se ha visto que en mamíferos existe transmisión vertical y horizontal de la microbiota (Moeller *et al.*, 2018); además durante el desarrollo de intestino hay un sondeo a través del sistema enteroendocrino que establece las bases para el establecimiento de la microbiota (Buchanan & Bohórquez, 2018). Por lo tanto, esta activación puede ser por detección de la microbiota de la madre al desovar y/o del estanque en dónde se lleva acabo del desarrollo provocando una respuesta basal, que sienta las bases de la relación microbiota-RI.

Durante la cinética se establece un perfil diferencial de proteínas antimicroianas en los diferentes tratamientos producto de la activación de diferentes vías de señalización, lo que sugiere que la detección de un patógeno durante el desarrollo y tener una respuesta inmune activa antes de eclosionar. Por lo tanto se abre una ventana de oportunidad para modular la respuesta durante el desarrollo embrionario y obtener larvas con una inmunocompetencia mejorada. Dentro de estos perfiles inmunes se sugiere que la lisozima (Lys) tiene una participanción crucial en el control de microorganismos (Kaizu *et al.*, (2011). Lo que explica su expresión en los tratamientos y en el control, a diferencia de los otros péptidos que están sujetos a un estricto control por el costo energético que implica su producción.

Otro mecanismo de la regulación de la RI que se incluyó en esta evaluación es la ruta de los miARN, que provienen de regiones no codificantes del genoma. Argonauta (Argo) es ARNasa tipo III que forma parte del complejo RISC (*del inglés* ARN-induced silencing complex) que tiene una participación activa en la inhibición de los mARN diana (Bartel, 2004). La participación de miRNA en la RI ha sido descrita en la regulación de la familia NF $\kappa\beta$ (Ma *et al.*, 2011) y en infecciones virales (WSV) y bacterianas (*V. alginolyticus*) (Zhi & Fei, 2017) demostrando una participación crucial en la respuesta tanto celular como humoral cuando hay detección de una infección. En los resultados se detecta

Argo en el grupo control y en el grupo que se estímulo con VP con un aumento gradual de la expresión. Esta forma de regulación es crítica para optimizar el ahorro de energía y así montar una respuesta inmune, muy posiblemente estos miARN específicos que son producto de la identificación de un patógeno, puedan ser parte de la memoria innata que le permita responder más rápido en desafíos infecciosos subsecuentes. Esto se podrá comprobar en experimentos futuros en los que se conozca un poco más de la participación y función de los miARNs en el desarrollo y RI.

Otras respuestas diferenciales en la expresión génica asociadas al tipo de tratamiento fueron los genes asociados con el estrés oxidativo (ProPO, NOS y MnSOD). Naturalmente, estas moléculas se producen ya que regulan procesos tales como: crecimiento celular, expresión génica de proteínas de estrés y antioxidantes, apoptosis, entre otros (Holley et al., 2011; Zou et al., 2016) que explican su expresión en el control. Sin embargo, también participan en la activación de la respuesta inflamatoria y la eliminación de microorganismos (Kabe et al., 2005) como se observá en los tratamientos con VP y BS (Sppl. Figura 12 y Figura 12). Por otro lado, se detectó un aumento en la expresión del gen de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en ambos tratamientos. Esta enzima tiene un papel crucial en la eliminación de bacterias Gram negativas, como V. harveyi (Chen et al., 2015) y Aeromonas hydrophila (Rodríguez-Ramos et al., 2016). Sin embargo, como no se sabe qué factores estimulan la respuesta en los embriones de camarones y estas diferencias podrían estar relacionadas con componentes específicos producidos por cada cepa y no necesariamente relacionadas con las características externas de la célula.

La conexión entre desarrollo y RI (Respuesta Inmune) se establece con genes que participan en ambos procesos en rutas metabólicas altamente reguladas; como es el eje de regulación Twist-Dorsal, ambos participan en la embriogénesis, diferenciación celular y regulación de la producción de citocinas respectivamente (Jiang, et al., 1992; Sosic & Olson, 2003; Tassanakajon et al., 2017). En los resultados se muestran una alta variablidad en la expresión del gen Twist entre los tratamientos y el control lo que no permitió establecer si hay diferencias estadísticas, pero si hay un cambio en la cuantificación de su expresión, ya que al petenecer también a los genes del mesodermo (Wei et al.,

2016) se detectó a lo largo del tiempo. Además el factor de transcripción Twist interacciona con Dorsal para regular la producción de citocinas (Sosic *et al.*, 2003). Otro marcador de desarrollo expresado en el mesodermo con funciones de diferenciación celular y desarrollo muscular es Mef-2 (*del inglés* myocyte enhancing factor 2) (Wei *et al.*, 2016), en los tratamientos se expresa de manera intermitente presentando diferencias significativas entre las diferentes condiciones por lo tanto se relaciona con desarrollo de las larvas y crecimiento en la etapa adulta.

Una vez establecido que hay una respuesta diferencial, en dónde *Vibrio* se centra en una respuesta de efectores, *Bacillus* tiene una repuesta preventiva por la presencia de receptores y algunos AMP específicos (Crus, NOS y ALF) en mayor proporción a diferencia del control, pero en menor proporción que el tratamiento con *Vibrio*. El efecto de las estimulaciones durante el estadio embrionario se ve reflejado en la mejora de la inmunocompetencia de las larvas al sobrevivir al reto (**Figura 10**), pero con diferentes cantidades y tipo de efectores (**Figura 13**) dependientes del tipo de estimulación.

La inmunomodulación con bacterias Gram (+) es eficiente y menos costosa energéticamente para el individuo. En este modelo sí hay diferencia en cuanto a utilizar bacterias asociadas al medio y las no relacionadas como se observa en la Figura 8. Estos resultados difieren un poco de lo reportado con el trabajo de Tenebrio por Dhinaut et al. (2017) en este modelo se utilizaron bacterias Gram (+) (S. aureus, B. thurigensis) y Gram (-) (E. coli, S. entomophila) como inductores del priming. Los resultados obtenidos, fueron que con las bacterias Gram (+) hay mayor tasa de supervivencia frente al reto, sin importar la naturaleza de la pared del agente etiológico y que incluso la bacteria Gram (+) no relacionada (S. aureus) presenta mayor protección en el reto que el priming realizado con la cepa entomopatógena. Por lo tanto, la elección bacteriana que produce la inmunomodulación óptima para la prevención y control de enfermedades sin agotamiento del sistema, serían las bacterias Gram (+). A pesar de que existen reportes dónde la inmunización con Bacillus se considera un "priming" fallido, al no encontrar una respuesta específica contra esta misma bacteria, es decir, un aumento de hemocitos, AMP's y capacidades fagocíticas (Pope et al., 2011; Powell et al., 2011). Estos ensayos se realizaron con L.

vannamei en el estadio de adulto y se inmunizaron por vía intramuscular, evaluando la respuesta efectora con la misma bacteria con la que se realizó la inmunización. Entonces el descartar a *Bacillus* es una conclusión apresurada, si únicamente miden parámetros solubles de la respuesta y aumento de hemocitos sin un reto con un patógeno que demuestre la sobrevivencia. En este trabajo se evidencia que si hay una señalización que refuerza la RI humoral y celular al promover la transcripción de PRR's que prepara al organismo para resolver una infección.

Otro punto a considerar es la forma de administración de las bacterias para que ocurra el "priming". Trabajos recientes que demuestran la generación de memoria innata usan la vía de administración intramuscular u oral (Chang et al., 2018); lo que representa problemas desde el punto de vista operacional en una granja, porque no se puede inyectar a cada animal y tampoco es sencillo la incorporación de un inmunomodulador en el alimento. Además de la estandarización de las dosis para no provocar un agotamiento o anergía de la RI. En este trabajo se propone la inmunomodulación con adición de las bacterias muertas por calor al agua (aprox. 1.5x10⁶ cel/mL). Ofreciendo una ventaja operacional como estrategia inmunomodulatoria, sumando el hecho de que no se desregularía la microbiota del estanque. De esta manera no se forzará el sistema como sucede por vía intramuscular, produciendo un estrés por manejo y activación de la RI por DAMP's (del inglés damage-associated molecular patterns) y en adición a esto las dosis administradas van desde ordenes de 10⁵ hasta 10⁸ (Powell et al., 2011; Pope et al., 2013; Lin et al., 2013) cuando los reportes de la microbiota en hemolinfa son del orden 10³ (Wang et al., 2015a). Por lo tanto, la vía de administración y dosis tiene un efecto sobre el "priming", ya que existe evidencia que dependiendo la vía de administración que se utilice para inocular el agente etiológico, puede retrasar o promover el desarrollo (Schulz et al., 2019).

9. CONCLUSIONES

- 1. Se demuestra que desde embriones es posible llevar a cabo una modulación de la respuesta generando un entrenamiento inmune que le permite la supervivencia en un reto infeccioso de las larvas nauplio.
- 2. La inmunomodulación con bacterias Gram (+) es eficiente y menos costoso energéticamente para el individuo, porque no es una respuesta exacerbada que no necesita la producción de proteínas específicas para generar un efecto protector.
- 3. Los resultados apuntan que la sobrevivencia es por diferentes mecanismos con base en los efectores, receptores y factores de transcripción que generan un balance entre desarrollo y respuesta.
- 4. Se propone un nuevo gen de referencia SubF0 para determinar la expresión génica durante el desarrollo larvario de *L. vannamei*, para cualquier tipo de evaluación de la expresión génica durante el desarrollo y la metamorfosis de *L. vannamei*.

Aportación y perspectivas

Este trabajo aporta conocimiento de la biología básica de la respuesta inmune en etapas embrionarias y comprueba que es posible la generación de memoria innata por diferentes mecanismos en crustáceos. Dejando la puerta abierta para una posible aplicación biotecnológica en la acuacultura y establecer las bases para conocer los mecanismos moleculares de acción de los probióticos. Además de proponer y validar un gen de referencia para los trabajos de expresión génica durante el desarrollo y metamorfosis de *L. vannamei*, cabiendo la posibilidad que tenga la posibilidad de aplicación de en otros modelos.

10. REFERENCIAS

- Agarwala K., Ganesh S., Amano K., Suzuki T., Yamakawa K. (2001). DSCAM, a highly conserved gene in mammals, expressed in differentiating mouse brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281: 697-705. DOI:10.1006/bbrc.2001.4420
- Agarwala K., Silverman N. (2008). Positive and negative regulation of the Drosophila immune response. BMB Rep. 41: 267-77. DOI: 10.5483/bmbrep.2008.41.4.267
- Akhtar W., Veenstra G.J. (2011). TBP-related factors: a paradigm of diversity in transcription initiation. Cell Biosci. 1: 23. https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-23
- 4. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walters P. (2014). Molecular biology of the cell. New York and Abingdon, UK: Garland Science.195-329.
- 5. Amparyup P., Charoensapsri W., Tassanakajon A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. Fish Shellfish Immunol. 34(4): 990-1001. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019
- 6. Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative re- verse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res. 64: 5245-5250. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- 7. Araujo L.L., Plagnes-Juan E., Marques P.S., Baron F., Weissman D., Guyonvarch A., Brugger R., Nunes J.P., Panserat S. (2017). Ontogenesis of metabolic gene expression in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): New molecular tools for programming in the future. Aquaculture 479: 142-149. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.030
- 8. Ardia D.R., Gantz J.E., Schneider B.C., Strebel S. (2012). Costs of immunity in insects: An induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. Funct. Ecol. 26(3): 732-739. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.01989.x

- Armitage S.A., Peuß R., Kurtz J. (2015). Dscam and pancrustacean immune memory–A review of the evidence. Dev. Comp. Immunol. 48: 315-323.
- **10.** Bartel D.P. (2004). MicroARNs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116: 281-297. DOI:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Boutros M., Agaisse H., Perrimon N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. Dev. Cell. 3: 711-722. doi: 10.1016/S1534- 5807(02)00325-8
- 12. Brandt J. and Ringstad K. (2015). Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior.Curr. Biol. 25: 2228-237 http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.037.
- **13.** Buchanan K.L. and Bohórquez D.V. (2018). You are what you (First) eat. Front. Hum. Neurosci. 12: 323. DOI=10.3389/fnhum.2018.00323
- 14. Bunnell T.M., Burbach B.J., Shimizu Y., Ervasti J.M. (2011). β–Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool Mol. Biol. Cel. 22: 4047-4058. https://doi.org/10.1091/mbc
- 15. Bustin S.A., Benes V., Garson J., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., and Wittwer C.T. (2009). The MIQE Guidelines. Clin Chem. 55: 4. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797
- **16.** Cerenius L., Jiravanichpaisal P., Liu H., Söderhäll I. (2010). Invertebrate Immunity. Ed. Springer, edited by Kenneth Söderhäll. 239-259.
- 17. Chang Y.H., Kumar R., Ng T.H., Wang, H.C. (2018). What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish? Dev. Comp. Immunol. 80: 53-66. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.003
- **18.** Chen L.H., Lin S.W., Liu K.F., Chang C.I., Hseu J.R., Tsai J.M. (2016). Comparative proteomic analysis of *Litopenaeus vannamei* gills after vaccination with two WSSV structural proteins. Fish Shellfish Immunol. 49: 306-314. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.044
- **19.** Chen T., Wong N.K., Jiang X., Luo X., Zhang L., Yang D. (2015). Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the

- hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 42: 114-120.
- 20. Chiang Y.A., Hung H.Y., Lee C.W., Huang Y.T., Wang H.C. (2013). Shrimp Dscam and its cytoplasmic tail splicing activator serine/arginine (SR)-rich protein B52 were both induced after white spot syndrome virus challenge. Fish Shellfish Immunol. 34: 209-219.
- 21. Deepika A., Sreedharan K., Paria A., Makesh M., Rajendran K.V. (2015). Toll-pathway in tiger shrimp (Penaeus monodon) responds to white spot syndrome virus infection: Evidence through molecular characterisation and expression profiles of MyD88, TRAF6 and TLR genes. Fish Shellfish Immunol. 41(2): 441-454. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.026
- 22. De Spiegelaere W., Dern-Wieloch J., Weigel R., Schumacher V., Schorle H., Nettersheim D., Bergmann M., Brehm R., Kliesch S., VandekerckhoveL., Fink C. (2015) Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. PLoS ONE 10(3): e0122515
- 23. Dhar A.K., Bowers R.M., Licon K.S., Veazey G., Read B. (2009). Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. Mol. Immunol. 46: 1688-1695. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.02.020.
- 24. Dhinaut J., Chogne M., Moret Y. (2018). Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. J Anim Ecol.87:448–463.DOI: 10.1111/1365-2656.12661
- **25.** Dubuffet A., Zanchi C., Boutet G., Moreau J., Teixeira M., Moret, Y. (2015). Trans-generational immune priming protects the eggs only against positive bacteria in the mealworm beetle. PLoS Pathogens. 11, e1005178.
- **26.** Fang-fang M., Qing-hui L., Guang-kuo G., Chen L., Jie H. (2014). Arginine kinase of *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. Gene. 539: 99-106. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.047
- **27.** Fariedah F. and Marsoedi M. (2013). Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by intramuscular administration of the outer membrane protein *Vibrio alginolyticus*. Springer plus. 2: 432.

- 28. Flegel, T.W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. J World Aquacult Soc. 1-18. https://doi.org/10.1111/jwas.12589
- 29. Fuerst P.G., Bruce F., Tian M., Wei W., Elstrott J., Feller M. B., Erskine L., Singer J.H., Burgess R.W. (2009). DSCAM and DSCAML1 function in self-avoidance in multiple cell types in the developing mouse retina. Neuron. 64: 484-497.
- 30. Fujun H., Shulin H., Yongjie L., Xiaowen Z., Chengbo S., Xiaolin L. (2014). RNAi knock-down of shrimp *Litopenaeus vannamei* toll gene and immune deficiency gene reveals their difference in regulating antimicrobial peptides transcription. Dev. Comp. Immunol. 44: 255-260. doi: 10.1016/j.dci.2014.01.004
- **31.** Gao Y., Wei J., Jianbo Y., Zhang X., Li F., Xiang J. (2017). Exoskeleton transcriptome analysis on the exoskeleton formation in early developmental stages and reconstruction scenario in growth- moulting in *Litopenaeus vannamei*. Sci. Rep. 7: 1098. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01220-6
- **32.** Ghosh J., Man Lun C., Majeske A., Sacchi S., Schrankel C., Smith L.C. (2011). Invertebrate immune diversity. Dev. Comp. Immunol. 35: 959-974
- **33.** Giulianini G., Bierti M., Lorenzon S., Battistella S., Ferrero A. (2007). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after *in vivo* artificial non-self challenge. Micron. 38: 49–57. doi:10.1016/j.micron.2006.03.019
- 34. Guénin S., Mauriat M., Pelloux J., Wuytswinkel O.V., Bellini C., Gutierrez L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. J Exp. Bot. 60(2): 487-493. https://doi.org/doi:10.1093/jxb/ern305
- **35.** Haine E.R., Moret Y., Siva-Jothy M.T., Rolff J. (2008a). Antimicrobial defense and persistent infection in insects. Science. 322: 1257-1259.
- **36.** Haine E.R., Pollitt L.C., Moret Y., Siva-Jothy M.T., Rolff, J. (2008b). Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). J Insect Physiol. 54: 1090-1097.

- **37.** Haug T., Kjuul A.K., Stensvar G.K., Sandsdalen E., Styrvold O.B. (2002). Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. Fish Shellfish Immunol. 12: 371-385 doi:10.1006/fsim.2001.0378
- 38. Hauton C., Hudspith M., Gunton L. (2015). Future prospects for prophylactic immune stimulation in crustacean aquaculture the need for improved metadata to address immune system complexity. Dev. Comp. Immunol. 48: 360-368 .https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.017
- 39. Hauton C. (2012). The scope of the crustacean immune system for disease control. J Invertebr Pathol, 110(2): 251-260. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.005
- **40.** He Y., Ju Ch., Zhang X. (2015). Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans. Mol Immunol 68: 399-403. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.008
- 41. Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J. (2007). Base relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biol. 8: R19. https://doi.org/doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
- **42.** Hettiarachchi M., Pathirage S.G., Hettiarachchi D.C. (2005). Isolation of the bacterium, *Vibrio harveyi* from cultured shrimp, *Penaeus Monodon* and production of vaccines against the bacterium. J. Natn Sci. Found. SRI. 33: 257-263. Doi: 10.4038/jnsfsr.v33i4.2115
- **43.** Holley A.K., Vasudevan B., Joyce M., Velez-Roman, Daret K. St. Clair. (2011). Manganese superoxide dismutase: Guardian of the powerhouse Int. J. Mol. Sci. 12: 7114-7162. doi:10.3390/ijms12107114
- **44.** Hung H.Y., Ng T.H., Lin J.H., Chiang Y.A., Chuang Y.C., Wang H.C., (2013). Properties of *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) isoforms related to specific pathogen recognition. Fish Shellfish Immunol. 35: 1272-1281.
- **45.** Jacinto A. and Baum B. (2003). Actin in development. Mech. Dev. 120: 1337-1349. https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.06.006
- **46.** Jaramillo M.L., Ammar D., Quispe R.L., Guzman F., Margis R., Evelise N., Müller Y. (2017). Identification and evaluation of reference genes for expression studies by RT-qPCR during embryonic development of the

- emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*. Gene 598: 97-106. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.001
- **47.** Jiang H., Qian Z., Wei L., Ding H., Yu H., Wang H., Li J. (2015). Identification and characterization of reference genes for normalizing expression data from red swamp cawfish *Procambarus clarkii*. Int J Mol Sci. 16: 21591-21605. https://doi:10.3390/ijms160921591
- **48.** Jiang J., Rushlow CA., Zhou Q., Small S., Levine M. (1992). Individual dorsal morphogen binding sites mediate activation and repression in the *Drosophila* embryo. EMBO J. 11: 3147-3154.
- **49.** Jiravanichpaisal P., Puanglarp N., Petkon S., Donnuea S., Söderhäll I., Söderhäll, K. (2007). Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 23(4): 815-824. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.003
- **50.** Jung H., Lyons R., Hurwood D., Mather P. (2012). Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. Rev Aquacult. 4: 1-34. https://doi.org/10.1111/raq.12005
- 51. Kabe Y., Ando K., Hirao S., Yoshida M., Handa H. (2005). Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. Antioxid. Redox Signal. 7: 395-403. DOI:10.1089/ars.2005.7.395
- 52. Kaewkascholkul N., Somboonviwat K., Asakawa, S., Hirono, Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K. (2016). Shrimp miARNs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection. Dev. Comp. Immunol. 60: 191-201. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.002
- 53. Kaizu A., Fagutao F.F., Kondo H., Aoki T., Hirono I. (2011). Functional analysis of C-type lysozyme in *Penaeid* shrimp. J Biol Chem. 286: 52 44344-44349 DOI 10.1074/jbc.M111.292672
- 54. Katz Z., Wells A., Park H., Wu B., Shenoy S. M., Singer R.H. (2012). b-Actin mARN compartmentalization enhances focal adhesion stability and directs cell migration. Gen Dev. 26: 1885-1890. https://doi.org/10.1101/gad.190413.112
- **55.** Ke C., Erchao L., Lei G., Xiaodan W., Chang X., Heizhao L., Jian Q.G., Liqiao C. (2014). Growth and Lipid Metabolism of the Pacific White Shrimp

- *Litopenaeus vannamei* at Different Salinities. J Shellfish Res. 33(3): 82-832. https://doi.org/10.2983/035.033.0317
- 56. Kotlyar S., Weihrauch D., Paulsen R.S., Towle D.W. (2000). Expression of arginine kinase enzymatic activity and mARN in gills of the euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. J Exp Biol. 203: 2395-2404.
- **57.** Kozera B. and Rapacz M. (2013). Reference genes in real-time PCR. Jo Appl Genetics. 54: 391-406. https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x
- **58.** Kurtz J. & Franz K. (2003) Evidence for memory in invertebrate immunity. Nature. 425:37-38.DOI: 10.1038/425037a
- **59.** Lafont M., Petton B., Vergnes A., Pauletto M., Segarra A., Gourbal B., Montagnani C. (2017). Long- lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Sci Rep. 7: 13143.
- 60. Lafont M., Gonclaves P., Guo X., Montagnani C., Raftos D., Green T. (2019). Transgenerational plasticity and antiviral immunity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). Dev. Comp. Immunol. 91: 17-25. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.022
- 61. Lanz-Mendoza H. and Garduño-Contreras J. (2018). Insect innate immune memory. In Advances in Comparative Immunology. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_9
- 62. Leekitcharoenphon P., Taweemuang U., Palittapongarnpim P., Kotewong R., Supasiri T., Sonthayanon B. (2010). Predicted sub-populations in a marine shrimp proteome as revealed by combined EST and cADN data from multiple *Penaeus* species. BMC Research Notes. 3(1): 295. https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-295
- **63.** Leelatanawit R., Klanchui A., Uawisetwathana U., Karoonuthaisiri N. (2012). Validation of reference genes for real-time PCR of reproductive system in the black tiger shrimp. PLoS ONE. 7(12): e52677. https://doi.org/10.1371/jouARNI.pone.0052677
- 64. Li-Shi Y., Zhi-Xin Y., Ji-Xiang L., Xian-De H., Chang-Jun G., Shao-Ping W., Siu-Ming C., Xiao-Qiang Y., Jian-Guo H. (2007). A Toll receptor in shrimp. Mol Immunol. 44: 1999-2008. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.021

- 65. Li S., Guo S., Li F., Xiang J. (2014). Characterization and function analysis of an anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis. Dev. Comp. Immunol. 46(2): 349-355. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.013
- 66. Lightner D.V., Redman R.M., Pantoja C.R., Tang K.F.J., Noble B.L., Schofield P., Mohney L.L., Nunan L.M., Navarro S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. J Invertebr Pathol. 110: 174-183 https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006
- 67. Lin Y.C., Chen J.C., Morni W.Z., Putra D.F., Huang C.L., Li C.C., Hsieh J.F. (2013). Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. PLoS One. 8, e69722. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069722

68.

- **69.** Little T.J. and Kraaijeveld A.R. (2004) Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. Trends. Ecol. Evol. 19:58-60
- 70. Livak K. J and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- CT method. Methods 25: 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262
- 71. Ma X., Becker L., Barker J. and Li Y.(2011).MicroRNAs in NF-κB signaling.J Mol Cell Biol. 3(3): 159–166.doi: 10.1093/jmcb/mjr007
- 72. Maftuch, Prasetio E, Sudianto A, Rozik M, Nurdiyani R, Sanusi E, Nursyam H, Fariedah F, Marsoedi, Murachman. (2013) .Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by intramuscular administration of the outer membrane protein *Vibrio alginolyticus*. SpringerPlus 2: 432. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-432
- 73. Martín L., Castillo N. M., Arenal A., Rodríguez G., Franco R., Santiesteban D., Cabrera H. (2012). Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture*, 358–359, 234–239. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.005

- **74.** Milutinovic B. and Kurtz J. (2016) Immune memory in invertebrates. Semin. Immunol. 28:328-342
- 75. Medina-Reyna C. E., Beltrán-González M. H., & Salinas-Orta H. T. (1999). Nauplii production of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae), on-board of commercial trawlers. Revista de Biología Tropical, 47(4), 913-916.
- **76.** Moeller A. H, Suzuki T. A., Phifer-Rixey M., Nachman M. W. (2018) Transmission modes of the mammalian gut microbiota. Science. 362, 453–457.doi: 10.1126/science.aat7164.
- 77. Netea M., Latz E., Mills K and O'Neill L. (2015).Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. Nat. Immunol. 16:(7) 675-679. DOI: 10.1038/425037a
- 78. Newaj-Fyzul A., Al-Harbi A.H. and Austin B. (2014) Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture. 431:1-11. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026
- **79.** Ng T. H., Chiang Y. A., Yeh Y. C., Wang H. C. (2015). Reprint of "Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods." Dev. Comp. Immunol. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.017
- **80.** Norouzitallab P., Biswas P., Baruah K., Bossier P. (2016) Multigenerational immune priming in an invertebrate parthenogenetic *Artemia* to a pathogenic *Vibrio campbellii*. Fish Shellfish Immunol. 42:426-429.
- Norzagaray C.M., Muñoz S.P., Sánchez V.L., Capurro F.L., Llánes C.O. (2012). Acuacultura: estado actual y retos de la investigación en México. Revista AquaTIC. 37: 20-25.
- **82.** Palumbo A (2005) Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 142(2):241-8. DOI: 10.1016/j.cbpb.2005.05.043
- **83.** Pei-Hui W., Jian-Ping L., Zhi-Hua G., Ding-Hui W., Shao-Ping W., Xiao-Qiang Y., Jian-Guo H. (2012). Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1–3) from *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 36: 359-371. DOI:10.1016/j.dci.2011.07.007

- **84.** Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29: 45. DOI:10.1093/nar/29.9.e45
- **85.** Pfaffl M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin, S.A. (Ed.). A–Z of Quantitative PCR. 87-112.
- 86. Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excelbased tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letter. 26: 509-515. http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html
- **87.** Phinyo M., Visudtiphole V., Roytrakul, S., Phaonakrop N., Jarayabhand P., Klinbunga S. (2013). Characterization and expression of cell division cycle 2 (Cdc2) mARN and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Gen. Comp. Endocr. 193: 103-111. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.07.012
- **88.** Pope, E.C., Powell, A., Roberts, E.C., Shields, R.J., Wardle, R., Rowley, A.F.(2011) Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'vaccination'. PLoS One 6, e20960.
- 89. Powell, A., Pope, E.C., Eddy, F.E., Roberts, E.C., Shields, R.J., Francis, M.J., Smith, P., Topps, S., Reid, J., Rowley, A.F.(2011). Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) post-exposure to a *Vibrio* vaccine. J. Invertebr. Pathol. 107, 95e99.
- 90. Quispe R.L., Justino E.B., Vieira F.N., Jaramillo M.L., Rosa, R.D., Perazzolo, L.M. (2016). Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. Fish Shellfish Immunol. 58: 103-107. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.024
- 91. Rasmussen R. (2001). Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (Eds.), Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg. 21-34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0
- 92. Rodríguez-Ramos T., Carpio Y,Bolívar J.,Gómez L., Estrada M.,Pendón C.(2016)Nitric oxide synthase-dependent immune response against Gram negative bacteria in a crustacean, *Litopenaeus vannamei*.Fish & Shellfish Immunology 50: 50-55. doi: 10.1016/j.fsi.2016.01.019

- **93.** Royle S.J. (2006). The cellular functions of clathrin. Cell Mol Life Sci CMLS. 63(16): 1823-1823. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5587-0
- **94.** Sadd B.M. and Schmid-Hempel P. (2006). Insect immunity shows specicity in protection upon secondary pathogen exposure. Curr. Biol. 16: 1206-1210.
- **95.** Schmucker D. and Chen B. (2009). Dscam and DSCAM: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. Genes Dev. 23: 147-156.
- 96. Schulz N.K.E., Sell M.P., Ferro K., Kleinhölting N., Kurtz J. (2019). Transgenerational developmental effects of immune priming in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Front. Physiol. 1-12. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00098
- **97.** Shekhar M.S., Kiruthika J., Ponniah A.G. (2013). Identification and expression analysis of differentially expressed genes from shrimp (*Penaeus monodon*) in response to low salinity stress. Fish Shellfish Immunol. 35: 1957-1968. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.038
- 98. Sirover M. (2011) On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Biochemical mechanisms and regulatory control. Biochemical et Biophysical Acta. 810: 741-751. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.010
- 99. Šošić D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN.(2003)Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity.Cell.112(2):169-80.DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00002-3
- **100.** Steiner H. (2004). Peptidoglycan recognition proteins: On and off switches for innate immunity. Immunol. Rev. 198: 83–96. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0120.x
- 101. Stentiford G.D., Neil D.M., Peeler E.J., Shields J.D., Small, H.J., Flegel T.W., Lightner, D.V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. J Invertebr Pathol. 110(2): 141-157. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013
- **102.** Sun X., Wei J., Yuan J., Zhang, X., Li F., Xiang J. (2015). Hox genes and the expression patterns of the *Litopenaeus vannamei*. Periodical of Ocean University of China Vol.45. Institute of Oceanology, Chinese Academy of

- Sciences, No. 7 Nanhai Road, Qingdao, Shandong Province 266071, China. https://45.10.16441/j.cnki.hdxb.20140323
- 103. Tassanakajon A., Rimphanitchayakit V., Visetnan S., Amparyup P., Somboonwiwat K., Charoensapsri W., Tang S. (2017). Shrimp humoral responses against pathogens: Antimicrobial peptides and melanization. Dev. Comp. Immunol. 80: 81-93. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009
- 104. Taju G., Madan N. Abdul S., Rajkumar T., Farook M. A., Vimal S. Nazeer A., Sahul A.(2017)Distribution of recombinant VP28 protein in tissues and its immunomodulatory effect against white spot syndrome virus in whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). Aquacult Int.25: 1761. DOI 10.1007/s10499-017-0155-9
- 105. Teixeira F., Sanchez C., Hurd T. Seifert J., Czech B., Preall J., Hannon G., Lehmann R. (2015). ATP synthase promotes germ cell differentiation independent of oxidative phosphorylation. Nat Cell Biol. 7(5): 689-696. https://doi.org/10.1038/ncb3165
- **106.** Tze H.N., Yi-An C., Ying-Chun Y., Han-Ching W. (2014). Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. Dev. Comp. Immunol. 46:129-138.
- 107. Valenzuela-Castillo A., Mendoza-Cano F., Enríquez-Espinosa T., Grijalva-Chon J. M., Sánchez-Paz A. (2017). Selection and validation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR studies in the shrimp *Penaeus vannamei* under viral infection. Mol. Cell. Prob.33, 42-50. http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2017.02.005
- 108. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple inteARNI control genes. Genome Biol. 3:1-12. https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- **109.** Vázquez L., Alpuche J., Maldonado G., Agundis C., Pereyra-Morales A., Zenteno E. (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. J Innate Immun. 15(3): 179-188. doi: 10.1177/1753425909102876
- **110.** Ventura T., Fitzgibbon Q.P., Battaglene S.C., Elizur A. (2015). Redefining metamorphosis in spiny lobsters: molecular analysis of the phyllosoma to

- puerulus transition in *Sagmariasus verreauxi*. Sci. Rep. 5:13537. https://doi.org/10.1038/srep13537
- 111. Walker S., Lorsch J. (2013). ARN Purification Precipitation Methods. Methods Enzymol. 530: 337-43. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00019-1
- **112.** Wang P.H., Gu Z.H., Wan D.H., Liu B.D., Huang X.D., Weng S.P., Yu, X.Q., He J.G. (2013). The shrimp IKK-NF-kB signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. Cell Mol. Immunol. 10(5): 423-436. doi: 10.1038/cmi.2013.30
- 113. Wang P.H., Gu Z.H., Wan D.H., Zhang M.Y., Weng S.P., Yu X.Q., He J.G. (2011). The Shrimp NF-kB pathway is activated by white spot syndrome virus (WSSV) 449 to facilitate the expression of WSSV069 (ie1), WSSV303 and WSSV371. PloS One. 6: e24773. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024773
- **114.** Wang S., Li H., L K., Qian Z., Weng S., He J., Li C. (2016). Identification and characterization of transforming growth factor b-activated kinase 1 from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense. Fish Shellfish Immunol. 52: 278-288.
- **115.** Wang S., Li H., Qian Z., Song X., Zhang Z., Zuo H., Xu X., Weng S., He J., Li C. (2015b). Identification and functional characterization of the TAB2 gene from *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 46: 206-216. doi: 10.1016/j.fsi.2015.06.024
- 116. Wang Z., Chen Y.H., Dai Y.J., Tan J.M., Huang Y., Lan J.F., Ren Q. (2015a). A novel vertebrates Toll-like receptor counterpart regulating the anti-microbial peptides expression in the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. Fish Shellfish Immunol. 43: 219-229. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.038
- **117.** Wei J., Glaves R.S.E., Sellars M.J., Xiang J., Hertzler P.L. (2016). Expression of the prospective mesoderm genes twist, snail, and mef2 in penaeid shrimp Dev. Genes Evol. 226: 317-324. https://doi.org/10.1007/s00427-016-0544-5
- **118.** Wei J., Zhang X., Yu Y., Huang H., Li F., Xiang J. (2014). Comparative transcriptomic characterization of the early development in Pacific white

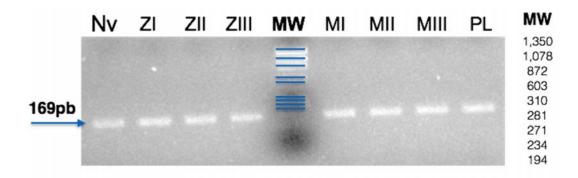
- shrimp *Litopenaeus vannamei*. PLoS ONE. 9(9): 1-13. https://doi.org/10.1371/jouARNI.pone.0106201
- 119. Wittig I., Meyer B., Heide H., Steger M., Bleier Lea, W., Karas Zibiernisha M., Schägger H. (2010). Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. Biochim Biophys Acta Bioenerg.
 1797: 1004-1011. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.02.021
- **120.** Wu C.H., Siva V.S., Song Y.L. (2013). An evolutionarily ancient NO synthase (NOS) in shrimp. Fish Shellfish Immunol. 35(5): 1483-1500. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.016
- **121.** Xian-Wei W. and Jin-Xing W. (2015). Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. Mol. Immunol. 68(2): 404-411. http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.018
- **122.** Xie F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B. (2012). MiRDeepFinder: a miARN analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant. Mol. Biol. 80: 75-84. https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2
- 123. Yimlamai D., Konnikova L., Moss L.G., Jay D.G. (2005). The zebrafish down syndrome cell adhesion molecule is involved in cell movement during embryogenesis. Dev. Biol. 279: 44-57. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.12.001
- **124.** Yount N.Y., Bayer A.S., Xiong Y.Q., Yeaman M. (2006). Advances in antimicrobial peptide immunobiology. Biopolymers. 84(5): 435-58. DOI:10.1002/bip.20543
- **125.** Zhang S.M., Adema C.M., Kepler T.B., Loker E.S. (2004). Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. Science. 305: 251-254. doi: 10.1126/science.1088069; pmid: 15247481
- **126.** Zhi W. and Fei Z. (2017). MicroARN-100 is involved in shrimp immune response to white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio alginolyticus* infection. Sci. Rep. 7: 42334 https://doi.org/10.1038/srep42334

Citas de internet

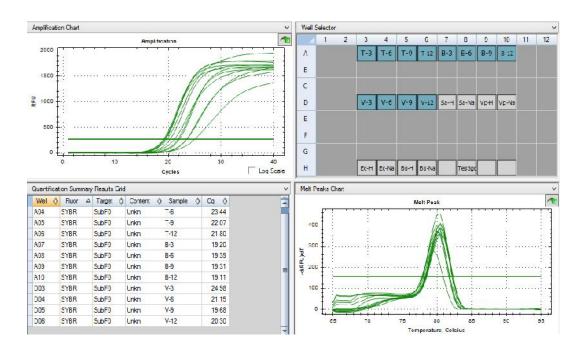
 Fao.org. (2018). SOFIA 2018 - El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Retrieved February 22, 2019, from http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/ II. Comisión Nacional de Acuacultura, & Pesca. (2019, February 15). Inicia proceso de certificación inteARNcional de camarón nacional. Retrieved February 22, 2019, from https://www.gob.mx/conapesca/articulos/inicia-proceso-de-certificacion-inteARNcional-de-camaron-nacional?idiom=es

ANEXOS

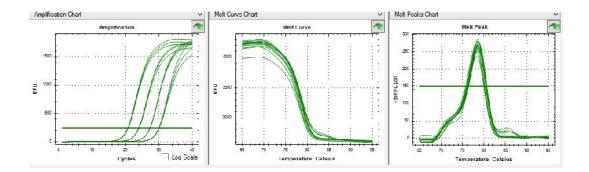
Material Suplementario



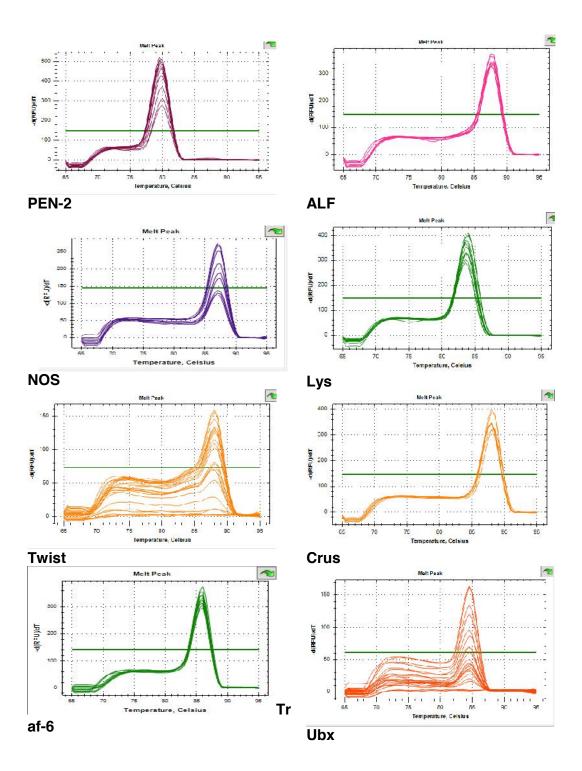
Sppl. Figura 1. Detección del gen SubF0 en los estadios larvarios de *L. vannamei.* PCR tiempo final en cada unos de los estadios del desarrollo larvario.

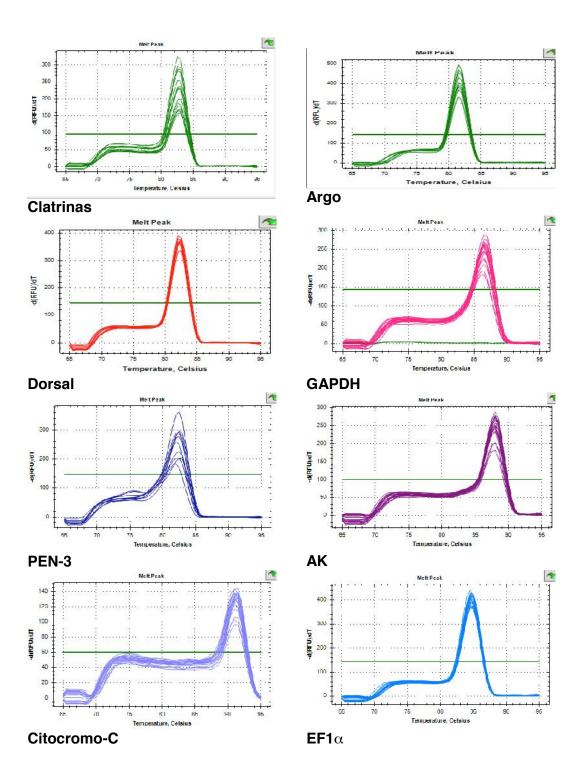


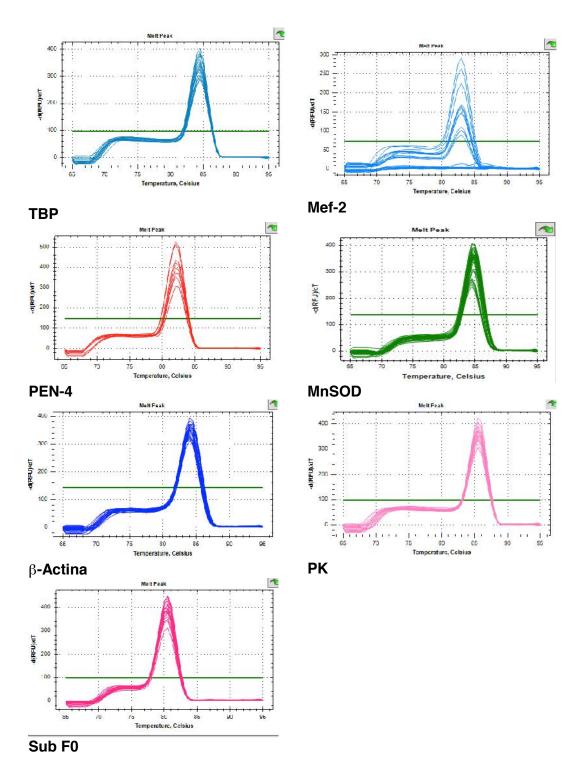
Sppl. Figura 2. Detección del gen SubF0 de referencia durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión.



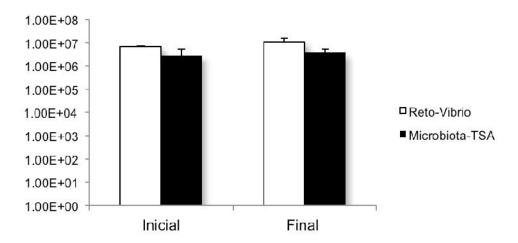
Sppl. Figura 3.Ejemplo de gráficas de Eficiencia. Es la representación de la gráfica de eficiencia del par de oligonucleótidos de PEN-2.







Sppl. Figura 4. Curvas de desnaturalización de los amplicones. Se muestra su especificidad al solo observar un pico de desnaturalización de acuerdo al tamaño del producto de PCR.



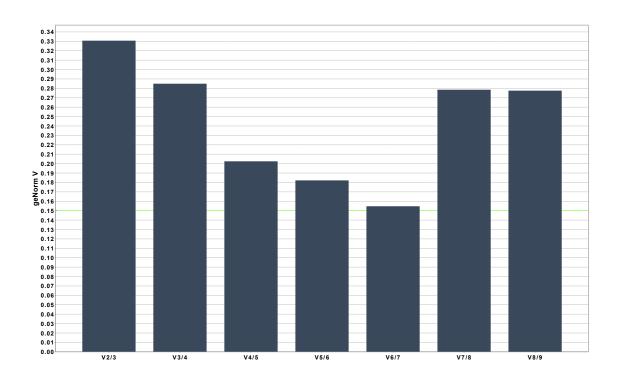
Sppl. Figura 5. Conteo de bacterias (*V. parahaemolyitcus*) durante el experimento de infección de nauplios.

Sppl. Tabla 1. Datos descriptivos de los genes candidatos.

Estadio	Gen	Νν	′	ZI		ZII		ZII		MI		MI		MII	I	PL	-	SD por
Función		X	SD	gen														
Replicación/Tra ducción	EF1a	25.96	0.7 4	19.08	0.4 1	20.68	0.4 5	18.16	0.2 1	18.55	0.2 2	21.37	0.0 2	19.30	0.0 9	22.19	0.1 3	2.563
	TBP	0.00	0.0	31.45	0.2 7	32.07	0.1	31.19	0.2	31.26	0.2	36.27	0.3	32.14	0.1	33.15	0.3	11.611
Metabolismo/E nzimas	GAPDH	33.04	0.3 6	31.99	0.4 6	30.04	0.1 7	31.85	0.1 4	32.42	0.1 9	32.21	0.0 5	31.86	0.1 8	27.25	0.1 6	1.859
	AK	36.64	0.2 7	28.81	0.1 4	28.13	0.0 9	28.72	0.0	29.13	0.1 1	32.11	0.2 8	26.86	0.2	29.64	0.1 4	3.066
	PK	38.18	0.4 7	28.88	0.1 7	28.41	0.0	27.28	0.3 4	28.83	0.2	30.67	0.1	28.46	0.2 9	27.81	0.1 9	3.521
Cadena de transporte de electrones	SubFo	21.46	0.0 5	20.05	0.0 9	19.14	0.1	18.90	0.0	19.70	0.2	21.21	0.1	20.35	0.0 7	20.11	0.0	0.900
	Cit-c	0.00																10.891
Proteínas	Clatrina	0.00	0.0	35.64	0.4	36.73	0.5	33.03	0.0	34.91	0.0	37.75	0.4	35.79	0.1	36.18	0.2	12.703

estructurales	s		0		7		0		3		6		6		5		4	
	β-Actin	28.64	0.3	27.01	0.2	25.15	0.1	28.01	0.1 8	27.97	0.1	26.66	0.3	24.48	0.0	30.37	0.0	1.898

Nota: Todos los valores representados en la tabla corresponden al Cq de la expresión. Los valores de cero significan la no detección del gen blanco; el valor de corte para la detección de la expresión en los estadios larvarios es de un Cq de 35



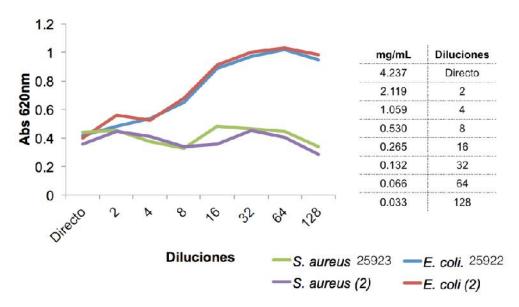
V 2/3	V 3/4	V 4/5	V 5/6	V 5/7	V 7/8	V 8/9
SubF0	SubF0	SubF0	Cyt- C	Cyt- C	Cyt- C	Cyt- C
PK	PK	PK	TBP	TBP	TBP	TBP
TBP	TBP	TBP	AK	AK	AK	AK
	AK	AK	PK	PK	PK	PK
		Cyt-C	SubF0	SubF0	SubF0	SubF0
			Clathrin	Clathrin	Clathrin	Clathrin
			s	s	s	s
				E1Fa	E1Fa	E1Fa
					β Actin	β Actin
						GAPDH

Sppl. Figura 6. Determinación de la combinación del número óptimo de genes de referencia con base en algoritmo basado en geNorme. GeNorm V representa la selección de los genes más estables en diferentes combinaciones para obtener el número óptimo de genes de referencia (valor de geNorme V debajo de 0.15). Cada barra representa la variabilidad entre los factores de normalizadores secuenciales (basados en que n y n+1 presentan menos variabilidad).

Sppl. Tabla 2. Valores de estabilidad asignados por geNorm.

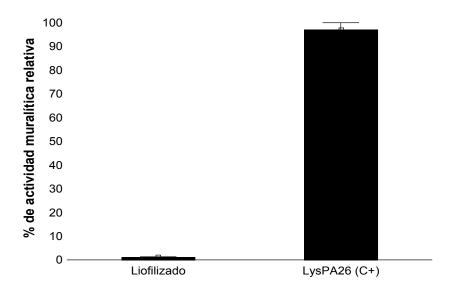
Orden de estabilidad	Gen	Valor M	CV		
1	SubF0	1.403	0.347		
2	PK	1.406	0.536		
3	TBP	1.52	0.527		
4	AK	1.54	0.711		
5	Cyt-C	1.554	0.806		
6	Clatrinas	1.592	0.85		
7	EF1a	1.676	0.594		
8	β-Actin	2.491	1.036		
9	GAPDH	2.581	2.025		

CV: Coeficiente de variación



Sppl. Figura 7. Capacidad antimicrobiana del extracto crudo de huevos de *L. vannamei.* Ensayo de la determinación de la MIC (*del inglés* minimal inhibitory concentration) por el método avalado por la NCCLS 2019.

La actividad enzimática sobre la pared celular del extracto crudo de los huevos de camarón se evaluó en células sensibilizadas previamente tratadas con EDTA para exponer la pared celular de acuerdo al método de Nelson *et al.* (2001)



Sppl. Figura 8. Actividad lítica sobre la pared celular de *V. parahaemolitycus.* El testigo positivo es una endolisina (LysPA26) específica para *Vibrio* y el liofilizado es la muestra del extracto crudo de huevos de camarón (1mg liofilizado/mL- NaCl 0.9%)

Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. PNAS, *98*(7), 4107-4112.