



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE DEFENSA EN
Litopenaeus vannamei INFECTADO CON EL VIRUS DE
LA MANCHA BLANCA (WSSV).

TESIS

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

Presenta:

NORA MARÍA CÁRCAMO ARÉCHIGA

Hermosillo, Sonora, México

Mayo de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE DEFENSA EN
Litopenaeus vannamei INFECTADO
CON EL VIRUS DE LA MANCHA
BLANCA (WSSV)**

T E S I S

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOCIENCIAS

Presenta

NORA MARÍA CÁRCAMO ARÉCHIGA

Hermosillo, Sonora

7 de Mayo de 2015


APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Efecto de la temperatura sobre la expresión de proteínas de defensa en *Litopenaeus vannamei* infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV)” presentada por Nora María Cárcamo Aréchiga, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



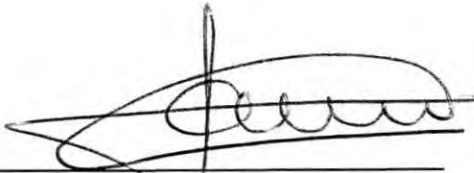
Dr. José Manuel Grijalva Chon

Co-Director




Dr. Jorge Hernández López

Co-Director



Dr. Alejandro Varela Romero

Sinodal



Dr. Marco Antonio López Torres

Sinodal



Dr. Luis Ángel Medina Juárez

Sinodal

DEDICATORIA

Para mis siete tesoros, por quienes quiero ser mejor cada día.

Victoria: Mi princesa, virtuosa innata, una estrella brillante que llegó llenando de amor y luz mi pequeño mundo.

Hugo: Mi campeón, el del corazón enorme, el mejor futbolista y responsable del más sabroso omelette que he comido en mi vida.

Fernanda: Mi guerrera, luchadora incansable por defender sus ideas ante quien trate de oponerse a ellas.

Quique: Mi guardián, protegiendo siempre a sus cariños y responsable del más tierno llamado a mi nombre.

Dante: Mi intrépido, seguro de sus decisiones y afectos y defendiéndolas a cada paso sin importar la talla del oponente.

Sofía: Mi políglota, desenvolviéndose sin importar idiomas, versátil y cooperadora, segura de lo que quiere y como conseguirlo.

J. Emilio: Mi observador, investigador incansable y aventurero atrevido, haciéndose escuchar aun sin palabras.

Para mi inspiración, que llega siempre con la primera luz de cada día.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo que brinda en pro del desarrollo de la ciencia y tecnología en este país.

A la UNISON, particularmente al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) por su aceptación y preparación bajo el programa de Biociencias Moleculares.

A mi director Dr. José Manuel Grijalva Chon (UNISON) y co-director Dr. Jorge Hernández López (CIBNOR Hermosillo), por que sin su apoyo no habría sido posible llevar a buen término esta etapa. Así como a los demás integrantes de mi comité de tesis, Dr. Luis Ángel Medina Juárez, Dr. Marco Antonio López Torres y Dr. Alejandro Varela Romero, por su enseñanza, paciencia y consejo.

A los técnicos de CIBNOR Hermosillo, MC. José Fernando Mendoza Cano, MC. Rosa Icela Vázquez Sánchez, Biol. Trinidad Encinas García, Biol. Daniel Eduardo Coronado Molina y Biol. Diego Alberto Galván Álvarez, porque sin su colaboración y apoyo incondicional, no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

RESUMEN

La acuicultura juega un papel fundamental en la contribución de proteína animal de origen acuático para el consumo humano. El camarón es uno de los recursos acuícolas más importantes y como cualquier organismo vivo, es atacado por diversos agentes patógenos tales como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Dado que el camarón carece de un sistema inmune adquirido utiliza como sistema de defensa la inmunidad innata la cual se basa en respuestas humorales, en las cuales participan, entre otras: enzimas como fenol oxidasa, súper óxido dismutasa, lisozima, α -2 macroglobulina, proteína antimicrobiana y proteína tipo tripsina, además moléculas que actúan como chaperoninas reparando proteínas disfuncionales como HSP90, HSP60 y HSP10. En el año 2012, se realizó un bioensayo para comparar la respuesta inmune involucrando proteínas totales y actividad de las enzimas mencionadas anteriormente mediante espectrofotometría, así como la expresión de los genes de *HSP90*, *60* y *10* mediante PCR tiempo real, en camarones infectados y no infectados con WSSV mantenidos a tres diferentes temperaturas. Las diferencias encontradas se relacionan más con las temperaturas que con la presencia del virus, en base a estos resultados se concluyó que el efecto de la temperatura sobre la reacción de los organismos ante una infección pueden ser iguales o mayores que los provocados por dicha infección, ya que la temperatura influye sobre los procesos biológicos, respuesta inmune y función de las actividades enzimáticas en todos los organismos, por tal razón, el manejo es de vital importancia para el control y no la erradicación de patógenos como el WSSV.

ABSTRACT

Aquaculture plays a fundamental role in contributing aquatic animal origin protein for human consumption. Shrimp is one of the most important aquaculture resources and like any living organism is attacked by various pathogens such as the white spot syndrome virus (WSSV). Since shrimp lacks of an adaptive immune system, uses as a defense system the innate immunity which is based on humoral responses, in which enzymes as phenol oxidase, super oxide dismutase, lysozyme, α -2 macroglobulin, antimicrobial protein and trypsin-like protein, among others, are involved, also molecules as HSP90, HSP60 and HSP10 which act as chaperonins. During the summer of 2012, a bioassay was conducted to compare the response of total protein, and activity of the enzymes listed above using spectrometry, as well as gene expression of *HSP90*, *60* and *10* by real time PCR, in infected and uninfected shrimps with WSSV maintained at three different temperatures. The differences founded was more related to temperatures than the virus presence, it was concluded that the effect of temperature on the organisms reaction to infection may be the same or greater than that caused by the infection because temperature influences all biological processes, immune response and function of the enzyme activities in all organisms. For this reason, management is of vital importance for the control of pathogens such as WSSV, but not for its eradication.

ÍNDICE GENERAL.

I.INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Camaronicultura mundial.....	3
II.2 Camaronicultura en México.....	3
II.2.1 Producción nacional.....	3
II.2.2 Camaronicultura en Sonora.....	6
II.3 <i>Litopenaeus vannamei</i>	8
II.3.1 Clasificación.....	8
II.3.2 Características.....	9
II.3.3 Distribución.....	10
II.3.4 Densidad de cultivo.....	12
II.3.5 Tolerancia a la salinidad.....	12
II.3.6 Tolerancia a la temperatura.....	13
II.3.7 Requerimientos de proteína en la dieta.....	13
II.3.8 Resistencia a las enfermedades.....	14
II.3.9 Facilidad de crianza y domesticación.....	14
II.3.10 Crianza de larvas.....	14
II.3.11 Inmunidad del camarón.....	15
II.3.11.1 Exoesqueleto.....	15
II.3.11.2 Proteínas plasmáticas.....	16
II.3.11.3 Señalización.....	17
II.3.11.4 Hemocitos.....	20
II.3.11.5 Fenol oxidasa.....	24
II.3.11.6 Tripsina.....	25
II.3.11.7 Fagocitosis, especies reactivas de oxígeno y antioxidantes.....	27
II.3.11.8 α 2-macroglobulina.....	28
II.3.11.9 Lisozima.....	29
II.3.11.10 Péptidos antimicrobianos.....	31

II.4 Proteínas de choque térmico (HSPs).....	33
II.5 Principales enfermedades del camarón.....	40
III. HIPÓTESIS.....	47
IV. OBJETIVOS.....	48
IV.1 Objetivo general.....	48
IV.2 Objetivos específicos.....	48
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
V.1 Colección de muestras.....	49
V.2 Diseño del experimento.....	50
V.3 Procesamiento de las muestras.....	53
V.3.1 Proteínas totales.....	53
V.3.2 Determinación de la actividad de fenol oxidasa.....	54
V.3.3 Actividad de Lisozima.....	54
V.3.4 Actividad antibacteriana.....	54
V.3.5 Actividad de proteínas tipo tripsina.....	54
V.3.6 Actividad de α 2-macroglobulina.....	55
V.3.7 Actividad de súper óxido dismutasa.....	55
V.3.8 Expresión de <i>Pro-PO</i> , <i>Hsp10</i> , <i>Hsp70</i> y <i>Hsp90</i>	55
V.3.9 Análisis estadístico.....	56
VI. RESULTADOS.....	58
VI.1 Actividad inmune.....	58
VI.2 Expresión de las proteínas de choque térmico.....	64
VII. DISCUSIÓN.....	65
VII.1 Actividad inmune.....	65
VII.2 Expresión de las proteínas de choque térmico.....	69
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. RECOMENDACIONES.....	73
X. LITERATURA CITADA.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción de camarón en peso vivo en toneladas (2003-2013) (SAGARPA, 2013).....	5
2	Producción de camarón en tres zonas de cosecha (esteros, mar abierto y cultivo) en los años 2011 y 2012 (SAGARPA, 2012).....	6
3	Producción de camarón por camaronicultura en Sonora de 2011 a 2014 (SAGARPA, 2012; COSAES, 2014).....	8
4	Anatomía de un camarón peneido (Fischer <i>et al.</i> , 1995).....	9
5	Distribución natural de <i>Litopenaeus vannamei</i> (área sombreada) (FAO, 1980).....	11
6	Ciclo de vida de los camarones peneidos (Chappe-Bonnichon, 2006).....	12
7	Exoesqueleto de camarón (Chris Lukhaup, http://www.gambarium.com/2013/08/anatomia-y-biologia-de-las-gambas-o.html , consultada el 3 de enero de 2015).....	15
8	Sistema inmune de <i>Drosophila</i> utilizado para marcar las vías de señalización. (Chappe-Bonnichon, 2006).....	17
9	Funcionamiento de las vías Toll e IMD (Rolland, 2010).....	20
10	Observación microscópica de los tres tipos de hemocitos. Gr = hemocitos granulares, SeGr = hemocitos semigranulares y H = hemocitos hialinos. (Rolland, 2010).....	23
11	Principales moléculas de defensa utilizadas por los camarones.....	24
12	Activación y prevención de la fenol oxidasa.....	26
13	Inducción y regularización de las proteínas de choque térmico (Pockley, 2003).....	34

14	Localización de las principales HSPs en la célula.....	36
15	Microfotografías electrónicas de preparaciones de purificados (por ultra centrifugación de gradientes en sacarosa o cloruro de cesio) de virus de camarones peneidos, teñidos con PTA al 2%. Las barras de escala están en nanómetros. Las imágenes corresponden a: 1: IHHNV; 2: TSV; 3: WSSV; 4: YHV; 5: IMNV (Lightner, 2012).....	41
16	Estructura del ADN del WSSV, las flechas fuera del anillo indican la dirección de transcripción, los rectángulos las regiones homólogas y las B los sitios de enzimas de restricción BamHI (Yang <i>et al.</i> , 2001).....	42
17	Imágenes mostrando algunos de los signos que presentan los animales infectados con WSSV (Sankar <i>et al.</i> , 2013; Lightner, 2011 y Afsharnasa <i>et al.</i> , 2009).....	43
18	Microfotografía electrónica porción del núcleo de una célula infectada en donde se observan numerosas partículas virales baciliformes rodeadas por una envoltura trilaminar (Kasornchandra <i>et al.</i> , 1998).....	44
19	Representación esquemática de la morfología de una partícula viral (Sánchez-Paz, 2010).....	45
20	Localización geográfica de la camaronícola Cruz de Piedra.....	49
21	Esquema de recepción en un tanque comunal y distribución de los organismos en tanques para cada tratamiento.....	50
22	Tinas de 60 litros utilizadas en el bioensayo, A) manguera de aireación para cada una.....	51
23	Esquematación de la toma de muestras e inoculación de los camarones. Se observa el sitio de toma de muestra (A) y de inoculación (B).....	52
24	Procedimiento seguido en el análisis de las muestras de hemolinfa de camarón para conocer la actividad del sistema inmune (los números indican el orden de los pasos a seguir).....	53
25	Secuencia de extracción de ARN y su paso a ADNc.....	56

26	Niveles de proteína plasmática de (A) camarones control e (B) infectados con WSSV. Actividad de la SOD en (C) organismos control y en (D) organismos infectados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$	59
27	Promedio de los niveles de actividad de fenol oxidasa en A) organismos control e B) infectados. Niveles de expresión de <i>Pro-PO</i> en C) camarones control y en D) inoculados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$	60
28	Actividad de $\alpha 2$ -macroglobulina para (A) organismos control e (B) infectados. Actividad de Lisozima en (C) organismos control y en (D) infectados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$	62
29	Actividad de proteínas antimicrobianas en (A) organismos control e (B) infectados. Actividad de proteínas tipo tripsina en (C) organismos control y en (D) infectados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$	63

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla		Página
1	Producción de camarón en 2012 y 2013 (SAGARPA, 2013).....	5
2	Producción de camarón en México periodo 2006-2013 en toneladas de peso vivo (SAGARPA, 2013).....	7
3	Oligos diseñados para estimar la expresión genética mediante PCR de tiempo real.....	57
4	Diferencia estadística entre los camarones control y los infectados a las 48 horas post inoculación (hpi). T °C: Temperatura del agua. P: significancia. I: Infectados. C: controles	61
5	Número de cambios en los niveles de expresión de los genes <i>Hsp10</i> , <i>Hsp60</i> y <i>Hsp90</i> en respuesta a la temperatura en los hemocitos de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado con WSSV y control. hpi=horas post-infección	64

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura juega un papel muy importante al obtenerse, por medio de ella, un alimento de alto nivel proteico (Reynaud, 2008), y aún cuando ésta ha sido practicada por milenios, su máxima expansión ha ocurrido en las últimas tres décadas; habiéndose registrado un incremento de aproximadamente 9 veces en el total de la producción mundial entre 1980 y 2004 (Phuoc, 2008).

A inicios de los años setenta, muchos investigadores y emprendedores de varios países de Asia así como de América Latina invirtieron en granjas de camarón, lo que ha tenido un progreso enorme a través de los años, incrementando la producción mundial por camaronicultura de 200,000 toneladas en 1985 a aproximadamente 2.7 millones de toneladas en 2005 (Phuoc, 2008). En México, en reportes de 2006 a la fecha, el volumen de la producción de acuicultura en peso vivo, ha representado un promedio de alrededor de 278,816 toneladas, más del 50% es resultado de la producción de los estados del litoral del Pacífico, representados principalmente por Sonora y Sinaloa, y en los cuales la especie que más se produce es el camarón (SAGARPA, 2012). En términos de la contribución a nivel mundial, *Litopenaeus vannamei* es la especie más utilizada, llegando a representar el 60% de la producción mundial total de camarón cultivado, ya que se adapta bien a un amplio rango de condiciones ambientales, pueden ser almacenados en tallas pequeñas y aunque toleran salinidades muy elevadas, crecen mejor a las más bajas salinidades, soportan rangos de temperaturas muy amplios, pero pueden morir si son mantenidos en temperaturas mayores a 33°C o menores de 15° C por más de 24 horas y los juveniles crecen mejor en aguas cálidas (Phuoc, 2008).

Pero la sustentabilidad y desarrollo de la camaronicultura se encuentra mermada por problemas ecológicos y patológicos que se han incrementado en la gran mayoría de los países productores. Ahora la prevención y control de las enfermedades es una prioridad para la durabilidad de esta industria. En este campo, la inmunología del camarón es un elemento clave para establecer estrategias para el control de las enfermedades en la camaronicultura (Bacheré, 2000). Los crustáceos dependen completamente de su inmunidad innata (Jiravanichpaisal,

2005), la cual está basada en respuestas no específicas, una celular, dada por los hemocitos, que aseguran la fagocitosis de los microorganismos invasores y una humoral compuesta por péptidos secretados en la hemolinfa y distribuidos a todo el organismo en donde pueden destruir una amplia gama de microorganismos (Chappe-Bonichon, 2006). Muchos factores pueden influenciar el estatus de salud del camarón, entre ellos edad, condiciones de manejo, patógenos y estresantes bióticos y abióticos. Las enfermedades infecciosas son uno de los factores limitantes del cultivo de camarón, ya que este puede ser infectado por protozoarios, hongos, bacterias y virus, siendo estos últimos el mayor problema de cultivo (Phuoc, 2008).

Los virus son los microorganismos más abundantes en el ambiente marino, por tanto, las enfermedades virales son comunes entre los crustáceos marinos. Algunos virus como el de la mancha blanca (WSSV: White spot syndrome virus) se han vuelto la mayor causa de mortalidad en la acuicultura del camarón (Chappe-Bonichon, 2006), ya que infecta a un amplio rango de crustáceos acuáticos por transmisión vertical y horizontal, con distintos resultados en mortalidad. La diseminación de la infección entre regiones puede deberse a los camarones infectados o a portadores como otros crustáceos, aves marinas, artrópodos acuáticos u otros vectores (Sánchez-Martínez *et al.*, 2007; Ramos-Paredes *et al.*, 2012).

Dado todo lo anterior, en el presente estudio se evaluaron tres distintas temperaturas para conocer su efecto sobre la expresión de proteínas de defensa en *Litopenaeus vannamei*.

II. ANTECEDENTES

II.1 Camaronicultura mundial

La acuicultura parece jugar hoy en día un papel primordial en el aporte de proteína animal de origen acuático para el consumo humano (Reynaud, 2008). Entre estos productos el camarón es uno de los de mayor utilización y ante el agotamiento de sus poblaciones silvestres por sobreexplotación, su cultivo (camaronicultura) es una buena alternativa para satisfacer gran parte de su demanda (Rodríguez-Valencia *et al.*, 2010).

En 2010 la pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo unos 148 millones de toneladas de pescado (con un valor total de \$217,500 millones de USD). De ellos, aproximadamente 128 millones de toneladas se destinaron al consumo humano y para 2011 la producción se incrementó hasta alcanzar los 154 millones de toneladas, de los que 131 millones de toneladas se destinaron a alimentos (FAO, 2012).

Los peces de agua dulce dominan la producción acuícola mundial (56.4%, 33.7 millones de toneladas), seguidos por los moluscos (23.6%, 14.2 millones de toneladas), los crustáceos (9.6%, 5.7 millones de toneladas), los peces diádomos (6.0%, 3.6 millones de toneladas), los peces marinos (3.1%, 1.8 millones de toneladas) y otros animales acuáticos (1.4%, 814.30 toneladas). En términos de volumen, la acuicultura en América del Norte y del Sur está dominada por los peces de escama (57.9%), los crustáceos (21.7%) y los moluscos (20.4%) (FAO, 2012).

La producción mundial de camarones peneidos está sostenida principalmente por tres especies, que en su totalidad representan el 71% y que corresponden al camarón tigre gigante *Penaeus monodon*, con el 33%, el camarón Chino *Peanaeus chinensis* o *Penaeus orientalis*, con el 28% y el camarón blanco de Occidente *Litopenaeus vannamei*, con el 10% (SAGARPA, 2009).

II.2 Camaronicultura en México

II.2.1 Producción nacional

México es la sexta potencia mundial en producción de camarón. El crustáceo se ubica en primer lugar como generador de divisas entre los productos pesqueros y ocupa el tercer sitio por volumen, representando el mayor valor económico del subsector con casi la mitad de

los ingresos por este concepto (45.2%). Asimismo, a partir de 2003, el volumen de camarón creció en promedio anual trece mil toneladas, y en 2009 registró un monto récord de 181 mil toneladas. De cada tonelada de camarón producida en el país, 671 kilogramos corresponden a la acuicultura. Por tipo de especie, predomina el camarón café en la pesca de altura con 55.3% de la captura en tal modalidad; en la acuicultura, la única especie que se cultiva es el blanco, que se comercializa en su mayoría en estado fresco y entero (SAGARPA, 2012).

En México, la producción de camarones ocupa el primer lugar entre los recursos de pesquería con alto valor económico. Durante 2001, del total de capturas (95,000 toneladas), la costa del Pacífico contribuyó con 70,000 toneladas (79%) de la producción nacional (Rivera-Velázquez *et al.*, 2008). Entre 2006 y 2009, este sector, creció en un 13%, al pasar de 111.3 a 125.8 miles de toneladas de peso vivo cosechadas (SAGARPA, 2010).

En la región del Golfo de California, la acuicultura del camarón está creciendo rápidamente, esto puede apreciarse con el incremento en el número de camaronicultores: de casi 400 granjas entre 1993 y 1998 a 1,039 granjas en 2009, con una producción de 129,671 toneladas (SAGARPA, 2009). Actualmente, la industria del camarón del Golfo de California genera 70% (3,400 millones de pesos) del valor de la producción nacional, siendo Sonora, Sinaloa y Nayarit líderes de la misma (Rodríguez-Valencia *et al.*, 2010). Entre 2006 y 2011, la producción acuícola de Sinaloa y Sonora fue la más importante del país, logrando las producciones más altas en todo el territorio nacional, siendo el camarón el principal producto obtenido (SAGARPA, 2012).

La producción de camarón para 2013, en toneladas de peso vivo, fue de 102,437 en total, por todos los estados productores (Figura 1). El camarón en este año, por su volumen se encuentra posicionado en el lugar 4 de la producción pesquera en México; y su valor lo encontramos en el lugar 1. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 1.71% (SAGARPA, 2013).

Comparando la producción en los últimos diez años, en lo referente a camarón podemos notar un incremento relacionado con el aumento en el número de granjas camaronícolas en los primeros años y hasta aproximadamente 2009 y un descenso hacia 2013 (Tabla 1; SAGARPA 2013). Esto se debe a que en este último año se han reportado mortalidades de camarón en estanques de cultivo en algunas granjas del norte de México, cuya signología indica que se trata posiblemente de la presencia de una bacteriosis de alta

patogenicidad (COSAES, 2013). Aunado a esto se tiene la presencia de WSSV con un avance progresivo hacia el norte desde el 2010, alcanzando todas las granjas camaronícolas a lo largo de la costa del Pacífico con un severo impacto económico (Ramos-Paredes *et al.*, 2012).



Figura 1. Producción de camarón en peso vivo en toneladas (2003-2013) (SAGARPA, 2013).

Tabla 1. Producción de camarón en 2012 y 2013 (SAGARPA, 2013).

	2012	2013	Diferencia	Diferencia %
Volumen (Peso vivo en toneladas)	161,852	102,437	-59,415	-37%
Valor (Miles de pesos)	7,629,994	7,550,001	-79,993	-1%
Captura (Peso vivo en toneladas)	61,532	49,330	-12,201	-20%

II.2.2 Camaronicultura en Sonora

Las entidades productoras líderes son Sonora y Sinaloa, alcanzando durante 2005-2010 un volumen promedio anual de producción de 75,159 y 50,528 toneladas respectivamente. En conjunto, producen siete de cada diez toneladas (71.6%) del volumen nacional (FAO, 2012).

En Sonora, entre 1996 y 2006 la explotación de este organismo se había desarrollado de manera extraordinaria obteniendo de 126 granjas 66,000 toneladas de este crustáceo, con un valor de 261 millones de dólares (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

En 2011 se reportó una producción de 52,412.4 toneladas de camarón como captura total, pudiendo ser separado en tres rubros de acuerdo a su procedencia: de esteros y bahías (4,075.5 toneladas), de mar abierto (7,467.0 toneladas) y de cultivo (40,869.9 toneladas), representando esto una ganancia total de 2,190.6 millones de pesos correspondiendo un 10.9, 15.9, y 73.1% a cada una de las zonas de captura respectivamente para ese año. Para el año 2012, los valores fueron 5,705.5, 6,105 y 35,305.6 toneladas de peso vivo, correspondiendo a la captura en esteros, mar abierto y cultivo, con un total de 47,116 toneladas de camarón en peso vivo (SAGARPA, 2012), en la figura 2 podemos apreciar los datos de esas capturas.

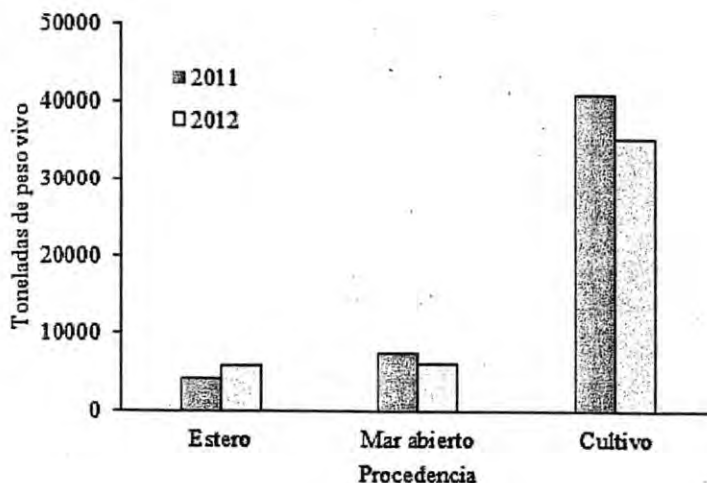


Figura 2. Producción de camarón en tres zonas de cosecha (esteros, mar abierto y cultivo) en los años 2011 y 2012 (SAGARPA, 2012).

En la tabla 2 se puede apreciar la producción de camarón en Sonora en el año 2013 y encontramos una producción de 20,328 toneladas de peso vivo, que representó un 19.84% de la producción nacional en ese año. En esa misma tabla se aprecia el comparativo de esta producción con los otros estados productores del organismo, ocupando Sonora el segundo lugar nacional (SAGARPA, 2013).

Tabla 2. Producción de camarón en México periodo 2006-2013 en toneladas de peso vivo (SAGARPA, 2013).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Sinaloa	60,076	66,255	60,441	55,838	59,498	79,020	63,870	40,286
Sonora	75,598	78,405	96,557	101,045	58,447	52,424	47,870	20,328
B. C. S.*	5,013	4,765	4,264	4,464	6,150	6,946	7,652	5,918
Nayarit	8,148	8,611	9,567	8,645	9,114	16,255	13,831	5,462
Total	151,925	158,036	170,829	169,892	133,209	154,645	132,469	70,984

*B.C.S. Baja California Sur

Para 2014, en lo referente a camaronicultura, la producción total estimada fue de 32,616.03 toneladas, tomando en cuenta las granjas que habían presentado su reporte de producción en diciembre y un estimado de las que no lo habían hecho, presentándose una mayor producción en la zona norte del estado (74.36%) y la menor producción en la zona centro (8.02%) (COAES, 2014). Esto muestra un aumento en la producción de camarón, comparado con lo obtenido en 2013 y casi alcanzando la producción alcanzada en 2012, como se puede apreciar en la figura 3 (SAGARPA 2012, 2013; COAES, 2014).

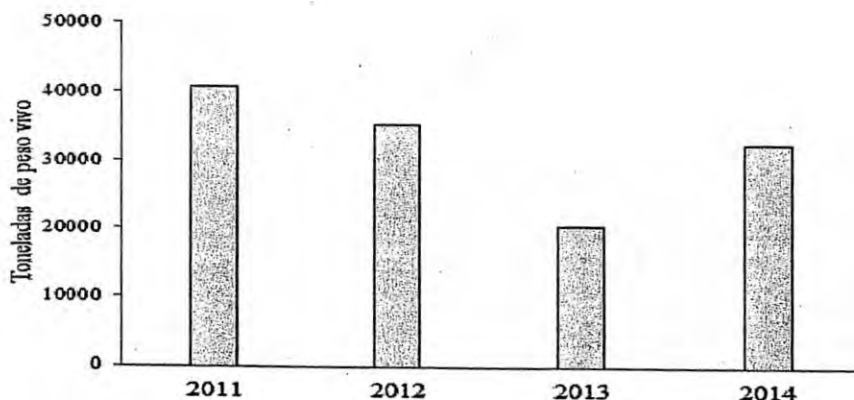


Figura 3. Producción de camarón por camaronicultura en Sonora de 2011 a 2014 (SAGARPA, 2012, 2013; y COSAES, 2014).

II.3 *Litopenaeus vannamei*

II.3.1 Clasificación

Los camarones peneidos pertenecen al filo de los artrópodos, que se caracterizan por la presencia de apéndices unidos y un exoesqueleto o cutícula que es periódicamente cambiado. Dentro de las especies acuáticas se presenta un subfilo muy grande, los crustáceos; dentro de estos los más evolucionados incluyen a los peneidos (Clase Malacostraca, Orden Decapoda).

- Filo: Arthropoda
- Subfilo: Crustacea
- Clase: Malacostraca
- Subclase: Eumalacostraca
- Superorden: Eucarida
- Orden: Decapoda
- Suborden: Natantia
- Superfamilia: Penaeoidea
- Familia: Penaeidae
- Género: *Litopenaeus*
- Especie: *vannamei* (Andrade, 2011).

II.3.2 Características

Los decápodos pueden ser distinguidos de otros crustáceos examinando las diferencias en sus apéndices torácicos. Los primeros tres pares de apéndices torácicos, los maxilípedos, son modificados para la alimentación y los cinco pares restantes son utilizados como patas para caminar, de ahí el nombre decápoda o diez patas (Figura 4). Los apéndices de los peneidos típicamente consisten en dos ramas (biramous), el exopodito y un endopodito. Estas estructuras están variablemente desarrolladas para la alimentación, locomoción o sujeción; o que tienen branquias plumosas (epipoditos modificados) bajo el caparazón, o estructuras sensoriales en las antenas y anténulas (Andrade, 2011).

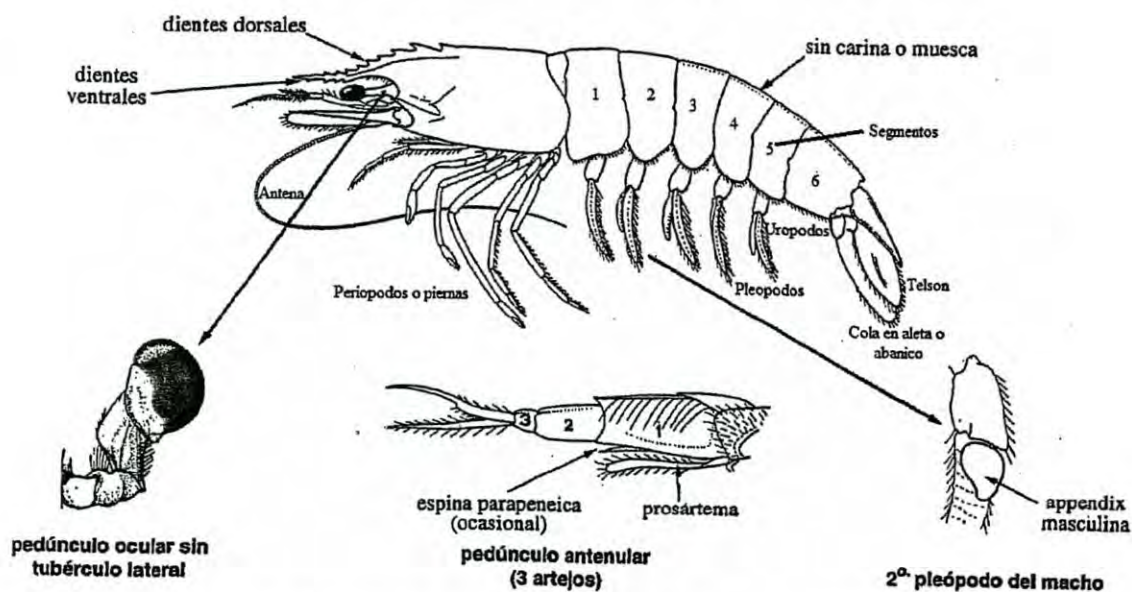


Figura 4. Anatomía de un camarón peneido (Fischer *et al.*, 1995).

De la familia *Penaidae*, el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es la especie más cultivada en el hemisferio occidental, dado que su desarrollo larvario no presenta grandes complicaciones debido a que tolera amplios intervalos de salinidad de 10 a 50‰ (Manzo, 2000) y temperatura de 20 a 30 °C e incluso se ha desarrollado en agua dulce, además de presentar la tasa más elevada de crecimiento, sobrevivencia y alto valor en el mercado en comparación con otras especies de camarón, lo que la hace ser muy apreciada por los

acuicultores. Otra de las ventajas de esta especie es su resistencia al Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) que tan severamente ha afectado a las granjas regionales que cultivan camarón azul (Phuoc, 2008; SAGARPA, 2009).

El camarón blanco presenta un rostrum moderadamente largo con 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales. En los machos maduros tiene un petasma simétrico y semi abierto. Los espermátóforos son complejos, consistentes de masa espermática encapsulada por la vaina. Las hembras maduras tienen el télico abierto. Su coloración es normalmente blanca translúcida, pero puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. Presenta una talla máxima de 23 cm, con longitud de cefalotórax máxima de 9 cm. Comúnmente las hembras crecen más rápidamente y adquieren mayor talla que los machos (FAO, 2015). El camarón blanco presenta un ciclo de madurez gonádica de marzo a octubre con máximos de ocurrencia en junio y julio (Hernández-Covarrubias *et al.*, 2012).

II.3.3 Distribución

El camarón blanco es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México, al norte, hacia centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú (Figura 5), en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año. *Litopenaeus vannamei* se encuentra en hábitats marinos tropicales (FAO, 1980).

Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, la etapa adolescente y pre adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares. Los machos maduran a partir de los 20 g y las hembras a partir de los 28 g en una edad de entre 6 y 7 meses. Cuando *L. vannamei* pesa entre 30 y 45 g libera entre 100,000 y 250,000 huevos de aproximadamente 0.22 mm de diámetro. La incubación ocurre aproximadamente 16 horas después del desove y la fertilización. En la primera etapa, la larva, denominada nauplio, nada intermitentemente y es fototáctica positiva. Los nauplios no requieren alimentación, sino que se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvarias (protozoa, mysis y postlarva temprana respectivamente) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan del fitoplancton y del zooplancton, y son transportados a la costa por las corrientes mareales. Las postlarvas (PL) cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a PL, se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y crustáceos (Figura 6). Los camarones

presentan seis etapas de nauplio, tres de protozoa y tres de mysis (Chappe-Bonnichon, 2006; FAO, 2015).

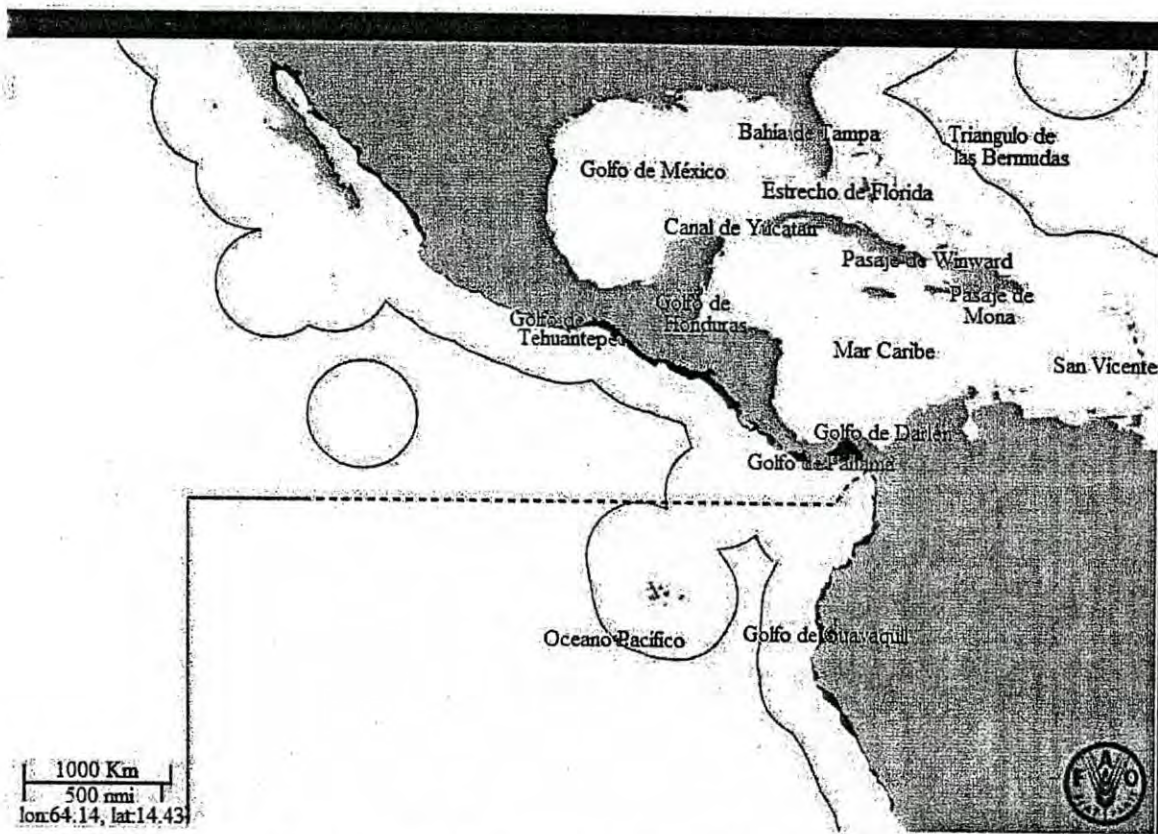


Figura 5. Distribución natural de *Litopenaeus vannamei* (área sombreada) (FAO,1980).

Litopenaeus vannamei tiene un potencial de crecimiento parecido a *Penaeus monodon* (hasta 3 g/semana), más de 20 g bajo condiciones de cultivo intenso (más de 150/m²). Aun cuando puede seguir creciendo más allá de los 20 g, su crecimiento se hará más lento (especialmente en los machos) a 1 g/semana, pasados los 20 g (Brigs *et al.*, 2005).

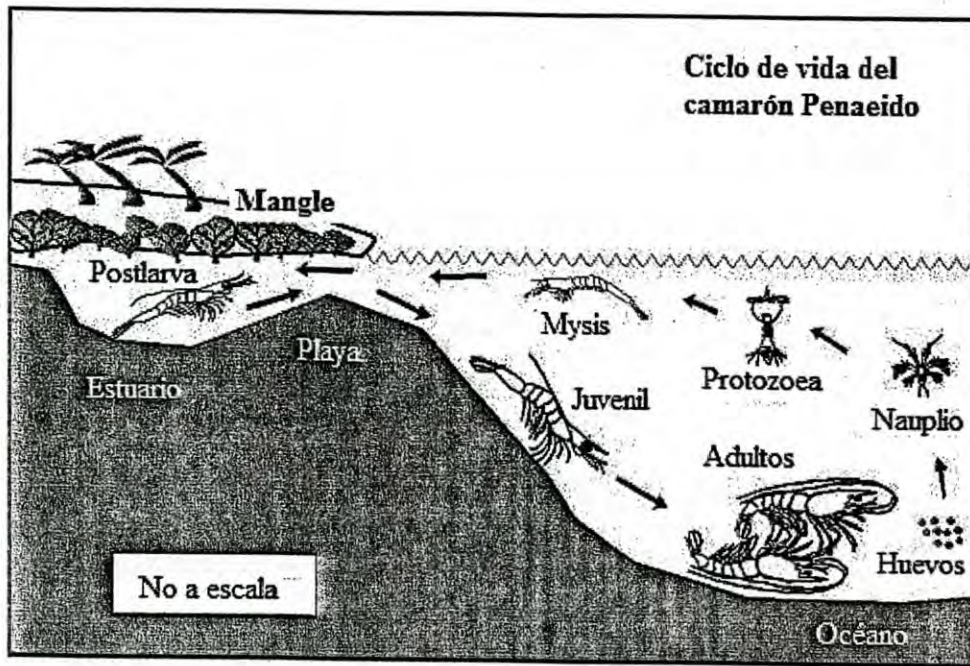


Figura 6. Ciclo de vida de los camarones penaeidos (Chappe-Bonnichon, 2006).

II.3.4 Densidad de cultivo

Este camarón es dócil para ser cultivado en densidades muy elevadas, más allá de 150/m² en estanques de cultivo, y hasta tan altas como 400/m² en tanques de cultivo de recirculación controlada (Brigs *et al.*, 2005). Araneda *et al.* (2008) reportaron un crecimiento isométrico en buena condición a densidades de 130/m², pero a 180/m² resultó negativo.

II.3.5 Tolerancia a la salinidad

La salinidad juega un papel clave en la distribución de muchos animales marinos y *L. vannamei* no es la excepción. Es sabido que las preferencias de salinidad varían entre las diferentes especies de camarón. Tolerancia un amplio rango de salinidad, desde 0.5 – 45‰, puede desempeñarse bien a 7 - 34‰, pero crece especialmente bien a bajas salinidades entre 10 y 15 ‰ (donde el ambiente y la hemolinfa son iso-osmóticos). Esta habilidad lo hace un buen candidato para el cultivo tierra dentro (Brigs *et al.*, 2005). Ponce-Palafox *et al.* (1997) no encontraron diferencias en el crecimiento de postlarvas al mantenerlas en distintos niveles de salinidad (entre 20 y 50‰). En general, la habilidad del camarón a tolerar cambios en la

salinidad parece ser influenciada por edad, especie y factores ambientales. Si el cultivo comercial es bajo en salinidad, PL menores a 15 días de edad no deben ser aclimatadas a salinidades inferiores a 4‰. Aun así, PL mayores pueden ser aclimatadas a 1‰ con una sobrevivencia a las 48 h de entre 83 y 92 % dependiendo de la edad (McGraw *et al.*, 2002).

II.3.6 Tolerancia a la temperatura.

La temperatura del agua es probablemente la variable ambiental más importante en el cultivo de camarón, debido a que afecta directamente el metabolismo, consumo de oxígeno, crecimiento, muda y sobrevivencia. En general, un cambio repentino afecta el sistema inmune del camarón, lo que puede ser crítico si coincide con el tiempo en el que se presente algún patógeno. Bajas temperaturas pueden inducir un descenso en el número de hemocitos circulantes y de su capacidad fagocítica, medida por su metabolismo oxidativo. Un incremento en la temperatura puede aumentar los hemocitos circulantes y proteínas plasmáticas, pero disminuye la profenol oxidasa hemocítica total (Le Moullac y Haffner, 2000). *Litopenaeus vannamei* es muy tolerante a las bajas temperaturas (15 °C) lo que permite su cultivo en estaciones frías (Brigs *et al.*, 2005). Por otro lado, tomando en cuenta el punto iso-osmótico en *L. vannamei*, se ha demostrado que condiciones de 32 °C y 28‰ produce el mejor crecimiento (Buckle *et al.*, 2006).

El significativo incremento del número de células apoptóticas en camarones mantenidos a 32 °C sugiere que la hipertermia facilita la apoptosis en camarones infectados por WSSV. Esto reducirá la replicación viral y permitirá al camarón controlar la enfermedad y sobrevivir (Granja *et al.*, 2003) y las PL mantenidas constantemente a 32±1 °C por siete días fueron capaces de eliminar la infección por WSSV (Wongmaneeprateep *et al.*, 2010). Moser *et al.* (2012) concluyen que la temperatura del agua tiene un profundo efecto en la replicación del virus en estos camarones por lo que proponen un seguimiento con un protocolo de estrés térmico. Sin embargo, *L. vannamei* morirá si es expuesto por 24 horas o más en aguas con temperaturas menores a 15 °C o superiores a 33 °C (Phuoc, 2008).

II.3.7 Requerimientos de proteína en la dieta

Litopenaeus vannamei requiere menos proteína en la dieta (20-35%) que *P. monodon* y *P. stylirostris* (36-42%), lo que resulta en una reducción en costos operacionales y lo hace más

dócil para los sistemas heterotróficos cerrados. Sus rangos de conversión del alimento (FCR's) son menores de 1.2 (Brigs *et al.*, 2005). Velasco *et al.* (2000) realizaron experimentos con la formulación de la dieta para este tipo de camarones y no encontraron diferencia significativa en la ganancia de peso de PL alimentadas con dietas formuladas con 18% de proteína o más, pero si cuando bajaron el nivel de proteína a 15%, por lo que concluyeron que la necesidad de aminoácidos requeridos por el camarón era satisfecha con ese nivel de proteína en la dieta.

II.3.8 Resistencia a las enfermedades

Litopenaeus vannamei es generalmente considerado más resistente a las enfermedades que otros camarones, siendo introducido de esta manera a China por acuicultores mal informados que creían que son resistentes a WSSV y YHV (Brigs *et al.*, 2005). Se han realizado trabajos basados en la selección por índice de crecimiento y resistencia al virus del síndrome de taura (TSV) y se demostró que se pueden hacer mejoras en crecimiento y resistencia a TSV a través de crianza selectiva (Argüe *et al.*, 2002).

II.3.9 Facilidad de crianza y domesticación

Existen varios factores que favorecen la domesticación de *L. vannamei*: a) hay buena disponibilidad de reproductores para crianza en estanque; b) se han desarrollado esquemas para la selección genética; c) están disponibles líneas libres de patógenos y líneas resistentes a patógenos (SPF, specific pathogen free y SPR, specific pathogen resistant) y d) se han eliminado los problemas con reproductores silvestres y/o colección de post-larvas en campo (Brigs *et al.*, 2005).

II.3.10 Crianza de larvas

Una ventaja desde el punto de vista productivo es que *L. vannamei* posee mayores rangos de sobrevivencia en criadero, hasta 50 – 60%, mayor que la obtenida por *P. monodon* (Brigs *et al.*, 2005). *L. vannamei* es una especie de télico abierto, lo que significa que puede ser inducida a reproducirse fácilmente en cautiverio, lo que permite a los camaronicultores a desarrollar el ciclo completo de vida del camarón, facilitando la selección genética y programas de domesticación. Esto les permite mucho mayor control y mejora las acciones de cultivo y permite el desarrollo de reserva de organismos SPF y SPR. Esto a su vez alivia el

gasto, las consecuencias de la enfermedad, las preocupaciones ambientales, la imprevisibilidad y la dependencia de reproductores silvestres (Brigs *et al.*, 2004).

II.3.11 Inmunidad del camarón

II.3.11.1 Exoesqueleto

En insectos, la cutícula es la capa más externa secretada por la epidermis y se continua por el estomodeo, proctodeo y la tráquea, protegiendo, por tanto, no solo la superficie externa, sino también las internas que son accesibles a invasores externos. Esta cutícula esclerotizada es una barrera contra heridas e invasión microbiana. Las cutículas están principalmente compuestas por quitina (polímeros de β -1,4 acetilglucosamina) y proteínas, estas son reforzadas por esclerotización (Gupta, 1999).

En los crustáceos, la primera línea de defensa contra la invasión de los microorganismos está constituida por una cutícula (figura 7) que actúa como una barrera física y consiste en un exoesqueleto rígido que protege de daños y ataques microbianos. El exoesqueleto está compuesto de carbonato de calcio y proteínas y contribuye a diferentes procesos fisiológicos asociados con la respuesta inmune (Chappe-Bonichon, 2006; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

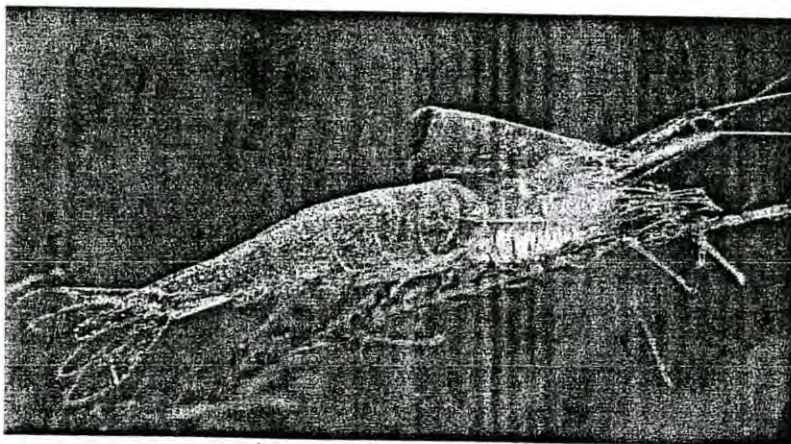


Figura 7. Exoesqueleto de camarón (Chris Lukhaup, <http://www.gambarium.com/2013/08/anatomia-y-biologia-de-las-gambas-o.html>, consultada el 3 de enero de 2015).

II.3.11.2 Proteínas plasmáticas

Los patógenos que logran cruzar a través de las partes protectoras del animal se encontrarán con una serie de factores inmunes derivados de hemocitos y plasma. Un primer paso crítico en cualquier respuesta inmune es el reconocimiento de los organismos invasores como extraños. Bacterias y hongos presentan en su superficie moléculas como polisacáridos y β -1,3 glucanos que son reconocidos como moléculas extrañas y producen una reacción inmune tanto en vertebrados como en invertebrados (Roux *et al.*, 2002). Además de otras funciones, el sistema de defensa de los invertebrados está fuertemente comprometido con la eliminación de patógenos. Por ello, las señales más importantes que ellos deben reconocer son las extrañas, presentes en la superficie de los patógenos.

En los camarones, los dos componentes microbianos que se ha demostrado que están involucrados en la estimulación de las funciones celulares son los lipopolisacáridos (LPS) y los β -glucanos. Aunque la interacción en ambos casos puede ser similar (directamente o a través de las proteínas plasmáticas), los marcadores celulares y los sistemas de activación son diferentes. Los componentes microbianos son capaces de activar las funciones celulares directamente, pero la participación de las proteínas plasmáticas mejora la eficiencia de la respuesta del sistema inmune. Estas proteínas, definidas como proteínas de reconocimiento, reaccionan a los componentes microbianos y también previenen la activación celular innecesaria o, si es necesario, incrementan la respuesta de las células efectoras (Figura 8). El primer grupo es constituido por aglutininas multivalentes de unión a azúcares, también llamadas hemoaglutininas o lectinas. La segunda proteína de reconocimiento detectada en el plasma del camarón tiene la capacidad de reaccionar con los β -glucanos, y por ello es llamada proteína de unión a los β -glucanos (BGBP) (Vargas-Albores *et al.*, 1998). Las proteínas que reconocen a los LPS y β -1,3 glucanos son conocidas como proteínas de patrón de reconocimiento (PRP). Los receptores PRP son moléculas esenciales que tienen la habilidad para reconocer e iniciar los mecanismos de defensa del hospedador (Amparyup *et al.*, 2012).

En los crustáceos se han aislado y caracterizado en detalle varias PRP. Estas incluyen las proteínas de unión a β -glucanos (BGBP, también abreviadas β GBP), proteínas de unión a lipopolisacáridos y glucanos (LGBP), algunas proteínas enmascaradas como homólogas a proteinasa de serina (SPHs) y un gran número de lectinas. Las LGBP y los BGBP se unirán a

los 1-3 glucanos y después de esta unión dispararán las reacciones inmunes (Yu *et al.*, 2002; Yu y Kanost, 2002; Cerenius *et al.*, 2010).

En el camarón, el gen de LGBP se encontró sobreexpresado en los animales infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV), lo que sugiere que LGBP es una proteína de fase aguda inducible que puede jugar un papel crítico no solo en la patogénesis bacteriana y fúngica, sino también en la viral. La subexpresión de Pro Fenol Oxidasa (ProPO) sugiere que el WSSV puede emplear una vía novedosa para regular la activación y/o actividad de la cascada de ProPO para evadir las defensas del hospedador (Roux *et al.*, 2002).

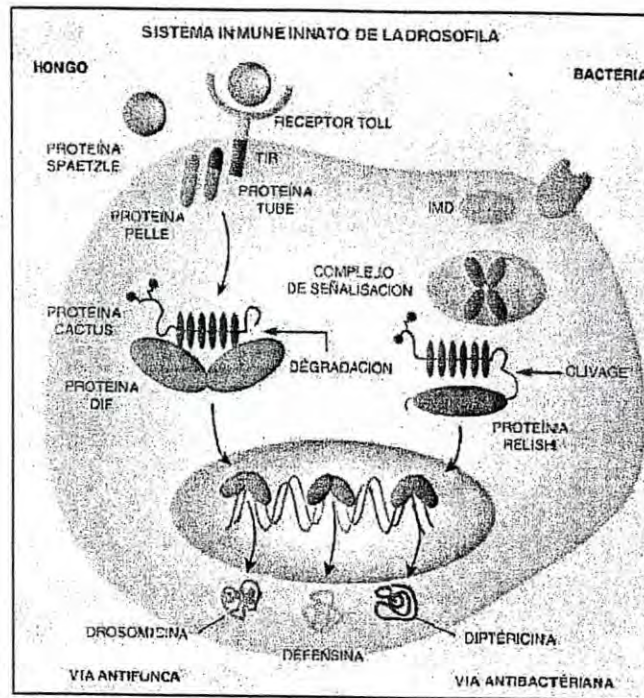


Figura 8. Sistema inmune de *Drosophila* utilizado para marcar las vías de señalización. (Chappe-Bonnichon, 2006).

II.3.11.3 Señalización

También las BGBP, que no están estructuralmente relacionadas a las LGBP, son capaces de unirse a los β -1,3 glucanos y mediar reacciones inmunes, así como de prestarse a activarse por bacterias Gram negativas ya que estas son capaces de unirse a los LPS y después de esto mediar la activación del sistema ProPO, fagocitosis, formación de nódulos y

encapsulación. Las vías de señalización Janus quinasa (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT), los receptores tipo Toll y la de deficiencia inmune (IMD) son vistas como las que regulan la respuesta inmune en los invertebrados. Así, la vía de señalización JAK-STAT esta usualmente involucrada en la defensa antiviral ya que un estudio reciente sugiere que STAT puede ser anexado por el WSSV para mejorar la expresión de un gen viral temprano inmediato en los camarones infectados. Se ha demostrado que en un cultivo de células de órganos linfoides de camarones infectados, un STAT activado era translocado del citoplasma al núcleo. Esto provee evidencia experimental de que el STAT en camarones es activado en respuesta a una infección con WSSV. Estos resultados apoyan un hallazgo anterior de que WSSV no interrumpe la vía JAK-STAT, sino al contrario, beneficia la activación del STAT en el camarón hospedador (Chen *et al.*, 2008). Li y Xian (2013), encontraron que la transcripción de STAT en camarones era modulada después de una infección con WSSV, lo que sugiere que puede existir una vía JAK-STAT putativa en los camarones y que puede ser muy importante en las infecciones virales. Otros resultados sugieren que muchos mecanismos de defensa fueron inducidos sobre una infección con WSSV, incluyendo la activación del sistema ProPO y de la vía de transducción de señales JAK-STAT. Inversamente, el sistema de coagulación y la expresión de péptidos antimicrobiales son subexpresados en una infección con WSSV. Aun así, las respuestas dañan a la célula hospedadora así como al patógeno invasor y la regulación de las respuestas de defensa necesitan, por tanto, ser algo sofisticadas (Mavrouli *et al.*, 2005).

Los receptores tipo Toll (TLR) son glicoproteínas de membrana que consisten en un ectodominio, abarcando repeticiones ricas en leucina (LRR) en tándem, un segmento que abarca membrana y un dominio citoplasmático de receptores Toll/interleucina1 (TIR). Ellos detectan microbios con base a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Algunos TLR se expresan en la membrana celular y su ectodominio reconoce a los PAMP extracelulares, mientras que otros son expresados en endosomas para detectar a los PAMP internalizados (Rolland, 2010). Los TLR han sido encontrados en cuatro especies de crustáceos, todos pertenecientes a la familia Penaeidae. La localización celular de los tres LvTolls es diferente: LvToll1 y LvToll3 están presentes tanto en citoplasma como en membrana, mientras que LvToll2 se restringe solo a citoplasma. Ellos están constitutivamente expresados en muchos tejidos incluyendo branquias, estómago, intestinos, nervios, músculo,

ciego pilórico, espermario y epidermis, con menor nivel de expresión en pedúnculo ocular y hepatopáncreas (Yang *et al.*, 2007; Coscia *et al.*, 2011).

Sobre los cambios de expresión ante la presencia de *Vibrio alginolyticus* y WSSV, los tres LvTolls mostraron diferente respuesta: LvToll1 fue sobreexpresado con ambos retos; LvToll2 fue sobreexpresado únicamente con el reto de WSSV y LvToll3 es sobreexpresado en ambos retos como LvToll1, pero a distintos tiempos y también se piensa que pueden estar involucrados en la fagocitosis (Coscia *et al.*, 2011). En *L. vannamei* con la proteína de interacción con TOLL (LvTollip) bloqueadas, los niveles de expresión de genes de proteínas antimicrobianas (AMP) de penaeidina 4 (PEN4) se incrementaba. Pero aun así, los niveles de mortalidad en los camarones con LvTollip bloqueado no fueron significativamente diferentes de los del grupo control. Lo que sugiere que la LvTollip puede estar involucrada en una regulación negativa de las PEN4 y que la expresión de LvTollip puede ser respuesta a infecciones microbianas (Wang *et al.*, 2013). En las branquias, después de un reto con *V. alginolyticus*, LvToll1 era sobreexpresado, pero LvToll2 y LvToll3 no mostraron cambios obvios, salvo una ligera subexpresión 12 horas posteriores a la inoculación con WSSV. Las proteínas tipo Spätzle de *L. vannamei* (LvSpz tipo 1 y 2) fueron fuertemente inducidas por un reto contra *V. alginolyticus*, pero LvSpz2 únicamente mostró una leve subexpresión. En las branquias, después de un reto con WSSV, tanto LvToll1, LvToll2, LvToll3, LvSpz1 y LvSpz3 se sobreexpresaron, pero LvSpz2 no mostró cambios, excepto por una leve subexpresión a las 12 horas post inyección de WSSV (Wang *et al.*, 2012).

La vía de deficiencia inmune (IMD) es una vía de señalización importante en la inmunidad de invertebrados. IMD es visto como adaptador clave para unir las señales extracelulares e intracelulares (Feng *et al.*, 2014) y media la inmunidad contra bacterias Gram negativas en *Drosophila* (Figura 9). Estudios recientes muestran que la vía IMD también involucra una respuesta inmune innata de tipo antiviral. En estudios con ARN de transferencia mostró que la vía IMD está involucrada en la regulación de la expresión de tres tipos de genes, incluyendo las crustinas, factores anti lipopolisacáridos y lisozima en camarones y cangrejo de río (Lan *et al.*, 2013).

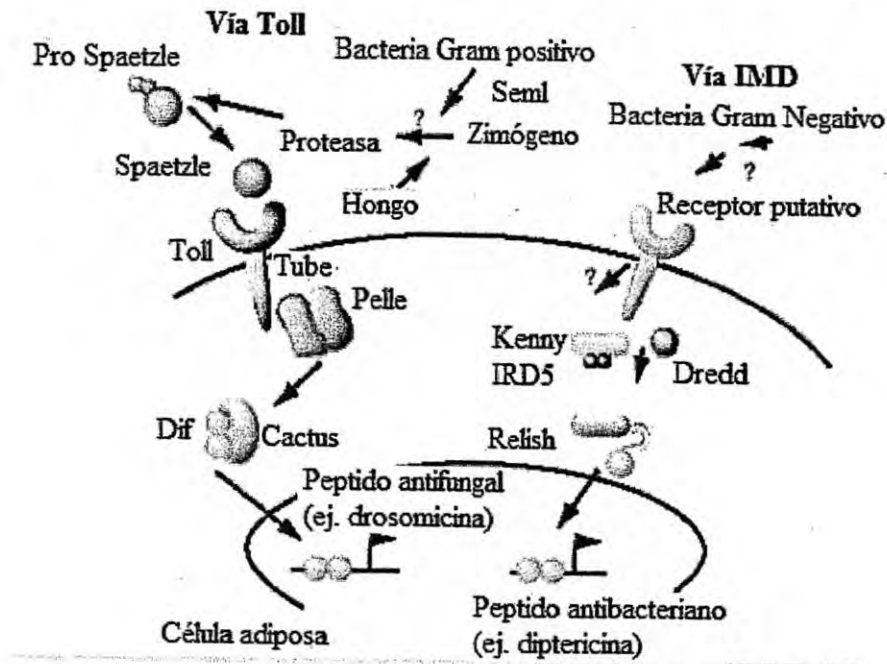


Figura 9. Funcionamiento de las vías Toll e IMD (Rolland, 2010).

II.3.11.4 Hemocitos

La comunicación y cooperación celular es necesaria para por lo menos una de las reacciones de defensa que ocurre cuando los microorganismos o parásitos son reconocidos y se monta una respuesta inmune. Por ejemplo, durante una infección por hongos, una proteína de unión específica β -1,3 glucanos (BGBP) en el plasma primero reconoce y se une a la pared celular del hongo. Luego, los hemocitos semigranulares y granulares responden al complejo BGBP con los glucanos por degranulación, incluyendo la adhesión celular y proteínas opsoninas almacenadas en los gránulos. Finalmente, la liberación de las opsoninas puede estimular la fagocitosis por las células hialinas o la encapsulación por las células semigranulares. Las células granulares y semigranulares pueden ser citotóxicas y lisan las células eucarióticas extrañas (Johansson *et al.*, 2000). Los cambios en la expresión de los genes están asociados con el estrés medioambiental y esto puede ser influenciado por variaciones en la abundancia relativa de diferentes poblaciones de hemocitos (De la Vega *et al.*, 2007).

Los hemocitos en los crustáceos son principalmente subdivididos en tres tipos de células (Figura 10): hialinas, semigranulares y granulares (Battistella *et al.*, 1996; Laxmilatha y Laxminarayana, 2004). Difieren no solo en sus características morfológicas, sino también bioquímicas y en su comportamiento *in vitro*. Las células hialinas son las más pequeñas, con un núcleo grande y central rodeado por citoplasma basofílico, escaso retículo endoplásmico y ribosomas y el aparato de Golgi puede estar ausente. Aunado a esto, no presentan gránulos distintivos y actividad de fenol oxidasa. *In vitro*, estas células desarrollan pseudópodos y fácilmente se adhieren y se dispersan en las superficies de vidrio. Son capaces de fagocitosis en crustáceos (Battistella *et al.*, 1996), con un tamaño promedio de $3.35 \times 4.76 \mu\text{m}$. Son de ovoides a esféricas con cromatina nuclear dispersa. El núcleo ocupa gran parte de la célula, es generalmente ovoide y la relación núcleo-citoplasma es generalmente alta. La envoltura nuclear es lisa y las inclusiones citoplasmáticas son pocas o ausentes, el retículo endoplasmático liso y rugoso es raramente visto en este tipo de hemocitos: los agranulocitos muestran pocas señales de diferenciación (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004).

Las células semigranulares son transicionales entre las células hialinas y granulares. Tienen un núcleo esférico, bilobulado y central o excéntrico, así como ribosomas libres, retículo endoplásmico, dos o más aparatos de Golgi y numerosos gránulos eosinofílicos pequeños. Estas células son muy inestables *in vitro* y requieren manejo delicado, de otra manera rápidamente se lisan y liberan su contenido. Una característica importante de las células granulares y semigranulares de los crustáceos es la presencia, dentro de los gránulos, de ProPO, las enzimas responsables de la síntesis de melanina. Las células semigranulares reaccionan a los polisacáridos microbiales, como los lipopolisacáridos y los β -1,3 glucanos por una respuesta de degranulación y liberación del sistema ProPO (Battistella *et al.*, 1996). Son ovoides o en forma de huso, algunas veces irregulares, con un tamaño promedio de $4.16 \times 7.18 \mu\text{m}$. Están caracterizados por la presencia de gránulos citoplasmáticos más numerosos que en los agranulocitos. Estas inclusiones usualmente son mucho más pequeñas que las encontradas en los granulocitos densos y miden aproximadamente $0.043 \mu\text{m}$. El núcleo en este tipo de hemocitos es también de varias formas, pero no ocupa el volumen celular completo. Presenta numerosas regiones de heterocromatina densa y empacada alrededor y dentro de la envoltura nuclear. En algunos casos, el núcleo es muy reducido y el retículo endoplasmático

rugoso es más desarrollado. También se aprecian vesículas secretoras con contenido electrodenso y mitocondrias (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004).

Las células granulares son los hemocitos más grandes y tienen un núcleo pequeño, excéntrico y bilobulado. Casi siempre está presente un aparato de Golgi. Alrededor del núcleo y a lo largo de la periferia celular, están los retículos endoplásmicos liso y rugoso. Tiene ribosomas libres en el citoplasma, conteniendo grandes gránulos rodeados por membrana, las cuales son electro densas y usualmente fuertemente acidofílicas, presentando diferentes contenidos como mucopolisacáridos, glicoproteínas, oligosacáridos (carbohidratos), proteínas básicas, etc. Este hallazgo de alta heterogeneidad de gránulos apoya la afirmación de que los plasmocitos y/o células granulares juegan un papel esencial en varias actividades fisiológicas. Así, estas células pueden ser importantes en la defensa inmunológica y de síntesis de hemocianinas (Battistella *et al.*, 1996; Aguirre-Guzman *et al.*, 2009).

Las células granulares, por lo menos en el langostino *Pacifastacus leniusculus*, parecen ser repositorio para el sistema de activación del sistema ProPO (Battistella *et al.*, 1996) y por microscopia electrónica se ha demostrado que las penaeidinas (una familia de péptidos antimicrobianos, con capacidades antifúngicas y antibacterianas) están presentes en los gránulos de estas células (Destomieux *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2002). Estos hemocitos son bien diferenciados y poseen gran número de gránulos densos. Son generalmente ovoides y más grandes que los otros hemocitos: en promedio $4.72 \times 5.85 \mu\text{m}$. El núcleo no ocupa todo el espacio citoplasmático y una masa de heterocromatina densa está presente cerca de la envoltura nuclear. El núcleo puede tener varias formas. La característica más distintiva de estos hemocitos es la presencia de gránulos gruesos y densos. Estos gránulos varían en talla desde 0.1 a $0.56 \mu\text{m}$, y forman la base de identificación de estos hemocitos. En algunos casos, dos tipos de gránulos son notados en el citoplasma: gránulos muy densos (G) y gránulos menos densos (LG). Los gránulos son rodeados por una membrana y generalmente poseen un contenido homogéneo electrodenso, pero algunas veces exhiben una estructura interna heterogénea, hecha de áreas electrodensas y electrolucientes. El citoplasma de estos hemocitos contiene únicamente pocos ribosomas y retículo endoplasmático y unas pocas vacuolas. El desarrollo de extensiones a manera de pseudópodos en contacto con cualquier superficie también es notado (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004).

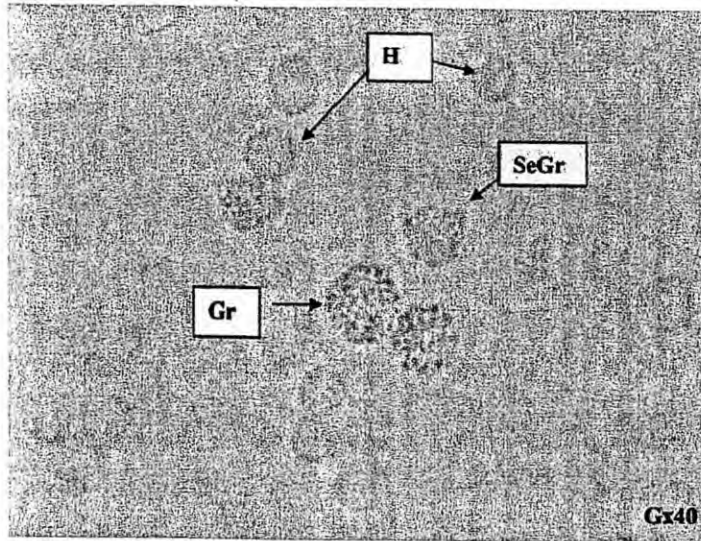


Figura 10. Observación microscópica de los tres tipos de hemocitos. Gr = hemocitos granulares, SeGr = hemocitos semigranulares y H = hemocitos hialinos (Rolland, 2010).

Con el fin de sobrevivir en un mundo cargado con microorganismos, la respuesta del sistema inmune innata se refiere a la primera línea de defensa del hospedador, la cual actúa unas horas después de la exposición microbiana a las superficies mucosas, después de la identificación de los patrones de reconocimiento microbiales (Marshall y Arenas, 2003). Los camarones poseen un sistema circulatorio abierto que les permite a los hemocitos infiltrarse y adherirse a muchos tejidos. Todas las expresiones genéticas son de los hemocitos infiltrados y los niveles de expresión relativos de estos genes se reflejarán en la cantidad de hemocitos infiltrados o fijados en estos tejidos (Swapna *et al.*, 2011).

La fagocitosis es el proceso de ingestión y digestión de pequeñas partículas extrañas y en los camarones la fagocitosis es realizada por los hemocitos granulares y semigranulares, además sintetizan y almacenan en sus gránulos proteínas del sistema inmune, como aglutininas, pironectinas, enzimas citolíticas, enzimas del sistema ProPO y péptidos antimicrobianos que son liberados a la hemolinfa sobre el sitio de infección o herida (Figura 11). Por otra parte, las células hialinas juegan un papel en la coagulación (Herbinière, 2005). En caso de patógenos (como por ejemplo huevos de parásitos o nemátodos) que son muy grandes para ingerirlos, estos hemocitos pueden formar cápsulas de múltiples capas que

inmovilizan a los organismos invasores. Cuando las bacterias o los hongos están en gran número, tanto los hemocitos como las proteínas plasmáticas se pueden agregar, resultando en la formación de nódulos (Gupta, 1999).

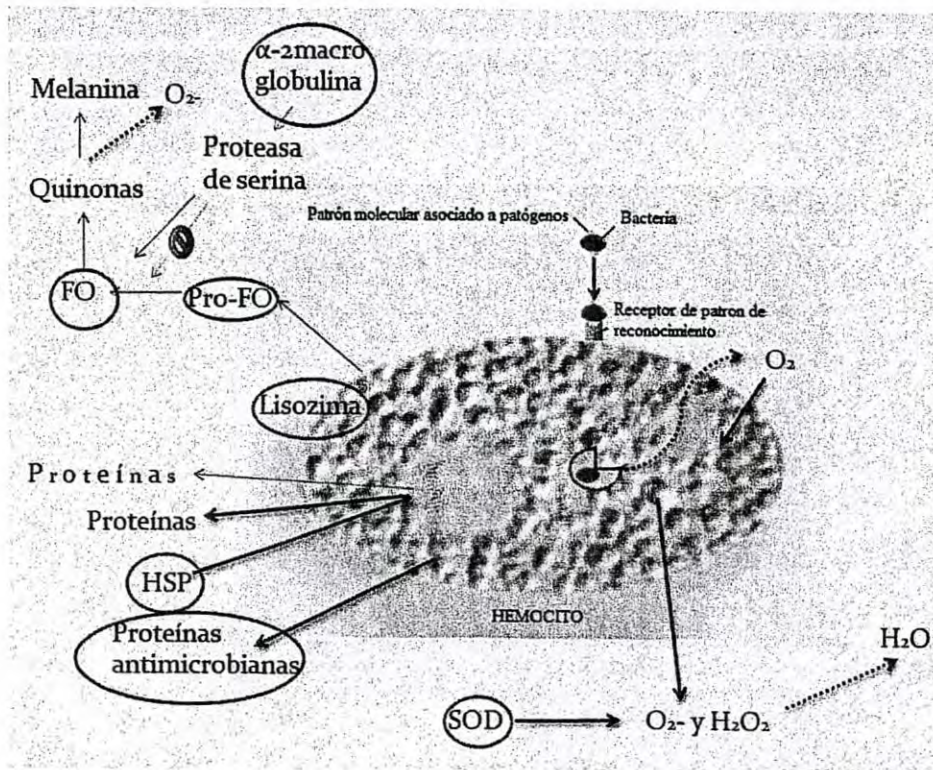


Figura 11. Principales moléculas de defensa utilizadas por los camarones.

II.3.11.5 Fenol oxidasa

La fenoloxidasas (PO, EC 1.14.18.1), es una tirosinasa que contiene cobre, juega un papel importante en la melanización, reparación de heridas y esclerotización de la cutícula. La PO es sintetizada como un zimógeno inactivo, llamado ProPO (Gupta, 1999). En los crustáceos está localizada dentro de los hemocitos como una enzima inactiva llamada profenoloxidasas (ProPO) y su transformación de ProPO a PO involucra muchas reacciones conocidas como el sistema de activación de la ProPO (figura 11 y 12). En el camarón el sistema ProPO es activado por β-1,3 glucanos y LPS. Esta activación involucra dos pasos, el

primero es la degranulación que ocurre cuando los hemocitos son estimulados por bacterias, LPS o β -1,3 glucanos para liberar las formas inactivas de ProPO y la enzima activadora de ProPO (PPAE). El segundo paso requiere la participación del calcio para la conversión de la PPAE inactiva en una proteinasa activa que en su momento transforma el ProPO en PO activo. Entonces, el PPAE en condiciones *in vivo*, es activado por calcio plasmático después de la degranulación de los hemocitos, la cual es inducida por estímulos externos, como LPS y los beta glucanos (Vargas-Albores *et al.*, 1998; Fagutao *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que el calcio estimula la actividad proteolítica que transforma la ProPO, por lo que se puede sugerir que el calcio solo participa una vez que PPAE y ProPO han sido liberadas de las células, lo que ocurriría después de un estímulo (Gollas-Galván *et al.*, 1997).

En los camarones, la melanización es debida a la acción de la PO que promueve la hidroxilación de los monofenoles y oxidación de los difenoles a quinonas, en respuesta a materia extraña invadiendo el hemocele y durante la reparación de heridas. Estas quinonas son subsecuentemente transformadas en melanina por reacciones no enzimáticas. Posteriormente, la melanina se une a la superficie de las bacterias e incrementa la adhesión de hemocitos a la bacteria, acelerando así su remoción por formación de nódulos (Fagutao *et al.*, 2011). Aun cuando se ha descrito una actividad antimicrobiana directa para la melanina, la producción de especies oxígeno reactivas como los aniones súper oxido y radicales hidroxilo durante la generación de las quinoides, también tienen un papel importante como antimicrobianos. Aunado a lo anterior, se activan las reacciones biológicas como la fagocitosis, encapsulación y nodulación (Gupta, 1999).

II.3.11.6 Tripsina

La tripsina y las enzimas tipo tripsina han sido estudiadas extensivamente en una gran variedad de filos debido a su papel central en la digestión y en otros procesos fisiológicos (por ejemplo: coagulación sanguínea, fibrinólisis, inmunidad celular y humoral, fertilización y desarrollo embrionario). La tripsina en los invertebrados tiene características tales como una independencia aparente de los iones de calcio, actividad hacia sustratos proteínicos naturales, un gran número de isoformas y pobre estabilidad a pH ácido. En el caso de los crustáceos, mucha de esta información ha sido obtenida en estudios en extractos crudos de enzimas

parcialmente purificadas (Perera *et al.*, 2012). Las tripsinas de los crustáceos han sido caracterizadas en langostinos, camarones y el cangrejo rey. Este tipo de tripsinas es más estable que la de los mamíferos. Un factor importante que determina la estabilidad de estas tripsinas es la autólisis, que se cree es resultado del reducido número de localizaciones alteradas de sitios de hendiduras autolíticas (Hehemann *et al.*, 2008).

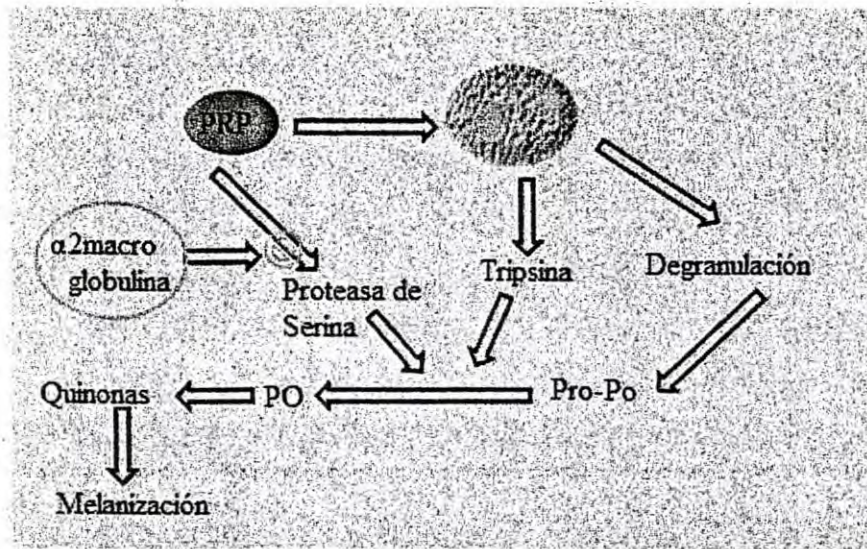


Figura 12. Activación y prevención de la fenol oxidasa.

La tripsina es una de las más importantes proteasas y contribuye con cerca del 6% de las proteínas solubles en la glándula digestiva (Shi *et al.*, 2010). Lai *et al.* (2005) encontraron que los puntos funcionales en la secuencia de *L. vannamei* corresponden a los supuestos sitios de hendidura de la tripsina de la ProPO del camarón, que se había sugerido era el sitio de hendidura para la activación de la ProPO, mismo sitio correspondiente a la ProPO de otros artrópodos. Cuando usaron la tripsina para activar la PO (Figura 12), concluyeron que la tripsina y el dodecil sulfato de sodio (SDS) actúan directamente en ProPO, pero las LPS, β -1,3 glucanos, zimosano y alginato de sodio necesitan afiliarse con un sistema complejo de reconocimiento y reacción; mientras la tripsina (la cual es similar a la enzima de activación de

la ProPO), puede incidir sobre la ProPO activándola a PO (Perazzolo y Barracco, 1997; Lai *et al.*, 2005).

La ProPO puede ser rápidamente activada a PO por un sistema de activación endógeno y los incitadores exógenos como la tripsina, lipopolisacáridos y el zimosano. En muchos insectos y crustáceos, esta activación ha sido usada por ser susceptible a la inhibición por inhibidores de proteasa de serina. Al incubar el fluido humoral de anfibios con los inhibidores de proteasa de serina STI y p-NPGB, antes de reaccionar con tripsina, zimosano o LPS, previene la activación de ProPO por lo menos en un 79%. Esto sugiere la presencia de proteasas de serina naturales en forma inactiva en el fluido humoral del sistema de activación de ProPO. Se ha mostrado que la activación de ProPO en el fluido humoral de anfibios por incitadores exógenos es significativamente incrementada en presencia de Calcio 10mM. Esto concuerda con la sugerencia de que la activación de ProPo es un proceso dependiente de calcio, esto puede ser debido a su papel en la regulación de la actividad de proteasa endógena (Pang *et al.*, 2004). Además de la ProPO, las hemocianinas también pueden ser activadas por tripsina (Cammarata y Parrinello, 2009).

II.3.11.7 Fagocitosis, especies reactivas de oxígeno y antioxidantes

El sistema de inmunidad innata activado también utiliza la fagocitosis para eliminar los microorganismos invasores. Durante este proceso se producen especies microbicidas oxígeno reactivas (ROS), como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iones hidróxido (OH^-) y oxígeno simple (O_2) y los intermediarios de oxígeno reactivos (ROI) y se necesitan que sean prontamente eliminados con la ayuda de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) encontradas en virtualmente casi todos los organismos que respiran oxígeno. Estas pueden destruir cuerpos invasores eficientemente si son dirigidos contra el blanco correcto (Holmblad y Söderhäll, 1999).

Durante el proceso de la fagocitosis se producen sustancias oxidantes bactericidas que actúan en contra de los intrusos, pero estas sustancias ROS pueden dañar también a las células del hospedero. La eliminación rápida y efectiva de las ROS es esencial para mantener el estado de salud y la supervivencia de los organismos, por lo que han desarrollado defensas antioxidantes, incluyendo mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que eliminan eficientemente el peróxido de hidrógeno de las células. La SOD posee la capacidad de

disminuir el anión superóxido generando como resultado agua y peróxido de hidrógeno. Las SOD se han clasificado en tres grupos mayores, dependiendo del ion metálico que contengan. La Mn-SOD se encuentra en las mitocondrias, la Fe-SOD en bacterias y la Cu/Zn-SOD en eucariotas. La SOD extracelular (EC-SOD) coopera en la destrucción de parásitos ingeridos o encapsulados durante la explosión respiratoria generada durante la fagocitosis (Campa-Córdova *et al.*, 2005; Gómez-Anduro *et al.*, 2006).

Los hemocitos de *L. vannamei* pueden ser estimulados por acetato de forbolmiristato (PMA), zimosano, LPS y laminarina, los que los llevan a producciones similares de aniones superóxido. Se ha asumido que las capacidades de defensa de los hemocitos estarán relacionadas con la edad del camarón. Bajo condiciones experimentales comparando *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum* y *V. harveyi*, todas las cepas, excepto *V. harveyi*, se unían a los hemocitos como inductores de fagocitosis y cuando eran usadas vivas, eran capaces de inducir la generación de iones superóxido. La respuesta de los hemocitos fue dependiente de la concentración de bacterias. Hay una importante variabilidad en la actividad entre individuos, en las bacterias vivas, con la excepción de la patogénica *V. harveyi*, para inducir la producción de superóxido (Muñoz *et al.*, 2000).

Los ROI y ROS son producidos durante el metabolismo aeróbico normal y se incrementan en condiciones fisiológicas que resultan en estrés oxidativo y durante reacciones de defensa. Los ROI y ROS son entonces rápidamente eliminados por las enzimas antioxidantes, las cuales pueden participar en la producción de compuestos oxígeno reactivos usados en la destrucción de parásitos englobados o encapsulados (Campa-Córdova *et al.*, 2002). Ji *et al.* (2011) encontraron un incremento significativo en la producción de aniones superóxido en camarones después de ser inyectados con *V. parahaemolyticus* y WSSV, concluyendo que el sistema ROS juega un papel muy importante en la defensa contra patógenos extraños.

II.3.11.8 α 2-macroglobulina

La α 2-macroglobulina (A2M) es un elemento evolutivamente conservado del sistema inmune innato, cuya función es la limpieza de las proteasas activas de los fluidos tisulares, ya que estas proteasas cuando están libres en la sangre o espacios tisulares pueden ocasionar un

daño considerable y en respuesta a este reto, los animales han desarrollado una colección de diversos inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas son de dos clases fundamentales, una de las cuales es la A2M, que reacciona por un mecanismo único que involucra el envolvimiento físico de la proteasa blanco con el doblamiento de la molécula de A2M. Al unirse al sitio activo de la proteasa, el sitio activo inhibidor destruye su actividad proteolítica.

La A2M muestra un mecanismo único de interacción con su proteasa blanco el cual es iniciado por su hendidura proteolítica a un motivo definido que es construido como un tramo expuesto y muy flexible de 30 a 40 aminoácidos que presenta una serie de enlaces peptídicos que invitan a los blancos de la mayoría de las proteasas existentes. Esto significa que, cual sea la proteasa, encontrará un blanco para su ataque proteolítico en esta región “cebo” de la molécula de A2M. La hendidura proteolítica de la región cebo realiza un rápido doblamiento de la molécula de A2M para producir un bolsillo interior cerrado que ahora contiene la proteasa blanco, atrapada en los dobleces de la A2M.

Aun cuando la α 2-macroglobulina ha sido vista como un inhibidor de proteasa, debe ser considerado como una molécula de unión de proteasas cuya principal función es entregar su cargamento de proteasas a una vía endocítica de limpieza de proteasas, que se encarga de degradarlas a componentes de bajo peso molecular que aparecen después en la hemolinfa. El cambio conformacional de la proteasa reactivada de A2M sirve tanto para entrapar a la proteasa como para exponerla a un dominio previamente relativo en el término carboxilo, el dominio de receptor de unión, que es reconocido por los receptores de superficie celulares, lo que lleva a la unión y endocitosis del complejo proteasa-A2M. Esto remueve la proteasa de la circulación, neutralizando por tanto, sus acciones potencialmente perjudiciales (Enghild *et al.*, 1990; Saravanan *et al.*, 2003; Armstrong, 2010).

II.311.9 Lisozima

La lisozima fue una de las primeras proteínas antibacterianas conocidas. En los invertebrados es bien sabido que la expresión de la lisozima es regulada y responde a un reto bacteriano y es comúnmente incluida en la familia de los péptidos antibacterianos, basados en su pequeño peso molecular y efecto bacteriolítico. Aun así, la lisozima ejerce su función antibacterial de tipo C catalizando la hidrólisis de los peptidoglicanos de la pared celular de las

bacterias (Jolles y Jolles, 1984; Sotelo-Mundo *et al.*, 2003), y actúa como una defensa inmune no específica en los camarones peneidos. La lizosima de estos camarones ha sido bien caracterizada, es una proteína específica de los hemocitos que se ha demostrado posee actividad lítica contra una variedad de especies de bacterias Gram positivo y negativo, incluyendo el patogénico *Vibrio* spp.

La actividad enzimática de la lizosima es específica en lisados de hemocitos, siendo ausente en hemolinfa libre de células y se estima que comprende aproximadamente el 4% de las proteínas de los hemocitos en *L. vannamei*. La caída rápida y sostenida del número circulante de hemocitos es acompañada por un incremento significativo y persistente de transcritos de lizosima lo que sugiere que conforme la bacteria se disemina vía circulación, el tránsito de hemocitos a los tejidos va siguiendo un patrón predecible. Burge *et al.* (2007) sugirieron que la disminución de marcas de lizosima vistas en los tejidos (y hemocitos circulantes) durante una fase temprana de la infección es debida a una infiltración masiva de hemocitos granulares en el sitio de infección, ya que ellos vieron que en el sitio de inyección con *Vibrio* aumentó el mRNA de lizosima, lo que los llevó a concluir que la migración de hemocitos hacia el sitio de inyección (herida) ocurre rápidamente después de que el cuerpo es comprometido y que altas concentraciones de hemocitos expresando lizosima permanecen en la locación por lo menos 48 horas después del reto.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la acción de lizosima en varias especies de camarones en donde se ha encontrado que la lizosima de *Marsupenaeus japonicus* desarrolla actividades líticas contra muchas especies de *Vibrio* incluyendo *V. penaeicida* y a una gran variedad de patógenos (Hikima *et al.*, 2003). La actividad antibacteriana de la lizosima del camarón *L. vannamei* contra *Vibrio* sp. es al menos igual a los valores contra la Gram positiva *Micrococcus luteus* y más activa contra los patógenos del camarón *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus* (de la Re-Vega *et al.*, 2006). La proteína recombinante de *Fenneropenaeus chinensis* mostró alta actividad antibacteriana contra algunas bacterias Gram positivas y relativamente baja actividad contra Gram negativas. Todo esto sugiere que la lizosima puede ser uno de las moléculas importantes contra los patógenos en la inmunidad innata del camarón (Bu *et al.*, 2008).

II.3.11.10 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son un grupo diverso de moléculas efectoras del sistema inmune que son utilizadas por los organismos multicelulares para prevenir o combatir una infección por microbios (Cuthbertson *et al.*, 2008). La actividad de los AMP debe iniciar en la membrana citoplasmática ya que la mayoría de ellos permeabiliza la membrana microbiana. Se han propuesto muchos modelos de cómo se insertan a la membrana llevando a la formación de canales de iones, poros transmembrana o rupturas de membrana extensivas. Hay péptidos que no forman poros, pero su actividad antimicrobiana es a una concentración por lo menos cuatro veces de magnitud bajo la concentración que disturba la membrana bacteriana.

Los péptidos de cada estructura familiar recaen en un mecanismo antimicrobiano que puede no implicar despolarización de la membrana del microorganismo blanco, sugiriendo un determinante molecular interno. Ciertos péptidos son incapaces de causar despolarización de la membrana a la concentración mínima inhibitoria (MIC), mientras otros causan máxima despolarización muy abajo del valor de la MIC. Hay evidencias que soportan que ciertas macromoléculas, así como funciones intracelulares, se involucren como el blanco final para la actividad antimicrobiana del AMP. Aunque las membranas bacterianas son una vía de entrada necesaria para los AMPs, por lo tanto, determinan parte de la selectividad de los AMPs, así como su eficiencia (Condé *et al.*, 2012). Los péptidos antimicrobiales son importantes en la defensa inmune innata, especialmente en aquellos animales que carecen de inmunidad adaptativa. Debido a su pequeño tamaño, estructura anfipática y carácter catiónico, pueden rápidamente difundirse al sitio de infección (Swapna *et al.*, 2011).

Los AMPs, que son constitutivamente expresados o inducidos, proveen medios de defensas rápidos y efectivos. La mayoría de estos genes codifican péptidos que son movilizados poco después de una infección y actúan rápidamente para neutralizar una amplia variedad de microbios (bacterias, virus y protozoarios). La naturaleza ubicua de los péptidos antimicrobianos sugiere que su papel en la naturaleza ha estado presente desde hace mucho tiempo y debe haber contribuido al mejoramiento de un organismo. Muchas de estas moléculas ejercen un mecanismo de acción que parece ser único y altamente complejo. Aun así, los AMPs exhiben, en algunos casos, significativos grados de citotoxicidad para el hospedador reflejando un blanco celular no selectivo (Condé *et al.*, 2012).

Considerando que los AMPs son barreras naturales contra las infecciones bacterianas, los patógenos deberían haber desarrollado una variedad de estrategias para presentar resistencia a las defensas del hospedador. Actualmente, el único modelo estructural que explica el mecanismo de acción de los AMPs, dice que actúan desde el exterior y sobre la membrana del patógeno, pudiendo ser porque aumenta la permeabilidad de su membrana o por desestabilización de la misma debido a cambios en la carga neta del sistema. Como las membranas biológicas son en efecto fluidos dinámicos, la generación de resistencia parece ser menos probable que ocurra. No obstante, los patógenos han desarrollado contra ataques no para resistir, sino al menos para limitar la efectividad de los AMP, como modificaciones químicas y/o alteraciones de energía dependiente de las bombas a nivel de membrana (Marshall y Arenas, 2003).

Similarmente, los AMP del camarón, incluyendo las penaeidina, crustina y factores antilipopolisacáridos (ALF), juegan un papel importante en las respuestas antibacteriales y antivirales. Particularmente, los ALF puede proteger al camarón contra una infección por WSSV (Wang *et al.*, 2011). Un nuevo péptido antimicrobiano similar a la crustina fue identificado en los hemocitos de *Penaeus monodon* y mostró una actividad antimicrobiana fuerte tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluyendo *V. harveyi*, una bacteria patógena muy importante en la acuicultura (Amparyup *et al.*, 2008).

Debido a su pequeño tamaño, estructura anfipática y carácter catiónico, los AMPs se pueden difundir rápidamente al punto de infección y pueden matar bacterias en concentraciones micromolares por un mecanismo no mediado por receptor como modo de acción. Muchos péptidos antimicrobianos muestran una remarcada especificidad por células procariotas y baja toxicidad para las células eucariotas. Como una de las AMPs importantes en crustáceos, las crustinas tienen secuencias que han sido descritas en los camarones peneidos. Los AMPs juegan un papel importante en la defensa del camarón por lo que los niveles de expresión de estas moléculas son posibles indicadores del estatus inmune del camarón. Se ha probado que los hemocitos son el sistema de producción y de almacenamiento de crustinas a muy altos niveles. Generalmente, las expresiones de crustina eran más elevadas en los hemocitos después de un reto con WSSV, sugiriendo su papel en la defensa antiviral (Swapna *et al.*, 2011).

Las penaeidinas fueron primeramente descubiertas en el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) por extracción de proteínas de un grupo de hemocitos de varios organismos. En la descripción inicial y consecuente examinación a través de formas recombinantes de penaeidinas, fue aparente que son activas primeramente contra bacterias Gram positivas, con algunos efectos sobre hongos a mayores concentraciones. Además, se encontró evidencia que indica que los hemocitos que contienen penaeidinas en gránulos liberan su contenido intracelularmente y pueden lisar en el proceso de entrega de las penaeidinas al sitio de infección. Además, las penaeidinas pueden estar involucradas en el reconocimiento de los fagocitos para rodear microbios por las células inmunes (aglutinación de las bacterias), esto en adición a sus actividades antimicrobianas (Cuthbertson *et al.*, 2008).

La variedad que es observada en las funciones de las penaeidinas muestra el potencial para diversidad *in vivo* de funciones inmunes y especificidad inmune (antibiótica) en ellas. La expresión de isoformas específicas de penaeidinas en diferentes tejidos, dependiendo en el tipo de inmunógeno detectado por el camarón y el camino en el cual fue detectado, puede probar que éstas moléculas son parte de un más eficiente camino de respuesta al ataque inmune y a la agresividad patogénica de los microbios (Cuthbertson *et al.*, 2008; Rolland, 2010; Woramongkolchai *et al.*, 2011).

II.4 Proteínas de choque térmico (HSPs)

El término estrés tiene diferentes significados, en su origen fue definido por Selye (1950), como la suma de todas las respuestas fisiológicas por las cuales un animal trata de mantener o reestablecer un metabolismo normal en frente de una fuerza física o química. Otra definición más acertada para los organismos acuáticos dice que el estrés es la etapa producida por un factor ambiental o de otro tipo, el cual extiende las respuestas adaptativas del animal más allá de su nivel normal o disturba la función normal de tal manera que las oportunidades de sobrevivir se reducen. Los cambios que tienen lugar en respuesta a los estresores son conocidos como síndrome de adaptación general (GAS). Esto son una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que toman lugar en tres fases, la primera la reacción de alarma, seguido de la etapa de resistencia, cuando las adaptaciones están tomando lugar para alcanzar la homeostasis en las nuevas circunstancias y, por último, la etapa de agotamiento, si la adaptación es inadecuada y no se alcanza la homeostasis. Los componentes del GAS no son

específicos de la especie ni de los estresantes, pero la totalidad de la respuesta para cada estresante puede variar (Roberts *et al.*, 2010).

Como los inductores de las HSPs no están restringidos a estrés calórico pueden ser estimulados por cualquier estresante suficientemente intenso. La sobreexpresión de las HSPs es generalmente descrita como parte de una respuesta celular al estrés. La regulación del gen de transcripción de los HSP es mediada por la interacción de los factores de choque calórico (HSFs) con los elementos de choque calórico en las regiones promotoras del gen (Figura 13). Los HSFs de animales y plantas tienen una estructura marcadamente similar, pero presentan diferencias significativas en el complemento de la actividad de los miembros de la familia de HSF en diferentes grupos de organismos (Pockley, 2003).

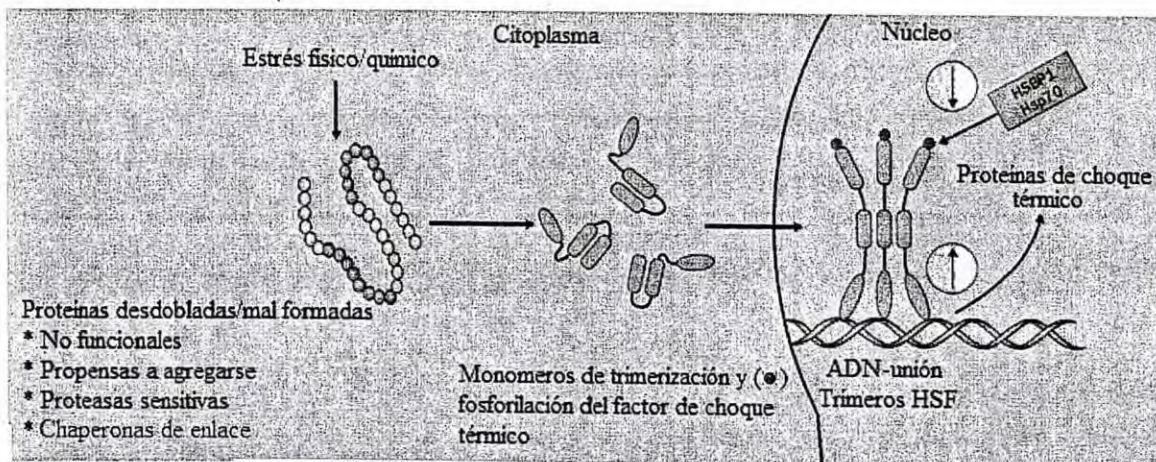


Figura 13. Inducción y regularización de las proteínas de choque térmico (Pockley, 2003).

La sobreexpresión es directamente estimulada durante una excursión hipo metabólica; este patrón se presenta en organismos que no pueden predecir cuándo serán necesarios estos episodios de grado de depresión metabólica. Las HSPs elevadas en estados hipo metabólicos indudablemente contribuyen a la cito protección y sobrevivencia de largo término durante la dormancia por proteger al proteoma. Esto es crítico por tres razones: primero una fuerte supresión de la expresión genética, síntesis de proteína y degradación de proteínas como un mecanismo salvador de energía durante el hipo metabolismo, significa que el alcance para la

síntesis de nuevas proteínas y/o degradación de proteínas dañadas es bajo y, por ello, la protección de la estructura/función de los proteomas existentes se vuelve crítico. Segundo, la capacidad elevada de las chaperonas provee una defensa preexistente contra estresantes que son impuestos durante la excursión metabólica (ejemplo: protección de proteínas en especies tolerantes al congelamiento y/o desnaturalización de proteínas bajo profundidades impredecibles, duración o ciclos de congelamiento). Tercero, la excitación del hipometabolismo es a menudo rápido y estresante (ejemplo, involucrar grandes cambios en temperatura, oxígeno, ROS) y las HSPs pueden tener un papel clave asegurando que la transición regrese al estado de excitación con impacto mínimo negativo del organismo (Storey y Storey, 2011).

Las HSPs son chaperonas intracelulares moleculares evolutivamente antiguas y altamente conservadas, constituyen muchas súper familias multigénicas. Son las proteínas intracelulares solubles más abundantes y ubicuas y llevan a cabo una serie de funciones que son esenciales para la supervivencia celular presentes en diferentes compartimientos subcelulares (ejemplo: núcleo, mitocondria, cloroplastos, citosol, retículo endoplasmático) de todos los tipos de células procariontas y eucariotas (figura 14). La nomenclatura inicial para los HSPs se basa en su peso molecular aparente (ejemplo: HSP 84, 85, 86, etc.) y fueron agrupadas de acuerdo a su talla más cercana (ejemplo: familia HSP90 kD). La disponibilidad de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida permite ahora una clasificación de sistematización con bases filogenéticas (Feder y Hofman, 1999; Srivastava, 2002; Robert, 2003).

Como proteínas chaperonas moleculares, las HSPs son responsables de diversos procesos celulares como el doblaje de proteínas, activación, transporte y ensamblaje oligomérico. No solo mantienen la función proteica apropiada, sino que también promueven la función correcta de las proteínas patológicas cuando se expresan inapropiadamente (Eustace y Jay, 2004). Aun cuando son constitutivamente expresadas, esta expresión se ve aumentada por distintos perturbadores fisiológicos o estresantes (ejemplo: temperatura elevada, hipoxia, isquemia, privación de glucosa, cáncer o infección microbiana). Las HSPs desarrollan funciones biológicas esenciales bajo condiciones fisiológicas o estresantes (Robert, 2003).

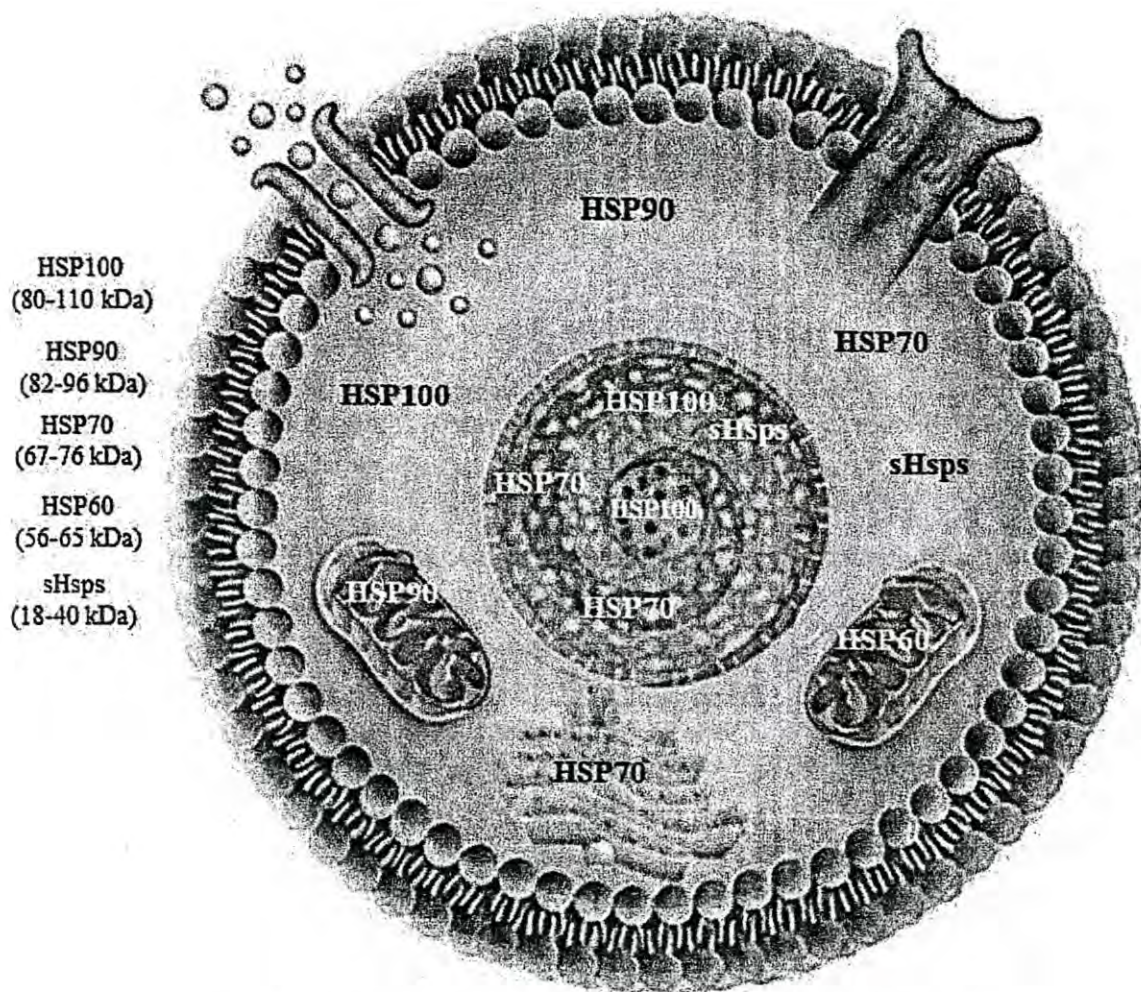


Figura 14. Localización de las principales HSPs en la célula.

El argumento más fuerte de que las HSPs tienen una función protectora es la fuerte correlación entre su inducción y la inducción de termo tolerancia. Hay experimentos de termo tolerancia con diseños y resultados similares, tanto en células cultivadas, como en diversidad de organismos. La observación básica es que el grupo de células u organismos muere rápidamente cuando es cambiado directamente de su temperatura normal de crecimiento a una temperatura mucho más alta, mientras que al grupo igual, al que se le da un tratamiento de

precalentamiento medio para inducir las HSPs, muere mucho más lentamente. Más aun, los tratamientos de precalentamiento inducen la tolerancia a otras formas de estrés y otras formas de estrés inducen tolerancia al calor. Aparentemente entonces, las proteínas de choque térmico son inducidas por estrés moderado, estresantes que por sí mismos no son letales, en orden de proteger al organismo de estresantes aún más severos (Lindsquit y Craig, 1988).

Las HSPs mejor entendidas son aquellas con masas moleculares de 60, 70, 90 y 110 kDa. Estas HSPs mayores son expresadas a 37 °C en ausencia de choque térmico. Las HSP70 y 90 se han encontrado en todos los organismos, mientras las HSP110 están presentes principalmente en las células de mamíferos. Un segundo grupo de HSPs (algunas veces llamados HSPs menores) son inducidas bajo condiciones de privación de glucosa e incluyen proteínas reguladas por glucosa (GRP), como las de 34, 47, 56, 75, 78, 94 y 174 kDa. Un tercer grupo de HSPs son las de bajo peso molecular; estas tienen pesos moleculares de alrededor de 20 kDa; son encontradas en elevados niveles en células de *Drosophila* calentadas y en miocitos cardiacos isquémicos. Una pequeña porción de su secuencia de aminoácidos es similar a la α -cristalina de los mamíferos (Kiang y Tsokos, 1998).

Las HSPs de las células de mamíferos pueden activar la inmunidad innata en ausencia de contaminantes bacterianos. Aunque algunos de estos efectos parecen ser mediados por los TLRs, su participación en cada uno de los efectos observados debe ser cuidadosamente analizada. Si las HSPs son dotados con actividad inmuno-estimuladora sigue en duda; aun así, el alto grado de conservación de secuencias en las HSPs a través de la evolución sugiere que las HSPs de diferentes organismos puede compartir propiedades inmuno-estimuladoras. Los complejos péptidos HSP son fuentes de información que puede influenciar la respuesta inmune, manifestando actividades pro y anti inflamatorias. En esta línea, se puede diferenciar bien entre inflamación séptica y estéril. La inflamación estéril está involucrada en la homeostasis del cuerpo y resulta de estímulos endógenos. La inflamación séptica se presenta para atacar a los agentes infecciosos que la estimulan. Solas las HSPs juegan un papel en ambos tipos de inflamación, impulsando y controlando la respuesta inmune. En la inflamación séptica, las moléculas microbiales pueden formar complejos con HSPs extrañas o propias para facilitar la inducción de una respuesta inmune efectiva. Por el contrario, los productos microbiales pueden potencialmente interferir con los mecanismos necesitados en la

inflamación estéril para la homeostasis de cuerpo, estimulando el desarrollo de la enfermedad inflamatoria (Quintana y Cohen, 2005).

Las HSPs son altamente conservadas y bien conocidas por su rápida respuesta al estrés ambiental (Xu y Quin, 2012). Entre otras funciones, actúan como acompañantes, ya que tienen un papel activo en el crecimiento y la diferenciación celular, señalan comunicación de célula a célula y participan en la duplicación, el transporte y el ensamble de las proteínas; son sintetizadas en respuesta al estrés, que puede provenir de temperaturas extremas, el agotamiento de la energía celular, la concentración extrema de iones y otros osmolitos, gases y diversas sustancias tóxicas, la apoptosis y la respuesta inmune (Dong y Xiang, 2007; Roberts *et al.*, 2010; Danwattananusorn *et al.*, 2011; Storey y Storey, 2011). El proceso de activación de las HSP genera moléculas con capacidad antioxidante, la cual es importante para defenderse a sí mismos de los agentes patógenos, especialmente de virus.

Las HSP90 se han reportado como una proteína dímera y su actividad requiere ATP, tanto en eucariotas como en procariotas. Esta proteína juega un papel crucial en el doblamiento de proteínas como un mecanismo de protección contra el estrés calórico. A diferencia de otras chaperonas moleculares, las HSP90 también se involucran en muchos sistemas de transducción de señales como las proteínas de cinasa en la familia de MAP cinasas y en los receptores nucleares para hormonas. Más aun, también juega un papel importante en la mediación de la activación de ADN y LPS de los macrófagos del hospedador. Rungrassamee *et al.* (2010), presentaron evidencia para la participación de HSP90 en *P. monodon* bajo estrés calórico y bacteriano, concluyendo que puede ser un buen candidato como biomarcador para evaluar el nivel de estrés ambiental y de enfermedad en los cultivos de *P. monodon*.

En cuanto a la expresión de HSP, se han realizado estudios que muestran que la HSP90 está directamente implicada en la resistencia de los organismos, ya que puede proteger a las células contra la apoptosis inducida por choque térmico (Malago *et al.*, 2002; Spees *et al.*, 2002; Yavelsky *et al.*, 2004). Por ejemplo, en los tejidos de *P. monodon* la expresión de este gen se incrementó significativamente después de 30 minutos de tratamiento a 37 °C (Jiang *et al.*, 2007). Li *et al.* (2009) encontraron que los niveles de expresión relativos de ARNm de HSP90 en camarones juveniles durante la primera hora en el choque térmico (35 °C) fueron significativamente mayores (8.3 veces) cuando se compara con los valores previos al

tratamiento, y se mantuvo alta, alcanzando 12.3 veces a las 6 horas posteriores. En este estudio, la más alta expresión de este gen está presente en el camarón mantenido a altas temperaturas (32 °C), incluso en el grupo que no estaba en tratamiento térmico, lo que sugiere que el aumento de la expresión fue causada por la temperatura. Danwattanasorn *et al.*, (2011), reportaron que en *Marsupenaeus japonicus*, después de la inyección de WSSV, sólo se aumenta la expresión de HSP90. Zhang *et al.* (2012) reportaron que los niveles de expresión de SP-HSP90 alcanzaron el nivel más alto en 6 h y luego disminuyó a las 12 h, por lo tanto, parecen funcionar como una chaperona esencial que interviene en la respuesta inmune para hidrolizar ATP y proteger el cuerpo contra el daño bacteriano.

Los miembros de las familias HSP60 y HSP70 son las HSPs más involucradas en las enfermedades autoinmunes y la inmunidad innata. Las HSP60 o familia de chaperonas son un grupo de proteínas con estructura cuaternaria de forma distintiva de anillo o dona doble. Una importante actividad de las HSP60s es la mediación del doblado nativo de las proteínas de manera ATP dependiente. Los miembros de la familia de las HSP70 son inducibles por el estrés y proteínas constitutivas que juegan un papel esencial en el metabolismo de las proteínas bajo condiciones normales y de estrés, incluyendo el doblado proteico *de novo*, translocación de membrana, degradación de proteínas mal dobladas y otros procesos regulatorios (Zhou *et al.*, 2010).

Yan *et al.*, (2010), en un estudio realizado en hemocitos de camarón, encontraron una unión entre la actividad de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) y la sobrevivencia celular en el sistema del camarón. Ellos proponen que existe una interacción entre la expresión de HSP70 y los niveles de apoptosis celular en los hemocitos de camarones infectados. En las etapas tempranas de la infección, HSP70 parece ser estimulada por una infección por WSSV para inhibir la apoptosis celular. Contrariamente, en etapas tardías de la infección por WSSV, encontraban una ausencia de la actividad de inhibición de apoptosis, lo que confirma que hay más de la HSP70 además de su papel como chaperona. En estudios realizados con camarones *L. vannamei*, se encontró que HSP60 y HSP70 están potencialmente involucradas en el sistema inmune relacionado a infecciones bacterianas y que la vía de transducción de señales de Ca puede estar involucrada en la respuesta inmune del camarón en etapas de post infección temprana contra *V. alginolyticus* y *Staphylococcus aureus* (Zhou *et al.*, 2010). Danwattanasorn *et al.* (2011) reportaron en un estudio realizado con camarones

Marsopenaeus japonicus, que los niveles de RNAm se elevaban significativamente por choque térmico a 32 °C y que la expresión de HSP40, HSP70 y HSP90 aumentan después de una inyección con WSSV.

El virus de la mancha blanca, WSSV y el *V. alginolyticus* son dos patógenos comunes en la industria de la acuicultura. La infección activa la expresión de HSP60 en etapas tempranas del periodo experimental. Aun así, la infección por WSSV era aguda y los camarones infectados murieron de 5 a 6 días. La expresión de HSP60 permaneció fuertemente reducida hasta que los organismos murieron. Resultados similares fueron encontrados en otros trabajos con HSP21. Aparentemente el WSSV ocupa los recursos del hospedador no permitiéndole expresar los HSPs, o el WSSV puede apagar a las HSP para detener su actividad chaperona en orden de incrementar la expresión de las proteínas virales. Todo esto indica que la HSP60 regula la respuesta inmune por una vía intrínseca (Huang *et al.*, 2011). Kim *et al.* (1998) propusieron que las chaperonas HSP de bajo peso molecular (como la HSP10) contienen una estructura de ventana a la que la proteína desnaturalizada puede ser atraída debido al estrés y esto puede prevenirla de la adición y desplegamiento.

II.5 Principales enfermedades del camarón

Se han reportado más de veinte virus con capacidad de infectar a los camarones marinos. Muchos no están asociados a signos clínicos de alguna enfermedad y otros solo han sido vistos en microscopía electrónica y han sido pobremente descritos (Walker *et al.*, 2009). Ocho patógenos están listados actualmente en la Organización Mundial de Salud Animal (World Organization for Animal Health) como causantes de enfermedades de crustáceos: la plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*), hepatopancreatitis necrotizante (NHP) y las ocasionadas por virus (figura 15) en camarón: necrosis hematopoyética e hipodermal infecciosa (IHHNV), mionecrosis infecciosa (IMNV), síndrome de Taura (TSV), enfermedad de la mancha blanca (WSSV), enfermedad de la cola blanca, enfermedad de la cabeza amarilla (YHV) (OIE, 2013; Lightner, 2003).



Figura 15. Microfotografías electrónicas de preparaciones de purificados (por ultra centrifugación de gradientes en sacarosa o cloruro de cesio) de virus de camarones peneidos, teñidos con PTA al 2%. Las barras de escala están en nanómetros. Las imágenes corresponden a: 1: IHNV; 2: TSV; 3: WSSV; 4: YHV; 5: IMNV (Lightner, 2012).

Estudios de laboratorio han mostrado que algunos peneidos importantes son susceptibles a infecciones por WSSV y YVH y a sufrir serias enfermedades cuando son expuestos durante ciertas etapas de vida. Los Estados Unidos de América (USA) es el mercado más grande de camarón, anualmente importan miles de toneladas de camarones peneidos congelados de los países asiáticos en los cuales el WSSV y el YHV son actualmente enzoóticos y causando serias epizootias. Se ha demostrado que estos virus pueden estar presentes en camarones congelados importados en el mercado de USA, lo que puede hacer significativo las amenazas de introducción accidental y diseminación de estos patógenos en las industrias de cultivo del camarón o en los lotes silvestres (Lightner, 1997). Sankar *et al.* (2011), después de analizar durante ocho meses organismos silvestres en busca de WSSV en la India, concluyeron que lo extenso de la contaminación causada por el virus se rige principalmente por la presencia de granjas camaronícolas y que la dispersión del virus en el ambiente silvestre es mayor durante abril y mayo y mínimo durante los meses de julio y agosto. La alta carga viral se debió al drenaje de los afluentes infectados no tratados de las plantas directamente a los cuerpos de agua. La carga viral mínima puede ser debida a la dilución por el agua fresca que llega durante la estación de lluvia (Sankar *et al.*, 2011).

Entre las enfermedades que han causado mayor mortalidad de especies de camarón económicamente importantes, se encuentran las de etiología viral. El síndrome de la mancha blanca (WSSV: White spot syndrome virus) es ocasionado por un virus altamente letal que pertenece a la familia Nimaviridae, género *Whispovirus*. De acuerdo con las secuencias del genoma completo, elucidado en 1992 en Tailandia, Taiwán y China, se detectaron tres genotipos de WSSV. Más tarde, un cuarto aislado del virus fue detectado en América en 1999 y recientemente se han detectado mutaciones en los genotipos virales en camarones infectados

Los camarones afectados de manera aguda muestran una rápida reducción del consumo de alimento, se vuelven letárgicos y tienen pérdidas de cutícula con manchas blancas (de ahí el nombre de enfermedad de la mancha blanca) de 0.5 a 2.0 mm de diámetro, las cuales son más aparentes en la superficie interior de su caparazón. Las manchas blancas representan depósitos anormales de sales de calcio en la epidermis cuticular. En muchos casos los animales moribundos muestran una coloración rosada a café rojiza, debida a la expansión de cromatóforos cuticulares y algunas o ninguna mancha blanca (Figura 17). Las poblaciones que muestran estos signos presentan una mortalidad que alcanza el 100% de 3 a 10 días después de iniciados los signos clínicos (Lightner, 2011). Se han realizado estudios en donde se reportan poblaciones de camarones sin signos de WSSV, pero una vez presentados, los animales morían de 3 a 10 días después (Peinado-Guevara y López-Meyer, 2006).



Figura 17. Imágenes mostrando algunos de los signos que presentan los animales infectados con WSSV (Sankar *et al.*, 2013; Lightner, 2011 y Afsharnasab *et al.*, 2009).

Hablar de la morfología y ultraestructura del virus de mancha blanca no es completamente claro; se ha observado que los viriones del WSSV muestran una morfología de ovoide a bacilar con una extensión larga en una extremidad de su envoltura (Sánchez-Paz, 2010). En aislados virales que ocasionaron WSSV en cultivos de camarón en seis distintos países mostraron similitud en tamaño y morfología. Las partículas del virus encontradas en los núcleos de las células infectadas son de forma ovoide o elíptica (Figura 18) rodeadas por una

envoltura trilaminar, esta envoltura trilaminar claramente muestra dos capas electro opacas separadas por una capa transparente (Kasornchandra *et al.*, 1998).

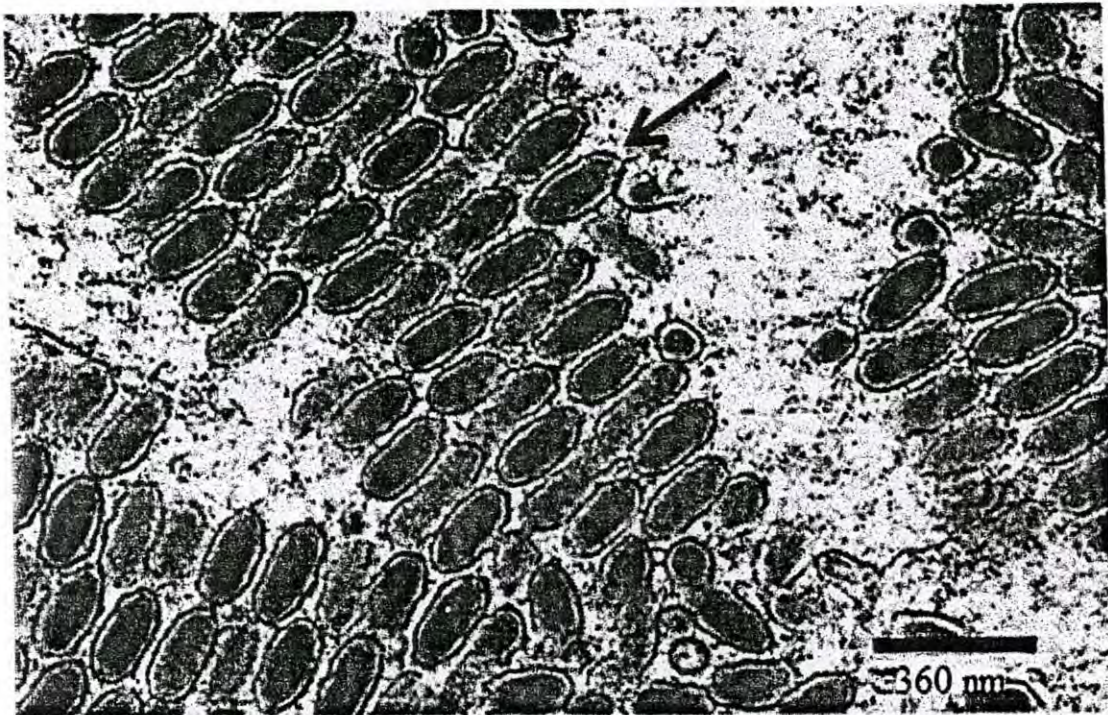


Figura 18. Microfotografía electrónica porción del núcleo de una célula infectada en donde se observan numerosas partículas virales baciliformes rodeadas por una envoltura trilaminar (Kasornchandra *et al.*, 1998).

El tamaño del virus varía entre 210 y 420 nm de largo y 70-167 nm de diámetro. Un virión está formado por un complejo de macromoléculas específicamente dobladas y ensambladas para la protección y entrega de los genomas virales. Entre el conjunto completo de macromoléculas, las proteínas estructurales son particularmente importantes, la información hasta ahora obtenida indica que el WSSV está conformado por lo menos por 58 proteínas estructurales. La envoltura viral del WSSV consiste por lo menos de 35 proteínas distintas, de las cuales VP28 y VP26 son las más abundantes, conformando aproximadamente el 60% de las proteínas que constituyen la envoltura (Figura 19). De las proteínas de la

nucleocápside del WSSV, se han reportado la VP15, VP664, además se han reportado a VP51 y VP76 como componentes estructurales menores asociados a la nucleocápside viral (Sánchez-Paz, 2010; Seibert y Pinto, 2012).

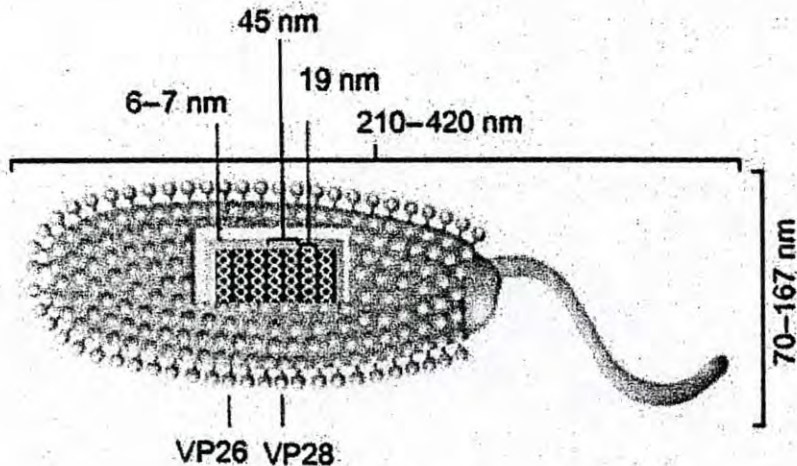


Figura 19. Representación esquemática de la morfología de una partícula viral (Sánchez-Paz, 2010).

En los últimos años, los estudios de WSSV se han enfocado principalmente en las proteínas estructurales, de las cuales, más de 30 proteínas correspondientes a los ORFs (cuadros abiertos de lectura) de WSSV han sido identificadas como proteínas de envoltura y proteínas parecidas al colágeno. Se han realizado investigaciones para saber si los camarones libres de patógenos específicos (SPF) son portadores asintomáticos de WSSV, midiendo la expresión genética del virus en camarones SPF e infectados, encontrando tres genes de WSSV con expresión relativamente alta en los camarones SPF. Se amplificaron las secuencias virales identificándolas como pertenecientes a los ORFs 151, 366, y 427 del virus, soportando la sugerencia de que estos camarones SPF en realidad son portadores asintomáticos (Khadijah *et al.*, 2003). Los tres genes asociados a la latencia fueron identificados en camarones SPF por microarreglos, entre estos el ORF89 se encontró que es un represor de la transcripción

(Hossain *et al.*, 2004) y ORF427 puede interactuar con la fosfatasa del camarón (Lu y Kwang, 2004). Basado en RT-PCR y PCR tiempo real, se ha detectado la transcripción de ORF403 en camarones SPF, lo que lo sugiere como gen de latencia asociados ya que es capaz de unirse a las proteínas fosfatasa (PPs) caracterizadas con anterioridad como compañeras de interacción de otra proteína latente, la ORF427, lo que hace que ORF403 actúe como un regulador del estado de latencia del WSSV en virtud de su función como ligasa E3 (He y Kwang, 2008).

III. HIPÓTESIS

El mantenimiento de *Litopenaeus vannamei* a diferentes temperaturas e infectados con el virus de la mancha blanca, produce respuesta diferencial de la expresión de proteínas de defensa.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Conocer el efecto de la temperatura sobre la expresión de proteínas de defensa en *Litopenaeus vannamei*

IV.2 Objetivos específicos

- a) Evaluar la concentración de proteínas de defensa (fenoloxidasa, lisozima, α 2-macroglobulina, súper óxido dismutasa (SOD) y proteínas de actividad antimicrobiana para conocer la actividad del sistema inmune en *Litopenaeus vannamei* inoculados con WSSV a tres temperaturas (20, 29 y 32 °C).
- b) Evaluar la expresión de los genes *ProPO*, *Hsp10*, *Hsp60* y *Hsp90* en *Litopenaeus vannamei* inoculados con WSSV a tres temperaturas (20, 29 y 32 °C).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Colección de muestras

El experimento se llevó a cabo con 120 camarones (*Litopenaeus vannamei*) de aproximadamente 15 g, proporcionados por la camaronícola Cruz de Piedra, ubicada en el municipio de Guaymas, Sonora, México, a 110.676944° de longitud oeste y 27.951667° de latitud norte (Figura 20). Estos camarones fueron proporcionados el 15 de agosto del 2011.

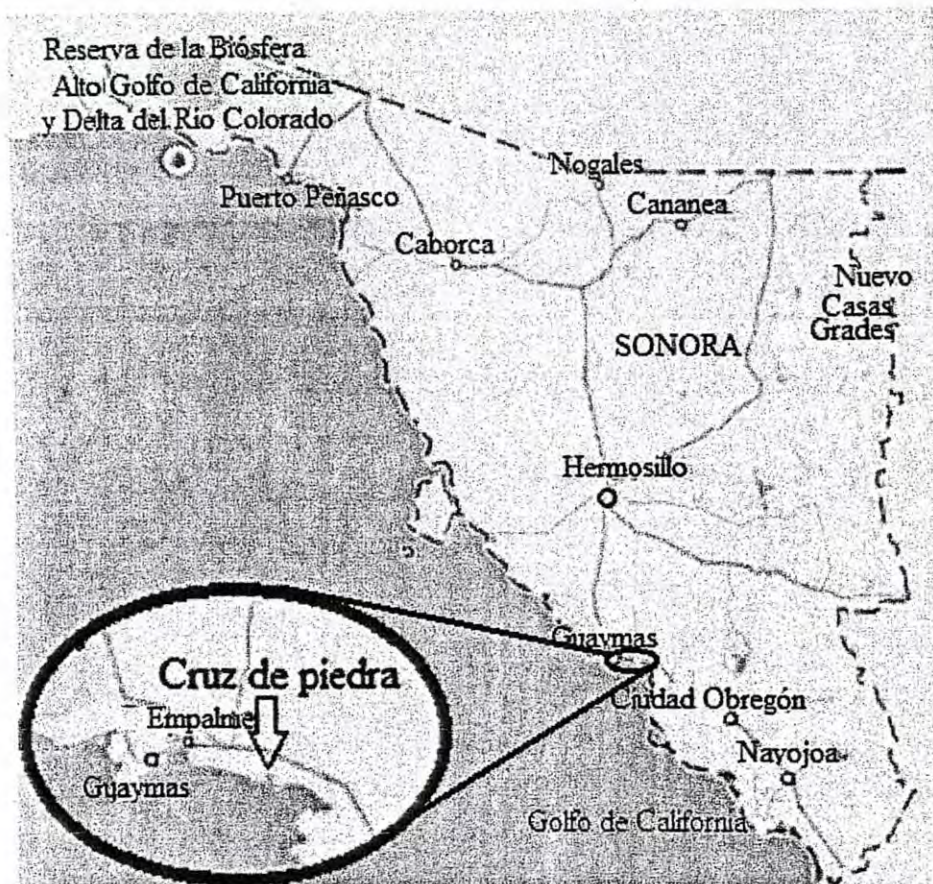


Figura 20. Localización geográfica de la camaronícola Cruz de Piedra.

V.2 Diseño del experimento

Los camarones fueron transportados al laboratorio y adaptados a las condiciones del mismo por una semana en tinas de 200 L, una vez pasado este tiempo se les tomaron muestras de hemolinfa que fueron analizadas mediante la técnica de PCR en tiempo real, para comprobar que estuvieran libres de IHHNV y WSSV. Se seleccionaron 90 organismos que fueron distribuidos en 9 acuarios de 60 L, y estos fueron repartidos en cada una de tres temperaturas, una mínima de 20 °C (baja), intermedia de 29 °C y alta de 32 °C, proporcionándoles a los organismos un nuevo periodo de adaptación de 3 días a esas temperaturas (Figuras 21 y 22). Desde su llegada y hasta el final del estudio, los animales fueron alimentados con dieta comercial (pellets, Malta Clayton) una vez al día y con recambios diarios de agua del 20%, con agua ya preparada a las temperaturas correspondientes.

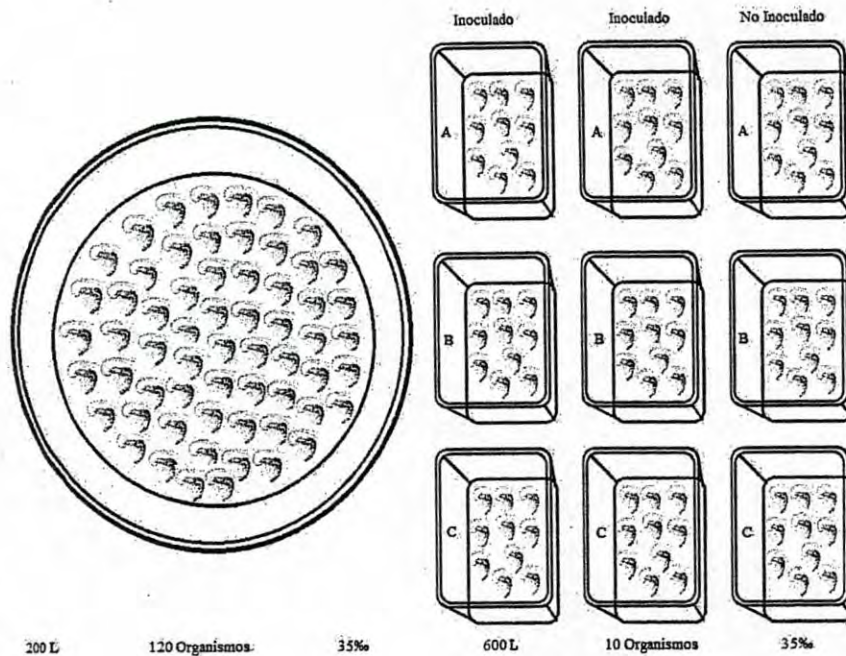


Figura 21. Esquema de recepción en un tanque comunal y distribución de los organismos en tanques para cada tratamiento.

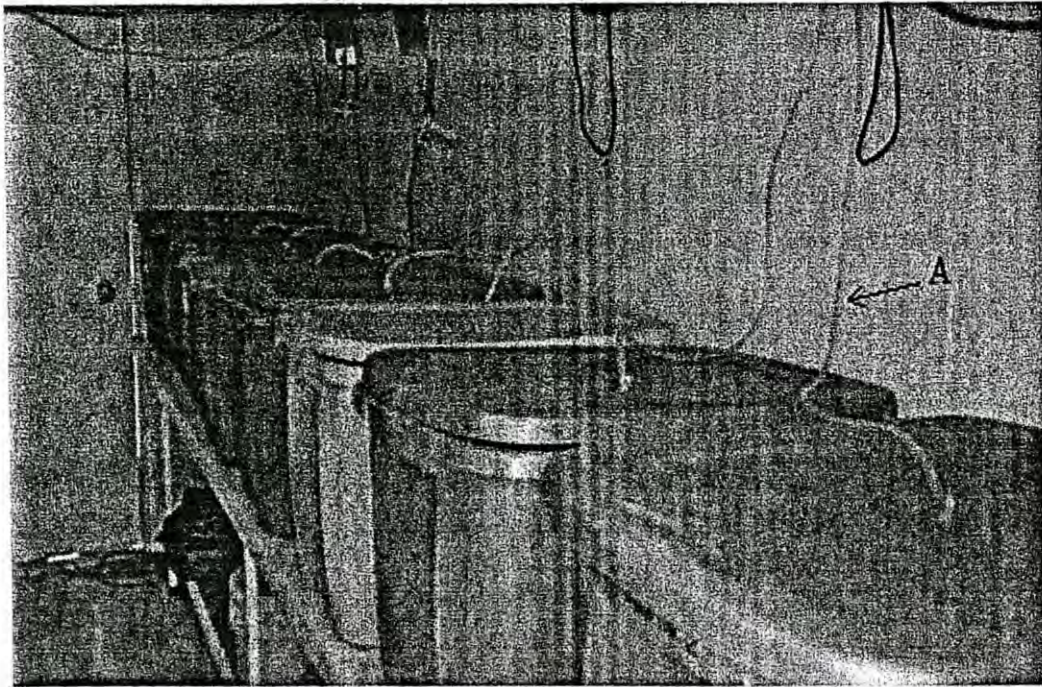


Figura 22. Tinas de 60 litros utilizadas en el bioensayo, A) manguera de aireación para cada una.

Para la infección experimental, se preparó un inóculo a partir de tejido muscular de camarón congelado infectado con WSSV positivo con análisis de PCR. Se disectó un fragmento de tejido (10 gr) y se maceró con solución salina fisiológica al 2% (60 mL) relación 1:6 (w:v), el extracto fue centrifugado a $3000 \times g$ por 20 minutos a $4^{\circ}C$, el sobrenadante se volvió a centrifugar con las mismas condiciones, para después ser pasado por un filtro de $0.45 \mu m$ (de acuerdo con la técnica propuesta por Escobedo-Bonilla *et al.*, 2006).

Antes de la inoculación, se tomaron $500 \mu l$ de hemolinfa a cada camarón con una jeringa que contenía $500 \mu l$ de anticoagulante, de acuerdo con la técnica propuesta por Vargas-Albores *et al.* (1993), correspondiendo está a la muestra de las 0 hrs; y después se inocularon dorsalmente en el segundo segmento del cuerpo 20 organismos de cada tratamiento térmico. Posteriormente se tomaron muestras ($500 \mu l$ de hemolinfa) a las 24 y 48 horas posteriores a la inoculación (hpi), las cuales fueron procesadas para determinar el efecto del tratamiento térmico sobre las actividades del sistema inmunitario del camarón en camarones no inoculados (organismos control) e inoculados con WSSV (Figura 23). Una vez obtenidas las muestras

estas fueron divididas, siendo una parte destinada a conocer los niveles de proteínas totales y la otra para conocer la actividad de algunas de las enzimas de defensa del camarón. Para los análisis se empleó un espectrofotómetro marca Biotek (Figura 24).

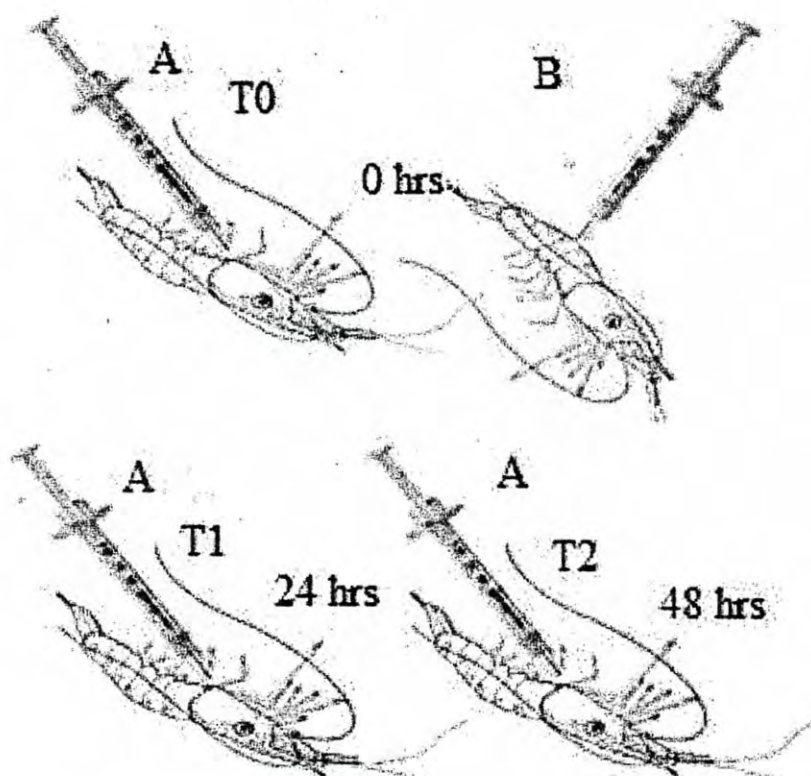


Figura 23. Esquematización de la toma de muestras e inoculación de los camarones. Se observa el sitio de toma de muestra (A) y de inoculación (B).

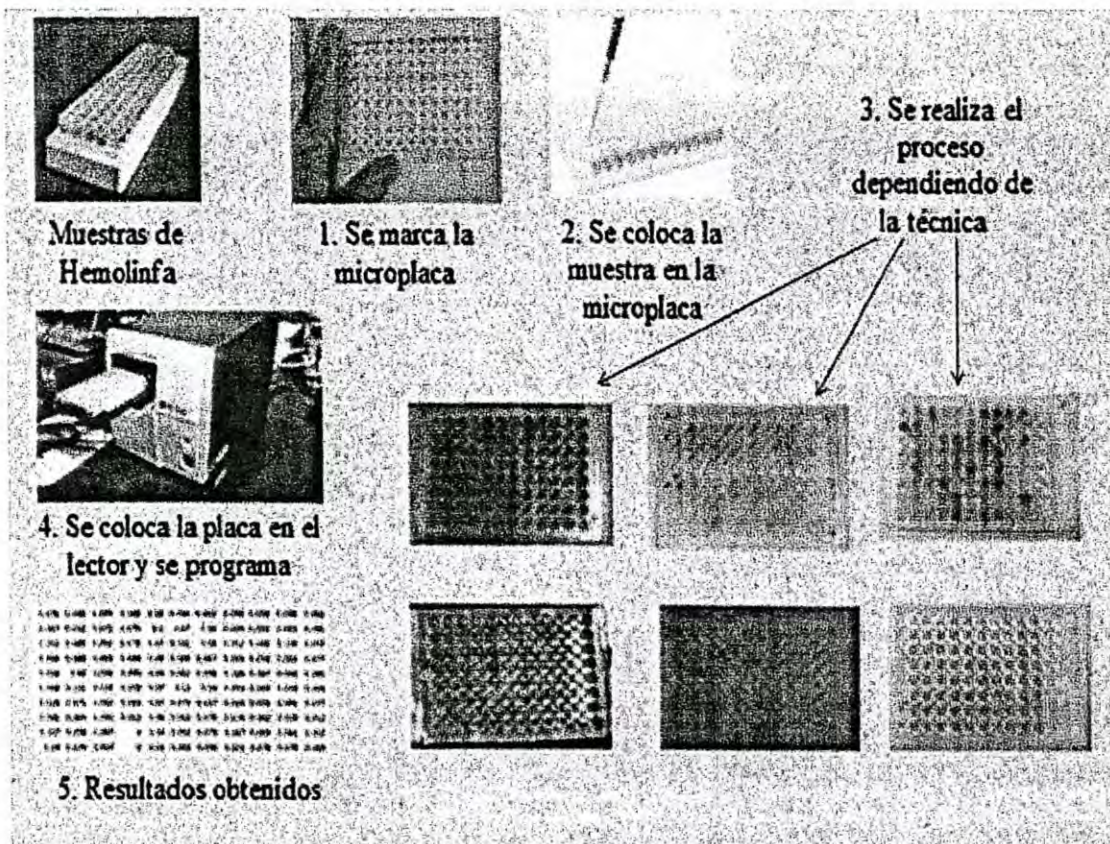


Figura 24. Procedimiento seguido en el análisis de las muestras de hemolinfa de camarón para conocer la actividad del sistema inmune (los números indican el orden de los pasos a seguir).

V.3 Procesamiento de las muestras

V.3.1 Proteínas totales

La concentración de proteínas totales se midió usando la técnica de biuret (Randox, TP3869), adaptado al formato de microplaca para lector de absorbancia de acuerdo con Hernández-López (2001). La concentración de proteína se estimó utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) para la curva estándar. Esto se realizó de la siguiente manera: Se colocaron 10 μL de muestra en una microplaca de 96 pozos para lector de absorbancia (Thermo Scientific FS-167008), seguido de la adición de 200 μL de reactivo de biuret e

incubando durante 10 min a temperatura ambiente (25-28 °C) y se leyó a una absorbancia de 550 nm.

V.3.2 Determinación de la actividad de fenoloxidasa

Se estimó la actividad de fenoloxidasa (PO) usando como sustrato L-DOPA. Se colocó en una microplaca de 96 pozos para lector de absorbancia (Thermo Scientific FS-167008) 10 µL de hemolinfa y 250 µL de L-DOPA (3 mg/mL) disuelto en agua inyectable comercial. Se incubó 20 minutos 37 °C y se leyó a 490 nm. La actividad total del PO se midió por la pre-incubación de la hemolinfa (10 µL) con 10 µL de tripsina (1 mg/mL), de acuerdo con el protocolo propuesto por Hernández-López (2001).

V.3.3 Actividad de Lisozima

La actividad de la lisozima se obtuvo mediante la reducción de la turbidez de *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich, M3770) en solución amortiguadora de fosfato de acuerdo con Hernández-López (2001). En una microplaca de 96 pozos para lector de absorbancia (Thermo Scientific FS-167008) se colocaron 50 µL de muestra y 200 µL de una suspensión de *Micrococcus* en PBS, se incubó a 37 °C durante 1 h y se midió la disminución en la absorbancia a 405 nm. El resultado se obtiene utilizando una curva estándar con lisozima comercial (Sigma-Aldrich, L7651).

V.3.4 Actividad antibacteriana

Esta actividad se midió al verter en una microplaca de 96 pozos para lector de absorbancia (Thermo Scientific FS-167008) 200 µl de hemolinfa y 10 µl de una suspensión de *Vibrio* en fase de crecimiento logarítmico. La placa se incubó durante 8 h a 30 °C y se mide a una absorbancia de 415 nm. Se utilizó el antibiótico florfenicol (Sigma-Aldrich, 32492) para generar una curva estándar (Hernández-López, 2001).

V.3.5 Actividad de proteínas tipo tripsina

Esta técnica se basa en la hidrólisis de BAPNA (Na-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida, hidrocloreuro, Sigma-Aldrich, B4875). En una microplaca de 96 pozos para lector de absorbancia (Thermo Scientific FS-167008) se colocaron 50 µL de hemolinfa con 200 µl

de BAPNA (1 mg/ml). Se incubó por 1 h a temperatura ambiente (TA) y se leyó a una absorbancia de 415 nm. Se utilizó Tripsina (Sigma-Aldrich, T0303) para generar una curva estándar (Hernández-López, 2001).

V.3.6 Actividad de α 2-macroglobulina

Se colocaron 50 μ L de hemolinfa en una microplaca de 96 pozos para lector de absorbancia (Thermo Scientific FS-167008) con 10 μ L de tripsina (1 mg/mL) y se incubó durante 10 min a TA. Después de eso, se añadieron 10 μ L de inhibidor de tripsina de soya (Sigma-Aldrich, T7659 (ITS) 2 mg/mL) y se incubó durante 10 min a TA. Por último, se añadieron 200 μ L de sustrato BAPNA (1 mg/mL) y se incubó durante 30 min, se leyó a una absorbancia de 415 nm. Se utilizó tripsina comercial para generar una curva estándar (Hernández-López, 2001).

V.3.7 Actividad de súper óxido dismutasa

Para la detección de SOD se utilizó un kit comercial (RANDOX, SD125) y se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante pero adaptado para microplaca (Hernández-López, 2001).

V.3.8 Expresión de *Pro-PO*, *Hsp10*, *Hsp70* y *Hsp90*

Para medir la expresión de los genes *ProPO*, *Hsp10*, *Hsp60* y *Hsp90*, primero se realizó la extracción de ARN de hemocitos mediante la técnica de Trizol. El ARN fue tratado con DNasa y posteriormente se cuantificó y se sintetizó un ADNc utilizando SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen (Figura 25).

EXTRACCIÓN DE ARN CON EL MÉTODO DE TRIZOL

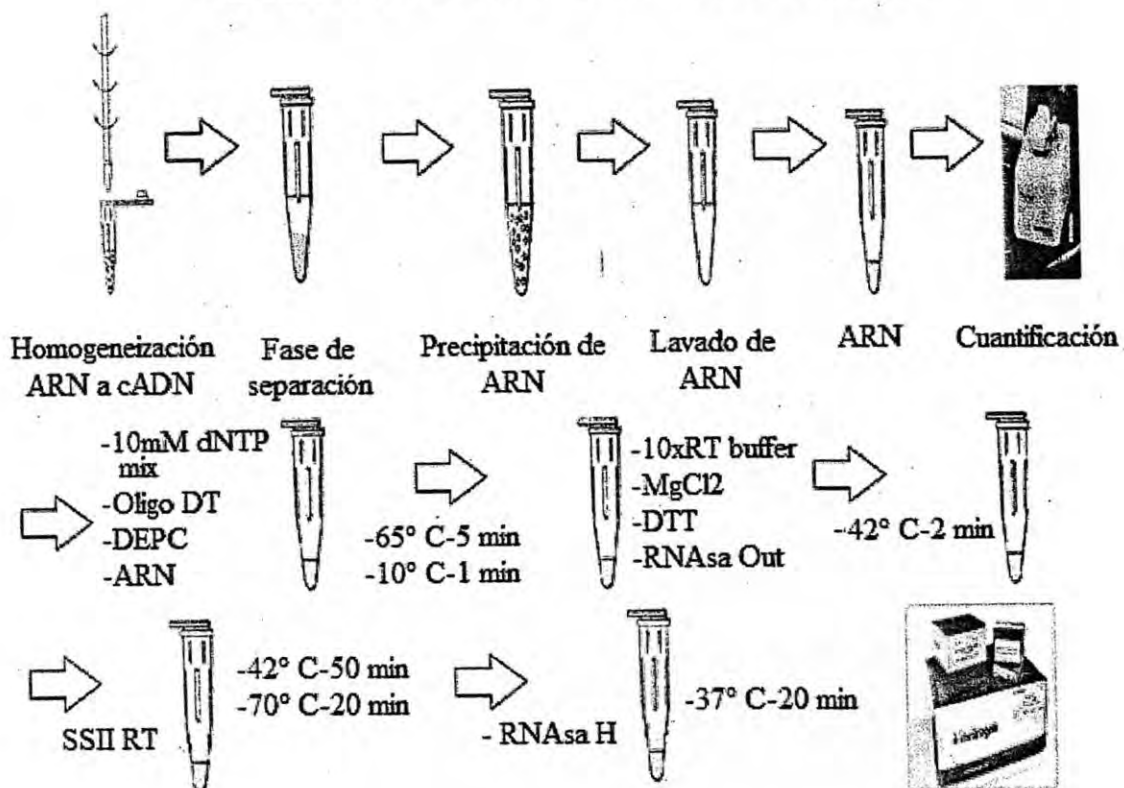


Figura 25. Secuencia de extracción de ARN y su paso a ADNc.

La amplificación se realizó con una temperatura de alineación a 60 °C, en un termociclador tiempo real LightCycler 480 Roche, donde se obtuvieron los valores de CP (Pfaffl, 2001) a partir de cada muestra. Los resultados se analizaron usando la fórmula $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$ (Livak y Schmittgen, 2001).

La expresión de los genes antes mencionados, se midió utilizando los iniciadores específicos diseñados para este trabajo (Tabla 3), usando el software Primer3 y el método de cuantificación relativa con el Factor de Elongación Alfa (EF1 α) como un gen constitutivo.

V.3.9 Análisis estadístico.

Todos los resultados enzimáticos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de dos vías y en bloques de comparaciones múltiples (prueba de Tukey) ($p > 0.05$), con el programa SigmaPlot11.

Tabla 3. Oligos diseñados para estimar la expresión genética mediante PCR de tiempo real.

Gen	Oligo	Secuencia
<i>Pro-PO</i>	pro-POF	5'-ACGCTTGCCTTGGCATCA-3'
	pro-POR	5'-CGCGCACAGTCATTTGTTGT-3'
<i>Hsp10</i>	HSP10F	5'-TGTGTTTCAGGTGATGTTGAAGTG-3'
	HSP60R	5'-CAAGGCACTAAAACTCTACACTG-3'
<i>Hsp60</i>	HSP60F	5'-CGGGATAGAGCAAGTCACAA-3'
	HSP60R	5'-TCCACCAACCACCACCTTTG-3'
<i>Hsp90</i>	HSP90F	5'-CCACCAATTACGAAGACAGG-3'
	HSP90R	5'-CTCACCTCAAAAACGGCAGA-3'
<i>EF1α</i>	EF1 α F	5'-TCGCCGA ACTGCAGACCATGA-3'
	EF1 α R	5'-GCTGCCTCCTCCAGTTTACC-3'

VI. RESULTADOS

VI.1 Actividad inmune

Una vez realizados los análisis correspondientes para evaluar el efecto de la temperatura del agua sobre cada una de las actividades inmunes a medir en el camarón, se encontró que en la concentración de proteínas totales, los valores promedio oscilaron desde 45.72 hasta 87.01 mg/mL, siendo los organismos control los que se ubicaron en los extremos de este rango, mientras que los valores obtenidos para los organismos inoculados se ubicaron en los valores medios del mismo. Las temperaturas utilizadas no tuvieron ningún efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la concentración de proteína en el plasma durante todo el experimento y tampoco hubo ninguna diferencia al comparar esos valores entre camarones infectados y control para una misma condición de tiempo y temperatura (Fig. 26A y 26B).

La actividad enzimática de súper óxido dismutasa fue baja hasta las 24 hpi tanto en los organismos control como en los infectados. El incremento observado a las 48 h en todas las temperaturas fue más marcado en los organismos infectados (Fig. 26C y 26D). Sólo a 29 °C la actividad enzimática en los organismos control fue mayor que en los organismos infectados (Tabla 4).

Aunque se presentaron pequeños incrementos en la actividad de la fenoloxidasa entre los tratamientos, la concentración de la misma en la hemolinfa de los camarones control mostró aumento significativo a las 48 hpi para el tratamiento de 32 °C ($P < 0.05$) (Figura 27A). Por otro lado, los organismos infectados experimentalmente mostraron un incremento significativo en la actividad de la enzima ($P < 0.05$) a las 24 hpi a 20 °C (Figura 27B).

En el caso de la expresión de *Pro-PO*, los organismos control mantenidos a 20 °C presentaron en promedio un incremento cinco veces mayor en la expresión a las 24 hpi, y un incremento ocho veces mayor a las 48 hpi, al ser comparados con el gen constitutivo *EF1 α* (Figura 27C). No se encontraron diferencias significativas a los 29 o 32 °C. Los camarones infectados experimentalmente con WSSV mostraron un aumento de cinco veces en la expresión génica a las 24 hpi a 20 °C, pero los valores disminuyeron a su expresión normal en 48 hpi (Figura 27D).

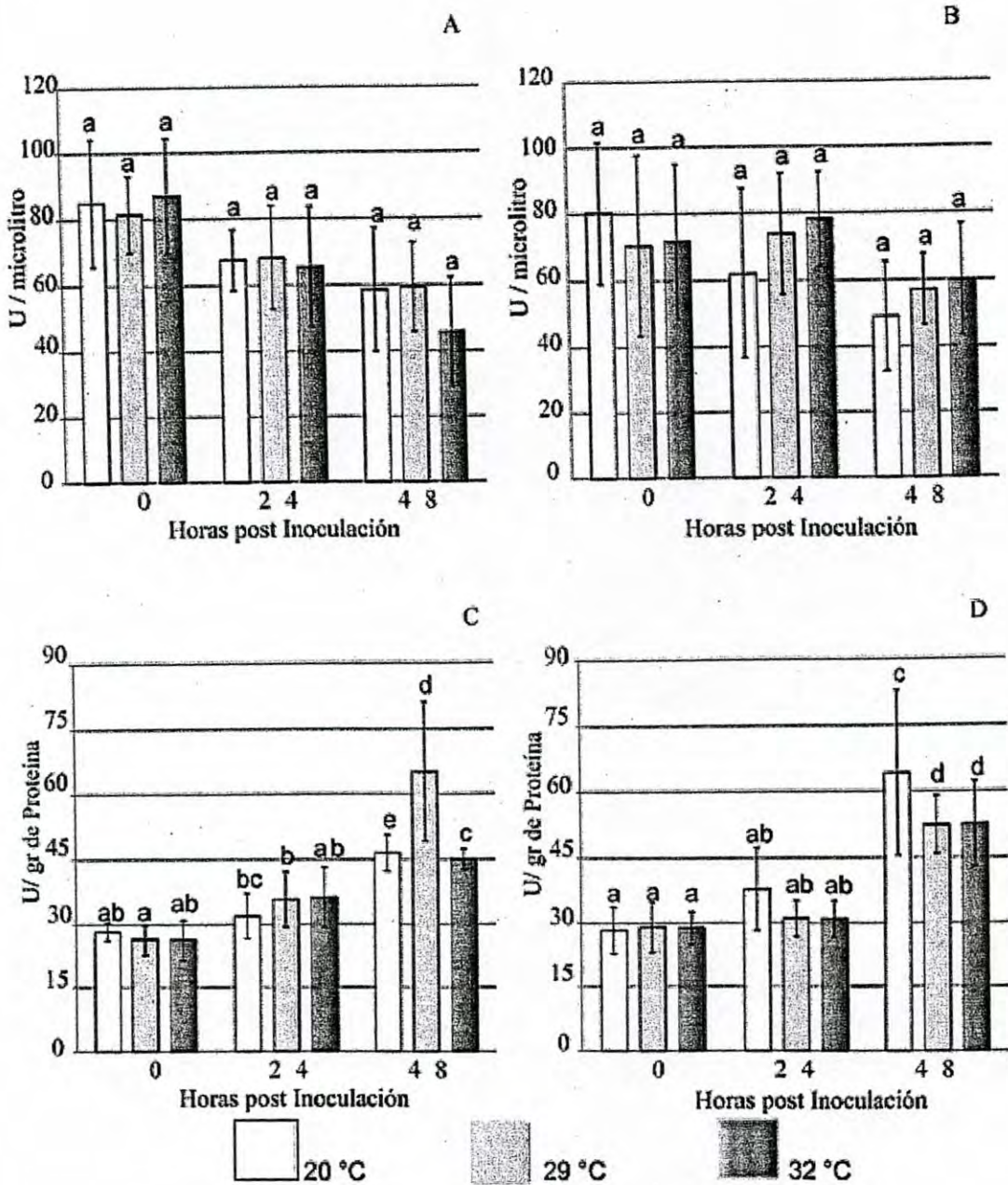


Fig. 26. Niveles de proteína plasmática de (A) camarones control e (B) infectados con WSSV. Actividad de la SOD en (C) organismos control y en (D) organismos infectados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$.

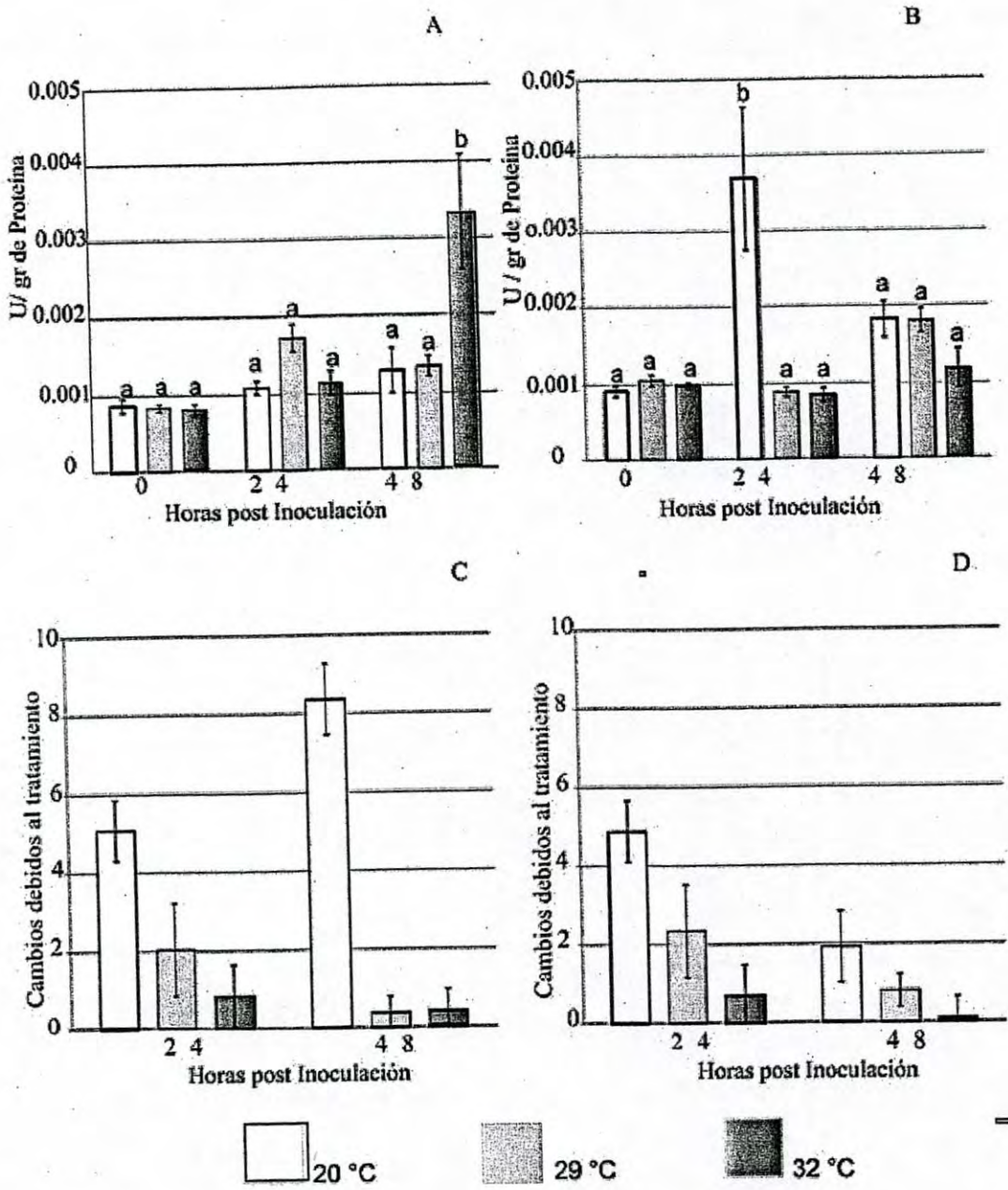


Fig. 27. Promedio de los niveles de actividad de fenol oxidasa en A) organismos control e B) infectados. Niveles de expresión de *Pro-PO* en C) camarones control y en D) inoculados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$.

En el caso de α -2 macroglobulina, cuando se comparan los niveles de actividad en una condición de temperatura específica, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los organismos inoculados. Las pruebas múltiples mostraron que se encontraron diferencias entre los distintos ensayos en organismos control (Fig. 28A), así como entre los diferentes ensayos de los organismos infectados (Fig. 28B).

Para la lisozima, la única diferencia entre los niveles de actividad en camarones control y camarones infectados se presentó a las 48 hpi a 32 °C, con valores más altos en los camarones del grupo control (Tabla 4); también se observaron diferencias a las 48 hpi tanto en los organismos control para la temperatura más alta, como en los infectados en las dos temperaturas más altas (Fig. 28C y 28D).

Tabla 4. Diferencia estadística entre los camarones control y los infectados a las 48 horas post inoculación (hpi). T °C: Temperatura del agua. P: significancia. I: Infectados. C: controles.

	hpi – T °C	P	Diferencia
SOD	48 – 20	<0.001	I > C
	48 – 29	0.006	C > I
	48 – 32	<0.001	I > C
Lisozima	48 – 32	<0.001	C > I
Tripsina	48 – 20	<0.001	I > C

En cuanto a la respuesta antimicrobiana, no se detectaron diferencias entre los grupos control e infectados en ninguna comparación hpi-temperatura (fig. 29A y 29B). En la actividad de las proteínas tipo tripsina, se obtuvieron altos valores a las 48 hpi a 20 °C en camarones infectados en comparación con los camarones del grupo control (Tabla 4). En el grupo de los infectados se obtuvieron altos valores a 48 hpi, pero se observó la misma tendencia en el ensayo control (Fig. 29C y 29D).

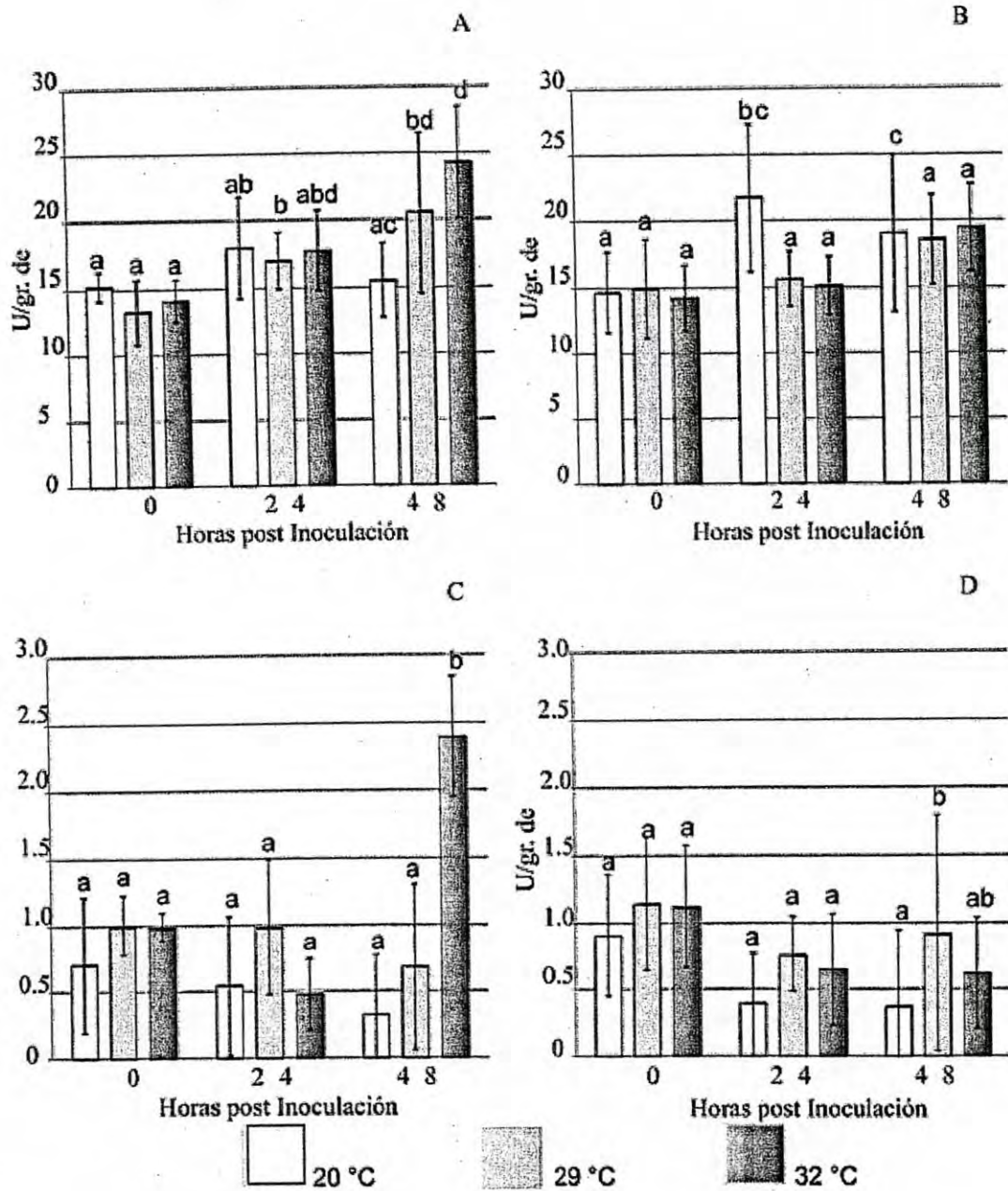


Fig. 28. Actividad de $\alpha 2$ -macroglobulina para (A) organismos control e (B) infectados. Actividad de Lisozima en (C) organismos control y en (D) infectados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$.

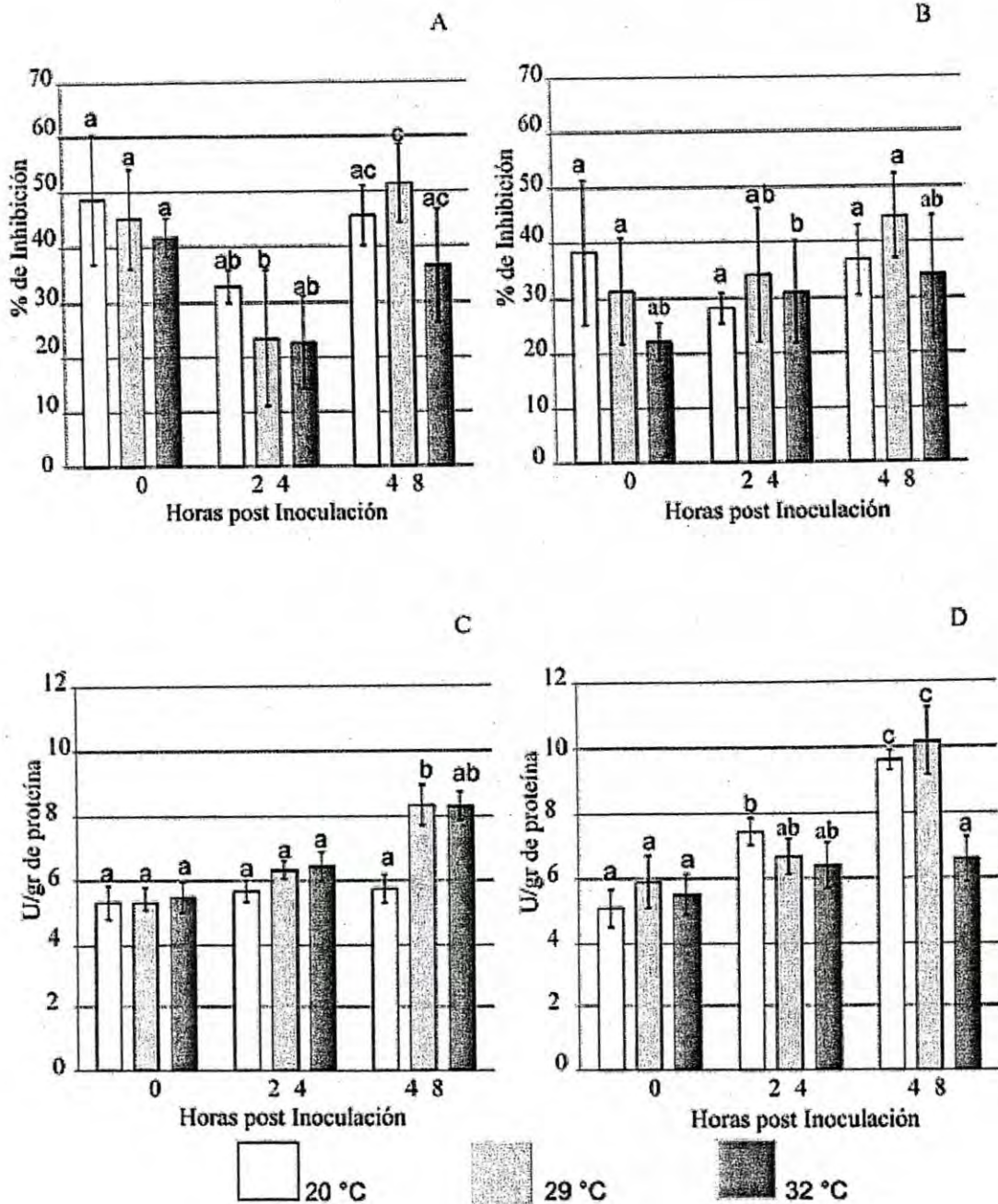


Fig. 29. Actividad de proteínas antimicrobianas en (A) organismos control e (B) infectados. Actividad de proteínas tipo tripsina en (C) organismos control y en (D) infectados. Las letras sobre las columnas indican la prueba de comparaciones múltiples de las medias, diferencia significativa a $p < 0.05$.

VI.2 Expresión de las proteínas de choque térmico

En lo referente a la expresión de los genes *Hsp10*, *Hsp60* y *Hsp90* en camarones control, se observó una sobreexpresión a las 48 hpi en los organismos mantenidos a 32 °C para *Hsp90* y en los mantenidos a 20 °C para el gen *Hsp60*. En los camarones infectados experimentalmente con WSSV mantenidos a una temperatura de 32 °C, se encontró una diferencia significativa sólo en la expresión de *Hsp90* a las 48 hpi, mostrando una sobreexpresión de casi 100 veces mayor que los valores del gen constitutivo (Tabla 5).

Tabla 5. Número de cambios en los niveles de expresión de *Hsp10*, *Hsp60* y *Hsp90* en respuesta a la temperatura en los hemocitos de *L. vannamei* infectado con WSSV y control. hpi=horas post-infección.

Temperatura	Gen	Control hpi			Infectados hpi		
		0	24	48	0	24	48
20 °C	<i>Hsp10</i>	1.76	0.57	0	0.58	1.30	0.25
	<i>Hsp60</i>	1.80	0	12.77	0	0	0
	<i>Hsp90</i>	1.01	0.40	0.41	0.05	0.12	0.10
29 °C	<i>Hsp10</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Hsp60</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Hsp90</i>	1.45	0.11	0.12	0.17	0.12	0.01
32 °C	<i>Hsp10</i>	1.00	0.06	0	0	0	0
	<i>Hsp60</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Hsp90</i>	0.99	0.83	15.08	0.28	1.06	110.66

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Actividad inmune

Es sabido que los estresantes ambientales afectan el sistema inmune del camarón de manera dependiente a la dosis. De esta forma, los animales requieren tiempo para adaptarse a las condiciones ambientales, tiempo durante el cual la susceptibilidad del animal a las enfermedades es a menudo agudo (Granja *et al.*, 2003). Uno de estos estresantes es la temperatura. Sin embargo, en algunos casos, como en la infección por WSSV en camarón, parece ser que las temperaturas funcionan más como una estrategia para disminuir los efectos de la infección viral. Existen reportes de que temperaturas altas (32 °C) favorecen al camarón en el ataque evitando la enfermedad (Granja *et al.*, 2006; Wongmaneeprateep *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2012) y a temperaturas bajas (18 °C) los organismos no presentan signos y la mortalidad ocurre solo después de 36 h (Jiravanichpaisal, 2005). En el presente estudio se evaluaron tres distintas temperaturas esperando que las reacciones de defensa de los camarones mantenidos a 29 °C presentaran una respuesta menor que a 20 y 32 °C, tratando con esto de conocer el efecto de la temperatura sobre la respuesta inmune en organismos infectados con el virus de la mancha blanca.

En el presente trabajo se presentaron diferentes tasas de mortalidad (datos no mostrados) en las tres distintas temperaturas. En el tratamiento con la temperatura media (29 °C) del ensayo, se observó una alta tasa de mortalidad. Por otro lado, la tasa de mortalidad más baja ocurrió con las temperaturas alta y baja (32 °C y 20 °C). Sin embargo, no se puede demostrar si es debido a los efectos de la temperatura sobre la replicación viral o sobre el sistema inmune de los organismos.

Al analizar uno a uno los parámetros de la actividad de la respuesta inmune de *L. vannamei*, los resultados obtenidos muestran diferentes efectos sobre este sistema. Jiravanichpaisal (2005) reportó que la temperatura juega un papel importante como un detonante en el proceso de infección del virus de la mancha blanca, el cual aparentemente no se replica a bajas temperaturas. Sin embargo, cuando los organismos eran cambiados de una temperatura baja (4 ± 2 °C) a una más alta (22 ± 2 °C), estos murieron rápidamente debido al

aumento de la replicación del virus. El mismo autor describe que en los cangrejos de río, *Pacifastacus leniusculus*, infectado con WSSV, los hemocitos no degranularon y la reacción de melanización era inhibida. También menciona que la actividad de fenoloxidasa en el sobrenadante del lisado de hemocitos infectados y no infectados del cangrejo de río se mantuvo similar, así como la expresión de Pro-PO detectado por RT-PCR. Sin embargo, Roux *et al.* (2002) encontraron que hay una reducción en la actividad de la enzima PO en los animales infectados con este virus.

En el presente trabajo, los resultados mostraron un aumento de PO en los camarones control mantenidos a 32 °C a las 48 hpi. Esto sugiere que la temperatura alta desencadena una respuesta mediada por PO, lo que explicaría, de cierta manera, que el WSSV se mantenga inhibido por la acción de la enzima en hemolinfa, evitando su dispersión en los tejidos del camarón, pero no eliminando al virus del organismo. Por otra parte, no se encontró una diferencia significativa en la actividad de la enzima en los camarones infectados con WSSV a 29 o 32 °C pero los valores de PO aumentaron a 20 °C a las 24 hpi, lo que sugiere que el sistema de PO fue activado por la infección viral como parte de los mecanismos de respuesta del camarón.

En cuanto a la expresión de genes de respuesta inmune, se observó una sobreexpresión el gen *Pro-PO* en los camarones control mantenidos a 20 °C. De acuerdo con estos resultados, se puede asumir que la baja temperatura tiene una influencia en la expresión de esta enzima, implicando una mayor concentración de esta en los hemocitos y por lo tanto, una mejor respuesta en caso de que el sistema se active. Tal vez esta sea la razón de que a temperaturas bajas el WSSV se mantiene controlado. Varios autores han informado de un aumento en las posibilidades de supervivencia de los camarones con WSSV cuando son sometidos a una hipertermia de alrededor de 32 °C (Jiravanichpaisal, 2005; Granja *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2006; Wongmaneeprateep *et al.*, 2010). Los resultados de este estudio muestran una tendencia similar y están de acuerdo con los reportados por Moser *et al.* (2012), que llegaron a la conclusión de que los organismos están infectados, pero la infección no se manifiesta debido a que las bajas temperaturas no permiten la replicación del virus. Con base en lo anterior, podemos sugerir que se necesita más investigación para comprender mejor la actividad y la expresión de *Pro-PO* y su papel en el sistema inmune de camarones en tratamientos térmicos

de baja temperatura. Una investigación más profunda podría conducir a formas de controlar los efectos del WSSV en estos organismos.

Se han realizado estudios para evaluar el efecto de la hipertermia sobre los niveles de supervivencia en organismos infectados con WSSV, para los que se han utilizado temperaturas que van desde 32 °C a 45 °C. Esto cambia drásticamente la historia natural de la enfermedad, ya que afecta la infectividad del virus y reduce su prevalencia (Vidal *et al.*, 2001; Granja *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2006). Por otro lado, hay evidencia de que las temperaturas de entre 22 y 30 °C permiten altos niveles de replicación de WSSV en camarones infectados a esas temperaturas (Roux *et al.*, 2002). Guan *et al.* (2003) encontraron que *Marsupenaëus japonicus* mantenido a 15 °C presentó infecciones más leves pero con un conteo total de hemocitos superior (THC) y Moser *et al.* (2012) demostraron que el mantenimiento de los organismos a 18 °C y posterior trasladado a 29 °C hace que se manifieste una signología, concluyendo que la enfermedad está presente en la baja temperatura, pero que esta no permite la replicación del virus.

La respuesta inmune de los invertebrados está dada por los hemocitos, lo que los hace muy importantes en la evaluación de la respuesta a la presencia de agentes patógenos, tanto virus como bacterias. Fagutao *et al.* (2008) mencionan que los genes de respuesta inmune probablemente se activan inmediatamente después de una estimulación inmune de un día, lo que puede resultar en la liberación de enzimas, similar a la encontrada en la expresión génica. En este trabajo se encontró que tres de las enzimas analizadas (SOD, α 2-macroglobulina y proteínas tipo tripsina), generaron un aumento de actividad en los organismos mantenidos a 20 °C y 29 °C, lo que coincide con lo descrito por Guan *et al.* (2003), relacionado con el aumento en el recuento total de hemocitos, que nos llevaría a pensar que con un aumento de hemocitos se incrementaría la cantidad de enzimas presentes en la hemolinfa.

Los altos valores de SOD en los camarones infectados después de 48 h contrastan con Chang *et al.* (2003), que reportan que cuando los camarones eran infectados con WSSV se presentaba una reducción significativa en la actividad de SOD entre los días 1 y 4, presentando los organismos un consecuente choque del sistema inmune, lo que producía una alta mortalidad. En cuanto a los resultados de α 2-macroglobulina, se encontraron pocas variaciones entre los diferentes tratamientos de los organismos inoculados. En el ensayo de

temperatura más baja, podemos ver un aumento significativo de la actividad a las 24 hpi en los organismos infectados y que perdura en el muestreo de las 48 hpi. Esto contrasta con los hallazgos de Ma *et al.* (2010), quienes mencionan una disminución de expresión de α 2-macroglobulina a las 37 hpi en hemocitos de organismos inoculados con WSSV. Este contraste de resultados se podría atribuir a que ellos midieron expresión de tres genes de α 2-macroglobulinas por separado y posiblemente lo que se observó en este trabajo es la liberación de enzimas producto de la suma de esas expresiones.

En cuanto a los resultados de la lisozima, Jeswin *et al.* (2013) reportaron que el gen de la lisozima se expresa doce horas después de la infección por WSSV en *Penaeus monodon*, con una disminución a las 48 hpi para alcanzar niveles similares a los encontrados a las 12 h pero mayores que las de los camarones control. En los resultados obtenidos en este trabajo con *L. vannamei*, no se encontraron cambios entre los tratamientos entre los valores en las mediciones a distintos tiempos y temperaturas con una excepción a las 48 hpi en el grupo de los infectados (29 °C) y control (32 °C). Mai y Wang (2010), en un estudio con *Litopenaeus stylirostris* y WSSV, encontraron que los genes de lisozima se sobreexpresan a partir de 4 hpi, alcanzando su máxima expresión a 8 hpi antes de disminuir. Si la expresión de lisozima inicia en etapas muy tempranas de la infección, entonces los niveles pueden ser reducidos ya desde las 24 hpi, lo que nos lleva a esperar a no encontrar diferencias más allá de ese tiempo. Las diferencias que encontramos en los organismos control a las 48 hpi para el tratamiento a 32 °C puede ser resultado de una posible infección bacteriana secundaria debido a la inmunodepresión provocada por el estrés causado a los organismos por la temperatura y no relacionado con la infección viral como tal.

Las proteínas antimicrobianas mostraron una disminución a las 24 hpi con posterior recuperación en los camarones control a 29 °C, sin ningún cambio en los animales infectados, independientemente de la temperatura del tratamiento analizado. En un ensayo desarrollado por Huang *et al.* (2013), podemos observar una respuesta contraria, ya que ellos encontraron ese comportamiento en los organismos infectados con *V. harveyi*, presentando una disminución en la actividad de estas proteínas a las 3 hpi con recuperación a las 24 hpi, sin cambio en los organismos control. La expresión de las proteínas antimicrobianas no ha sido bien explicada en infecciones de tipo viral. En *P. monodon* las proteínas antimicrobianas se

expresan desde pocas horas después de la infección con WSSV pero hay una disminución para las 48 hpi (Woramongkolchai *et al.*, 2011; Jeswin *et al.*, 2013). Esos resultados contrastan con los del presente estudio ya que no observamos un patrón que indicara que la infección viral influenciara la expresión de las proteínas antimicrobianas.

Las proteínas tipo tripsina presentaron un incremento a las 48 hpi para los animales control e infectados, el aumento en los infectados se presentó en niveles más altos que en el control. Resultados similares se reportan por Shi *et al.* (2010), que mencionan un aumento de este tipo de proteínas en el hepatopáncreas del langostino *Procambarus clarkii* infectado con WSSV, pero no reportan su relación con la reacción frente a diferentes patógenos.

Jeswin *et al.* (2013) observaron que los animales que sobrevivieron más de 3.5 días a una infección con WSSV mostraron niveles más altos en la expresión de lisozima y algunas otras proteínas antimicrobianas del sistema inmune, que los animales que murieron antes de los 2.5 días. Por lo tanto, es claro que un diseño experimental que involucre una mayor frecuencia en los muestreos y un mayor tiempo de duración puede explicar de una mejor manera la relación existente entre la expresión o respuesta inmunológica y una infección viral.

VII.2 Expresión de las proteínas de choque térmico

En cuanto a la expresión de los genes *Hsp*, se han realizado estudios que muestran que la proteína HSP90 está directamente implicada en la resistencia de los organismos, ya que puede proteger a las células contra la apoptosis inducida por choque térmico (Malago *et al.*, 2002; Spees *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007). En este trabajo, encontramos que *Hsp90* fue sobreexpresado en casi 100 veces. Por ejemplo, en los tejidos de *P. monodon* la expresión de este gen se incrementó significativamente después de 30 minutos de tratamiento a 37 °C (Jiang *et al.*, 2007). Li *et al.* (2009) encontraron que los niveles de expresión de *Hsp90* en camarones juveniles durante la primera hora en el choque térmico (35 °C) fueron significativamente mayores (8.3 veces) cuando se compara con los valores previos al tratamiento, y se mantuvo alta, alcanzando 12.3 veces a 6 hpi. En este estudio, la más alta expresión de este gen está presente en el camarón mantenido a altas temperaturas (32 °C), incluso en el grupo que no

estaba infectado, lo que sugiere que el aumento de la expresión fue causada por la temperatura.

Los genes *Hsp* juegan un papel importante en el marco de la respuesta inmune del huésped (Rungrasamee *et al.*, 2010). Danwattananusorn *et al.* (2011) reportaron que en *M. japonicus*, después de la inyección de WSSV, sólo se aumenta la expresión de *Hsp90*. Nuestros resultados mostraron que los aumentos de expresión de *Hsp90* ocurrieron en los animales inoculados que se mantuvieron a 32 °C. Estos resultados se oponen a las conclusiones de Zhang *et al.* (2012), quienes reportaron que los niveles de expresión de *Hsp90* alcanzaron el nivel más alto en 6 hpi y luego disminuyó a las 12 hpi, por lo tanto, la proteína parece funcionar como una chaperona esencial que interviene en la respuesta inmune para hidrolizar ATP y proteger el cuerpo contra el daño bacteriano. Tal vez, estas diferencias podrían ser debido al hecho de que en este estudio hay virus implicados. En cuanto a *Hsp60*, los resultados fueron casi nulos, ya que no se presentó expresión en 29 °C o 32 °C; sólo hubo cambios a 20 °C en organismos control. Estos resultados llevan a la conclusión de que WSSV ocupa los recursos de acogida y no permite que estas proteínas se manifiesten, o que WSSV puede apagar la actividad chaperona de las HSP, o que mantienen una expresión muy reducida hasta que el organismo perece (Huang *et al.*, 2011).

Kim *et al.* (1998) propusieron que las chaperonas HSP de bajo peso molecular (como la HSP10) contienen una estructura de ventana a la que la proteína desnaturalizada puede ser atraída debido al estrés y esto puede prevenirla de la adición y desplegamiento. También se cree que durante una infección viral, WSSV puede ocupar recursos del hospedero inhibiendo la expresión de los genes *Hsp*. En nuestro caso no hubo expresión de *Hsp10* en hipertermia (32 °C), por lo que podemos concluir que esto puede ser debido a que los organismos están respondiendo al estrés por alta temperatura, pero la producción de HSP es inhibida por la presencia del virus WSSV, de acuerdo a las conclusiones de Huang *et al.* (2008).

Para las otras temperaturas utilizadas en este estudio que no están relacionados con la hipertermia, podríamos decir que las bajas expresiones encontradas en organismos control e infectados pueden ser debido al estrés causado por la presencia del virus o una bacteria cuyo desarrollo ha sido estimulado por el estrés causado por el manejo diario. En este punto, se puede concluir que especialmente el gen *Hsp90* es estimulado por las altas temperaturas, pero

su acción puede ser inhibida por la presencia del virus WSSV. Además, es necesario realizar más estudios sobre los procesos de inhibición de las HSP de bajo peso molecular.

VIII. CONCLUSIONES

Los efectos que la temperatura tiene sobre la reacción de los organismos al estrés provocado por ésta, pueden ser iguales o mayores que los provocados por un proceso infeccioso por WSSV.

La temperatura tiene un efecto importante sobre procesos biológicos, así como sobre las respuestas inmunes y sobre la función de las actividades enzimáticas en todos los organismos; por lo que, la diferencia entre la reacción de un organismo a una infección en una temperatura óptima de desarrollo y otra que no lo es, será de suma importancia para su resistencia ante una infección. Esto es de gran ayuda no solo en la erradicación de un agente patógeno en el estanque donde viven los camarones, sino en la sobrevivencia del animal ante ese agente patógeno.

Las temperaturas de mejor respuesta de *Litopenaeus vannamei*, independientemente de si está o no infectado, son altas (32 °C) o bajas (20 °C). Siendo temperaturas de alrededor de 29 °C, las que más afectan a la respuesta inmune de este camarón.

La temperatura del agua superficial en un estanque de cultivo en los meses cálidos puede alcanzar los 32 °C en la zona de estudio, pero debido a lo somero de los estanques de cultivo de camarón, la temperatura que prevalece en el ciclo de cultivo siempre es más alta que la que prevalece en el hábitat natural del camarón, por lo que el límite inferior de temperatura en los estanques, no será menor a aquella en la que presentó mayor mortalidad de organismos (29° C), permitiendo esto, de acuerdo a los hallazgos encontrados, una mayor mortalidad de los animales infectados con WSSV.

Los parámetros de actividad del sistema inmune, así como la producción de hemocitos en los organismos, pueden ser afectados por temperatura o por el tipo de infección, pero para lograr un análisis más certero es necesario realizar un muestreo a intervalos más cortos, esperando con esto encontrar una diferencia significativa en la expresión o actividad del sistema inmune de camarones.

Las proteínas de choque térmico necesitan mayor estudio en su expresión, así como se mencionó para los parámetros de actividad del sistema inmune, estableciendo muestreos

menos espaciados y haciendo énfasis en las diferentes temperaturas, sobre todo en las de bajo peso molecular, que son las que mostraron menos respuestas ante los tratamientos utilizados.

IX. RECOMENDACIONES

Algunos aspectos sobre el diseño metodológico podrían mejorarse para obtener resultados con un mayor grado de resolución, como los que a continuación se mencionan:

- a) Realizar estudios utilizando las mismas temperaturas, utilizando un margen de tiempo más corto entre cada muestreo.
- b) Que el tiempo de duración del estudio sea más largo, buscando conocer las respuestas en la expresión de aquellos organismos que sobrevivan más tiempo, analizando la diferencia de sobrevivencia entre las distintas temperaturas.
- c) Además, es necesario realizar más estudios sobre los procesos de inhibición de las HSP de bajo peso molecular.
- d) Hacer un estudio sobre las temperaturas presentes en los estanques de crianza de los camarones, tanto de superficie como de fondo, para conocer más detalladamente el ambiente en el que se están desarrollando estos organismos.

X. LITERATURA CITADA

- Afsharnasab M., R. Mortezaei, V. Yegane y B. Kazemi. 2009. Gross signs, histopathology and polimerase chain reaction observations of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free *Litopenaeus vannamei* in Iran. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 4(6): 297-305.
- Aguirre-Guzmán, G., J.G. Sánchez-Martinez, A.I. Campa-Córdova, A. Luna-González y F. Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune system. Thai Journal of Veterinary Medecin. 39: 205-15.
- Amparyup, P., J. Sutthangkul, W. Charoensapsri y A. Tassanakajon. 2012. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. Journal of Biological Chemistry. 287: 10060-10069.
- Amparyup, P., H. Kondo, I. Hirono, T. Aoki y A. Tassanakajon. 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Molecular Immunology. 45(4): 1085-93.
- Andrade, A.J. 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Faculty of Bioscience Engineering. Universiteit Gent. Gent, Belgium.
- Araneda, M., E.P. Pérez y E. Gasca-Leyva. 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight. Aquaculture. 283: 13-18.
- Argue, B.J., S.M. Arce, J.M. Lotz y S.M. Moss. 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. Aquaculture. 204(3-4): 447-460.
- Armstrong, P.B. 2010. Role of α_2 -macroglobulin in the immune responses of invertebrates. Invertebrate Survival Journal. 7: 165-180.
- Battistella, S., P. Bonivento y G.A. Amirante. 1996. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. Italian Journal of Zoology. 63: 337-343.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe y M. Phillips. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. <http://www.fao.org/docrep/007/ad505e/ad505e00.htm>
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe y M. Phillips. 2005. Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Fao Fisheries Technical Paper 476. 82 p.

- Bu, X., X. Du, W. Zhou, X. Zhao y J. Wang. 2008. Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 24: 723-732.
- Bückle, L.F., B. Barón y M. Hernández. 2006. Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Revista de Biología Tropical*. 54: 745-753.
- Burge, E.J., D.J. Madigan, L.E. Burnett y K.G. Burnett. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 327-339.
- Cammarata, M. y N. Parrinello. 2009. The ascidian prophenoloxidase activating system. *Invertebrate Survival Journal*. 6: 67-76.
- Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis y F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 353-366.
- Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, G. Aguirre-Guzmán y F. Ascencio. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxidodismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas*. 31: 661-669.
- Cerenius L, P Jiravanichpaisal, H.P. Liu e I. Söderhäll. 2010. Crustacean immunity. 239-259 p. En: Söderhäll, K. (Ed.), *Invertebrate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 708: 239-259.
- Chang, C.F., M.S. Su, H. Chen e I. Liao. 2003. Dietary-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 297-310.
- Chappe-Bonnichon, V. 2006. Infections virales chez les crevettes: interférence, inhibition plasmatique et développement d'un modèle in vitro. Tesis Doctoral. Université Montpellier II.
- Chen, W.Y., H.C. Wang y C.L. Lo. 2008. Modulation of bio-defense genes in WSSV-infected *Penaeus monodon*. 399-408 p. En: Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish M. y Subasinghe, R.P. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*.
- Condé, R., M. Argüello, J. Izquierdo, R. Noguez, M. Moreno y H. Lanz. 2012. Natural antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. 51-72 p. En: Bobbarala, V. (Ed.), *Antimicrobial Agents. InTech*.

- COSAES. 2013. Boletín informativo 2013. Boletín urgente SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. www.cosaes.com.
- COSAES. 2014. Informe Final Ciclo 2014. Seguimiento a los Cultivos de Camarón del Estado de Sonora. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A. C. www.cosaes.com.
- Coscia, M.R., S. Giacomelli y U. Oreste. 2011. Toll-Like receptors: an overview from invertebrates to vertebrates. *Invertebrate Survival Journal*. 8: 210-226.
- Cuthbertson, B.J., L.J. Deterding, J.G. Williams, K.B. Tomer, K. Etienne, P.J. Blackshear, E.E. Büllsbach y P.S. Gross. 2008. Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Developmental Comparative Immunology*. 32: 167-181.
- Danwattananusorn, T., F.F. Fagutao, A. Shitara, H. Kondo, T. Aoki, R. Nozakie e I. Hirono. 2011. Molecular characterization and expression analysis of heat shock proteins 40, 70 and 90 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish. Science*. 77: 929-937.
- De la Vega, E., B.M. Degnan, M.R. Hall y K.J. Wilson. 2007. Differential expression of immune-related genes and transposable elements in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) exposed to a range of environmental stressors. *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 1072-1088.
- de-la-Re-Vega, E., A. García-Galaz, M.E. Díaz-Cinco y R.R. Sotelo-Mundo. 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 405-408.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps y E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113: 461-469.
- Dong, B. y J.H. Xiang. 2007. Discovery of genes involved in defense/immunity functions in a haemocytes cDNA library from *Fenneropenaeus chinensis* by ESTs annotation. *Aquaculture*. 272: 208-215.
- Enghild, J.J., I.B. Thøgersen, G. Salvesen, G.H. Fey, N.L. Figler, S.L. Gonias y S.V. Pizzo. 1990. Alpha-macroglobulin from *Limulus polyphemus* exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system. *Biochemistry*. 29: 10070-10080.
- Escobedo-Bonilla, C.M., L. Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert y H.J. Nauwynck. 2006. Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Disease of Aquatic Organisms*. 68: 181-188.
- Eustace, B.K. y D.G. Jay. 2004. Extracellular roles for the molecular chaperone, HSP90. *Cell Cycle*. 3: 1098-10100.

- Fagutao, F.F., H. Kondo, T. Aoki e I. Hirono. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp. 171-176 p. En: Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. y Aoki, T. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia.
- Fagutao, F.F., M. Yasuike, C.M. Caipang, H. Kondo, I. Hirono, Y. Takahashi y T. Aoki. 2008. Gene expression profile of Hemocytes of Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* following peptidoglycan stimulation. Marine Biotechnology. 10: 731-740.
- FAO.1980. Shrimps and Prawns of the World. An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. FAO Fisheries Synopsis No.125, Volume 1.
- FAO. 2012. El estado mundial de la acuicultura 2012. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 231 p.
- FAO. 2015. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 April 2006. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es#tcNA0126
- Feder, M.E. y G.E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology. 61: 243-282.
- Feng, N., D. Wang, R. Wen y F. Li. 2014. Functional analysis on immune deficiency (IMD) homolog gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Molecular Biology Reports. 41: 1437-1444.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen 1. Plantas e Invertebrados. Roma. FAO. 646 p.
- Gollas-Galván, T., J. Hernández-López y F. Vargas-Albores. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology. 117: 419-425.
- Gómez-Anduro, G.A., C.V. Barillas-Mury, A.B. Peregrino-Uriarte, L. Gupta, T. Gollas-Galván y J. Hernández-López. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Developmental and Comparative Immunology. 30: 893-900.
- Granja, C.B., L.F. Aranguren, O.M. Vidal, L. Aragón y M. Salazar. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*?. Diseases of Aquatic Organisms. 54: 73-78.

- Granja, C.B., O.M. Vidal, L.G. Parra y M. Salazar. 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 68: 175-180.
- Guan, Y., Z. Yu y C. Li. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83: 257-260.
- Gupta, S. 1999. Molecular interactions among pap-1, sphs and propo in activation of prophenoloxidase. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. A.N.G.R. Agricultural University. Oklahoma State University.
- He, F.F. y J. Kwang. 2008. Identification and characterization of a new E3 ubiquitin ligase in white spot syndrome virus involved in virus latency. *Virology Journal*. 5: 151.
- Hehemann, J.H., L. Redecke, J. Murugaiyan, M. von Bergen, C. Betzel y R. Saborowski. 2008. Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 370: 566-571.
- Herbinière, J. 2005. Contribution à la mise en évidence des effecteurs impliqués dans l'immunité innée d'*Armadillidium vulgare*, crustacé isopode terrestre infecté par une bactérie du genre *Wolbachia*. Tesis Doctoral. Faculté Des Sciences Fondamentales Et Appliquées. L'université De Poitiers. France.
- Hernández-Covarrubias, V., H.A. Muñoz-Rubí, J. Madrid-Vera y D. Chávez-Herrera. 2012. Fecundidad del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la plataforma continental de Sinaloa, México. *Ciencia Pesquera*. 20(2): 17-21.
- Hernández-López, J. 2001. Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Hikima, S., J. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono y T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*. 316: 187-195.
- Holmblad, T. y K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172: 111-123.
- Hossain, M.S., S. Khadijah y J. Kwang. 2004. Characterization of ORF89 a latency-related gene of white spot syndrome virus. *Virology*. 325: 106-115.
- Huang, H.H., X.L. Liu, J.H. Xiang y P. Wang. 2013. Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 406-407: 115-120.
- Huang, P.Y., S.T. Kang, W.Y. Chen, T.C. Hsu, C.F. Lo, K.F. Liu y L.L. Chen. 2008. Identification of the small heat shock protein, HSP21, of shrimp *Penaeus monodon* and

the gene expression of HSP21 is inactivated after white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 250-257.

- Huang, W.J., J.H. Leu, M.T. Tsau, J.C. Chen y L.L. Chen. 2011. Differential expression of LvHSP60 in shrimp in response to environmental stress. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 576-582.
- Jeswin, J., A. Anju, P.C. Thomas, M.P. Paulton y K.K. Vijayan. 2013. Survivability of *Penaeus monodon* during white spot syndrome virus infection and its correlation with immune related genes. *Aquaculture*. 380-383: 84-90.
- Ji, P.F., C.L. Yao y Z.Y. Wang. 2011. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. *Disease of Aquatic Organisms*. 96: 9-20.
- Jiang, S., L. Qiu, F. Zhou, J. Huang, Y. Guo y K. Yang. 2007. Molecular cloning and expression analysis of a heat shock protein (Hsp90) gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Molecular Biology Reports*. 36: 127-134.
- Jiravanichpaisal, P. 2005. White spot syndrome virus interaction with freshwater crayfish. *Acta Universitatis Uppsaliensis. Digital comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 47. 56 p.
- Johansson, M.W., P. Keyser, P. Sritunyalucksana y K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.
- Jollès, P. y J. Jollès. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 63: 165-189.
- Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin y J. Itami. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 164: 243-251.
- Khadijah, S., S.Y. Neo, M.S. Hossain, L.D. Miller, S. Mathavan y J. Kwang. 2003. Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of amicroarray. *Journal of Virology*. 77: 10162-10167.
- Kiang, J.G. y G.C. Tsokos. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology and Therapeutics*. 80: 183-201.
- Kim, K.K., R. Kim y S.H. Kim. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*. 394: 595-599.
- Lai C.Y., W. Cheng y C.M. Kuo. 2005. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and shellfish Immunology*. 18: 417-430.

- Lan, J.F., J. Zhou, X.W. Zhang, Z.H. Wang, X.F. Zhao, Q. Ren y J.X. Wang. 2013. Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Developmental and Comparative Immunology*. 41: 608-617.
- Laxmilatha, P. y A. Laxminarayana. 2004. Fine Structure of the Haemocytes of the Indian White Shrimp, *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837). *Crustaceana*. 77: 835-848.
- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*. 191: 121-131.
- Li, F. y J. Xiang. 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 973-980.
- Li, F., W. Luan, C. Zhang, J. Zhang, B. Wang, Y. Xie, S. Li y J. Xiang. 2009. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hipoxia. *Cell Stress Chaperones*. 14: 161-172.
- Lightner, D.V. 2003. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status, *Proceedings of the 32nd Joint UJNR Aquaculture Panel Symposium*. Pp. 17-20.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, C.R. Pantoja, K.F.J. Tang, B.L. Noble, P. Schofield, L.L. Mohny, L.M. Nunan y S.A. Navarro. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110: 174-183.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, B.T. Poulos, L.M. Nunan, J.L. Mari y K.W. Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Revue Scientifique et Technique*. 16(1): 146-160.
- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106: 110-130.
- Lindquist, S. y E.A. Craig. 1988. The Heat-Shock Proteins. *Annual Reviews in Genetics*. 22: 631-677
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lu, L. y J. Kwang. 2004. Identification of a novel shrimp protein phosphatase and its association with latency-related ORF427 of white spot syndrome virus. *FEBS Letters*. 577: 141-146.

- Ma, H., B. Wang, J. Zhang, F. Li y J. Xiang. 2010. Multiple forms of alpha-2 macroglobulin in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and their transcriptional response to WSSV or *Vibrio* pathogen infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 34:6 77–684.
- Mai, W.J. y W.N. Wang. 2010. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *Fish and Shellfish immunology*. 28: 727-733.
- Malago, J.J., J.F. Koninkx y J.E. van Dijk. 2002. The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium. *Cell Stress and Chaperones*. 7: 191–199.
- Manzo, D.H. 2000. Efecto de cuatro densidades de siembra sobre el crecimiento del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado en estanques rústicos, en Manzanillo, Colima. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad de Colima.
- Marshall, S.H. y G. Arenas. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 271-284.
- Martínez-Córdova, L.R., M. Martínez-Porchas y E. Cortés-Jacinto. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25(3): 181-196.
- Mavroulia, M.D., S. Tsakasa, G.L. Theodoroub, M. Lampropoulou y V.J. Marmaras. 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1744: 145–156.
- McGraw, W.J., D.A. Davis, D. Teichert-Coddington y D.B. Rouse. 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33: 78–84.
- Moser, J.R., D.A. Galván-Álvarez, F. Mendoza-Cano, T. Encinas-García, D.E. Coronado-Molina, G. Portillo-Clark, M. Risoleta, F. Marques, F.J. Magallón-Barajas y J. Hernández-López. 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*. 326-329: 9–14.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhed y E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191: 89–107.
- OIE. 2013. Aquatic animal health code 2013. World Organization for Animal Health. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-code/access-online/>

- Pang, Q., S. Zhang, C. Wang, X. Shi y Y. Sun. 2004. Presence of prophenoloxidase in the humoral fluid of amphioxus *Branchiostoma belcheritsingtauense*. Fish and Shellfish Immunology. 17: 477-487.
- Peinado-Guevara, L.I. y M. Lopez-Meyer. 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. Aquaculture. 251: 33-45.
- Perazzolo, L.M. y M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Developmental and Comparative Immunology. 2: 385-395.
- Perera E., J. Rodríguez-Casariego, L. Rodríguez-Viera, J. Calero, R. Perdomo-Morales y J.M. Mancera. 2012. Lobster (*Panulirus argus*) hepatopancreatic trypsin isoforms and their digestion efficiency. The Biological Bulletin. 222: 158-170.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. NucleicAcids Research. 29: e45.
- Phuoc, L.H. 2008. Single and dual experimental infection of specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio* species. Tesis Doctoral. Ghent University, Belgium.
- Pockley, A.G. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet. 362: 469-476.
- Ponce-Palafox, J., C.A. Martinez-Palacios y L.G. Ross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture.157: 107-115.
- Quintana, F.J. y I.R. Cohen. 2005. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. Journal Immunology. 175: 2777-2782.
- Rahman, M.M., C.M. Escobedo-Bonilla, M. Corteel, J.J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday Sanz, M.B. Pensaerth, P. Sorgeloos y H.J. Nauwynckb. 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 261: 842-849.
- Ramos-Paredes, J., J.M. Grijalva-Chon, J. De la Rosa-Vélez y L.M. Enríquez-Paredes. 2012. New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Boone) in northwest Mexico. Aquaculture Research. 43: 339-348.
- Reynaud, Y. 2008. Identification de marqueurs génétiques de la virulencechez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie. Tesis Doctoral. Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie.

- Rivera-Velázquez G., L.A. Soto, I.H. Salgado-Ugarte y E.J. Naranjo. 2008. Growth, mortality and migratory pattern of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Crustacea, Penaeidae) in the Carretas-Pereyra coastal lagoon system, México. *Reviews of Tropical Biology*. 56: 523-533.
- Robert, J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 449-464.
- Roberts, R.J., C. Agius, C. Saliba, P. Bossier y Y.Y. Sung. 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases*. 33: 789-801.
- Rodríguez-Valencia, J.A., D. Crespo y M. López-Camacho. 2010. La camaronicultura y la sustentabilidad del Golfo de California. Available from: <http://www.wwf.org.mx>.
- Rolland, J.L. 2010. Aspects moléculaires et biochimiques des stylicines, peptides multifonctionnels identifiés chez la crevette bleue du Pacifique *Litopenaeus stylirostris* (Crustacea, Decapoda). Tesis Doctoral. Université Montpellier II.
- Roux, M.M., A. Pain, K.R. Klimpel y A.K. Dhar. 2002. The lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*. 76: 7140-7149.
- Rungrassamee, W., R. Leelatanawit, P. Jiravanichpaisal, S. Klinbungab y N. Karoonuthaisiri. 2010. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 34: 1082-1089.
- SAGARPA. 2009. Estudio de la infraestructura logística para la exportación del camarón blanco a algunas ciudades de Estados Unidos y Canadá. convenio de concentración que celebran el firco y camaronicultores de Sonora, s.p.r. de r.l., para formalizar la entrega de los apoyos del plan anual de trabajo, componente desarrollo de mercados "promercado". 324 p.
http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/CAMARONICULTORES.pdf
- SAGARPA. 2010. México: sexto productor mundial de camarón. Boletines. SIAP. GC. Anuario estadístico 2010 de CONAPESCA.
- Sagarpa. 2012. CONAPESCA, consulta específica por especie. Registro de estadística pesquera y acuícola. www.conapesca.sagarpa.gob.mx.
- SAGARPA. 2013. Seguimiento mensual de la producción de Camarón. 2013 Preliminar. Conapesca. Gob. Mx.
http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/seguimiento_mensual_de_la_produccion_de_camaron_20.

- Sánchez-Martínez, J.G., G. Aguirre-Guzmán y H. Mejía-Ruíz. 2007. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*. 38: 1339-1354.
- Sánchez-Paz, A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research*. 41(6): 43.
- Sankar, G., K. Ramamoorthy, K. Sakkaravarthi y S. Vanitha. 2011. Prevalence of shrimp viral pathogen (WSSV) in marine ecosystem. *Aquaculture Aquarium Conservation and Legislation BIOFLUX*. 4(1): 40-45.
- Sankar M.M., C.H. Nageswar-Rao, G. Salilaja, N. Bhuvaneshwary y P. Gunasekhar. 2013. White Spot Virus detection in shrimp images using image segmentation techniques. *International Journal Of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*. 3: 107-112.
- Saravanan, T., C. Weise, D. Sojka y P. Kopáček. 2003. Molecular cloning, structure and bait region splice variants of alpha2-macroglobulin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33: 841-851.
- Seibert, C.H. y A.R. Pinto. 2012. Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43: 857-864.
- Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*. 1: 1383-1392.
- Shi, X.Z., X.C. Li, S. Wang, X.F. Zhao y J.X. Wang. 2010. Transcriptome analysis of hemocytes and hepatopancreas in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, challenged with white spot syndrome virus. *Invertebrate Survival Journal*. 7: 119-131.
- Sotelo-Mundo, R.R., M.A. Islas-Osuna, E. de-la-Re-Vega, J. Hernández-López, F. Vargas-Albores y G. Yepiz-Plascencia. 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 325-331.
- Spees, J.L., S.A. Chang, M.J. Snyder y E.S. Chang. 2002. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: equivalent temperature shifts elicit unique gene expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. *Cell Stress and Chaperones*. 7: 97-106.
- Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2: 185-194.
- Storey, K.B. y J.M. Storey. 2011. Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation. *Research and Reports in Biology*. 2: 57-68.
- Swapna, P.A., I.S. Bright Singh, N.S. Sudheer, S. Vrinda, P. Priyaja y R. Philip. 2011. Molecular characterization of a crustin like antimicrobial peptide in the giant tiger

- shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*. 216: 184–194.
- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán y J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenol oxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology*. 106: 299-303.
- Vargas-Albores, F., P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark, y F. Magallon-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquaculture Research*. 29: 549–553.
- Velasco, M., A.L. Lawrence, F.L. Castille y L.G. Obaldo. 2000. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Vidal, O.M., C.B. Granja, F. Aranguren, J.A. Brock y M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of World Aquaculture Society*. 32: 364–372.
- Walker, P.J. y C.V. Mohan. 2009. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture*. 1: 125-154.
- Wang, P.H., D.H. Wan, Z.H. Gu, X.X. Deng, S.P. Weng, X.Q. Yu y J.G. He. 2011. *Litopenaeus vannamei* tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) responds to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection and activates antimicrobial peptide genes. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 105-114.
- Wang, P.H., J.P. Liang, Z.H. Gu, D.H. Wan, S.P. Weng, X.Q. Yu y J.G. He. 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*. *Developmental and Comparative Immunology*. 36: 359-371.
- Wang, S., A.J. Chen, L.J. Shi, X.F. Zhao y J.X. Wang. 2012. TRBP and eIF6 homologue in *Marsupenaeus japonicus* play crucial roles in antiviral response. *PLoS ONE* 7: e30057.
- Wongmaneeprateep, S., P. Baoprasertkul, P. Prompamorn, K. Thongkao, C. Limsuwan y N. Chuchird. 2010. Effects of water temperature on the white spot syndrome virus infection in postlarvae *Litopenaeus vannamei*. *Walailak Journal of Science and Technology*. 7: 127-134.

- Woramongkolchai, N., P. Supungul y A. Tassanakajon. 2011. The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 530-536.
- Xu, Q. y Y. Qin. 2012. Molecular cloning of heat shock protein 60 (PtHSP60) from *Portunus stri tuberculatus* and its expression response to salinity stress. *Cell stress chaperones*. 17: 589-601.
- Yan, F., D. Xia, J. Hu, H. Yuan, T. Zou, Q. Zhou, L. Liang, Y. Qi y H. Xu. 2010. Heat shock cognate protein 70 gene is required for prevention of apoptosis induced by WSSV infection. *Archives of Virology*. 155: 1077-1083.
- Yang F., J.He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang y X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology*. 75: 11811-11820.
- Yang, L.S., Z.X. Yin, J.X. Liao, X.D. Huang, C.J. Guo, S.P. Weng, S.M. Chan , X.Q. Yu y J.G. He. 2007. A Toll receptor in shrimp. *Molecular Immunology*.44: 1999-2008.
- Yavelsky, V., O. Vais, B. Piura, M. Wolfson, A. Rabinovich y V. Fraifeld. 2004. The role of Hsp90 in cell response to hyperthermia. *Journal of Thermal Biology*. 29: 509-514.
- Yu, X.Q., Y.F. Zhu, C. Ma, J.A. Fabrick y M.R. Kanost. 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochemical Molecular Biology*. 32: 1287-1293.
- Yu, X.Q. y M.R. Kanost. 2002. Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *European Journal of Biochemistry*. 269: 1827-1834.
- Zhang, F., K. Jiang, D. Zhang, C. Ma, H. Ma y L. Ma. 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 (HSP90) from the mud crab *Scylla paramamosain*. *African Journal of Biotechnology*. 11: 6296-6304.
- Zhou, J., W.N. Wang, W.Y. He, Y. Zheng, L. Wang, Y. Xin, Y. Liu y A.L. Wang. 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: 170-178.