

TESIS DEFENDIDA POR  
**DAVID OSVALDO MARTÍNEZ CORONA**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Ivone Giffard Mena  
*Co-directora de tesis*

---

Dra. Ana Denise Re Araujo  
*Co-directora de tesis*

---

Dr. Luis Manuel Enriquez Paredes  
*Miembro del Comité*

---

M.C. Luis Mendoza Garcilazo  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
*Coordinador del programa de posgrado  
en (Ciencias de la vida)*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

3/Octubre/2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**EXPRESIÓN GENÉTICA EN FAMILIAS DE *Penaeus vannamei* EXPUESTAS  
EXPERIMENTALMENTE AL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)**

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

**DAVID OSVALDO MARTÍNEZ CORONA**

Ensenada, Baja California, México, Octubre-2011

**RESUMEN** de la tesis de **DAVID OSVALDO MARTÍNEZ CORONA**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en CIENCIAS DE LA VIDA con ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. **Octubre 2011**

**EXPRESIÓN GENÉTICA EN FAMILIAS DE *Penaeus vannamei* EXPUESTAS EXPERIMENTALMENTE AL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV).**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Ivone Giffard Mena  
*Co-Directora de tesis*

---

Dra. Ana Denise Re Araujo  
*Co-Directora de tesis*

El virus de la mancha blanca o White Spot Syndrome Virus (WSSV, por sus siglas en inglés) es un patógeno letal que afecta el cultivo de camarón a nivel mundial. Los síntomas visibles de los animales infectados son letargia, pérdida del apetito, expansión de cromatóforos y nado errático, pero se ha observado también una pérdida de la capacidad osmorreguladora y la presencia de inclusiones blancas de 0.2 a 0.5 mm (depósitos de calcio) al interior de la cutícula en las etapas tardías de la infección. Las medidas para contrarrestar la infección se han enfocado en mejorar los sistemas de bioseguridad, otra opción es el desarrollar camarones resistentes a patógenos específicos (SPR, por sus siglas en inglés) mediante programas de selección genética. En México se han desarrollado programas de selección genética desde hace algunos años enfocados a mejorar el crecimiento, y los organismos provenientes de familias seleccionadas son distribuidos por todo el país, sin embargo se desconoce si estas poblaciones presentan mayor ó menor susceptibilidad a patógenos, especialmente al WSSV. En el presente trabajo se evaluó mediante PCR en tiempo real la respuesta de tres familias de camarones provenientes de un programa de selección genética y un lote domesticado ante una infección experimental con el WSSV. Se cuantificó la expresión de genes implicados en el sistema inmune (crustinas y peneidinas), la osmorregulación (ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) y el gen viral VP664, para detectar respuestas diferenciales entre familias y examinar la relación del mecanismo de osmorregulación con el proceso de infección viral. Los camarones de las tres familias seleccionadas presentaron mayor sobrevivencia que el lote domesticado al desafiarlos experimentalmente con el WSSV. Los camarones infectados con el WSSV alcanzaron un 100 % de mortalidad entre las 75 y 85 hpi. Aunque no fue posible determinar la sobrevivencia en condiciones naturales debido a que en esta tesis se infectó mediante inyección vía intramuscular este método permitió diferenciar la susceptibilidad entre familias. Los niveles de transcritos de ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no se vieron afectados por el WSSV, el cual incrementa el número de copias de su

proteína estructural VP664 de manera exponencial entre las 6 y 24 hpi. La expresión de las crustinas y penaeidinas se presentaron de manera fluctuante entre familias y tratamientos siendo suprimida su expresión en organismos domesticados y seleccionados infectados. La crustina presentó una correlación positiva con mayor tiempo de sobrevivencia post inyección en solo una de las tres familias (rosa), lo cual hace un posible candidato como marcador inmunológico.

**Palabras clave:** Programa de selección genética, Sistema inmune, Osmoregulación, Q-PCR, ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , Crustinas, Peneidinas

**ABSTRACT** of the thesis presented by **DAVID OSVALDO MARTÍNEZ CORONA** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE DEGREE** in Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México October 2011.

**GENE EXPRESSION ON *Penaeus vannamei* FAMILIES EXPOSED EXPERIMENTALLY TO WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV).**

The white spot syndrome virus (WSSV) is a lethal pathogen in the shrimp farming industry worldwide. Visible symptoms of infected animals are lethargy, food consumption loss, chromatophores expansion and erratic swimming behavior. It also has been observed that they lose osmoregulation capacity. Infected shrimp usually show white spot inclusions of 0.5 – 2.0 mm in diameter (calcium deposits) on the inside cuticle during the last stages of the infection. Countermeasures have focused on the improvement of biosecurity protocols in order to prevent the infection. Another option is the development of specific pathogen resistant shrimps (SPR) through genetic selection programs. Even when, some genetic selection programs had been developed in Mexico during the last years they mainly focused on growing improvement. Organisms originated from these programs are widely distributed along the country, but It is unknown if these populations are more or less susceptible to pathogens, particularly to WSSV. The present work has the purpose to evaluate, through Real Time PCR, the response of descendant shrimps from a genetic selection program and a domesticated lot both infected experimentally with WSSV. We quantified two genes involved in the immune system response (crustins and penaeidins), one involved in osmoregulation process (ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) and the viral gene VP664 to detect differential responses between families and examine the relation within osmoregulation mechanism and the viral infection process. Three selected families had higher survival than the domesticated lot challenged experimentally with WSSV. Infected shrimps reach 100% mortality between 75 and 85 hpi. Although is not possible to determine survival under natural conditions because virus was inoculated by injection, this method allowed us to differentiate the susceptibility between families. ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transcripts levels was not affected by WSSV infection, copy number of viral structural protein VP664 increases exponentially between 6 and 24 hpi. Expression levels of crustins and penaeidins fluctuates between families and treatments with suppressed expression on selected and domesticated infected organisms. Crustin presented a positive co-relation with major post-injection survival time in only one of three families (pink), which makes it a possible immunological marker to measure the susceptibility to WSSV.

**Keywords:** Genetic selection program, Immune system, Osmoregulation, Q-PCR, ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, Crustins, Penaeidins

## **Dedicatorias**

A mi familia por su incondicional apoyo, por su confianza, por los ánimos que me han dado en todo momento

A mis padres Noemí Corona y Hector Martínez

A mis hermanos Eliud y Abel

Un agradecimiento especial a mis tíos Octavio y Ana y a mi prima Belén “Fufú” por toda la atención y apoyo que me han dado y hacerme sentir como en casa en esta ciudad de Ensenada.

A todas las personas que tanto quiero y estimo (amigos de toda mi vida y mis primos)

A mi María preciosa, espero que estemos juntos de nuevo.

## **Agradecimientos**

Una infinita gratitud a todas las personas que me ayudaron tanto moral como académicamente para realizar este trabajo de tesis.

A los miembros de mi comité de tesis; Dra. Ivone Giffard por haberme dado la oportunidad y confianza de trabajar en este proyecto de investigación y por todas sus enseñanzas, Dra Denise Re, por su apoyo incondicional en los asuntos académicos en el CICESE y por sus atenciones a mis inquietudes y dudas, Dr. Luis Enríquez, por sus observaciones certeras y enseñanzas, M.C. Luis Mendoza por haber aceptado formar parte de mi comité de tesis.

Al Oc. Joel Lizárraga y al personal de Aquapacific S.A. de C.V. por donar los camarones seleccionados, por su atención y amabilidad que nos brindaron en nuestra visita a las instalaciones de la empresa.

A todos mis compañeros del CICESE y de la UABC, en especial al Biol. Renné Cazares por sus aportaciones a este trabajo tesis, y a los alumnos de ayudantía Antonia, Natalia y mi compañera de laboratorio Jeny por entrarle al acarreo y clasificación de los camarones.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Ecología Molecular “Jorge de la Rosa Vélez”.

A los Laboratorios de Biología Molecular (IIO - UABC) y Biotecnología Marina (CICESE) por prestarnos el termociclador para los análisis de Q-PCR.

Al CICESE como institución receptora de estudios

Al CONACYT por otorgarme la beca de maestría No 231855.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>Contenido</b> .....	vi
<b>Lista de Tablas</b> .....	vii
<b>Lista de Figuras</b> .....	viii
<b>I. Introducción</b> .....	1
I.1 Enfermedad del camarón causada por WSSV.....	3
I.2 Selección de camarones por menor susceptibilidad al virus de la mancha blanca WSSV.....	6
<b>II. Antecedentes</b> .....	7
<b>III. Justificación</b> .....	9
<b>IV. Objetivos</b> .....	10
IV.1 Objetivo general.....	10
IV. 2 Objetivos particulares.....	10
<b>V. Hipótesis</b> .....	11
<b>VI. Materiales y métodos</b> .....	11
VI.1 Obtención de camarones domesticados.....	12
VI.2 Camarones seleccionados.....	12
VI.3 Diseño experimental del bioensayo.....	14
VI.4 Preparación del inóculo viral.....	15
VI.5 Extracción de RNA.....	16
VI.6 Tratamiento para eliminar DNA genómico.....	17
VI.7 Síntesis de cDNA o Transcripción Reversa (RT).....	18
VI.8 Detección de WSSV por PCR.....	18
VI.9 Clonación de productos PCR.....	19
VI.10 PCR en Tiempo real QPCR.....	20
VI.11 Análisis estadístico.....	22
<b>VII. Resultados</b> .....	23
VII.1 Supervivencia de los camarones desafiados con el WWSV.....	23
VII.2 Detección del WSSV por PCR.....	24
VII.3 Cuantificación de genes por PCR Tiempo Real (Q-PCR).....	25
VII.4 Cuantificación de la expresión de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> .....	31
VII.5 Cuantificación de la expresión de crustina.....	31
VII.6 Cuantificación de la expresión de la penaeidina.....	33
VII.7 Cuantificación de la expresión del gen viral VP664.....	34
<b>VIII. Discusión</b> .....	35
<b>XI. Conclusiones</b> .....	43
<b>X Literatura citada</b> .....	44
<b>XI Anexo I</b> .....	53



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Diseño experimental: Distribución de los camarones durante el periodo de aclimatación para el desarrollo del experimento de desafío con WSSV en el LPEA.	15
II	Tamaño de fragmentos amplificados para cada gen y número de moléculas de las soluciones madre obtenidos por el cálculo de la ecuación (1).	25
III	Cebadores empleados para cuantificar la expresión de genes por PCR en Tiempo Real.	53
IV	Secuencias de cebadores empleados para la amplificación del WSSV (ORF94) y la $\beta$ -Actina en <i>P. vannamei</i> .	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Camarones experimentales seleccionados y domesticados.	14
2	Curvas de sobrevivencia de <i>P. vannamei</i> infectados experimentalmente con el virus de mancha blanca.	24
3	Electroforesis de productos de PCR de los genes ORF94 y $\beta$ -Actina.	25
4	Amplificación por Q-PCR de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$ de <i>P. vannamei</i> .	27
5	Amplificación por Q-PCR de crustina de <i>P. vannamei</i> .	28
6	Amplificación por Q-PCR de peneidina de <i>P. vannamei</i> .	29
7	Amplificación por Q-PCR del gen viral WSSV-VP664.	30
8	Cuantificación de expresión de genes (ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , crustina, peneidina y VP664) por Q-PCR de camarones experimentales del área control e infección a diferentes horas post inyección (hpi).	32

## I. Introducción

---

*Penaeus vannamei* es la especie de camarón marino más cultivado en América. Es un animal eurihalino (tolerante a un amplio rango de salinidades) cuya distribución natural se extiende desde la costa del Pacífico de México hasta Perú (Briggs *et al.*, 2005). *P. vannamei* comúnmente conocido como “camarón blanco,” es un crustáceo de la familia Penaeidae (Main y Brock, 1994). Debido a su alta tolerancia a la baja salinidad, constituye un excelente candidato para ser cultivado en aguas continentales (Saoud *et al.*, 2003). En el 2004, los acuacultores de 14 países del hemisferio oeste produjeron más de 200,000 toneladas de camarón, generaron más de 2 billones de dólares de ganancias y dieron empleo a más de 500,000 personas (Lightner, 2011).

En estos organismos tienen la capacidad de adaptarse a diferentes salinidades (mediante el mecanismo de osmorregulación), dicho mecanismo se lleva a cabo a través de tejidos y epitelios especializados, responsables del transporte activo de sales principalmente a nivel de las branquias, tejido gastrointestinal y órganos excretores (Barba, 1999). En los crustáceos adultos el mantenimiento estable de la osmolalidad de la hemolinfa y las concentraciones iónicas, diferentes a las del medio externo, está basado en el transporte activo, principalmente de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , a través de la ingestión y la excreción de acuerdo al medio exterior. En el intercambio iónico intervienen diferentes enzimas (Pèqueux, 1995). La mayoría de los experimentos han demostrado que las branquias de los crustáceos eurihalinos sirven como órgano principal de la osmorregulación para el transporte de iones (Towle y Weihrauch, 2001). Se sabe, que la principal fuerza que impulsa el transporte de iones a través de las branquias es suministrada por la bomba  $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$  la cual genera el gradiente eléctrico para el movimiento para- y trans- celular de otros iones, mediante un conjunto especializado de transportadores, co-transportadores y canales iónicos (Towle, 1990). En branquias

aisladas del cangrejo azul, *Callinectes sapidus* la oubaina, inhibidor de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , bloquea más del 50% de la entrada de sodio del medio externo hacia la hemolinfa (Burnett y Towle, 1990) lo cual causa un desequilibrio en las concentración de iones dentro y fuera de la célula y por lo tanto una pérdida en la capacidad de osmorregulación. Se ha demostrado que el desequilibrio en las proporciones de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  limitan el crecimiento del camarón (Davis *et al.*, 2005).

Particularmente la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , se localiza en células especializadas (ionocitos) que poseen una membrana de superficie altamente elaborada en la región basolateral que encara los fluidos corporales. Dichas células poseen gran cantidad de mitocondrias que proveen el ATP que ejerce el poder de transporte (Towle and Weihrauch, 2001). Los ionocitos responden a cambios del medio ambiente y juegan un papel importante en la detoxificación (Clavero-Salas *et al.*, 2007) y el sistema inmune. Son abundantes en las branquias, las cuales están en contacto directo con el ambiente externo.

Las branquias aparte de ser un órgano osmorregulador también funcionan como sistema de defensa ante microorganismos patógenos, formando nódulos hemocíticos durante la detección de una partícula extraña (Martín *et al.*, 2000). Específicamente la inmunidad en los invertebrados está basada en reacciones celulares que incluyen también la fagocitosis y la encapsulación (Destoumieux *et al.*, 2000). Junto con otras reacciones humorales tales como la coagulación de la hemolinfa, melanización o acciones antimicrobianas, contribuyen a la eliminación de microorganismos invasores (Söderhäll *et al.*, 1996). Otro mecanismo del sistema inmune del camarón es la síntesis de péptidos antimicrobiales (AMP's), la cual se realiza principalmente en los hemocitos (Destoumieux *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2007). La mayoría de los AMP's actúan sobre la membrana de los microbios, y pueden ser constitutivos (que se expresan de forma continua) o

inducidos (que se expresan con la presencia de un agente extraño). Estos permean y desintegran la membrana celular externa (Yeaman and Yount, 2003)

Se han descrito dos familias de AMP's en camarones peneidos; penaeidinas y crustinas. Las crustinas fueron inicialmente descritas en *Carcinus maenas*, como una proteína de 11.5 kDa con actividad contra bacterias Gram positivo (Supungul *et al.*, 2008). Recientemente se han reportado en *P. vannamei* y *P. setiferus* (Bartlett *et al.*, 2002). En *P. vannamei* existen seis isoformas posibles con actividad antimicrobiana contra Gram positivas y Gram negativas, pero los mecanismos de acción antimicrobiana son desconocidos (Vargas – Albores *et al.*, 2004).

La penaeidina tiene actividad antimicrobiana contra bacterias tipo Gram positivo (Cornick and Stewart, 1968) y actividad fúngica (Destoumieux *et al.*, 1999). Existen diferentes isoformas de peneidinas, estas se clasifican en peneidina 2 (PEN2), peneidina 3 (PEN3) y peneidina 4 (PEN4) de acuerdo a la similitud de su secuencia de aminoácidos (Cuthbertson *et al.*, 2002). Dentro de los tres subgrupos de peneidinas, la PEN3 es la más abundante en los hemocitos de *P. vannamei* en cantidad de péptidos y de mRNA (Destoumieux *et al.*, 2000).

### **I.1 Enfermedad del camarón causada por WSSV**

Entre los múltiples virus reportados en los decápodos, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) es el más devastador y el más distribuido (Wang *et al.*, 1999). Es un patógeno que causa un gran impacto económico en el cultivo de los camarones penéidos. Este también infecta a otros crustáceos de agua dulce y marina, incluyendo cangrejos y langostas (Lo *et al.*, 1996a). En el cultivo de camarones, la infección puede ocasionar mortalidades del 100 % en un lapso de 3 a 10 días (Lightner, 1996 a; OIE, 2006b). Este virus fue descubierto en Taiwán en 1992 (Cai *et al.*, 1995). A principios de 1999 fue reportado en Sudamérica y América central y posteriormente fue reportado en Australia y Europa (van Hulten

*et al.*, 2001a). En 2008, la situación sanitaria de la actividad camaronícola mexicana fue crítica debido a la alta incidencia del WSSV en las granjas del estado de Sinaloa, con un total de 244 granjas acuícolas afectadas. En el 2009, la cifra aumentó a 414 de un total de 805 granjas sembradas (CESASIN, 2009).

Morfológicamente los viriones del WSSV son de forma ovoide a baciliforme con un apéndice en forma de vara en uno de sus extremos, contienen una nucleocápside que mide entre 80 a 120 nm de diámetro y 250 a 380 nm de longitud. El virus circula de manera ubicua en la hemolinfa del camarón infectado. Su replicación se lleva a cabo en el núcleo y está indicado por la migración de la cromatina e hipertrofia nuclear (Lightner, 2011).

Tras la infección, las células positivas con el WSSV son observadas primero en el estómago, branquias y la epidermis cuticular del camarón, posteriormente se disemina de manera sistémica a otros tejidos del mesodermo y ectodermo (Chang *et al.*, 1996). Los síntomas de los animales infectados son letargia, pérdida de apetito, nado errático. Usualmente presentan inclusiones blancas de varios tamaños (depósitos de calcio) al interior de la cutícula en las etapas tardías de la infección (Pérez *et al.*, 2005). En muchos casos no se observan estas manchas blancas, síntoma típico de las especies cultivadas en Asia. En muchos casos, los camarones infectados presentan una coloración rojiza, debido a la expansión de cromatóforos de la cutícula (Lightner, 1996), en México se les ha denominado comúnmente como camarones “canela o canelosos”. También se ha detectado que los camarones infectados con este virus, sufren una pérdida de la capacidad osmorreguladora (Ramos-Carreño, 2010; Lightner, 2011), como consecuencia de la destrucción del epitelio branquial. Sin embargo se desconoce si existe alguna relación entre el mecanismo de infección y la ruta metabólica del  $\text{Na}^+$ , del  $\text{Ca}^{2+}$  o algún otro ión.

Hasta ahora se ha secuenciado completamente el genoma de tres aislados del WSSV: Tailandia con 293 kbp (van Hulten *et al.*, 2001), China con 305 kbp (Yang *et al.*, 2001) y Taiwan con 307 kbp (Chen *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la virulencia está relacionada con el tamaño del genoma. Un aislado ancestral de 312 kbp presentó un tiempo letal medio ( $LT_{50}$ ) de 14 días, mientras que un aislado de 292 kbp tuvo un  $LT_{50}$  de 3.5 días. (Marks, 2005). Con esto se demostró que un aislado con un genoma de menor tamaño puede representar una ventaja en la replicación del virus.

Se sabe que el virión está constituido por diferentes proteínas de expresión tardía (se expresan después de la replicación del DNA del virus). Particularmente la proteína VP664 es la más grande y abundante de la nucleocápside del WSSV y es transcrita durante la fase tardía de la infección, por lo que se sugiere que contribuye en el ensamblaje y morfogénesis del virión (Leu *et al.*, 2005).

Para contrarrestar el impacto causado por el WSSV y reducir los problemas de mortalidad se han realizado diversos esfuerzos, entre ellos: 1) Proporcionar alimentos con inmunoestimulantes para incrementar la respuesta de defensa (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004); 2) Aplicar vacunas con el virus fijado a formalina o proteínas recombinantes de la envoltura del WSSV (Namikoshi *et al.*, 2004, Witteveldt *et al.*, 2004); 3) administrar péptidos antimicrobianos (Dupuy *et al.*, 2004) o RNA de doble cadena (dsRNA) (Robalino *et al.*, 2005); 4) manipulación de la temperatura del agua (Jiravanichpaisal *et al.*, 2004, Vidal *et al.*, 2007); 5) desarrollar líneas de organismos SPR (Specific pathogen resistant) (SIS,1998). Con los alimentos y vacunas orales se ha logrado un aumento en la sobrevivencia hasta un 77% de algunos camarones, sin embargo, la inmunoestimulación se reduce después de algunos días del tratamiento (Witteveldt *et al.*, 2004) obteniendo 29% de sobrevivencia final.

## **I.2 Selección de de camarones por menor susceptibilidad al virus de la mancha blanca WSSV.**

Una desventaja del cultivo de camarones provenientes del medio natural es la incapacidad de los camaronicultores de beneficiarse con la domesticación y la mejora genética además del agotamiento de las poblaciones silvestres (Bashirullah *et al.*, 1989). Para evitar este problema la gran mayoría de los animales de cría son producidos utilizando stocks domesticados, sin embargo, es usual que sufran de baja variabilidad genética debido a endogamia y deriva genética (De Donato *et al.*, 2008). La domesticación ideal es el proceso de seleccionar camarones que se adaptan mejor a las condiciones artificiales en las que son cultivados y la cría selectiva mejora rasgos de interés económico como el crecimiento y la resistencia a enfermedades (Gjedrem, 2005) manteniendo estables los niveles de variabilidad genética.

Usualmente, el principal rasgo a mejorar para la selección de cría, es el crecimiento, debido a su relación directa con el sistema de producción y ventas, pero, debido a la mortalidad de camarones ocasionada por enfermedades infecciosas, existe una creciente demanda para producir animales tolerantes a determinadas enfermedades (De Donato *et al.*, 2008). Además la endogamia usualmente se refleja en la debilidad del sistema inmune, por lo que los ensayos de desafío ante patógenos también son un indicador indirecto de la calidad génica (Gjedrem, 2005).

En especial el impacto económico/social que ha causado el WSSV y la falta de tratamiento eficaz para combatirlo han generado la necesidad de desarrollar programas de producción de camarones seleccionados con individuos o familias que presenten menor susceptibilidad al virus (Perez *et al.*, 2001). Estos programas requieren análisis de genética cuantitativa y sistemas de marcaje de animales para poder dar seguimiento y realizar las cruzas con mayores probabilidades de éxito.



Se ha propuesto la posibilidad de usar marcadores (inmunológicos y fisiológicos) tales como medir la producción de lisozima o actividad hemolítica para incrementar la eficiencia de la selección en resistencia a enfermedades en peces. La selección basada en altos niveles de expresión de estos genes ha demostrado tener correlación con mayores niveles de supervivencia (Fjalestad *et al.*, 1993).

También se ha llevado a cabo la cría selectiva y mejora genética en *Penaeus vannamei* (Fjalestad *et al.*, 1997) y *Penaeus monodon* (Jarayabhand *et al.*, 1998) para incrementar el rendimiento de reproductores y de larvas. Recientemente la empresa camaronera CAMACO (Panamá) obtuvo un 23, 26 y 57% de sobrevivencia de tres familias de su programa de selección genética desarrollado desde el 2001 en Panamá, ante una prueba de desafío con el WSSV (Cuellar-Anjel *et al.*, 2011).

## II. ANTECEDENTES

Se ha encontrado expresión de ciertos genes en branquias de *P. vannamei* en respuesta a una infección con el WSSV, algunos de ellos codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo, entre ellas la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , proteínas ribosomales, así como proteínas de stress y del sistema inmune y otros genes no descritos previamente en camarón. También se encontraron diversos transcritos de proteínas involucradas en la estructura y movilidad celular. Esto demuestra que el virus altera la expresión genética en las branquias, lo cual ha permitido identificar nuevos genes específicos del camarón blanco (Clavero-Salas *et al.*, 2007).

Mohankumar y Ramasamy (2006) reportaron una disminución en la actividad de fosfatasas de membrana como la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en branquias y músculo del camarón *Fenneropenaeus indicus* infectado con el WSSV en comparación con camarones sanos. La inactivación de esta enzima puede deberse a que la elevada producción de radicales libres, ocasionan un cambio conformacional de los grupos

SH localizados en el sitio activo de estas enzimas, además afecta la oxidación aeróbica provocando una baja producción de ATP. Con estos resultados concluyeron que la dinámica de la membrana juega un papel importante en la patogénesis de la infección con el WSSV.

García y colaboradores (2009), reportaron la sobreexpresión de la peneidina-3 y crustina en hemocitos de *P. vannamei* previamente desafiados con el WSSV. Detectaron por PCR tiempo real (Q-PCR) un incremento de 165 veces la expresión de la lectina tipo C, 36 veces de la peneidina-3 y 4 veces más la expresión de la crustina en camarones previamente desafiados en comparación a los camarones naïve o desafiados por primera vez. Esta investigación sugiere que la sobreexpresión o expresión elevada de los genes del sistema inmune, puede estar relacionada con la sobrevivencia de los camarones previamente desafiados al WSSV.

Por otro lado, el Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia (CENIACUA) ha obtenido de manera exitosa, familias de camarones resistentes al Virus del Síndrome Taura (TSV) con correlaciones positivas con otros rasgos de importancia económica como crecimiento, sobrevivencia en el cultivo y fecundidad (Cock *et al.*, 2008).

Cuellar-Anjel y colaboradores (2011) reportaron por primera vez en la literatura científica la resistencia de *P. vannamei* al WSSV, mediante una prueba de desafío de infección oral de familias seleccionadas provenientes de camarones de ciclo cerrado sobrevivientes al WSSV durante una década. En el bioensayo, realizado en la Universidad de Arizona (UAZ), se lograron obtener 23, 26 y 57% de sobrevivencia en tres familias. Con estos resultados se concluyó que los camarones nunca fueron infectados con el virus o que eran lo suficientemente resistentes para mantener niveles por debajo del nivel de detección de Q-PCR.

En México, la empresa mexicana Acuapacific SA de CV (localizada en Mazatlán Sinaloa), conduce un programa de selección genética desde el año 2006 con organismos sobrevivientes a un brote de IHHNV (Virus de Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa). Este programa se basa en el desarrollo de familias de camarones seleccionadas por características específicas de interés económico. La empresa parte de 40 familias por generación, a las cuales se evalúa el crecimiento, robustez (pruebas de campo y nivel de actividad de los individuos), capacidad reproductiva (número de desoves, % de eclosión y % de sobrevivencia larvaria) así como resistencia al WSSV. A lo largo de 7 generaciones de selección múltiple se pueden diferenciar familias con mayor tiempo de sobrevivencia con respecto a organismos no seleccionados o entre familias (Giffard-Mena y Enriquez-Paredes, 2010). Al comenzar el programa, de las 40 familias obtenidas en cada ciclo, se seleccionaban 15 con los mejores puntajes de todos los parámetros excepto la exposición al virus. Esas 15 familias y un lote domesticado eran desafiadas con el WSSV y de aquí se seleccionaban las tres familias que presentaban mayor tiempo de sobrevivencia para llevarlas a producción masiva (Cázares-Simental, en preparación). Actualmente se retan las 40 familias con el objetivo de obtener las 3 mejores en todos los parámetros de interés.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Uno de los principales objetivos de la camaronicultura es lograr un alto crecimiento, mayor sobrevivencia y aumentar las tasas de reproducción de las especies en cultivo. Dichas características se logran mejorar mediante programas de selección genética. Este tipo de programas son favorecidos por la alta demanda del producto, competencia por el mercado de engorda y en años más recientes por problemas de mortalidad generados por agentes patógenos, principalmente virales. En México los programas de selección genética se han venido desarrollando desde hace algunos años y los organismos provenientes de familias seleccionadas son distribuidos por todo el país. Sin embargo se

desconoce si estas poblaciones son más susceptibles al WSSV o si por el contrario es posible que estas familias sean menos susceptibles al virus. El presente trabajo tiene el propósito de evaluar la respuesta de camarones provenientes de un programa de selección genética, inicialmente sobrevivientes al IHNV y cuantificar mediante Q-PCR la expresión de genes implicados en la osmorregulación (ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) y el sistema inmune (crustina y penaeidina). Se evaluará si alguno de estos genes funciona como marcador molecular fisiológico que indique correlación genética positiva con la sobrevivencia.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1 Objetivo general**

Evaluar el grado de susceptibilidad de camarón blanco *Penaeus vannamei* proveniente de un programa de selección genética con respecto a un lote domesticado ante una infección con el virus de mancha blanca (WSSV) y determinar los niveles de expresión de genes de respuesta fisiológica y del sistema inmune.

### **IV.2 Objetivos particulares**

1. Cuantificar y comparar la sobrevivencia de tres familias del programa de selección y un lote de camarón domesticado ante la infección con el WSSV.
2. Determinar los niveles de expresión de genes implicados en la osmorregulación (ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), respuesta inmune (crustina y penaeidina) y carga viral (VP664) de camarón seleccionado genéticamente y un lote domesticado.
3. Relacionar la sobrevivencia con el proceso de infección y los niveles de expresión de los cuatro genes durante el proceso de infección.

## **V. HIPOTESIS**

Los camarones seleccionados genéticamente presentarán mayor sobrevivencia a una infección con WSSV que el lote domesticado.

Durante el desafío, conforme progresa la enfermedad, los camarones domesticados tendrán un mayor nivel de expresión del gen viral VP664, mientras que en los seleccionados los niveles serán bajos o nulos. Los genes de la osmoregulación y del sistema inmune son afectados por la infección y presentan menores niveles de expresión en organismos domesticados que en los seleccionados.

Altos niveles de expresión de genes del sistema inmune y de osmorregulación estarán correlacionados con familias que presentan mayor sobrevivencia. La crustina, la penaeidina y ATP asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  funcionan como marcadores fisiológicos para identificar familias que tienen menor susceptibilidad al WSSV.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo forma parte de una investigación del Laboratorio de Ecología Molecular de la UABC y Aquapacific S.A. de C.V. En el cual se han realizado bioensayos de desafío al WSSV inicialmente de 15 familias de camarones seleccionados y el lote domesticado. Posteriormente se seleccionaron las 3 familias que presentaron mejor sobrevivencia y se volvieron a desafiar con el WSSV y un lote domesticado. En este último bioensayo se realizaron muestreos programados de los organismos experimentales, a partir de los que se extrajo RNA de las branquias usando TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen). El RNA fue tratado con DNAasa (Invitrogen) para eliminar el DNA genómico y posteriormente se sintetizó el cDNA correspondiente por transcripción reversa (Cázares-Simental, en preparación).

En este trabajo también se realizaron extracciones de DNA de tejido de camarón *P. vannamei* del cual se amplificaron por PCR los genes de ATP asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , crustina y penaeidina con cebadores específicos para cada uno de los genes (Tabla Anexo I). Los productos de amplificación fueron clonados en vectores TOPO TA /FRT/V5-His-TOPO<sup>®</sup> que fueron usados para transformar células competentes de *E. coli*.

### **VI.1 Camarones domesticados**

Los camarones domesticados (*Penaeus vannamei* n=2000) en etapa juvenil ( $25 \pm 5$  g) fueron donados por una empresa localizada en San Felipe B.C., México. Estos se transportaron vía terrestre en un vehículo de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) en un tinaco de 1,000 L con aireación constante por medio de un compresor de aire con piedras difusoras. Los camarones fueron recibidos en un estanque circular de 10,000 L con agua de mar a 37 ppt y temperatura de 28 °C localizado en el invernadero del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la UABC. Los camarones fueron alimentados dos veces al día con alimento balanceado NASSA (35% de proteína) al 3 % de la biomasa total por día.

#### **VI.1.2 Camarones seleccionados**

Los camarones seleccionados genéticamente (n=1500) fueron proporcionados por una empresa localizada en Mazatlán, Sinaloa, México. El envío de los organismos fue por vía terrestre en un camión acondicionado de la empresa. Los animales se recibieron en la UABC con un peso de  $25 \pm 5$  g. Se descargaron en un estanque circular con fondo plano de 10,000 L y agua de mar a 37 ppt y 28 °C ubicado al costado del IIO. Los organismos se aclimataron con 50% de agua del estanque receptor y 50 % del agua de los tinacos en los que fueron transportados (37 ppt y 21 °C) para evitar un shock térmico. Estos parámetros se monitorearon durante el desembarque y hasta finalizar la aclimatación. En total se recibieron 15 familias (100 individuos de cada una) provenientes del programa de selección genética de

la empresa. De estas 15 se seleccionaron las 3 familias que respondieron mejor en diversos bioensayos de infección con el WSSV realizados por otro estudiante de maestría (Cázarez-Simental, en preparación).

Los camarones pertenecientes a las familias seleccionadas estaban marcados con elastómeros de color para diferenciar cada una (rosa, verde, y morado). El lote domesticado o no seleccionado no estaba marcado (sin elastómero) como se muestra en la figura 1. Cada familia tiene un número para identificarla dentro del programa de acuerdo a la hembra que realizó el desove, en este trabajo corresponden a las familias. Por cuestiones prácticas se manejarán colores en lo consecutivo.



Figura 1. Camarones experimentales seleccionados marcados con elastómeros, (rosa, verde y morado) y domesticados (sin elastómero) para desafío ante el WSSV.

### **VI.3 Diseño experimental del bioensayo de infección con WSSV.**

El desafío con WSSV se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) de la UABC. El LPEA consta de tres áreas; un área central en la cual se llevan a cabo los registros de los experimentos y manejo de productos, un área control y un área de infección. Cada zona de trabajo está equipada con 15 acuarios de 55 litros de capacidad cada uno, sistema de aireación, calentadores de agua de titanio de 200 W con reguladores de temperatura y equipo de filtración con carbono activo independiente. En la tabla I se presenta la distribución de los organismos con sus tratamientos.



Tabla I. Diseño experimental: Distribución de los camarones durante el periodo de aclimatación para el desarrollo del experimento de desafío con WSSV en el LPEA.

<b>Área control</b>			
<b>Familia</b>	<b>Acuario</b>	<b>No de organismos</b>	<b>No de réplicas</b>
<b>Domesticados</b>	1	n=10	1
<b>Rosa</b>	2 - 3	n=20	2
<b>Verde</b>	4 - 5	n=20	2
<b>Morado</b>	6 - 7	n=20	2
<b>Área de infección</b>			
<b>Domesticados</b>	1-2 -3	n=30	3
<b>Rosa</b>	4-5-6	n=30	3
<b>Verde</b>	7-8-9	n=30	3
<b>Morado</b>	10-11-12	n=30	3

Se realizaron muestreos programados a las 6, 24, 36 y 48 horas post-inyección (hpi). En cada hora de muestreo se colectaron 2 individuos por acuario teniendo un total de 4 individuos por tratamiento (n=4).

#### **VI.4 Preparación del inóculo viral**

El asilado utilizado para los bioensayos fue proporcionado por la Universidad Autónoma de Sonora al laboratorio de Ecología Molecular y Biotecnología de la UABC clave interna (WSSV-SON-FCM-07). La cepa se ha mantenido activa en camarones infectados vivos y congelados a -74 °C transmitiendo la enfermedad según el postulado de Koch, bajo condiciones controladas y de bioseguridad siguiendo protocolos establecidos para laboratorios de tipo 2. Para preparar el inóculo las muestras se descongelaron y se maceraron en buffer salino TN (Tris-HCl 10 mM y NaCl 400 mM), el homogenado se centrifugó gradualmente a 1000,

5000, 10000 y 14000 g a 4° C, cada velocidad a 5 min, esto con la finalidad precipitar los restos de tejido y dejar en el sobrenadante las células con los viriones. El sobrenadante se recuperó con una jeringa de 3 mL y se filtró por 0.25 µm. Se prepararon alícuotas de 0.7 mL, se mantuvieron en hielo y se administraron inmediatamente a los camarones después de haber sido preparadas. Se inyectó cada camarón con 20 µL del inóculo vía intramuscular entre el quinto y sexto segmento abdominal. Al realizar la inyección, la aguja se dejó dentro del músculo alrededor de 7 segundos para asegurarse de que el inóculo penetrara el tejido, ya que en ocasiones al retirar la aguja sale gran cantidad de hemolinfa que pudiera expulsar el inóculo.

Se observó el comportamiento de los camarones a partir de que se inyectó el inóculo, una vez que se detectaron anomalías del comportamiento se intensificaron las observaciones cada 2 horas y se colectaron únicamente los organismos moribundos, es decir aquellos que presentaban pocos reflejos, pérdida del apetito y nado errático ó falta de movimiento corporal (algunos canelosos). Estos se envolvieron en papel aluminio y se etiquetaron individualmente marcando fecha, hora y familia a la que pertenecían, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un ultracongelador Revco a – 75 °C para su análisis posterior.

### **VI.5 Extracción de RNA**

Se pesaron 50 mg de branquia congelada de cada camarón. Se tomaron todas las branquias y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 500 µL de TRIZOL® (Invitrogen), este se homogenizó con un pistilo estéril y tratado con DEPC (Sigma), se mantuvieron en una cama de hielo por 15 min con agitación constante. Pasado el tiempo se agregaron 100 µL de cloroformo se dio vortex por 10 seg y se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente (TA). Después se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo

epENDORF limpio manteniendo los tubos sobre hielo. Se transfirió la fase acuosa “superior” a un tubo de 1.5 mL limpio (descartando el resto). Se precipitó el ARN con 250  $\mu$ L de 2 propanol por cada mL de TRIZOL. Se dio vortex por 5 seg y se incubó por 5 min a TA. Se colectó el ARN precipitado en forma de pastilla por medio de centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el isopropanol con cuidado para no perder la pastilla y se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 75% (a -20°C) despegando la pastilla del tubo sin disolverlo. Se centrifugaron las muestras por 5 min a 12,000 g a 4 °C, se eliminó el etanol invirtiendo los tubos sobre papel secante, casi de inmediato se cerraron los tubos y se centrifugó brevemente por unos segundos para concentrar el etanol y así extraerlo con puntas de 10  $\mu$ L teniendo precaución de no perder la pastilla. Se resuspendió el ARN en 0.1- 0.5 mL de H<sub>2</sub>O PPI (La cantidad de agua dependió del volumen de la pastilla 1:10). La concentración de ARN en las muestras se determinó por espectrofotometría a 260 nm con un equipo Nanodrop® N-1000. Se evaluaron 1000 ng/ $\mu$ L por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad de las bandas ribosomales (18 y 23S). Finalmente se congelaron las muestras rápidamente a -74 °C para su tratamiento posterior.

## **VI.6 Tratamiento para eliminar DNA genómico**

Las muestras de ARN fueron descongeladas y tratadas con DNAasa para eliminar posibles restos de ADN genómico. Para ello se tomaron 50  $\mu$ L del ARN total extraído como se describió previamente (sin importar la concentración). Se colocaron en tubos de PCR de 0.5 mL y se agregó 5.5  $\mu$ L buffer de reacción DNAasa 10x (Invitrogen), después se adicionaron 2  $\mu$ L de la enzima DNAasa I Desoxiribonucleasa 1u/  $\mu$ L (Invitrogen). La mezcla se incubó a 37 °C por 30 min en un termociclador Perkin Elmer y se añadieron 200  $\mu$ L de TRIZOL bajo la campana de extracción. Se dio vortex por 5 seg y se agregaron 40  $\mu$ L de cloroformo bajo la campana de extracción. Se dio vortex nuevamente por 5 seg, después se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C y se transfirió la capa

superficial a un tubo limpio agregando 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Nuevamente se dio vortex y se centrifugó a 12000  $g$  por 15 min a 4°C. Se eliminó el isopropanol y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75° a – 20 °C para lavar la pastilla. Se agitó por 5 segundos en el vortex y se centrifugó a 12,000  $g$  por 5 min a 4 °C. Se eliminó el etanol invirtiendo los tubos sobre papel absorbente e inmediatamente se dio “spin” y se extrajo el etanol restante con puntas teniendo cuidado de no tomar la pastilla. El ARN se suspendió en una cantidad arbitraria de 10-30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ppi. Finalmente se determinó su concentración con Nanodrop® y se verificó la calidad con un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### **VI.7 Síntesis de cDNA o Transcripción Reversa (RT)**

Para optimizar el PCR en tiempo real (Q-PCR) fue necesario ajustar todas las muestras a la misma concentración de inicio de RNA para la RT y se trataron todas las muestras al mismo tiempo y siempre en la misma máquina. Se requirieron 500 ng del ARN total extraído y tratado con DNAsa I para realizar la transcripción inversa (RT). Se utilizaron tubos de PCR de 0.5 mL y se añadió 1  $\mu\text{L}$  de oligo (dT)<sup>12-18</sup> (0.70  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  dNTP's (10 mM) y 500 ng de ARN en un volumen máximo de 10  $\mu\text{L}$  para cada una de las muestras. La muestra se incubó a 70 °C por 10 min e inmediatamente después se colocó a 4 °C. Se añadió una mezcla con 2  $\mu\text{L}$  de tampón 10x M-MLV RT-buffer (SIGMA) y 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNAasa (30-50 u/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (SIGMA) en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de agua. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 60 min inactivando la enzima a 80 °C por 10 min. Las muestras se colocaron en hielo y se almacenaron a -20 °C hasta su cuantificación por PCR en tiempo real.

## VI.8 Detección de WSSV por PCR

Mediante la técnica de PCR de punto final se realizaron pruebas para corroborar la ausencia del WSSV en el área control y su presencia en las muestras de cDNA de las branquias de camarones del área de infección. Para la reacción de amplificación se utilizaron primers específicos para el marco de lectura abierto del WSSV ORF94 y  $\beta$ -actina para *P. vannamei* como control endógeno para verificar la calidad de amplificación de cada muestra (ver tabla II). Las mezclas de reacción contenían 0.5  $\mu$ L de cDNA, 3 mM  $MgCl_2$ , 0.4  $\mu$ M dNTPs (Promega, Southampton, UK), 0.4  $\mu$ M de cada primer, 1 Unidad de Taq ADN polimerasa (PROMEGA), 1X amortiguador de reacción para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl) (Promega) en un volumen final de 25  $\mu$ L. El perfil térmico de amplificación fue de 5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 30 seg a 60 °C para (ORF94) y ( $\beta$ -Actina), 1 min a 72 °C y un paso final a 72 °C por 7 min. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient.

## VI.9 Clonación de productos PCR

Los fragmentos de ADN de los genes ATPasa  $Na^+/K^+$ , crustina y peneidina amplificados con cebadores específicos (ver tabla I) por PCR fueron purificados con el kit PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) e insertados en el vector Topo TA /FRT/V5-His-TOPO® 3956 pb (Invitrogen) por Cazares-Simental (en preparación). Los plásmidos posteriormente se clonaron en células *E. coli* competentes según las instrucciones del fabricante. Las bacterias transformadas se cultivaron en medio de cultivo Luria Bertoni con Kanamicina 0.05 mg/mL (LB+Kan). Se seleccionaron al menos 10 colonias de 2 placas LB+Kan y se amplificaron por PCR con primers M13F y M13R para verificar el tamaño del inserto. Así mismo se utilizó el fragmento de VP664 (ver tabla I) previamente clonado por Ramos-Carreño (2010). Seis colonias con insertos del tamaño esperado fueron cultivadas en medio LB+Kan. Los plásmidos fueron extraídos,

purificados (MINIPREP) y enviados a secuenciar a la Cia SeqXcell (San Diego, CA, EUA) para obtener el tamaño exacto del inserto. Las secuencias fueron editadas con BioEdit y alineadas en el Genebank (NCBI).

#### **VI.10 PCR en Tiempo real**

Los análisis de PCR en tiempo real (Q-PCR) se llevaron a cabo en un termociclador Step One Plus de Applied Biosystems (ABI) con una mezcla para PCR Fast SYBR Green I (ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , crustina y penaeidina) y Sonda Taq man para el gen viral VP664 de la misma casa comercial. Se utilizaron cebadores específicos para cada gen (ver tabla I).

Para poder realizar la cuantificación de de los genes mencionados, fue necesario estandarizar las reacciones de Q-PCR para cada gen y poder elegir las concentraciones óptimas de los reactivos para reducir el volumen final de reacción, reducir la formación de dímeros y asegurar la amplificación de un solo producto PCR. Para lograr esto, primero se realizaron reacciones en volumen final de 20  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{L}$  de mezcla de buffer Fast SYBR Green 2x, 1  $\mu\text{L}$  de los cebadores específicos sentido y antisentido para cada gen a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , 7.5  $\mu\text{L}$  de agua ppi y 0.5  $\mu\text{L}$  de cDNA templado). Las muestras de cDNA que se utilizaron en estas pruebas fueron plásmidos (como controles positivos) de cada uno de los genes clonados en vectores TOPO TA (Invitrogen), también se probaron muestras de branquias de camarones (pool de cDNA de 18 individuos aclimatados a 10, 26 y 40 ppt y 6 temperaturas; 20, 23, 26, 29 y 32 °C (Giffard-Mena, com. pers) y un control negativo ( $\text{H}_2\text{O}$  ppi en lugar de cDNA). Las concentraciones se fueron ajustando hasta obtener las óptimas de amplificación (con volúmenes mínimos de reacción y sin formación de dímeros). Esta información se presenta en la sección de resultados. Posteriormente se analizaron cada uno de los individuos colectados durante el muestreo para cada gen y tratamiento (n=136).

Para el gen viral VP664 se utilizó el siguiente perfil térmico; 1 a ciclo 50 °C por 30 min, 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 1 paso de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min con colecta de datos ópticos. La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL (7.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.5 µL de primer específicos sentido, antisentido (0.3 µM) y sonda TaqMan 0.3 µM, 2 µL H<sub>2</sub>O ppi y 1 µL de cDNA templado). Estas condiciones fueron publicadas por (Lightner y Durand 2002) y estandarizadas en el Laboratorio de Ecología Molecular (UABC-FCM) por Ramos-Carreño (2010).

Para correr las reacciones de amplificación y cuantificación por Q-PCR de cada uno de los genes de *P. vannamei* se realizaron pruebas con diferentes perfiles temperaturas de alineamiento (T<sub>m</sub>). Después de ajustar los tiempos y las temperaturas, se utilizó el perfil térmico siguiente: 1 ciclo de 95 °C por 20 seg, 40 ciclos de 95 °C por 3 seg, 30 seg a 57 °C para crustina. 55 °C para penaeidina y 60 °C para ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. El perfil térmico de la curva de disociación fue de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min y 95 °C por 15 seg.

Las cuantificaciones absolutas para establecer los niveles de expresión de los genes, se realizaron con base a las curvas estándar por medio de diluciones seriadas a partir de soluciones madre de cada uno de los vectores insertados con los genes de interés. Para obtener el número inicial de moléculas del plásmido más el inserto se sustituyeron los valores presentados en la Tabla I en la ecuación (1).

Ecuación (1)

$$Y \text{ moléculas}/\mu\text{L} = [(\mu\text{LDNA})/\text{plásmido} + \text{inserto bp} \times 660] 6.022 \times 10^{23}$$

Donde:

**g/  $\mu\text{L DNA}$**  = concentración de cDNA de la solución madre del plásmido mas el inserto.

**plásmido + inserto bp** = tamaño total del plásmido mas gen de interés.

**$6.022 \times 10^{23}$**  = Número de Avogadro.

**Y moléculas** = número de moléculas de la solución madre del plásmido + gen de interés.

## VI.11 Análisis estadístico

El análisis de mortalidad de los camarones experimentales del desafío ante el WSSV se realizó con pruebas no paramétricas de análisis de sobrevivencia Kaplan Meier (Gehan-Breslow) el cual determina si las curvas de sobrevivencia son significativamente diferentes.

Para analizar el efecto de la infección del WSSV sobre la expresión de los genes (ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , crustina y peneidina) de *P. vannamei* así como el seguimiento a los cambios en los niveles de expresión del gen viral VP664 durante el proceso de infección, se verificó la normalidad de los datos mediante una prueba t. Finalmente se realizaron análisis de datos mediante un ANOVA no paramétrico y un análisis de varianza en rangos de una vía Kruskal Wallis con el programa Sigma Plot v 11.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0.05$ .

Los niveles de expresión de los genes analizados, se establecieron mediante cuantificaciones absolutas con base en a las curvas estándar elaboradas para cada gen. Los datos se graficaron en escala logarítmica para poder comparar los patrones de expresión.



## VII. RESULTADOS

### VII.1 Sobrevivencia de los camarones desafiados con el WSSV.

En las pruebas de sobrevivencia para evaluar diferencias entre camarones domesticados y seleccionados inyectados con inóculo viral (WSSV) e inóculo sano se observó lo siguiente: En la zona control (libre de virus) no se presentaron mortalidades ni síntomas de enfermedad en los organismos durante todo el bioensayo. Los camarones del área de infección comenzaron a manifestar los síntomas de la enfermedad aproximadamente a las 24 horas post inyección (hpi). Los animales perdieron el apetito (tenían el intestino vacío), la capacidad de movimiento y algunos de ellos tenían un color rojizo. Estos síntomas fueron más acentuados en los camarones domesticados, en cambio los efectos de la infección tardaron ~ 5 horas más en manifestarse en las familias seleccionadas.

Los porcentajes de sobrevivencia para cada familia se presentan en la figura 2, es importante destacar que el lote domesticado infectado presentó una sobrevivencia del 50% en un tiempo promedio de 48 hpi, seguido por la familia verde, morado y rosa las cuales presentaron sobrevivencia con tiempos promedio de 51, 53 y 61 hpi respectivamente. Los camarones de la familia rosa manifestaron mayor tiempo de sobrevivencia con respecto a los camarones domesticados ( $p < 0.05$ ) con una diferencia de 13 horas. La mortalidad total se registró entre las 75 y 85 hpi para todas las familias.

## Análisis de Mortalidad

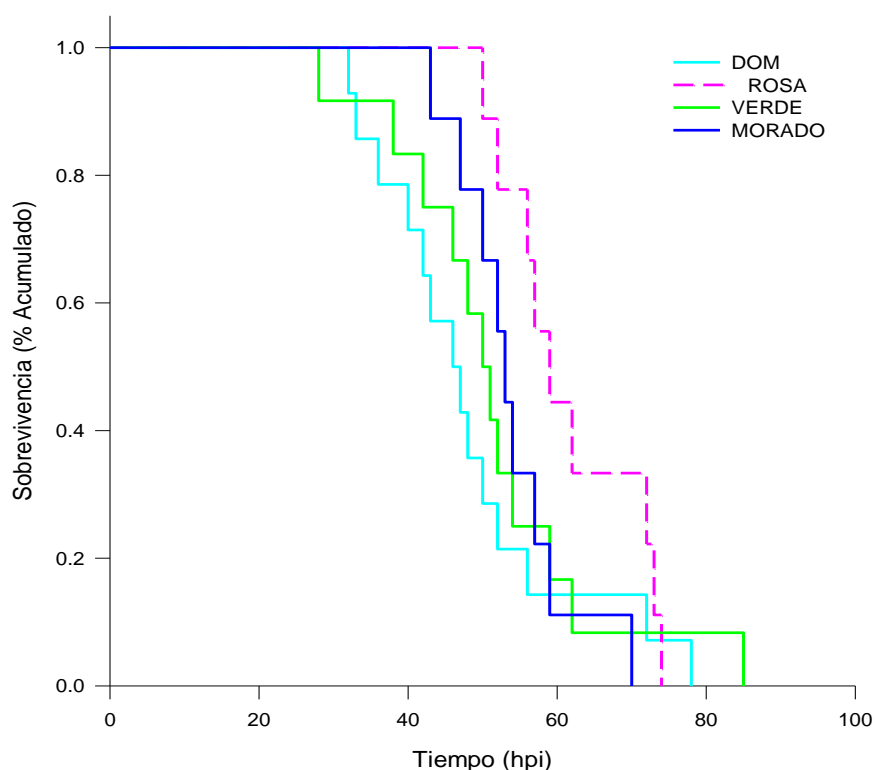


Figura 2. Curvas de supervivencia de *P. vannamei* infectados experimentalmente con el virus de mancha blanca. Dom, lote domesticado; Rosa, Verde y Morado, (familias seleccionadas).

### VII.2 Detección del WSSV por PCR

El análisis por PCR tanto en las muestras de los camarones del área control y de infección se verificó en el gel de agarosa (figura 3), se observa una banda de amplificación de 637 bp que corresponde a la  $\beta$ -actina de *P. vannamei* la cual fue usada como control de la extracción y de retro-transcripción. La presencia del WSSV en los camarones del área de infección se corroboró mediante la amplificación de productos a 653 pb que corresponden al ORF94-WSSV. En las muestras del área control no se detectó la presencia del WSSV mediante esta técnica.

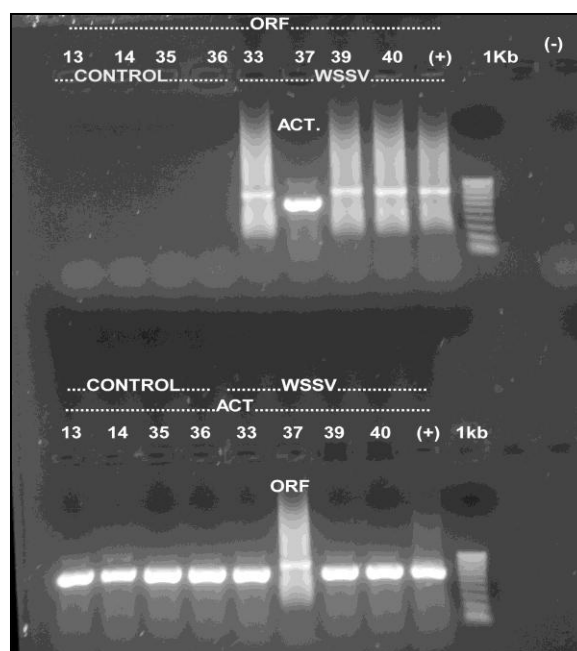


Figura 3. Electroforesis de productos de PCR de los genes ORF94-WSSV y  $\beta$ -actina. Muestras de cDNA de branquias de camarones domesticados y seleccionados de la zona control (muestras 13,14, 35 y 36) y de la zona de infección (muestras 33,37, 39 y 40) recolectados a diferentes horas post inyección. (+) DNA de camarón infectado con WSSV, (-) H<sub>2</sub>O ppi, 1Kb marcador de peso molecular. Migración en gel de agarosa 1% y teñido con bromuro de etidio.

### VII.3 Cuantificación de genes por PCR Tiempo Real (Q-PCR)

Tabla II. Tamaño de fragmentos amplificados para cada gen y número de moléculas de las soluciones madre obtenidos por el cálculo de la ecuación (1).

Gen	Gen (bp)	Plásmido (bp)	Plásmido + inserto (bp)	cDNA (g/ $\mu$ L)	Y moléculas/ $\mu$ L
VP664	69	3956	4025	$1.36 \times 10^{-8}$	$3.09 \times 10^7$
Crustina	204	3956	4160	$6.73 \times 10^{-8}$	$1.48 \times 10^{10}$
Peneidina	151	3956	4107	$5.68 \times 10^{-8}$	$1.26 \times 10^{10}$
ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	235	3956	4191	$2.40 \times 10^{-8}$	$5.23 \times 10^9$

Para cada uno de los genes analizados se construyó una curva estándar, en todos ellos se obtuvieron valores de eficiencia de amplificación (%Ef) y pendiente de la recta (m) dentro del rango establecido por el fabricante para hacer válido el ensayo de cuantificación (% Ef 97, recomendado de 92 a 100% y m entre -3.3 a -3.6) respectivamente. También se obtuvieron productos amplificados únicos específicos para cada una de las reacciones de amplificación de los distintos genes de acuerdo con las curvas de disociación o melt curve (Tm) (ver figuras 4, 5, 6 y 7).

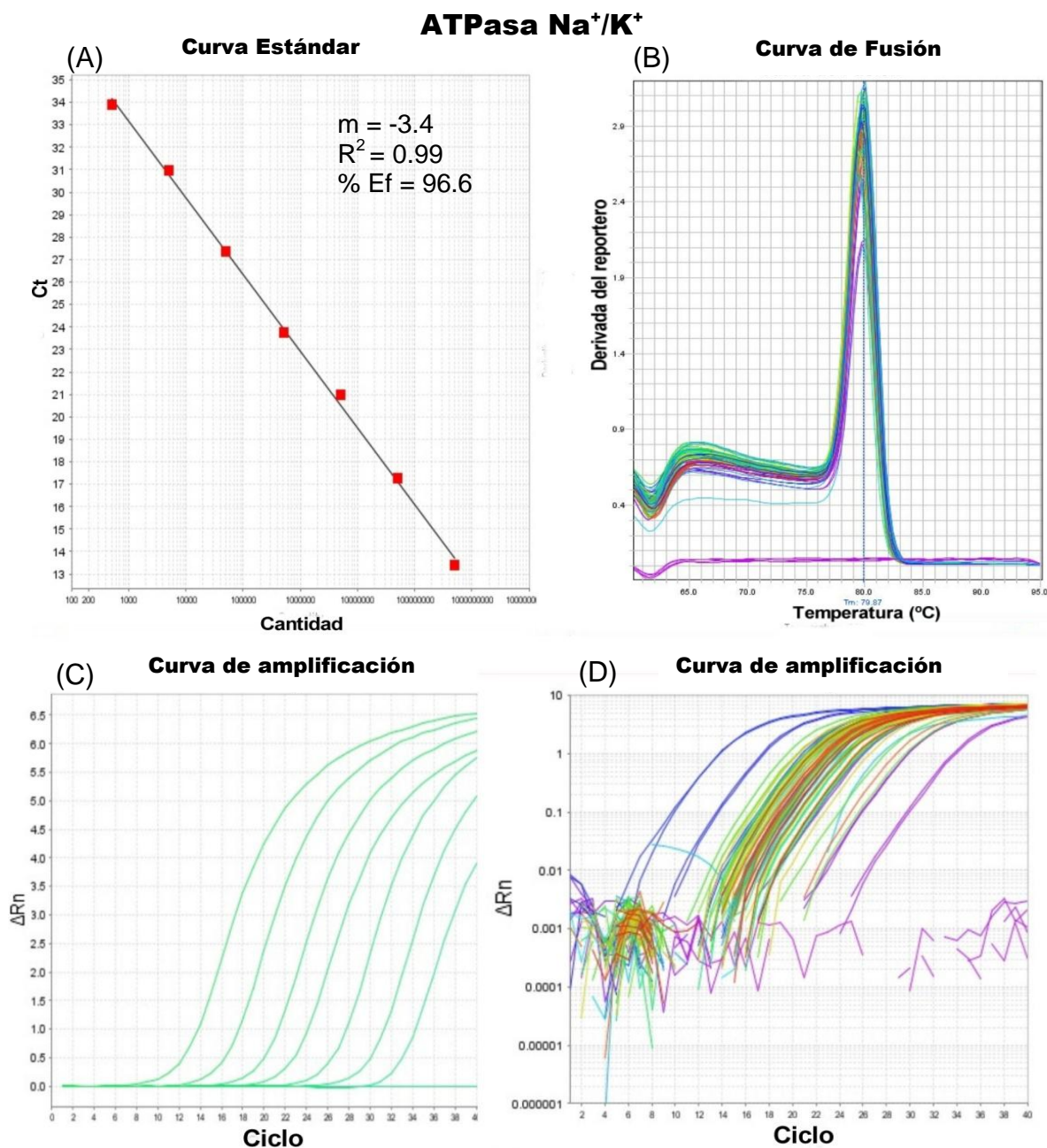


Figura 4. Gráficas de amplificación por Q-PCR de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de *P vannamei*. (A) Curva estándar del plásmido mas el inserto con un rango de dilución de 5.0E<sup>08</sup> a 5.0E<sup>02</sup> moléculas.μL<sup>-1</sup>, valores de pendiente (m), R<sup>2</sup> y eficiencia de reacción (Ef%). (B) Curvas de temperatura de disociación de amplicones. (C) Gráfica de amplificación de la curva estándar. (D) Gráfica de amplificación de curva estándar, muestras de cDNA de branquias de camarón del área control e infección del bioensayo de desafío y controles negativos (sin cDNA templado). Ct (Ciclo umbral de detección), (intensidad de la fluorescencia del reportero/ intensidad de fluorescencia pasiva, -Rn (magnitud generada por las condiciones de PCR).

## CRUSTINA

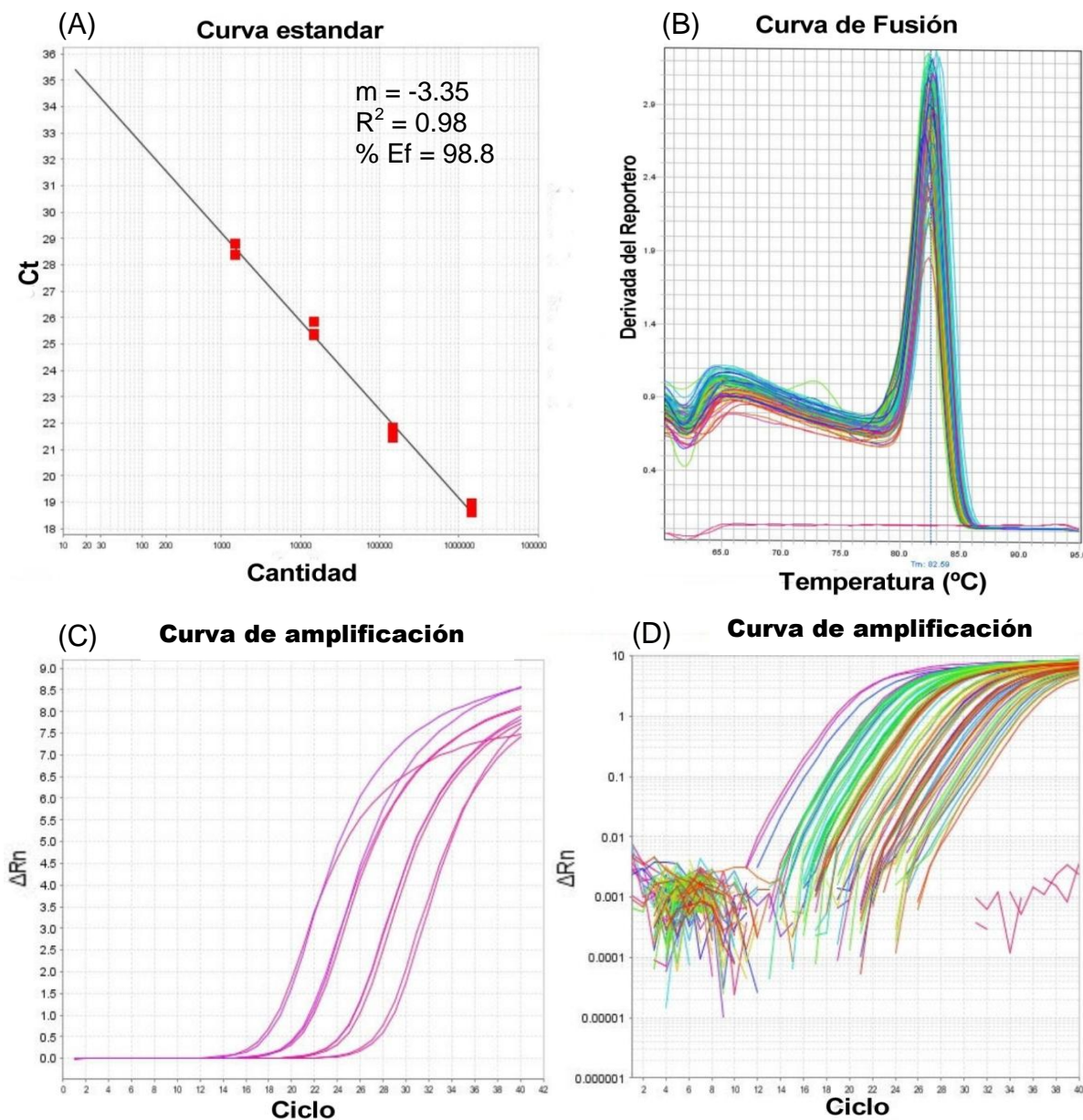


Figura 5. Gráficas de amplificación por Q-PCR de crustina de *P. vannamei*. (A) Curva estándar del plásmido mas el inserto con un rango de dilución de  $1.0E^06$  a  $1.0E^03$  moléculas.  $\mu\text{L}^{-1}$ , valores de pendiente ( $m$ ),  $R^2$  y eficiencia de reacción ( $\% \text{ Ef}$ ). (B) Curvas de temperatura de disociación de amplicones. (C) Gráfica de amplificación de curva estándar. (D) Gráfica de amplificación de curva estándar, muestras de cDNA de branquias de camarón del área control e infección del bioensayo de desafío y controles negativos (sin cDNA templado). Ct (Ciclo umbral de detección), (intensidad de la fluorescencia del reportero/intensidad de fluorescencia pasiva,  $-Rn$  (magnitud generada por las condiciones de PCR).

## PENAEIDINA

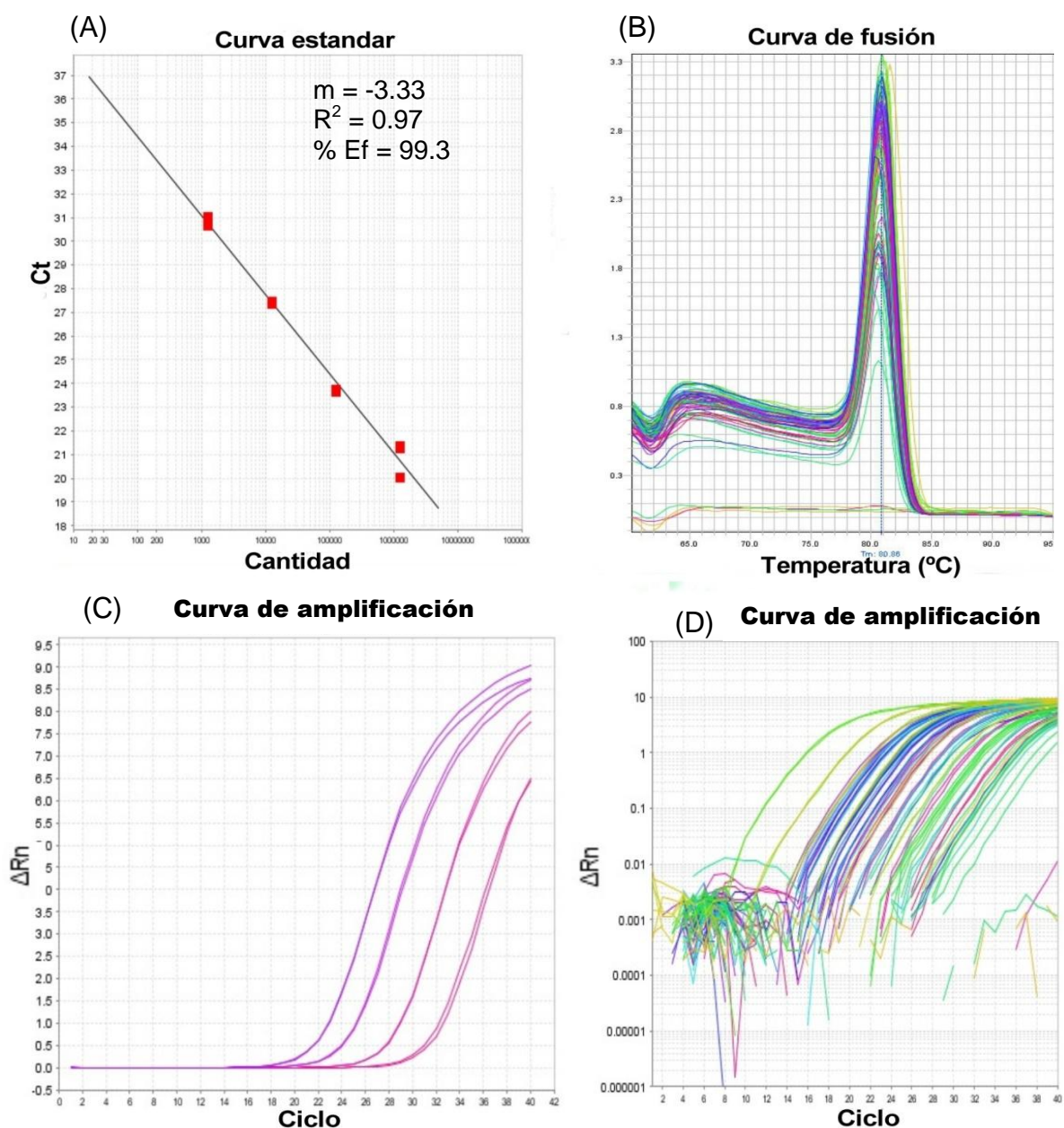


Figura 6. Gráficas de amplificación por Q-PCR de Peneidina de *P. vannamei*. (A) Curva estándar del plásmido más el inserto con un rango de dilución de  $1.0E^{06}$  a  $1.0E^{03}$  moléculas. $\mu$ L $^{-1}$ , valores de pendiente ( $m$ ),  $R^2$  y eficiencia de reacción ( $\%Ef$ ). (B) Curvas de temperatura de disociación de amplicones. (C) Gráfica de amplificación de curva estándar. (D) Gráfica de amplificación de curva estándar, muestras de cDNA de branquias de camarón del área control e infección del bioensayo de desafío y controles negativos (sin cDNA templado). Ct (Ciclo umbral de detección), (intensidad de la fluorescencia del reportero/intensidad de fluorescencia pasiva,  $-Rn$  (magnitud generada por las condiciones de PCR).

## WSSV - VP664

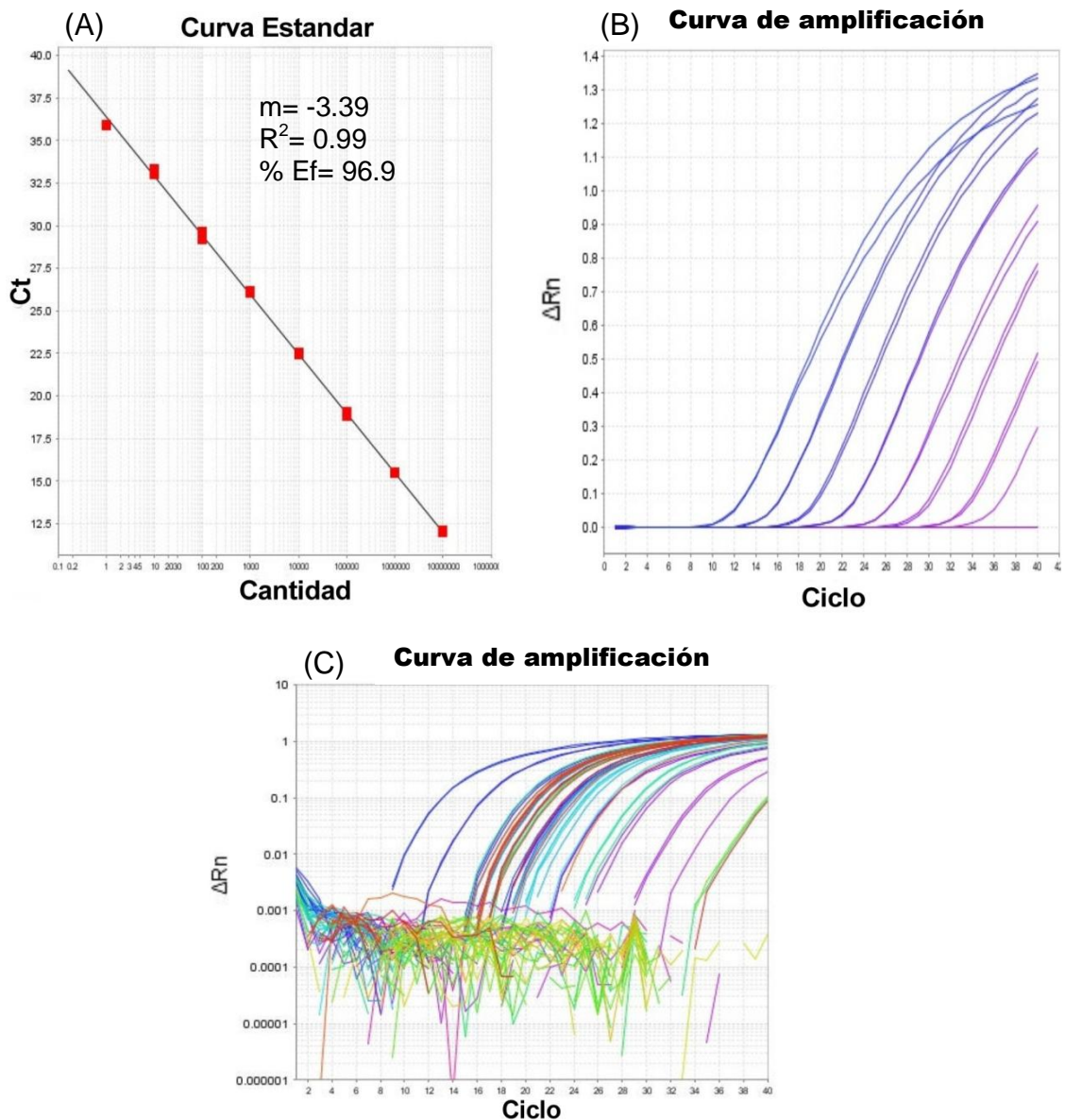


Figura 7. Gráficas de amplificación por Q-PCR del gen viral WSSV-VP664. (A) Curva estándar del plásmido mas el inserto con un rango de dilución de  $1.0E^{07}$  a  $1.0E^{00}$  moléculas. $\mu$ L $^{-1}$ , valores de pendiente (m),  $R^2$  y eficiencia de reacción (%Ef). (B) Gráfica de amplificación de curva estándar. (C) Gráfica de amplificación de curva estándar, muestras de cDNA de branquias de camarón del área control e infección del bioensayo de desafío y controles negativos (sin cDNA templado). Ct (Ciclo umbral de detección), (intensidad de la fluorescencia del reportero/intensidad de fluorescencia pasiva, -Rn (magnitud generada por las condiciones de PCR).



#### **VII.4 Expresión de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>**

El nivel de expresión de la (ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) se mantuvo estable en el lote de camarones domesticados y seleccionados en ambas áreas control e infección y a los diferentes hpi. (figura 8). Se observa una ligera disminución de 2.0 veces la expresión en la familia rosa a las 24 hpi (figura 8 C) y en la familia verde una disminución de 13.7 veces a las 48 hpi (figura 8 G) del área control. Sin embargo estos valores no fueron significativos en comparación con el resto de los otros grupos de camarones.

#### **VII.5 Expresión de la crustina**

El lote domesticado presentó un comportamiento inestable en cuanto a su expresión (figura 8 A). Se observa un nivel de expresión 23.1 veces menor a las 24 hpi con respecto a las 6 hpi, seguido a de un incremento a las 36 hpi de 20.6 veces en comparación a las 24 hpi ( $p < 0.05$ ) y nuevamente un descenso de 112.6 veces a las 48 hpi en comparación a las 36 hpi ( $p < 0.05$ ). Las tres familias seleccionadas del área control mantuvieron un nivel estable de expresión de la crustina a las diferentes hpi (figuras 8 C, E y G) a diferencia de los camarones seleccionados.

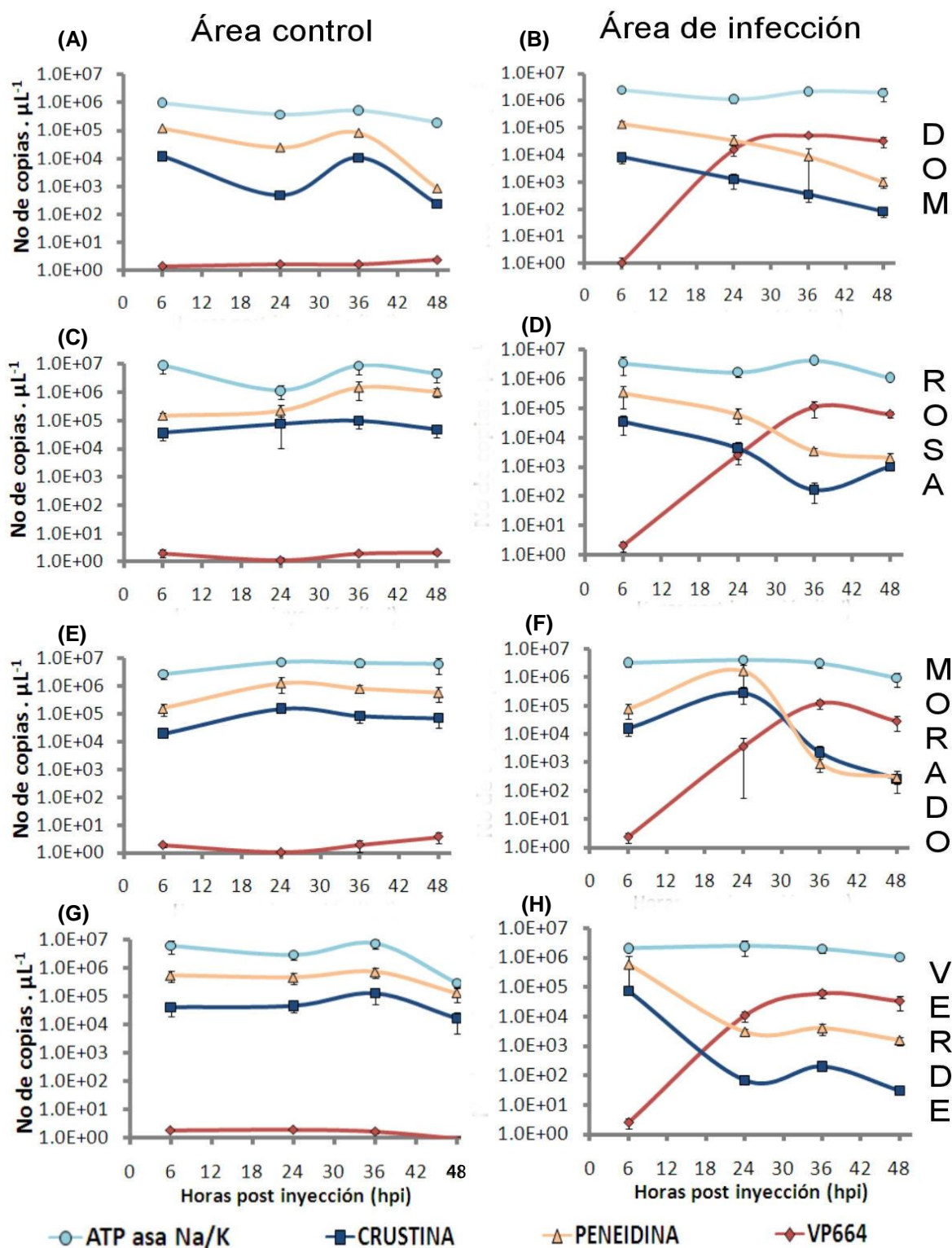


Figura 8. Gráficas de cuantificación de expresión de genes (ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, crustina, penaeidina y VP664) por Q-PCR de camarones experimentales del área control e infección a diferentes horas post inyección (hpi).

La expresión de la crustina tendió a disminuir en los camarones del lote domesticado y de las familias verde y rosa infectados con el WSSV a las 24 hpi (figura 8 A, D y H). De estos 3 grupos, el valor de expresión de la familia verde (figura 8 H) disminuyó 883.5 veces ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo homólogo del área control a las diferentes hpi (figura 8 G) y con la familia morada a las 24 hpi del área de infección. Este menor nivel de expresión de la familia verde se mantuvo en las siguientes hpi. En contraste los camarones de la familia morada, manifestaron un aumento en la expresión de la crustina a las 24 hpi (figura 8 F) a diferencia de los otros grupos, sin embargo esta diferencia no fue significativa en comparación con los camarones del área control (figuras 8 E) ni con los camarones infectados de las familias rosa y domesticadas a las mismas hpi

Los camarones de la familia rosa presentaron un descenso continuo en la expresión de la crustina a las 6, 24 y 36 hpi y posteriormente incrementaron sus niveles a las 48 hpi (figura 8 D) Este incremento de la familia rosa a las 48 hpi fue 10.8 veces más alto que los niveles de expresión del lote domesticado a las 48 hpi ( $p < 0.05$ ), 28.7 veces más alto que el de la familia verde ( $p < 0.05$ ) y 3.5 mayor que el de la familia morada ( $p < 0.05$ ).

## **VII.6 Expresión de la penaeidina**

El lote domesticado del área control (figura 8 A) tuvo una caída de 32.4 veces en el nivel de expresión a las 48 hpi, esta disminución presentó diferencias estadísticamente significativa en comparación con el mismo lote a las 6, 24 y 36 hpi ( $p < 0.05$ ) y con las tres familias seleccionadas a las diferentes hpi monitoreadas. Las tres familias seleccionadas del área control mantuvieron estable el nivel de expresión de la penaeidina (figura 8 C, E y G). Se observa un ligero aumento de 4.2 veces en la familia rosa (figura 8 C) a las 36 hpi y en la

familia verde un decremento de 7.5 veces a las 48 hpi (Figura 8 G). Sin embargo estas diferencias de valores no fueron significativas.

En los camarones de las familias domesticadas, rosa y verde infectados con el WSSV, la expresión de la penaeidina tendió a bajar a través del tiempo a partir de las 6 hpi (Figuras 8 B, D y H). Para la familia rosa se detectó una reducción significativa a las 36 y 48 hpi del área de infección contra el área control (figura 8C y D). Los camarones de la familia morada del área de infección (figura 8F) fueron los únicos que presentaron un incremento de 14.2 veces de la expresión de la penaeidina a las 24 hpi y después bajó 71.9 veces a las 36 y se mantuvo a este nivel a las 48 hpi ( $p < 0.05$ ).

Los camarones de la familia verde del área de infección (figura 8 H), presentaron una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) del nivel de expresión penaeidina, a partir de las 24 hpi, estos disminuyeron 204 veces en comparación con los de la familia morado y 11.5 veces con respecto la rosa (figura 8F y D) del área de infección y los tres grupos de camarones del área control (verde, morado y domesticado) a la misma hora post inyección.

#### **VII.1.7 Expresión del gen viral VP664.**

Se llegaron a detectar de una a dos copias del gen viral VP664 en muestras de los camarones del área control, sin incrementar en número a lo largo del muestreo, en ocasiones se detectó el mismo número de copias en los controles negativos (muestras sin cDNA templado, solo agua) (figuras 8 A, C, E y G).

La expresión del gen viral VP664 fue detectado en los camarones experimentales del área de infección a partir de las 6 hpi. A partir de esta hora, el número de copias del gen se incrementó de manera exponencial hacia las 24 hpi, con un promedio de  $1.57E+04$  en el lote domesticado, de  $2.53E+03$  en la familia rosa, de  $3.59E+03$  en la familia morado y de  $1.08E+04$  en la familia verde (Figuras 8 B, D,

F y H). Los camarones del lote domesticado y la familia verde alcanzaron la fase de meseta a partir de las 24 hpi (figura 8 B y H), mientras que las familias rosa y morado presentaron el mayor el número de transcritos a las 36 hpi, ( $1.12E+05$  y  $1.21E+05$  respectivamente) con una disminución a las 48 hpi. (ver figura 8 D y F). No se observaron diferencias significativas entre el lote domesticado y las 3 familias infectadas con el WSSV a las diferentes horas post inyección.

## VIII. DISCUSIÓN

El hecho de que los camarones inyectados con inóculo sano (libre de WSSV) no presentaran mortalidad ni síntomas de la enfermedad conforme transcurrió el tiempo del experimento, confirma la ausencia de contaminación de los organismos del área control. El inóculo sano sirvió como control experimental para observar el efecto que tiene la manipulación e inyección de la misma solución proteica en los organismos. En cambio, las mortalidades presentadas en los camarones del área de infección se debieron a la infección causada por el WSSV detectado con los PCR's.

Las diferencias en los tiempos de sobrevivencia detectadas durante el experimento entre el lote domesticado y las familias seleccionadas, para la familia rosa que presentó un tiempo medio de 61.6 horas hpi de sobrevivencia, comparada con el lote domesticado que tuvo un tiempo de 48.2 hpi de sobrevivencia, indican una diferencia de 13.4 horas ( $p < 0.05$ ). Esta diferencia de sobrevivencias puede servir como un indicador positivo en el proceso de selección de las familias para futuras generaciones dentro del programa de selección genética de la empresa Aquapacific S.A. de C.V. También puede dar un margen más amplio de tiempo a los acuacultores para cosechar los camarones en caso de que fuera detectado un brote del WSSV en sus granjas de cultivo.

El programa de selección del CENIACUA ha desafiado a cada una de sus familias al WSSV y los niveles de sobrevivencia han variado del 2 al 5 %. Basado en estos resultados se cree que un perfil genético único puede ser responsable de esta sobrevivencia (Gitterle et al., 2005). Supamattaya y colaboradores (2005) proponen que el monitoreo del sistema inmune de los camarones puede ser un indicador del estado de salud. Un camarón con un sistema inmune deficiente es más débil o más vulnerable a enfermedades, que usualmente resulta en una baja en la producción. En el cultivo de peces se han utilizado parámetros inmunológicos o fisiológicos que pueden ser obtenidos de muestras de sangre como medidas indirectas de resistencia a enfermedades. Estos suelen ser cortisol, lisozima, actividad total del anticuerpo IgM, repuesta de anticuerpo en contra de antígenos específicos o combinaciones de estos parámetros los cuales se ha reportado indican variación genética y son posibles indicadores de buenos rasgos para selección genética (Fjalestad *et al.*, 1993).

Cabe mencionar que en este experimento ningún camarón sobrevivió al final del de desafío con WSSV. Sin embargo hay que destacar que la selección de organismos de esta empresa no está enfocada a resistencia al virus, si no que se usa como un criterio más de selección siendo además un indicador indirecto de la capacidad inmune. También se ha demostrado que la vía de administración intramuscular del WSSV, tiene un efecto mucho más patógeno que la infección vía oral. En el camarón *Acetes sp* inoculados vía intramuscular tuvieron un 100 % de mortalidad al tercer día post inyección. En cambio los camarones infectados vía oral, la mortalidad del 100 % ocurrió en un periodo de 9 días post infección (Supamattaya *et al.* 1998). En desafíos previos de las familias del presente trabajo, se observaron resultados similares al ser infectados por vía oral (Cázares-Simental *et al.*, 2009).

Las causas de estas diferencias del tiempo mortalidad se pueden deber a que la administración de las partículas penetran directamente en el cuerpo del camarón,

evadiendo las barreras de defensa que inhiben la entrada y la diseminación del virus. En contraste la administración oral pone en contacto el virus con el lumen del estómago e intestino anterior el cual representa un ambiente hostil para los viriones (Bonilla *et al.*, 2005). Por ello siempre es recomendable realizar pruebas de desafío infectando a los camarones vía oral, que es la manera en la que se infectan en el medio natural (debido al canibalismo) y poder observar los tiempos de sobrevivencia de manera prolongada y posiblemente obtener individuos de familias que tengan resistencia y no mueran al final del experimento. Sin embargo, para tener ensayos comparativos es indispensable la inyección.

Los síntomas de los camarones infectados con el WSSV observados en este trabajo se presentaron de igual manera en el estudio realizado por Escobedo-Bonilla y colaboradores (2005) reportaron los mismos síntomas entre las 24 y 36 hpi y registraron las primeras mortalidades a las 36 hpi y una mortalidad del 100% a las 84 hpi de camarones *P. vannamei* (SPF) infectados experimentalmente con el WSSV vía intramuscular. La similitud de estos resultados indica una constancia en el proceso de infección viral, los tiempos de mortalidad y la utilidad de observar los síntomas para detectar el inicio de la infección en los organismos desafiados.

Por otro lado Cuellar-Anjel y colaboradores (2011) reportaron por primera vez en la literatura científica la resistencia de *P. vannamei* al WSSV. En este estudio lograron obtener 23, 26 y 57 % de sobrevivencia en tres familias seleccionadas de ciclo cerrado en infectadas vía oral con homogenizado de camarón infectado con el WSSV. Los camarones sobrevivientes no presentaron síntomas de la enfermedad, signos histopatológicos ni detección del WSSV por Q-PCR. Al contrario, los camarones de las tres familias que murieron en el experimento presentaron los síntomas descritos anteriormente y todos los individuos murieron. Con este hallazgo ellos concluyeron que los camarones sobrevivientes nunca fueron infectados por el WSSV o que eran lo suficientemente resistentes para mantener los niveles por debajo del límite de detección de la prueba de Q-PCR.

En el presente trabajo se realizaron cuantificaciones absolutas por PCR Tiempo Real de los transcritos de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  con el fin de evaluar de forma indirecta si el virus interfiere con el mecanismo de osmoregulación de los camarones infectados. Sus niveles de expresión fueron estables en ambas condiciones experimentales (sanos e infectados), que parecen indicar que el virus no interfiere con el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Al respecto, Ramos-Carreño (2010), reportó que *L. vannamei* exhibió un cambio en el comportamiento de osmorregulación al estar infectado con el WSSV y aclimatado a diferentes salinidades. Además de un cambio en el punto iso-osmótico para los camarones infectados con respecto al grupo control. Lo cual sugiere que la capacidad osmorreguladora es afectada por la infección viral, sin embargo aún se desconoce el mecanismo. Hasta el momento se ha atribuido a la destrucción del epitelio branquial y su consecuente pérdida de función (Kuo *et al.*, 1998)

Mohankumar y Ramasamy (2006) detectaron la disminución de la actividad de fosfatasa de membrana en branquias, entre ellas la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de camarón *F. indicus* infectado con el WSSV en comparación con camarones sanos. Estos autores atribuyen esta disminución de actividad de estas fosfatasa al incremento de radicales libres generados durante la patogénesis. La baja actividad de estas bombas de ATP también se puede deber a la baja producción de ATP ocasionada por el déficit de oxidación anaeróbica del piruvato debido a la reducción de la actividad de enzimas de las mitocondrias como la isocitrato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa (Voet *et al.*, 1998). Lo cual sugiere que las rutas de expresión de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no son afectadas de manera directa, sin embargo la capacidad de transporte iónico si puede disminuir.

Los niveles de expresión de la crustina en las 3 familias seleccionadas del área control fueron estables. En cambio, en los camarones domesticados la expresión de este gen fue inestable. El nivel de expresión disminuyó significativamente a las



24 hpi, aumentó a las 36 hpi y disminuyó nuevamente a las 48 hpi. El patrón de expresión de este gen en los camarones domesticados se puede deber a que no tiene un buen nivel de expresión constitutiva, es decir, los niveles de expresión de la crustina son bajos en ausencia de estímulo de un patógeno, lo cual lo haga ser más susceptible al combatir diferentes enfermedades. Los camarones domesticados y de la familia verde del área de infección tendieron a disminuir el nivel de expresión de la crustina a partir de las 6 hpi. Inclusive el desempeño de la familia verde fue más deficiente en cuanto a su expresión. Por otro lado los camarones de la familia morado y rosa presentaron un mejor desempeño en cuanto la expresión de la crustina y fueron las que mejor tiempo medio de sobrevivencia tuvieron siendo la familia rosa la que presentó una diferencia significativa de 13 horas en comparación con el lote domesticado y un nivel mayor de expresión de la crustina a las 48 en comparación con los tres grupos de camarones experimentales domesticados, verde y morado ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que la crustina pudiera estar más directamente relacionada con la susceptibilidad y posiblemente a la resistencia al WSSV.

García y colaboradores (2009) también observaron la sobreexpresión de la crustina en los camarones que sobrevivieron a una infección con el WSSV vía oral y nuevamente expuestos al WSSV en un segundo desafío. Estos autores reportan un incremento de 4 veces en comparación con los camarones que fueron infectados por primera vez con el virus.

Las crustinas son definidas o consideradas en la actualidad como polipéptidos catiónicos antimicrobianos ricos en cisteína que contienen un dominio WAP (Whey acidic protein por sus siglas en inglés) en la región carboxilo terminal. Este dominio podría tener una función importante en la actividad antimicrobiana de las crustinas ya que esta parte de la molécula se encuentra en las diferentes isoformas hasta ahora descritas. El dominio WAP se ha descrito en diferentes proteínas con funciones diversas como la SLPI (Zitnik *et al.*, 1997) que se ha

reportado en humanos y ratón como una proteína que provee protección una variedad de patógenos (Wiedow *et al.*, 1998). El mecanismo de acción y regulación de la expresión de las crustinas será de particular importancia para el control de enfermedades en el cultivo de camarones peneidos (Bacherè, 2000).

Con los resultados de expresión de los genes del sistema inmune analizados en el presente trabajo, es poco evidente recomendar el uso de estos genes como biomarcadores o marcadores inmunológicos para medir o correlacionar el grado de susceptibilidad al WSSV, ya que las diferencias de expresión entre los cuatro grupos no son muy constantes ni muy marcadas. La única correlación positiva en cuanto a sobrevivencia y alto nivel de expresión fue con la crustina, entre la familia rosa y el lote domesticado. Entre estos dos grupos, el tiempo de sobrevivencia fue 13 horas mayor en la familia rosa con un nivel de expresión 10.8 veces más alto ( $p < 0.05$ ). En contraste, al comparar el desempeño de la familia rosa con la familia verde, observamos que la familia rosa tuvo un tiempo de sobrevivencia de 10 horas mayor que la verde ( $p > 0.05$ ) y un nivel de expresión de crustina 28.7 veces más alto. Esto sugeriría que la familia verde tiene más comprometido su sistema inmune incluso que el lote domesticado.

Ya que aparentemente el aumento de la expresión de la crustina en la familia rosa está relacionado con su mayor sobrevivencia, sería conveniente cuantificar su abundancia y los niveles de actividad proteica en todas las familias y correlacionarlas con las sobrevivencias para evaluar distintivamente su uso como indicador de selección.

Las tres familias seleccionadas del área control (libres de WSSV), presentaron un nivel de expresión estable de transcritos de penaeidina, en cambio, el lote domesticado disminuyó 32.4 veces su nivel de expresión ( $p < 0.05$ ) a las 48 hpi. Esto se pudo deber a que los camarones domesticados no poseen un alto nivel de expresión constitutiva de este gen, ya que a las 6, 24 y 36 horas post inyección los

niveles de expresión fueron similares a los de las familias seleccionadas, posiblemente como respuesta al estímulo de la inyección del inóculo de tejido de camarón sano, que lo reconoce como agente extraño. Una vez que transcurrió el tiempo post inyección, el nivel de expresión volvió a un estado basal. Los camarones domesticados, verde y rosa, del área de infección, tendieron a disminuir sus niveles de expresión conforme progresó la infección con el WSSV y aumentaron los niveles de VP664. La única familia que presentó un incremento de 14.2 veces fue la familia morada a las 24 hpi y una disminución muy marcada de 71.9 veces las 36 y 48 hpi. Estos bajos niveles de expresión de la penaeidina evidencian el efecto de la infección causada por el WSSV en comparación con los niveles de expresión del área control, los cuales no presentaron reducciones tan pronunciadas.

García y colaboradores (2009) reportaron la sobreexpresión de genes del sistema inmune en camarones provenientes de un programa de selección genética que sobrevivieron a una infección experimental con WSSV vía oral y fueron nuevamente desafiados con el virus. Estos autores encontraron una sobreexpresión de 23 veces de la penaeidina 3a en hemocitos de camarones previamente desafiados al WSSV en comparación con camarones que habían sido infectados por primera vez. Además, encontraron la expresión de genes del sistema inmune solo en los camarones que fueron resistentes al WSSV. En contraste, en el presente trabajo, la expresión del gen de la penaeidina fue detectado en camarones sanos ya que manifiestan una respuesta inmune contra la solución proteica (inóculo sano) y en camarones infectados con WSSV.

Hasta ahora se sabe que el principal tejido de síntesis de péptidos antimicrobianos en camarón son los hemocitos, y que estos circulan por la hemolinfa y se infiltran en diferentes tejidos, contribuyendo a la expresión de crustinas y peneidinas entre otros genes del sistema inmune. En las branquias se forman los nódulos hemocíticos (Wang et al., 2007) para encapsular patógenos. En el presente

trabajo de tesis se eligieron las branquias debido al papel que desempeñan en la osmoregulación y en el sistema inmune del camarón. Además son uno de los principales órganos blanco de infección del WSSV.

Para determinar el grado de virulencia en los camarones, se cuantificó la expresión del gen viral de la nucleocápside VP664 del WSSV. En algunas de las muestras de los camarones del área controlada, tanto domesticados como seleccionados, se llegaron a detectar hasta tres copias de este gen. Pero cabe mencionar que algunas de las muestras de control negativo (sin cDNA templado), presentaron valores de Ct de 39 y 40 los cuales son similares a los de las muestras del área control. Estos falsos positivos se pueden deber a la formación de dímeros entre los primers y la sonda taqman después del ciclo 35 de reacción, que finalmente son reflejados en número de copias en las muestras.

Los camarones de la familia verde y domesticada del área de infección alcanzaron la fase de meseta a las 24 hpi con un número de copias de  $1.08E+4$  y  $1.57E+4$  del gen viral VP664 respectivamente. A diferencia de estos dos grupos, los camarones de las familias morada y rosa estaban por debajo de estos niveles a las 24 hpi con  $3.59E+03$  y  $2.53E+03$  respectivamente ( $p > 0.05$ ) y ambas alcanzaron la fase de meseta a las 36 hpi con  $1.12E+05$  en la familia rosa y  $1.21E+05$  en la familia morada. Correlacionando estos resultados con la susceptibilidad de los 4 grupos al virus de mancha blanca, se puede explicar la mayor sobrevivencia de los camarones de la familia rosa y morada en comparación a la familia verde y el lote domesticado. Posiblemente las diferencias de expresión de los genes del sistema inmune de las dos familias que mas sobrevivencia presentaron (rosa y morada), por pequeñas que fueron, tuvieron un efecto en los niveles de replicación del virus, en este caso medido indirectamente con la cuantificación del gen VP664.

## IX. CONCLUSIONES

1. Los camarones de las tres familias seleccionadas presentaron mayor sobrevivencia que el lote domesticado al desafiarlos experimentalmente al WSSV. Aunque los camarones infectados con el WSSV alcanzaron el 100 % de mortalidad entre las 75 y 85 hpi, no es posible determinar la sobrevivencia en condiciones naturales debido a que en esta tesis se infectó mediante inyección vía intramuscular, este método permite diferenciar la susceptibilidad entre familias.
2. Los niveles de transcritos de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no se vieron afectados por el WSSV, el cual incrementó el número de copias de VP664 de manera exponencial entre las 6 y 24 hpi. La expresión de crustinas y peneidinas se presentó de manera fluctuante entre familias y tratamientos, siendo generalmente suprimida en los individuos infectados tanto en el lote domesticado como en los seleccionados.
3. La crustina presentó una correlación positiva con mayor tiempo de sobrevivencia post-inyección en una de las familias seleccionadas (rosa), lo que la hace un posible candidato como marcador inmunológico.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- 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* 204:447-460.
- Bacherè, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191:3-11.
- Barba, E. 1999. El comportamiento osmorregulador de los crustáceos. *Contactos*. 34:23-28.
- Bartlett, T.C., B.J. Cuthbertson, E.F. Shepard, R.W. Chapman, P.S. Gross, y G.W. Warr. 2002. Crustins, Homologues of an 11.5-kDa Antibacterial Peptide, from Two Species of Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Marine Biotechnology* 4:278-293.
- Bashirullah, A.K.M., N. Mahmood, y A.K.M.A. Matin. 1989. Aquaculture and coastal zone management in Bangladesh. *Coastal Management* 17:119-127
- Bing, W., L. Fuhua, D. Bo, Z. Xiaojun, Z. Chengsong, y X. Jianhai. 2006. Discovery of the genes in response to White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology* 8:491-500.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe y M.Philips. 2005. Introducción y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 476. Roma. 86 pp.
- Burnett, L., y D. Towle. 1990. Sodium ion uptake by perfused gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: Effects of oubain and amiloride. *Journal of Experimental Biology* 149:293-305.
- Cai, S.L., J. Huang, C.M. Wang, X.L. Song, X. Sun, J. Yu, Zhang. y C.H. Yang. 1995. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *Journal of Fisheries of China* 19:112-117.
- Cázares-Simental, R., L. Enriquez-Paredes e I. Giffard-Mena. 2010. Evaluación de variabilidad genética en familias de camarones seleccionados y no

- seleccionados mediante SSRs. Séptma reunión anual de estudiantes de ecología molecular y biotecnología "Jorge de la Rosa Velez" IIO-UABC. pp.2.
- Cázares-Simental, R. (en preparación). Evaluación de variabilidad genética y susceptibilidad al WSSV en familias de *L. vannamei* mediante SSRs. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Maestría.
- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, e I.C. Liao. 2003. Dietary [beta]-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 15:297-310.
- Chang, P.S., C.F. Lo, Y.C. Wang y G.H. Kou. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:131-139.
- Chen, L.L., H.C.Wang, C.J. Huang, S.E. Peng, Y.G. Chen, S.J. Lin, W.Y. Chen, C.F. Dai, H.T. Yu y C.H. Wang. 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301:136-147.
- Chotigeat, W., S. Tongsupa, K. Supamataya y A. Phongdara. 2004. Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp. *Aquaculture* 233:23-30.
- Clavero-Salas, A., R.R. Sotelo-Mundo, T. Gollas-Galván, J. Hernández-López, A. B. Peregrino-Uriarte, A. Muhlia-Almazán, y G. Yepiz-Plascencia. 2007. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. *Fish and Shellfish Immunology* 23:459-472.
- Cock, J., T. Gitterle, M. Salazar y M. Rye. 2009. Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture* 286:1-11.
- Cornick, J. y J. Stewart. 1968. Interaction of the pathogen *Gaffkya homari* with natural defense mechanisms of *Homarus americanus*. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 25:695-709.

- Cuellar-Anjel, J., B. White-Nobel, P. Schcofield, R. Chamorro, y D.V. Lightner. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* resistant against WSSV. *Panorama Acuicola* 16 (5): 46-48.
- Cuthbertson, B., E. Shepard, R. Chapman, y P. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* 54:442-445.
- Davis, D.A., C.E. Boyd, y D.B. Rouse. 2005. Effects of the Potassium, Magnesium and Age on Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* Post-Larvae Reared in Land Low Salinity Well Waters in West Alabama. *Journal of the World Aquaculture Society* 36:416-419.
- De Donato, M., R. Ramirez, C. Howell, R. Verginelli, T. Orta, S. Cabrera y E. Mata, 2008. Artificial family selection based on growth rate in cultivated lines of *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) from Venezuela. *Genetics and Molecular Biology* 31:850-856.
- Destoumieux, D., P. Bulet, J. Strub, y E. Bachère. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European Journal of Biochemistry*. 266:335-346.
- Destoumieux, D., M. Munoz, 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.
- Dupuy, J.W., J.M. Bonami, y P. Roch. 2004. A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp. *Journal of Fish Diseases* 27:57-64.
- Durand, S.V., y D.V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in srhimp. *Journal of Fish Diseases* 25:381-389.
- Escobedo-Bonilla, C.M., L. Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert y H.J. Nauwynck. 2005. Standardized white spot syndrome virus



- (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:181-188.
- Escobedo-Bonilla, C.M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, and H.J. Nauwwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis y pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fishes Diseases* 31:1-18.
- Fjalestad, K., T. Gjedrem, W. Carr, y J. Sweeney. 1997. Final Report: The Shrimp Breeding Program, Selective Breeding of *Peneaus vannamei*. The Oceanic Institute, Wainmanalo, HI, USA.
- Fjalestad, K.T., T. Gjedrem, y B. Gjerde. 1993. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *Aquaculture* 111:65-74.
- García, C.J., A. Reyes, M. Salazar y C.B. Granja. 2009. Differential gene expression in the with spot syndrome virus (WSSV)-infected naïve and previously challenged Pacific white (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Aquaculture*. 289:253-258.
- Gitterle, T., R. Saltec, B. Gjerded, J. Cock, H. Johansen, M. Salazar, C. Lozano, M. Rye. 2005. Genetic (co) variation in resistance to With Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Aquaculture* 246:139-149
- Gjedrem, T. 2005. Selection and breeding programs in aquaculture. Springer. AKVAFORSK Institute of Aquaculture Research. pp 364.
- Giffard-Mena, I y L. Enriquez-Paredes. 2011. Reportes de avances con lotes de camarón seleccionado genéticamente. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Reporte Técnico. pp. 14.
- Gueguen, Y., J. Garnier, L. Robert, M.P. Lefranc, I. Mougnot, J. de Lorgeril, M. Janech, P.S. Gross, G.W. Warr, B. Cuthbertson, M.A. Barracco, P. Bulet, A. Aumelas, Y. Yang, D. Bo, J. Xiang, A. Tassanakajon, D. Piquemal, y E. Bachère. 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental and Comparative Immunology* 30:283-288.

- Jarayabhand, P., S. Uraivan, S. Klinbunga, A. Tassanakajon, P. Srimukda, P. Pattanachan, R. Panakulchaiwit, y P. Menasveta. 1998. Estimated heritabilities for early growth rate of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, Fabricus in *Proceedings to the special session on advances in shrimp biotechnology, the fifth asian fisheries forum: international conference on fisheries and food security beyond the year 2000*. T, ed., Chiangmai, Thailand. pp. 67-70
- Jiravanichpaisal, P., K. Söderhäll, e I. Söderhäll. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish and Shellfish Immunology* 17:265-275.
- Kuo, G.H., S.E. Peng, Y.L. Chiu y C.F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. pp. 267-271.
- Leu, J.H., J.M. Tsai, H.C. Wang, A.H. Wang, C.H. Wang, G.H. Kuo y C.F. Lo. 2005. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *Journal of Virology*. 79:140-149.
- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of the farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of invertebrate pathology*. 106:110-30
- Lightner, D.V. y S.V. Durand. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of the white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of fish diseases* 25: 381-389.
- Lightner, D.V. 1996. *A Handbook of Shrimp Patology and Diangnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquatic Society, Baton Rouge, LA.
- Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang y G.H. kou. 1996a. White spot syndrome

- baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27:215-225.
- Main, K.L., y J.A. Brock. 1994. *A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured Penaeus vannamei*. The World Aquaculture Society, Louisiana.
- Marks. H. 2005. Genomics and transcriptomics of white spot syndrome virus. PhD dissertation, Department of plant sciences. Wageningen University, The Netherlands. pp 152.
- Martín, G., M. Quintero, M. Quigley y H. Khosrovian. 2000. Elimination of the sequestered material from the gills of decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 20:209-217.
- Mohankumar, K. y P. Ramasamy, 2006. Activities of membrane bound phosphatases, transaminases and mitochondrial enzymes in the white spot syndrome virus infected tissues of *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research* 118:130-135.
- Morales, V. y J. Cuellar-Anjel. 2009 .CESASIN. BOLETIN INFORMATIVO. pp.2-3
- Namikoshi, A., J.L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto, y K. Muroga. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229:25-35.
- Pérez, F., L. Gómez, V. Otero, F. Volckaert, y J. Calderón. 2001. Supervivencia diferencial de familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas con el virus de la mancha blanca. *Domesticación y larvicultura* 8:25-28.
- Pèqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15:1-60.
- Pérez, F., F. Volckaert, y J. Calderón. 2005. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 250:586-591.
- Ramos-Carreño, S. 2010. Mecanismos de infección del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarón *Litopenaeus vannamei* expuesto a salinidades extremas, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de maestría.

- Ramos-Paredes, J., J. Grijalva-Chon, J. De la Rosa-Velez y L. Enriquez-Paredes 2011. New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Bonne) in northwest Mexico. *Aquaculture Research*. 1-10.
- Robalino, J., T. Bartlett, E. Shepard, S. Prior, G. Jaramillo, E. Scura, R.W. Chapman, P.S. Gross, C.L. Browdy, y G.W. Warr. 2005. Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNA Interference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response *Journal of Virology* 79:13561-13571.
- SIS. 1998. Shrimp Improvement Systems, líder mundial en reproductores de camarón. *Panorama Acuícola* 15:4649
- Saoud, I.P., D.A. Davis, y D.B. Rouse. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture* 217:373-383.
- Supamataya, K., R.W. Hoffman, S. Boonyaratpalin, y P. Kanchanaphum. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portonius pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes sp.* *Disease of Aquatic Organisms* 32:79-85.
- Supungul, P., S. Tang, C. Maneeruttanarungroj, V. Rimphanitchayakit, I. Hirono, T. Aoki, y A. Tassanakajon. 2008. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 32:61-70.
- Söderhäll, K., S. Iwanaga, y G.R. Vasta. 1996. *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, New Jersey : Fair Heaven.
- Towle, D. W. 1990. Sodium transport systems in gills. in *Comparative aspects of sodium cotransport systems*, ed Kinne R. K. H.(Karger, Basel, Switzerland), pp. 241-263.
- Towle, D.W. y D. Weihrauch. 2001. Osmoregulation by Gills of Euryhaline Crabs: Molecular Analysis of Transporters. *American Zoologist* 41:770-780.

- van Hulten, M.C.W., M. Westenberg, S.D. Goodall, y J.M. Vlak. 2000. Identification of Two Major Virion Protein Genes of White Spot Syndrome Virus of Shrimp. *Virology* 266:227-236.
- van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, y J.M. Vlak. 2001a. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology* 286:7-22.
- van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, M. Snippe, y J.M. Vlak. 2001b. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 Is Involved in the Systemic Infection of Shrimp. *Virology* 285:228-233.
- Vargas-Albores, F., G. Yepiz-Placencia, F. Jimenez-Vega, A. Avila-Villa, 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138:415-422.
- Vidal, O.M., C.B. Granja, F. Aranguren, J.A. Brocke, y M. Salazar. 2007. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* Juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the Aquaculture Society* 32:364-372.
- Voet, D., J.G. Voet, y C.W. Pratt. 1998. In: Mills, C., Heaney, B (Eds.), Biological membranes . Fundamental of Biochemistry. Von Hoffman Press Inc., John Wiley and Sons, Ney York.
- Wang, Q., B.L. White, R.M. Redman, y D.V. Lightner. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170:179-194.
- Wang, Y.C., P.S. Chang, and H.Y. Chen. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 23:1161-1177.
- Wiedow, O., J. Harder, J. Bartels, V. Streit, y E. Christophers. 1998. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248:904-909.

- Wiedow, O., J Harder, B.J. Argue, 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* 204:447-460.
- Witteveldt, J., J.M. Vlask, y M.C.W. van Hulten. 2004b. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish and Shellfish Immunology* 16:571-579.
- Yang, Y., J. Poncet, J. Garnier, C. Zatylny, E. Bachère, y A. Aumelas. 2003. Solution Structure of the Recombinant Penaeidin-3, a Shrimp Antimicrobial Peptide. *Journal of Biological Chemistry* 278:36859-36867.
- Yeaman, M.R., y N.Y. Yount. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* 55:27-55.
- Zitnik, R.J., J. Zhang, M.A. Kashem, T. Kohno, D.E., Lyons, C.D. Wright, E. Rosen, L. Goldberg y A.C Hayday, 1997. The cloning and characterization of a murine secretory leukocyte protease inhibitor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232:687-697.

## ANEXO I

Tabla I. Oligonucleótidos para cuantificar la expresión de genes por PCR en Tiempo real.

Gen blanco	No de secuencia en el Gene Bank #	Secuencias de cebadores Forward/ Reverse	Productos bp	Referencia diseño de primers
ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	JF288783	5'-CCAGTATGACAAGACCTC-3' 5'-CCTTAACATCACCAACAGCC-3'	235 bp	Giffard-Mena <i>et al.</i> , 2011
Crustina	AF430076	5'-ACGAGGCAACCATGAAGG-3' 5'-AACCACCACCAACACCTAC-3'	204 bp	Giffard-Mena (com. per.)
Peneidina 3a	Y14926	5'-CACCTTCGTGAGACCTTG-3' 5'-AATATCCCTTTCCACGTGAC-3'	151 bp	Giffard-Mena (com. per.)
VP664	U50923	5'-TGGTCCCGTCCTCATCTCAAG-3' 5'-GCTGCCTTGCCGAAATTA-3' 5'-AGCCATGAAGAATGCCGTCTA TCACACA5'3'	69 bp	Lightner y Durand, 2002

En las diferentes pruebas de desafío al WSSV que se han realizado previamente, en el laboratorio de Ecología Molecular “Dr. Jorge de la Rosa Velez”, se han utilizado cebadores específicos enlistados en la tabla II para la detección del WSSV (ORF94) en los organismos del área de infección y el gen de la  $\beta$ -actina de *P vannamei* como gen endógeno para verificar la calidad de amplificación de las muestras.

Tabla II. Secuencias de primers para detección del WSSV (ORF94) y de  $\beta$ -Actina de *P. vannamei*.

Gen	Secuencia	Producto bp	Referencia
<b>ORF94</b>	F5'-ACCCATCGAGCACGGCATC-3' R5'-TGGTCTCGTGGATGCCGAG-3'	653	Ramos –Paredes, 2011
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	F5'-TCTACTCGAGGAGGTGACGAC-3' R5'-AGCAGGTGTGTACACATTTAC-3'	627	De la Rosa, 2007*