

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL YHV AISLADO EN
MÉXICO

TESIS
PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA
YENELLI CEDANO THOMAS

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO 2010

RESUMEN: ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL YHV AISLADO EN MÉXICO.

La enfermedad producida por el YHV (*Yellow head virus*), ha ocasionado serias epizootias en países Asiáticos y cuantiosas pérdidas económicas a la industria camaronera. Sin embargo desde su identificación, en granjas camaroneras del sur de Tailandia en 1993, se han reportado diferencias en la patogenicidad en varios hospederos en diversas regiones. No obstante, hasta hace unos años el YHV únicamente se había detectado en granjas de países asiáticos. Pero en 1999 se detectó el YHV en varias granjas camaroneras del Pacífico Mexicano, esta cepa fue nombrada como “YHV-LvA” por haber sido aislada de *Litopenaeus vannamei* Americanos. Sin embargo, debido a la baja patogenicidad de la cepa y a la gran similitud que existe entre YHV y GAV (un virus prácticamente inocuo para *L. vannamei*) su identidad fue cuestionada. Por lo tanto, en este estudio confirmamos la identidad del YHV-LvA por secuenciación de varias regiones del genoma y determinamos su capacidad replicativa. Además se estableció la capacidad del sistema inmune del camarón para identificarlo y desplegar una respuesta, medible por expresión génica.

La identidad de la cepa YHV-LvA, fue confirmada mediante secuenciación y comparando las regiones genómicas funcionales del virus con otras cuatro cepas del YHV (YHV-PmA, Thailand, Cholburi y Chachoengsao) y con GAV. Mediante este análisis se encontró que la cepa YHV-LvA posee un 98% con respecto a la cepa Chachoengsao, 99% de similitud con la cepa Cholburi, así como un 100% con las cepas YHV-PmA y Thailand (todas las cepas provienen de *Penaeus monodon* infectados de granjas Tailandesas). Por otro lado, la cepa YHV-LvA presentó una similitud del 82% con respecto a GAV, por lo que se confirmó que el virus detectado en México es YHV.

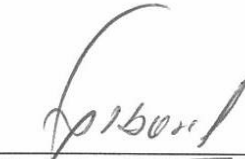
La capacidad replicativa del YHV-LvA, se estableció monitoreando la expresión de cuatro genes implicados en el reconocimiento e interacción celular (GP116 y GP64) y la replicación viral (3CL^{PRO}, POL); utilizando PCR cuantitativo a diferentes tiempos post-infección (1.5 a 96 h). Los resultados indican que la cepa YHV-LvA posee una

tasa de replicación de 5.73×10^5 (copias/h) y su cinética de expresión génica presenta tres fases: La inicial o de incubación, que dura 24 h, periodo en el cual el virus infecta a la célula y comienza a replicarse; la de replicación, la cual comprende de las 24 a las 48 h post-infección, durante el cual el virus se replica exponencialmente y la fase final, fue observada entre las 72 a 96 h, periodo en el cual el virus se ensambla y se libera fuera de la célula. También se encontraron diferencias en la susceptibilidad entre los organismos ya que se detectaron variaciones en su tasa de replicación.


Por otro lado, se encontró que la cepa YHV-LvA estimula la respuesta inmune del camarón, ya que utilizando técnicas de expresión como arreglos moleculares (macroarreglos) y expresión diferencial de genes de hemocitos del camarón, se encontró que el 72% de los genes de proteínas analizados del sistema inmune, modificaron su expresión.

En conclusión, este estudio confirma la identidad y presencia del YHV en granjas Mexicanas. Además, por primera vez se presenta la cinética de replicación del YHV y el papel del sistema inmune del *L. vannamei* para contrarrestar la infección producida por un virus con genoma de RNA.


APROBADO POR:




Dr. Francisco Vargas Albores
Director de tesis




Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal



Dr. Alexei F. Licea
Navarro
Sinodal



Dr. Eugenio Carpizo
Ituarte
Sinodal



Dr. Jorge Ledesma
Vázquez
Sinodal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

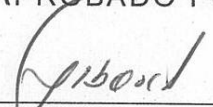
ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL YHV AISLADO EN MÉXICO

TESIS
PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA
YENELLI CEDANO THOMAS

APROBADO POR:


DR. FRANCISCO VARGAS ALBORES
DIRECTOR DE TESIS


DR. ALEXEI F. LICEA
NAVARRO
SINODAL


DRA. IVONE GIFFARD MENA
SINODAL


DR. JORGE LEDESMA VÁZQUEZ
SINODAL


DR. EUGENIO CARPIZO
ITUARTE
SINODAL

DEDICATORIA

A mi hijo Álvaro Iván Ortiz Cedano

A toda mi familia

“La religión explica los miedos del hombre, la ciencia descubre las verdades de la naturaleza, la ciencia es para valientes”

AGRADECIMIENTOS

Resulta difícil conjugar a todas las personas, instituciones y amigos que han apoyado en la realización de esta tesis. De antemano quiero agradecer a todos los que de una u otra forman me han ayudado.

Primeramente quiero expresar mi eterno agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Jorge de la Rosa Vélez sería muy largo si escribo todas la razones que tengo para agradecerle así que simplemente diré que por todas la enseñanzas académicas y no académicas que me brindo.

Al Dr. Jear Robert Bonami y al Laboratorio de Ecosystems Lagunaires, en la Université Montpellier II. Durante mi estancia en su laboratorio no solo fue una experiencia de aprendizaje sino de amistad. Ya que hice muy buenos amigos y tuve la oportunidad de sentirme parte de ese gran equipo de trabajo, además quiero agradecer muy especialmente a la Idalia Hernández, [Toubiana Mylène](#), al Dr. [Roch Philippe](#) y a todos los compañeros de ese laboratorio por su apoyo durante mi estancia en su hermoso país.

Al Dr. Francisco Vargas Albores por ser mi eterno asesor a lo largo de toda mi formación académica, así como un amigo incondicional.

A la Dra. Ivonne Giffard Mena por su apoyo para poder finalizar mi tesis y por ser una gran amiga.

Al Dr. Alexei Fedórovish por brindarme su amistad, por sus sabios consejos siempre acompañados de unos exquisitos expresos.

A todos los grandes investigadores que tuve la suerte de tener en mi comité de tesis, que sin sus consejos no hubiera sido posible este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California por apoyarme durante mi formación académica.

Al posgrado de la facultad de Ciencias marinas por brindarme una formación profesional de muy buen nivel académico y por darme la oportunidad de aprender gracias a su experiencia.

A mis compañeros del laboratorio de ecología molecular (UABC) y a mis compañeros del laboratorio de biotecnología marina (CIAD).

Un agradecimiento muy especial a mis entrañables amigos que más que amigos son mis hermanos Erika Aguirre y Ulices Noriega. Y para mi muy especial amigo del alma que siempre esta en mi corazón Iban Serna Santamaría.

Gracias a todos ustedes por su apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
ABREVIACIONES.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
YELLOW HEAD VIRUS.....	2
Clasificación taxonomía.....	3
Organización genómica	5
SISTEMA INMUNE DEL CAMARÓN.....	12
Respuesta celular	13
Respuesta humoral.....	14
ANTECEDENTES.....	18
REPLICACIÓN DEL YHV.....	19
ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR PATÓGENOS VIRALES.....	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
ANÁLISIS GENÓMICO.....	24
Cepas virales.....	24
Diseño de iniciadores específicos para genes virales.....	24
Obtención de secuencias virales	25
Análisis genómico y filogenético	26
ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN VIRAL.....	27
Preparación del inóculo viral.....	27
Estandarización de la dosis viral.....	27
Bioensayo.....	28
Selección de tejido.....	28
Cuantificación de la expresión viral	29
Clonación	29
Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR).....	30
ANÁLISIS DE LA ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	31

Obtención de Muestras para respuesta inmune.....	31
Macroarreglos.....	31
Preparación de las membranas.....	32
Preparación de las sondas.....	35
Hibridación.....	35
Detección.....	37
Expresión diferencial.....	37
Diseño de iniciadores específicos para genes del camarón.....	37
Reacciones de PCR.....	38
Cuantificación de la expresión	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
ANÁLISIS GENÓMICO.....	40
Cepas virales.....	40
Diseño de iniciadores.....	41
Obtención de secuencias virales.....	42
Análisis genómicos y filogénicos.....	43
REPLICACIÓN VIRAL.....	47
Dosis viral	47
Selección del tejido blanco.....	49
Cuantificación de la expresión viral.....	52
Expresión de genes replicativos.....	53
Expresión de genes estructurales.....	57
Tasa de replicación entre individuos	59
ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	62
Macroarreglos.....	63
Expresión de genes de proteínas del sistema inmune.....	65
Profenoloxidasa.....	69
Toll.....	70
ALF.....	72
Lisozima.....	73
SOD.....	74
SIBD.....	76
Peneidina.....	76
Kazal.....	77
I κ B.....	79
Expresión de genes de proteínas con dominios WAP.....	79
Crustina.....	79
SWD.....	82
SLPI.....	83
Expresión de genes de proteínas del metabolismo energético y del estrés	84
HSP 60.....	84
Citocromo C Oxidasa subunidad II y III.....	85
Expresión de genes desconocidos.....	88
CONCLUSIONES.....	90
REFERENCIAS.....	92

LISTA DE TABLAS

TABLA I. ARREGLO MOLECULAR DE LOS GENES ANALIZADOS POR MACROARREGLOS.....	34
TABLA II. INICIADORES ESPECÍFICOS PARA DIFERENTES REGIONES EL GENOMA DEL YHV.	42
TABLA III. DISTANCIA GENÉTICA DE LAS REGIONES DEL YHV-LvA.....	44
TABLA IV. INICIADORES ESPECÍFICOS PARA GENES DEL CAMARÓN	66
TABLA V. RESUMEN DEL ÍNDICE DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS NIDOVIRALES.....	7
FIGURA 2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL YHV.....	11
FIGURA 3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS GENÓMICAS DEL YHV-LvA.....	45
FIGURA 4. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DEL INÓCULO VIRAL.....	49
FIGURA 5. DETECCIÓN DEL YHV-LvA EN DIFERENTES TEJIDOS DEL CAMARÓN.....	51
FIGURA 6. EXPRESIÓN DE 3CLPRO Y POL A DIFERENTES TIEMPOS POST-INFECCIÓN.....	56
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE GP116 Y GP64 A DIFERENTES TIEMPOS POST-INFECCIÓN.....	58
FIGURA 8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN VIRAL EN MUESTRAS INDIVIDUALES.....	60
FIGURA 9. TASA DE REPLICACIÓN DE LOS GENES VIRALES.....	62
FIGURA 10. ANÁLISIS DE MACROARREGLOS.....	64
FIGURA 11. ÍNDICE DE EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA INMUNE.....	75
FIGURA 12. ÍNDICE DE EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA INMUNE II.....	78
FIGURA 13. ÍNDICE DE EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS CON UN DOMINIO WAP.....	81
FIGURA 14. ÍNDICE DE EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO Y DE ESTRÉS.....	87
FIGURA 15. ÍNDICE DE EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS DESCONOCIDAS.....	89

ABREVIACIONES

3CL^{PRO}	(proteasa similar a quimotripsina)
ALF	(factor Anti-Lipopolisacáridos)
An	(poly-A)
Anti-Dig	(anti-digoxigenina)
BGBP	(β -1,3-glucan binding protein)
cDNA	(ácido desoxirribonucleico complementario)
COII y COIII	(citocromo C oxidasa sub II y III)
C405	(Clon 405; gen desconocido)
C364	(Clon364; Similar sex to lethal)
Cys	(cisteínas)
DEPC	(Dietilpirocarbonato)
DNA	(ácido desoxirribonucleico)
dsRNA	(Double-stranded RNA)
E	(proteína de envoltura)
FO	(fenoloxidasa)
GAV	(<i>Gill-associated virus</i>)
GP116	(glicoproteína 116)
GP64	(glicoproteína 64)
GP2 a la GP5	(glicoproteínas no esenciales de la envoltura)
Gs	(glicoproteína pequeña)
HD1-HD4	(Regiones hidrofóbicas)
HE	(hemaglutinina esterasa)
HEL	(Helicasa)
HSP 60	(Heat Shock Proteins 60)
IE	(índice de expresión)
IGF	(Insulin-like Growth Factor)
IGFBP	(IGF binding protein)
iRNA	(RNA de interferencia)
L	(secuencia líder)
LB	(medio de cultivo Luria Broth)
LPS	(Lipopolisacáridos)
M	(proteína de membrana)
M1 y M3	(Motif 1 y 3)
MIB	(proteína con unión ion metálico)
N	(Nucleoproteína)
NendoU	(Uridylate-specific endoribonuclease)

nsp	(Nonstructural Proteins)
ORF	(open reading frame) marco de lectura abierto
PAM	(péptidos antimicrobianos)
PAMPs	(patrones moleculares asociados a patógenos)
PCR	(Reacción de la Cadena de Polimerasa)
PEN	(peneidinas)
PG	(peptidoglucanos)
PLP1	(proteasa similar a papaína)
PLPX	(dominio similar a PLP1 pero sin carga catiónica+)
POL	(polimerasa)
proFO	(profenoloxidasa)
PRP	(Pattern-Recognition Proteins)
qPCR	(Reacción de la Cadena de Polimerasa en tiempo real o PCR cuantitativo)
RNA	(ácido ribonucleico)
RNA_{TOTAL}	(ácido ribonucleico total)
RT-PCR	(Transcripción Reversa Reacción de la Cadena de Polimerasa)
S	(proteína spike)
SARS	(<i>Severe acute respiratory syndrome</i>)
sdRNA	(RNAs intermediarios de doble-cadena)
SDS	(sodium dodecyl sulfate)
sg RNA	(RNA sub-genómicos)
SIBD	(Single Insulin Binding Domain)
SLPI² y SLPI¹	(Secretory leukocyte protease inhibitor)
SOD	(superóxido dismutasa)
ssRNA	(RNA de cadena sencilla)
ssRNA⁺	(RNA de cadena sencilla, con polaridad positiva)
SSS	(solución salina para camarón)
SWD	(Single WAP Domain)
SWDM1 2	(Single WAP Motif protein 1 y 2)
Ta	(Temperatura de alineamiento)
TGV	(<i>Transmissible gastroenteritis virus</i>)
TLRs	(TOLL-LIKE RECEPTORS)
UTR	(unstranlated region)
WAP	(Whey Acidic Protein)
WSSV	(<i>White spot syndrome virus</i>)
YHV	(<i>Yellow head virus</i>).
YHV-LvA	(YHV aislada en granjas mexicanas “cepa americana”)
YHV-PmA	(YHV aislada en granjas asiáticas “cepa asiática”)

INTRODUCCIÓN

El camarón es una especie comercialmente importante, tanto para la industria pesquera como la de cultivos, lo que ha convirtiéndose a la camaronicultura, en una de las industrias con mayor crecimiento en todo el mundo. La gran demanda del producto y la insuficiencia de la flota pesquera para satisfacerla, ha provocado un incremento en el cultivo del camarón que, en algunos casos, rebasa los volúmenes de captura. México es uno de los países donde se ha impulsado la producción de camarón, favorecida por la cercanía con los Estados Unidos quienes son los principales consumidores (Briggs, Funge-Smith et al. 2004; Sagarpa 2005). Aunque la camaronicultura es una actividad altamente rentable, existen problemas que pueden afectarla, como son: la baja calidad del agua, una alimentación inadecuada y las enfermedades las cuales son las que mayor impactan el rendimiento de los cultivos (Tacon 2002).

Aunque se ha avanzado en la formulación de dietas y en el conocimiento de los parámetros ambientales de los cultivos, los padecimientos infecciosos siguen siendo el problema más importante en acuicultura, sobre todo en los cultivos intensivos, donde la transmisión de patógenos se ve favorecida por la alta densidad poblacional. Aunque las bacterias también causan graves daños, las epidemias causadas por virus han impactado profundamente la camaronicultura en Asia y en América Latina (DeWalt 2001; Rönnbäck 2003), sobresaliendo el virus de la mancha blanca WSSV (*White spot*

syndrome virus) y el virus causante de la enfermedad de la cabeza amarilla YHV (*Yellow head virus*). El WSSV fue reportado por primera vez, en 1995 (Wang, Lo et al. 1995; Wongteerasupaya, Vickers et al. 1995), en organismos cultivados en granjas asiáticas y, en 1997 (Lightner, Redman et al. 1997), en granjas del continente Americano, regiones donde, hasta la fecha, el virus sigue causando grandes mortalidades. Por otro lado, el YHV fue identificado en granjas tailandesas en 1993, en cultivos de *Penaeus monodon*, con mortalidades del 100% registradas en los primeros 3-5 días de la infección, por lo que es considerado como uno de los virus más agresivos (Boonyaratpalin, Supamattaya et al. 1993). Afortunadamente, hasta la fecha, no se ha reportado un ataque severo en granjas de América.

YELLOW HEAD VIRUS

El YHV, llamado así porque un signo de la enfermedad es la coloración amarillenta que adquiere el dorso del cefalotórax, ocasionada por la inflamación del hepatopáncreas. Los tejidos atacados por este virus son: órgano linfoide, intestino, gónada, glándula antenal, músculo, hemocitos, tejido hematopoyético, conectivo, nervioso, epitelio cuticular y las células epiteliales de las lamelas branquiales (Lightner 1996).

El YHV es capaz de infectar varias especies de peneidos, aunque con diferente grado de virulencia, incluso puede localizarse en animales sanos de algunas especies de camarones planctónicos, habitantes comunes de las estanquerías, por ejemplo en *P. merguensis*, *Acetes* sp., *Palaemon styliferus* y *Metapenaeus ensis* (Lu, Tapay et al. 1994;

Ma, Overstreet et al. 2009). Sin embargo, los camarones *L. vannamei* y *L. stylirostris* que han sido infectado experimentalmente muestran los mismo síntomas que *P. monodon* infectado en forma natural (Lu, Tapay et al. 1994). Por otro lado, en cultivos en donde se encuentran mezclados *P. monodon*, *P. indicus* y *P. merguensis* (en Tailandia y la India), se ha observado que *P. monodon* muere rápidamente víctima de la enfermedad de la cabeza amarilla; mientras que *P. indicus* y *P. merguensis* no muestran síntomas de la enfermedad. Este resultado se interpretó como especificidad del hospedero (Mohan, Shankar et al. 1998).

CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA

El YHV, fue reportado por primera vez en 1992, en cultivos de *P. monodon* al sur de Tailandia (Boonyaratpalin, Supamattaya et al. 1993) y, basándose únicamente en su morfología, se clasificó como un baculovirus debido a que tiene forma de barra (Boonyaratpalin, Supamattaya et al. 1993). Posteriormente, cuando el virus fue purificado por ultra-centrifugación, se pudo determinar que su genoma era un RNA, lo que llevó a sugerir que YHV era un *Rhabdovirus*, o un *Coronavirus* (Wongteerasupaya, Vickers et al. 1995). En 1997, Nadala y colaboradores (Nadala, E.C.B; et al. 1997) purificaron 4 proteínas virales de 24, 67, 135 y 170 kDa, las cuales coincidían con el patrón de bandas de los *Rhabdovirus*. Esto apoyó su inclusión en este grupo y, por lo tanto, se predijo que su genoma era de polaridad negativa (Nadala, E.C.B; et al. 1997). Sin embargo, posteriores pruebas de hibridación *in situ* con una sonda de secuencia-específica, demostraron que el genoma del YHV tiene

polaridad positiva (Tang and Lightner 1999). Esto hizo evidente la necesidad de estudiar la organización genómica y estrategia de replicación para poder clasificar adecuadamente a este virus.

Por otro lado, en Australia se aisló un virus muy semejante al YHV (en morfología y especificidad del hospedero), pero con baja patogenicidad para *P. monodon*, contrario a lo provocado por el YHV (Spann, Cowley et al. 1997; Cowley, Dimmock et al. 1999). Debido a que este virus se encontraba particularmente en las branquias, se le dio el nombre de “virus asociado a las branquias” GAV (*Gill-associated virus*). En 1999 se obtuvo la secuencia completa de las regiones ORF1a y ORF1b (20Kb) del GAV, lo que permitió conocer su organización genómica y aportar elementos sólidos para su clasificación taxonómica (Cowley, Dimmock et al. 2000; Cowley, Dimmock et al. 2002; Cowley and Walker 2002). Por su parte, la secuencia del ORF1b (~10Kb) del YHV se obtuvo en 2002 y se pudo realizar una comparación genómica con el GAV, donde se confirmó su estrecha relación taxonómica (Cowley, Dimmock et al. 2002; Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002).

Por lo anterior, YHV y GAV se encuentran clasificados como dos virus pleomórficos con envoltura, con genoma de RNA de cadena sencilla, con polaridad positiva (ssRNA⁺), que pueden ser aislados y localizados en el citoplasma de las células infectadas. Estos virus han sido ubicados dentro del género *Okavirus* dentro de una nueva familia llamada *Roniviridae* la cual, junto con las familias de los *Coronaviridae* y *Arteriviridae*, conforman el orden de los *Nidovirales* (Cowley, Dimmock et al. 1999; Cowley, Dimmock et al. 2000;

Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002; González, Gomez-Puertas et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Pasternak, Spaan et al. 2006). Además de tener una organización genómica similar, YHV y GAV también son semejantes a los *Nidovirales* por su mecanismo de replicación (de Vries, Horzinek et al. 1997; Cowley, Dimmock et al. 2002; Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002).

ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Los *Nidovirales* son virus con genoma (+)ssRNA, con envoltura y con capacidad para replicarse exclusivamente en el citoplasma de las células de su huésped. Los virus dentro de este orden presentan diferencias considerables en la complejidad de la arquitectura genética; sin embargo, son muy similares en organización genómica y estrategia de replicación (de Vries, Horzinek et al. 1997; González, Gomez-Puertas et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Pasternak, Spaan et al. 2006). La organización genómica de los *Nidovirales* es, característicamente, compleja (Figura 1). Más de dos tercios de su genoma está formado por dos marcos de lectura, ORF1a y ORF1b, que se traslapan (de Vries, Horzinek et al. 1997; Cowley, Dimmock et al. 2000) y codifican para una poliproteína que, después de sufrir procesos postraduccionales, da origen a las proteínas asociadas a la replicación (3CL^{PRO}, POL, HEL, MIB, M1 y M3). El brinco ribosomal ó cambio en el marco de lectura entre el ORF1a/ORF1b es producido por una estructura secundaria del RNA (Spaan, Cavanagh et al. 1988; de Vries, Horzinek et al. 1997; Cowley, Dimmock et al. 2000) la cual, en el caso de YHV y GAV, es estabilizada por una

secuencia de siete nucleótidos “AAAUUUU” (Cowley, Dimmock et al. 2000; Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002).

En todos los *Nidovirales*, el ORF1a codifica para una proteasa (3CL^{PRO}), la cual es similar a quimotripsina flanqueada por dominios transmembranales (Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006). La 3CL^{PRO} de YHV y GAV tiene características estructurales similares a la proteasa de los *Potyvirus*, aportando pruebas de una relación evolutiva entre los *Coronaviruses* y los *Potyviridae* (Ziebuhr, Bayer et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008). Por su parte, el ORF1b de YHV y GAV, codifica para una RNA polimerasa que posee un dominio SDD, el cual está altamente conservado entre las polimerasa de los *Nidovirales*. El ORF1b también codifica para una proteína con unión ion metálico (MIB), una helicasa y dos motivos estructurales (motif 1 y 3) de función desconocida (Figura 2) (Cowley, Dimmock et al. 2000; Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002); todas ellas también son características de otros *Nidovirales* (de Vries, Horzinek et al. 1997; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Pasternak, Spaan et al. 2006).

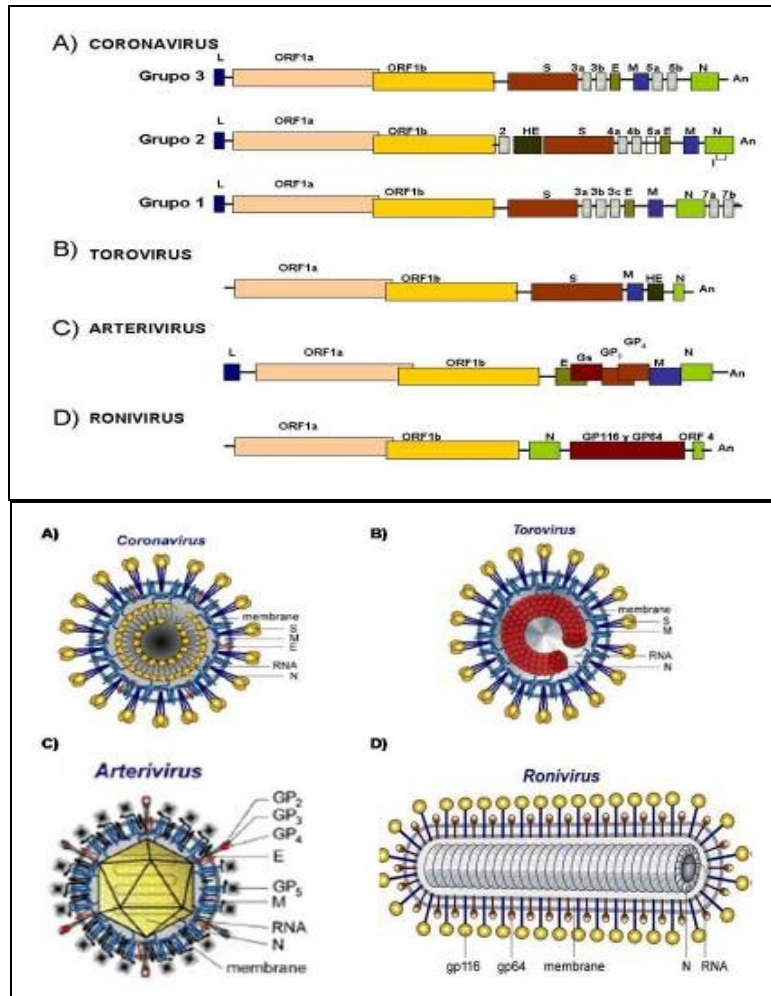


Figura 1 Estructura y organización genómica de los Nidovirales.

La figura muestra las estructuras morfológicas descritas para cada una de las familias de los *Nidovirales*, así como su organización genómica. En el cuadro superior se muestra un esquema de la organización genómica, en donde cada rectángulo representa un ORF (marco de lectura abierto) diferente. A) *Coronavirus* de los grupos 1, 2 y 3. B) *Torovirus* C) *Arterivirus* y D) *Ronivirus* (al que pertenecen YHV y GAV). Los cuadros numerados indican secuencias homólogas de proteínas no estructurales, presentes únicamente en los *Coronavirus*. En el cuadro inferior se muestran las representaciones morfológicas de cada tipo de virus. Las letras mostradas en ambos cuadros, representan los distintos elementos que componen los genomas virales: **An**, poly-A; **E**, proteína de envoltura; **Gs**, glicoproteína pequeña; **GP2 a la GP5**, glicoproteínas no esenciales de la envoltura; **GP116 y GP64** glicoproteínas de los *Ronivirus*; **HE** hemaglutinina esterasa; **I**, ORF interno; **L**, secuencia líder; **M**, proteína de membrana; **N**, nucleoproteína; **S**, proteína spike; (González *et al.*, 2003; Gorbalenya *et al.*, 2006).

El ORF2 de los *Nidovirales*, localizado río abajo (downstream) del ORF1b, codifica para las proteínas de la nucleocápside (N) y/o para alguna proteína de envoltura (Cowley, Dimmock et al. 2002; Cowley, Cadogan et al. 2004; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006). La proteína de la nucleocápside del YHV tiene 146 residuos, con 15.1% de aminoácidos básicos, 9,6% de ácidos, 34,3% de hidrofílicos polares y un alto contenido de residuos de prolina y glicina (16,4%) (Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006). En GAV, la misma proteína tiene 144 residuos, de los cuales 14% son básicos, 9% ácidos y 13% son prolinas (Cowley, Dimmock et al. 2002; Cowley, Cadogan et al. 2004). La proteína de la nucleocápside, tanto de YHV como de GAV, característicamente no contienen cisteína y poseen un racimo de argininas en su extremo N-terminal (Cowley, Cadogan et al. 2004; Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006). Dentro de los *Nidovirales*, el tamaño del producto del ORF2 es diferente, siendo de 110-128 residuos en los *Arterovirus* (den Boon, Snijder et al. 1991; Chen, Kuo et al. 1993; Godeny, Chen et al. 1993; Meulenberg, Hulst et al. 1993) y de 160-167 en *Torovirus* (Duckmanton, Tellier et al. 1998; Kroneman, Cornelissen et al. 1998); sin embargo, en los *Coronavirus* las proteínas de la nucleocápside tienen de 377 a 454 aminoácidos (Laude and Masters 1995). En general el producto del ORF2 de los *Okavirus* sólo tiene algunas semejanzas generales con la proteína de la nucleocápside de los *Torovirus*, como es la ausencia de cisteínas, un alto contenido de prolinas y la presencia de varios residuos básicos que probablemente facilitan la unión con el ácido nucléico (Cowley, Cadogan et al. 2004; Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006). Considerando que las proteínas de la nucleocápside definen la

forma de los viriones, las diferencias que ésta proteína tiene en los *Okavirus* se refleja en su arquitectura viral helicoidal (Figura 1) (Cowley, Cadogan et al. 2004; Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006).

El ORF3 codifica para un polipéptido de 1666 aminoácidos, con un peso molecular de 185.7 kDa y un pI de 6.68. El tamaño de la poliproteína del ORF3 de YHV, es similar a la de otros *Coronavirus* como el virus infeccioso de la bronquitis de 1160 aminoácidos (Binns, Bournnell et al. 1985), el virus infeccioso felino de la peritonitis de 1452 aminoácidos (de Groot, Maduro et al. 1987), el virus murino de la hepatitis de 1376 aminoácidos (Spaan, Cavanagh et al. 1988), el virus epidémico porcino de la diarrea de 1383 aminoácidos (Duarte and Laude 1994) y el *Coronavirus* respiratorio humano de 1353 aminoácidos (Mounir and Talbot 1993). Por ello, varios autores han propuesto que muchas de las características funcionales descritas ampliamente en los *Coronavirus* son válidas también para YHV y GAV (González, Gomez-Puertas et al. 2003; Jitrapakdee, Unajak et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008). En los *Nidovirales* que infectan a mamíferos, las glicoproteínas del virion tienen funciones asociadas al reconocimiento de la célula blanco, la fusión entre la membrana viral-celular y la liberación del virion de la célula infectada. Poco se sabe actualmente de la estructura o de la función de las glicoproteínas de los *Nidovirales* que infectan a invertebrados (Cowley, Dimmock et al. 2002; Jitrapakdee, Unajak et al. 2003); pero por comparación de secuencias, se ha demostrado que en el YHV, el polipéptido del ORF3 sufre una proteólisis postranscripcional y genera dos glicoproteínas: GP116 y

GP64 (Jitrapakdee, Unajak et al. 2003). En forma similar, en los *Coronavirus* y los *Torovirus*, el polipéptido de 180 kDa es hidrolizado por una proteasa celular generando dos proteínas, llamadas S1 y S2 (Sturman, Ricard et al. 1985; Cavanagh 1995; Snijder and Horzinek 1995), las cuales corresponden a las dos glicoproteínas, GP64 y GP116, del YHV ó GAV (Jitrapakdee, Unajak et al. 2003).

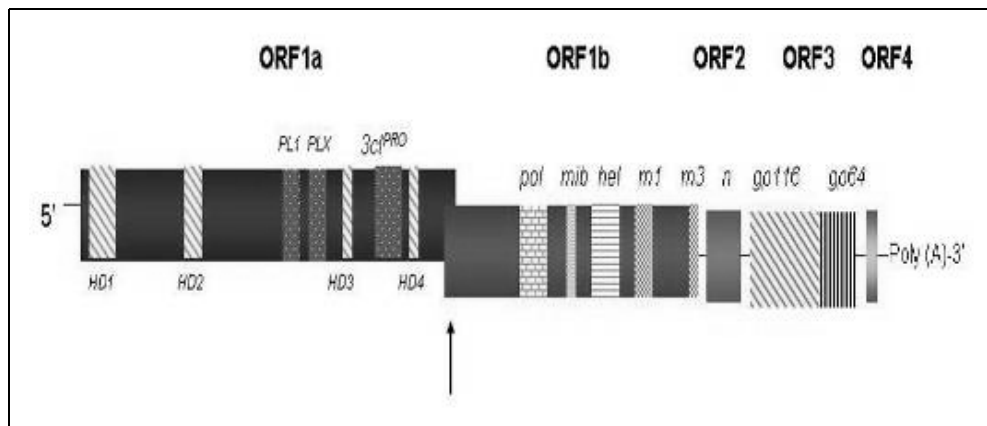


Figura 2. Organización genómica del YHV.

En la figura se muestra un esquema de la organización y ubicación de las regiones funcionales del genoma del YHV. Los recuadros con tono sólido representan secuencias que codifican regiones aparentemente no funcionales y/o de función desconocida. Los recuadros con tonos diversos representan los dominios funcionales. La flecha indica la zona de traslape o sitio del brinco ribosomal para el ajuste del marco de lectura entre el ORF1a y el ORF1b, el resto de marcos de lectura (ORFs) están separados por líneas. Los patrones de color similares indican función similar entre genes. **ORF1a:** Regiones hidrofóbicas (HD1 a HD4), proteasa similar a quimotripsina (3CL^{PRO}), proteasa similar a papaína (PLP1) y un dominio similar a PLP1 pero sin carga catiónica (+) (PLPX) (Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008). **ORF1b:** RNA polimerasa (pol), dominio unión a un ion metal (mib), helicasa (hel) motivo 1 y 3 (m1 y m3) (Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002). **ORF2:** nucleocápside (n) (Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006). **ORF3:** glicoproteína 116 (gp116) y glicoproteína 64 (gp64) (Jitrapakdee, Unajak et al. 2003). **ORF4:** fragmento no codificante.

Por su parte, el ORF4, localizado en el extremo 3'-terminal del genoma, no se transcribe en abundancia y posee varios codones de término, por lo que es posible que ésta región no sea traducida (Cowley, Dimmock et al. 2002) y por lo tanto, se ha propuesto que esta región, no es esencial para la replicación del virus (Jitrapakdee, Unajak et al. 2003).

Estos datos indican que a pesar de tener varias semejanzas en las regiones estructurales, organización genómica y mecanismos de replicación, los *Okavirus* poseen diferencias fundamentales a los *Nidovirales* que infectan a vertebrados. Incluso entre YHV y GAV, aparentemente muy cercanos, es posible observar diferencias en regiones importantes de su genoma.

SISTEMA INMUNE DEL CAMARÓN

El camarón, al igual que otros invertebrados, carece de un sistema inmune adaptativo caracterizado por la alta especificidad de efectores inducibles y por recordar contactos previos con el antígeno. Sin embargo, tienen un eficiente sistema aparentemente no inducible, con una especificidad limitada y una memoria de muy corto tiempo (Kurtz 2005).

La eficiencia del sistema de defensa del camarón se manifiesta por su prevalencia como especie hasta nuestros días y por haberse adaptado a ambientes exigentes, como son los sistemas de cultivos intensivos, donde la presencia de bacterias y virus se tornan más peligrosas debido a las altas densidades de organismos. La cutícula externa es la primera línea de defensa para prevenir efectos físicos y también una barrera química del ataque y penetración de patógenos. La vía digestiva es una ruta común para la invasión de patógenos, aún cuando es un ambiente hostil ya que los mismos ácidos y enzimas digestivos, también son capaces de inactivar y digerir muchos virus y bacterias. Si los patógenos logran romper éstas barreras y alcanzan el hemocele, se produce el encuentro con un

complejo sistema inmunitario compuesto por respuestas celulares y proteínas efectoras.

RESPUESTA CELULAR

En los invertebrados, la protección contra patógenos es llevada a cabo por las células sanguíneas o hemocitos (Söderhäll 1992; Vargas-Albores 1995; Tzou, De Gregorio et al. 2002; Cerenius and Soderhall 2004). Los crustáceos decápodos tienen tres tipos de hemocitos, clasificados principalmente por la presencia y tamaño de gránulos; hialinos, semigranulares y granulares (Johansson 1999).

Los hemocitos hialinos son pequeños, esféricos, no contienen gránulos y son capaces de fagocitar (Smith and Soderhall 1983; Söderhäll and Smith 1983). Los hemocitos semigranulares son las células más abundantes y muestran semejanza a los leucocitos polimorfonucleares de los vertebrados. Poseen un número variable de gránulos pequeños que contienen el sistema de activación de la profenoloxidasasa (proFO) y son también responsables de la encapsulación, aunque su actividad fagocítica es limitada (Smith and Soderhall 1983; Kobayashi, Johansson et al. 1990). Estos hemocitos también son los primeros en reaccionar a la presencia de partículas no propias, provocando la degranulación (Johansson and Söderhäll 1988), la liberación de enzimas y la activación de la peroxinectina, la cual es un factor de adhesión celular (Johansson, Lind et al. 1995).

Por otro lado, los hemocitos granulares, que constituyen el 20-30% de las células circulantes, contienen un gran número de gránulos grandes donde se almacena el sistema de activación de la proFO, las enzimas necesarias para

la melanización y otras enzimas de defensa (Johansson and Söderhäll 1996; Söderhäll, Cerenius et al. 1996; Söderhäll and Cerenius 1998). Estos hemocitos son responsables de la fagocitosis, la adhesión y el encapsulamiento, además de ser capaces de liberar sus gránulos por exocitosis controlada, cuando son activadas por moléculas exógenas, como lipopolisacáridos (LPS) ó β -1,3 glucanos.

RESPUESTA HUMORAL

La respuesta humoral del camarón está integrada por diversas proteínas que funcionan como moléculas de reconocimiento, antibacteriales o enzimas. La mayoría de estas sintetizadas por los hemocitos.

Las proteínas de reconocimiento han sido descritas como parte del sistema inmune innato en vertebrados e invertebrados y son capaces de reconocer moléculas de la superficie de microorganismos, conocidos como PAMPs ó patrones moleculares asociados a patógenos (O'Neill and Greene 1998; Anderson 2000; Iwanaga and Lee 2005). En el camarón se han descrito algunas de las proteínas que reconocen estos PAMPs y que son capaces de activar los diferentes tipos de respuestas inmunológicas. Por ejemplo, la proteína llamada BGBP por sus siglas en inglés (β -1,3-glucan binding protein) se encuentra en la hemolinfa y es capaz de reconocer a β -glucanos, con el cual forma un complejo BGBP- β -glucano. Cuando el complejo se fija al receptor, localizado en la membrana del hemocito (Barracco, Duvic et al. 1991), se estimula la degranulación, con la subsecuente

activación del sistema proFO (Vargas-Albores, Jiménez-Vega et al. 1997).

Otra proteína de reconocimiento es el receptor Toll, el cual es parte de la superfamilia de proteínas transmembranales que han sido identificadas en mamíferos y en muchos otros organismos. Estos receptores tipo Toll (TLRs) juegan un papel crucial en la respuesta inmune innata en todos los organismos en los que se han descrito (O'Neill and Greene 1998; Anderson 2000; Mekata, Kono et al. 2008) y han sido reconocidas como un vínculo importante entre la inmunidad innata y adquirida (Akira, Takeda et al. 2001; Goldstein 2004). En invertebrados los TLRs han sido analizados ampliamente y se ha demostrado que ellos son los responsables de la activación de las células inmunes, del reconocimiento de hongos y de bacterias Gram⁺ (Lemaitre, Nicolas et al. 1996; Rutschmann, Kilinc et al. 2002). La vía de señalización que desencadena Toll está mediada por el sistema NF- κ b, el cual regulan la expresión y transcripción de una gran variedad de genes involucrados en la respuesta inmune innata (Belvin and Anderson 1996; Lemaitre, Nicolas et al. 1996; Takeda, Kaisho et al. 2003; Liew, Xu et al. 2005).

Uno de los primeros elementos del sistema de defensa de los crustáceos son péptidos de bajo peso molecular, usualmente menores de 10 kDa, llamados péptidos antimicrobianos (PAM). Típicamente, son moléculas catiónicas, debido a su alto contenido de lisina y arginina, y gracias a su carácter anfipático, son estables en ambientes tanto acuosos como hidrófobos (Boman 1995; Nissen-Meyer and Nes 1997).

Posiblemente los PAM más estudiados en camarón son las peneidinas, las cuales muestran actividad contra hongos y bacterias Gram⁺ (Destoumieux, Bulet et al. 1997; Destoumieux, Muñoz et al. 2000) y se caracterizan por tener alto contenido de prolina en el extremo N-terminal, mientras que su extremo C-terminal contiene seis Cys, unidas por tres enlaces disulfuro. La segunda familia de PAM fue descrita inicialmente en el cangrejo *Carcinus maenas* (Relf, Chisholm et al. 1999), por lo que han sido llamadas crustinas. Estos PAM tienen un peso molecular de 11.5 kDa y presentan actividad específica contra bacterias Gram⁺ y han sido reportados recientemente en *L. vannamei* y *L. setiferus* (Bartlett, Cuthbertson et al. 2002; Vargas-Albores, Yepiz-Plascencia et al. 2004).

El sistema más eficiente de la respuesta inmune de invertebrados parece ser el sistema de activación de la proFO, en el cual participan proteínas de reconocimiento (PRP: Pattern-Recognition Proteins), varias enzimas hidrolíticas y la proFO (Cerenius and Soderhall 2004). La activación es iniciada cuando las proteínas de reconocimiento detectan y reaccionan con LPS, peptidoglucanos (PG) ó β -1,3 glucanos. Desde la primera descripción de la proFO en el langostino *P. leniusculus* (Aspan, Huang et al. 1995), muchas enzimas han sido reportadas en cerca de 20 diferentes especies de artrópodos (Cerenius and Soderhall 2004). En camarón, el sistema de activación de la proFO se encuentra compartamentalizado en los gránulos de los hemocitos y, cuando es liberado, la proFO es hidrolizada por una serine-proteasa, generando la enzima activa llamada fenoloxidasas (FO). La FO es la enzima responsable de oxidar fenoles a quinonas, iniciando la formación de la melanina. Dentro de la cascada de

activación de la proFO, también se generan proteínas relacionadas con la comunicación celular, la opsonización y la adherencia (Johansson and Söderhäll 1996; Söderhäll, Cerenius et al. 1996; Söderhäll and Cerenius 1998; Cerenius, Lee et al. 2008).

Aunque se han descrito un gran número de proteínas y factores inmunológicos en invertebrados, la gran mayoría de los estudios se han enfocado en los factores participantes en infecciones ocasionadas por bacterias y hongos, dejando un hueco en la identificación de factores inmunológicos antivirales. Debido a que los virus son los microorganismos que más afectan a la industria camaronícola, el estudio de factores inmunes involucrados en el reconocimiento y la eliminación de virus resulta ser de suma importancia.

ANTECEDENTES

Desde hace varios años, el YHV ha provocado serios problemas en granjas camaroneras del sur y sureste de Asia, por lo que se consideró que el patógeno estaba restringido a dichas regiones. Sin embargo, entre 1999 y 2002, el Laboratorio de Ecología Molecular de la UABC realizó un rastreo de WSSV, YHV y TVS en granjas de cultivo de *L. vannamei* y *L. stylirostris*, localizadas en el Pacífico Mexicano. Usando una prueba comercial (IQ2000™ YHV/GAV; GeneReach Biotechnology Corp), el YHV fue detectado en el 28% de las muestras analizadas; sin embargo no se encontraron animales con los síntomas típicos de la infección.

El kit de diagnóstico que se utilizó, amplifica una región del ORF1b de 273 nucleótidos, donde los genomas de YHV y de GAV son muy similares. Lo cual puso en duda la identificación del YHV, por lo que se recomendó el uso de metodologías más precisas que permitieran diferenciar ambos virus y, si fuera el caso, confirmar la identidad de la cepa de YHV aislada en granjas mexicanas (YHV-LvA). Para diferenciar al YHV del GAV, se propuso la comparación genómica de las regiones funcionales, principalmente las asociadas con la replicación y con las proteínas de la superficie, donde se han identificado importantes diferencias. Adicionalmente, se propuso determinar la cinética de replicación del YHV en *L. vannamei* con el fin de evaluar la patogenia del virus, midiendo su capacidad para controlar los procesos de la célula huésped.

REPLICACIÓN DEL YHV

Aunque existe un considerable avance en la caracterización del genoma del YHV, se tiene poca información sobre los mecanismos de replicación o sobre su cinética de expresión durante la infección. Recientemente, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas GP116, GP64 y la proteína de la nucleocápside, se realizó un monitoreo inmunohistoquímico en cinco especies de palemónidos (*Macrobrachium rosenbergii*, *M. lanchesteri*, *M. sintangense*, *Palaemon styliferus* y *P. serrifer*). En este estudio se observó que los camarones infectados en forma natural, no presentaron síntomas de la enfermedad y ninguna de las proteínas analizadas fue detectada. Sin embargo, cuando los animales fueron infectados experimentalmente, las proteínas fueron fácilmente detectadas en *P. serrifer*, *P. styliferus* y *M. sintangense*, (Longyant, Sithigorngul et al. 2005). Además, aunque *M. rosenbergii* y *M. lanchesteri* no presentaron síntomas de infección de YHV, se detectó la expresión de proteínas virales en las primeras horas post-infección y, posteriormente, fueron disminuyendo. Lo anterior sugiere una resistencia natural a la infección de YHV y/o la capacidad de eliminar de manera eficiente al virus (Longyant, Sithigorngul et al. 2005). Un comportamiento similar fue observado en *Metapenaeus affinis* y *M. brevicornis*, indicando que estas especies son capaces de eliminar gradualmente al YHV, gracias a un mecanismo aún desconocido (Longyant, Sattaman et al. 2006).

Por otro lado, utilizando RT-PCR para amplificar una región del ORF1b, donde se localizan los genes replicativos, fue posible detectar la expresión del YHV desde las 6 h post-infección (Kiatpathomchai, Jitrapakdee et al. 2004). Estos experimentos nos indican que el seguimiento de la expresión de algunas

proteínas y/o sus genes a lo largo de la infección, permite establecer la capacidad replicativa del virus y, en caso de observar una disminución, medir la resistencia natural del hospedero.

ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR PATÓGENOS VIRALES

Los estudios sobre el sistema inmune del camarón se han centrado principalmente en la caracterización y descripción de diversas proteínas que lo integran, como son: La aglutinina que reconoce y se une a LPS (Vargas-Albores, Guzmán-Murillo et al. 1993), la proteína que reconoce a β -glucanos (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia 2000), las peroxinectinas (Sritunyalucksana, Wongsuebsantati et al. 2001), proteínas implicadas en la coagulación como la CP (clotting protein) (Montaño-Pérez, Yepiz-Plascencia et al. 1999), la lisozima (Sotelo-Mundo, Islas-Osuna et al. 2003), la superóxido dismutasa (SOD) (Gómez-Anduro, Barillas-Mury et al. 2006), proteínas tipo Toll (Arts, Cornelissen et al. 2007; Yang, Yin et al. 2007; Mekata, Kono et al. 2008; Yang, Zhang et al. 2008), péptidos antimicrobianos entre los que destacan las peneidinas (Destoumieux, Muñoz et al. 2000), crustinas (Vargas-Albores, Yepiz-Plascencia et al. 2004) y recientemente serin-proteinasas junto con sus inhibidores (Jiménez-Vega, Yepiz-Plascencia et al. 2004; Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2005; Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2007).

En los últimos años, se ha descrito la capacidad de los camarones para responder a la presencia de diversos patógenos (virus y bacterias), mediante la expresión de genes de proteínas efectoras y reguladoras relacionadas con el sistema inmune. Por ejemplo: expresión de proFO (Chiu, Guu et al. 2007; Ai, Huang et al. 2008; Wang, Chang et al. 2008), BGBP (Roux, Pain et al. 2002;

Sritunyalucksana, Lee et al. 2002; Wang, Chang et al. 2008), SOD (Cedano-Thomas 2003; Gómez-Anduro, Barillas-Mury et al. 2006; Chiu, Guu et al. 2007; Zhang, Li et al. 2007), lisozima (Cedano-Thomas 2003; Sotelo-Mundo, Islas-Osuna et al. 2003; Somboonwiwat, Supungul et al. 2006; Burge, Madigan et al. 2007), Toll (Arts, Cornelissen et al. 2007; Mekata, Kono et al. 2008; Yang, Zhang et al. 2008), proteínas con dominios tipo WAP (Abe, Kobayashi et al. 1991; Jiménez-Vega, Yepiz-Plascencia et al. 2004; Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2007), ALF (Somboonwiwat, Marcos et al. 2005; Liu, Jiravanichpaisal et al. 2006; Pan, Chao et al. 2007; de la Vega, O'Leary et al. 2008), entre otras.

La mayoría de los estudios relacionados con la expresión de proteínas del camarón en respuesta a una infección viral se han realizado con el WSSV (Dhar, Roux et al. 2002; Rojtinnakorn, Hirono et al. 2002; Pan, He et al. 2005; Mohankumar and Ramasamy 2006; Wang, Li et al. 2006; Clavero-Salas, Sotelo-Mundo et al. 2007; Leu, Chang et al. 2007; Zhao, Yin et al. 2007). Por lo tanto, hay pocos estudios sobre la expresión de proteínas inducidas por infecciones con YHV y, los que existen han reportado proteínas relacionadas con el metabolismo energético (Rattanarojpong, Wang et al. 2007; Bourchookarn, Havanapan et al. 2008). A la fecha no existen reportes sólidos y suficientes que pongan en evidencia la capacidad del sistema inmune del camarón para identificar al YHV.

HIPÓTESIS

La secuenciación y análisis filogenético de regiones funcionales del virus permite confirmar la identidad del YHV-LvA.

Considerando que la replicación del YHV es similar a la de otros virus, la cinética de expresión y la capacidad replicativa del YHV puede ser evaluada por cuantificación de la expresión génica durante la infección experimental.

El YHV es reconocido por el sistema inmune del camarón provocando modificaciones en la expresión de proteínas relacionadas con el sistema inmune.

OBJETIVO GENERAL

Confirmar la identidad de la cepa YHV-LvA, determinar su cinética de expresión y evaluar la capacidad del sistema inmune del camarón para identificar y responder a la presencia de YHV.

OBJETIVOS PARTICULARES

Confirmar la identidad del YHV-LvA, por secuenciación y análisis filogenético de las regiones funcionales más importantes.

Establecer la capacidad replicativa del YHV-LvA y cinética de expresión, a través de la cuantificación en la expresión de las proteínas estructurales y de la replicación.

Determinar la capacidad del sistema inmune del camarón para responder a la presencia del virus, por evaluación cuantitativa de la expresión génica de inmuno proteínas en hemocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANÁLISIS GENÓMICO

CEPAS VIRALES

La “cepa americana” ó YHV-LvA, fue obtenida de camarones *L. vannamei* aparentemente sanos, cultivados en costas del Pacífico Mexicano (de la Rosa-Vélez, Cedano-Thomas et al. 2006), pero que usando los iniciadores 273-ORF1b para YHV (del kit IQ2000™), reportados por Tang (1999) dieron positivas para YHV. La “cepa asiática” nombrada YHV-PmA, fue aislada de camarones moribundos, *Penaeus monodon* provenientes de una epizootia de YHV en Tailandia en 1996 y mantenida activa a través de infecciones experimentales, en *Penaeus setiferus*. La cepa fue donada por el Laboratorio de Ecosistemas Lagunares, en la Universidad de Montpellier 2, Francia (Laboratory of Ecosystemes Lagunaires, Université Montpellier 2, France).

DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA GENES VIRALES

Para confirmar la identidad de las cepas, se diseñaron 11 pares de iniciadores basados en las secuencias del YHV y GAV reportadas en el GenBank. Estas regiones corresponden a genes asociados a la replicación viral como son: La proteasa 3C-like (3CL^{PRO}) (**AF227196**), la RNA polimerasa (POL), la helicasa (HEL), dos motivos estructurales,

el motivo 1 (M1) y el motivo 3 (M3) (**AY052786**), la nucleocápside (N) (**DQ067891**), las glicoproteínas GP116 y GP64 (**AF540644**) y el ORF4 (**AF227196**). También, se diseñaron iniciadores para amplificar la región localizada antes del gen de la RNA polimerasa, denominado "PEP1" (**AF148846**), la cual también es amplificada por los iniciadores 273-ORF1b del kit IQ2000™. Finalmente, para amplificar la región donde se encuentra el salto en el marco de lectura entre el ORF1a/1b, se utilizaron los iniciadores publicados por Sittidilokratna y colaboradores (2002).

OBTENCIÓN DE SECUENCIAS VIRALES

Para amplificar las secuencias virales, se utilizaron dos pleópodos de *L. vannamei* infectado con la cepa YHV-LvA y otros dos pleópodos de *P. setiferus* para obtener la cepa YHV-PmA. El RNA_{TOTAL} fue purificado con TRIzol (Gibco BRL) y el DNA complementario (cDNA) fue sintetizado utilizando la transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada uno de los genes virales, fueron amplificados por PCR en un termociclador iCycler™ (BioRad, Hercules, CA, USA) utilizando los iniciadores correspondientes para cada región (Tabla II).

Las reacciones de PCR contenían: Amortiguador 10X para PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.3), 10 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 µM de cada iniciador (sentido y anti-sentido), 1 U Taq DNA polimerasa (Go-Taq®) y 2 µl de cDNA, en un volumen final de 25 µl. La temperatura de alineación para cada par de iniciadores fue determinada por gradiente de temperatura, de 52 a 65°C (Tabla II). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Un ciclo de 94°C/5 min;

30 ciclos de 94°C/30 s, temperatura de alineamiento del iniciador/30 s, 72°C/1 min y un ciclo de extensión de 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml) y visualizados sobre luz UV. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit PCR Preps DNA Purification System (Promega) y enviados a secuenciar en ambas direcciones (sentido y antisentido) a SeqXcel Inc® (DNA Sequencing Services, San Diego, CA).

ANÁLISIS GENÓMICO Y FILOGENÉTICO

La veracidad de las secuencias fue analizada, haciendo una comparación de los cromatogramas (sentido y anti-sentido), con ayuda del programa Chromas Pro V 1.14. Posteriormente, usando el algoritmo megablast discontinuo, cada una de las secuencias fueron compradas con las secuencias depositadas en la base de datos nr/nt del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Las secuencias obtenidas con los iniciadores HEL1, HEL2 y HEL3-M1, se ensamblaron manualmente para obtener la secuencia continua de la helicasa, antes de hacer la comparación con la base de datos del NCBI.

Las secuencias de YHV-PmA, YHV-LvA y regiones homólogas reportadas en la base de datos NCBI de las diferentes cepas del YHV (Cholburi, Thailand y Chachoengsao), fueron alineadas utilizando el programa Clustal X (Thompson, Gibson et al. 1997). Las distancias genéticas se calcularon usando el método Jukes-Cantor (1969) y los árboles filogenéticos utilizando el método Neighbor-joining (Saitou and Nei 1987), para cada región con un re muestreo (bootstrap) de

1,000 repeticiones. Lo anterior con ayuda del programa MEGA 4.1 (Kumar, Tamura et al. 2004).

ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN VIRAL

PREPARACIÓN DEL INÓCULO VIRAL

Se prepararon dos tipos de inóculos YHV⁺ y YHV⁻. El YHV⁺ se realizó a partir de pleópodos de camarones congelados (*L. vannamei*), provenientes de granjas del Pacífico Mexicano (15-20 g) que fueron positivos al análisis con el kit IQ2000™ (de la Rosa-Vélez, Cedano-Thomas et al. 2006). El YHV⁻ se preparo utilizando pleópodos de *L. vannamei*; vivos y sanos. En ambos casos, se utilizaron 10 pleópodos, cada uno de diferentes camarones. Los pleópodos fueron homogenizados en 500 µl de solución salina (NaCl 2%) y centrifugados a 1,000 g por 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue recuperado, centrifugado a 16,000 g por 40 minutos y filtrado utilizando un poro de 0.2 µm. De este modo, se obtuvieron aproximadamente 100 µl para cada inóculo.

ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS VIRAL

Para determinar la dilución del inóculo que permitiera el 100% de sobrevivencia hasta las 96 h post-inoculación, se prepararon varias diluciones de los inóculos YHV⁺ y YHV⁻ (1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50) con solución salina (NaCl 2%). Posteriormente, 10 camarones, con peso promedio de 20 g, aparentemente sanos y YHV negativos fueron inoculados en el tercer segmento abdominal con 20 µl de cada dilución del inóculo (YHV⁺ y YHV⁻). Los síntomas típicos

de la infección y las mortalidades fueron monitoreados hasta las 125 horas.

BIOENSAYO

Se utilizaron 150 camarones *L. vannamei* de 18 a 20 g, de ambos sexos, los cuales fueron mantenidos a 26°C y alimentados *ad libitum* con una dieta comercial. Los animales fueron inoculados en el tercer segmento abdominal con 20 µl de la dilución viral adecuada. A diferentes tiempos post-inoculación (0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h) se tomaron muestras de pleópodos de 10 animales y el RNA_{TOTAL} fue aislado con Trizol para posteriormente sintetizar el cDNA utilizando transcriptasa reversa (SuperScript™ II, Invitrogen). Las muestras se mezclaron (pool) obteniendo una muestra por cada tiempo. Además las muestras de cinco organismos, de cada tiempo, fueron analizadas individualmente. Cada muestra fue analizada por triplicado.

SELECCIÓN DE TEJIDO

Ya que el YHV es capaz de infectar varios tejidos del camarón (hepatopáncreas, músculo, branquias, hemocitos, órgano linfoide, pleópodos, entre otros), fue necesario seleccionar el tejido más adecuado para hacer el seguimiento de la expresión sus genes. Esto se hizo infectando diez camarones *L. vannamei* juveniles (18-20 g) con la cepa YHV-LvA, se tomaron muestras de hemocitos, hepatopáncreas, músculo, branquias, intestino, y pleópodos a diferentes tiempos post-inoculación. El RNA_{TOTAL} de cada tejido fue aislado con TRizol (Gibco BRL) y el cDNA sintetizado con la transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen), siguiendo las

instrucciones del fabricante. El virus se detectó por PCR, utilizando los iniciadores específicos de las regiones PEP1 y GP116, siguiendo las condiciones de reacción específicas, las cuales están indicadas (Obtención de secuencias virales). Con el fin de obtener mayor sensibilidad, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y visualizados con la técnica de tinción con plata (Sanguinetti, Dias Neto et al. 1994).

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN VIRAL

Para evaluar la cinética de expresión se la cepa YHV-LvA se cuantifico por qPCR (PCR en tiempo real) cuatro genes virales: dos de expresión temprana (POL y 3CL^{PRO}) y dos de expresión tardía (GP116 y GP64) a lo largo de la infección (1.5 a las 96 h). Para lograrlo, se elaboraron curvas estándares para cada uno de los genes a evaluar, según el protocolo de Roche (2003) descrito a continuación.

CLONACIÓN

Para hacer las curvas estándar fue necesario clonar cada uno de los productos de PCR. Después de la amplificación por PCR, los productos fueron purificados utilizando el kit PCR Preps DNA Purification System (Promega) y clonados en el vector pCR2.1[®]-TOPO[®] con el que se transformaron las células competentes One Shot[®] Mach1[™]-T1R (TOPO TA Cloning[®], Invitrogen). Después de reproducir las células por incubación a 37°C, durante 48 horas, el plásmido fue purificado utilizando el kit SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega). La concentración del DNA plasmídico fue determinada a 260 nm y la calidad estimada por la relación 260nm/280nm, utilizando un

espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer). Para confirmar la identidad, de los genes clonados, los insertos fueron enviados a secuenciar en ambas direcciones a la compañía Millegen® (Biotechnologies, Labège, France).

CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

La curva estándar de cada uno de los genes (3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64) fue realizada diluyendo el DNA plasmídico, con esperma de salmón (10 mg/ml, Invitrogen). El DNA plasmídico de cada clon fue amplificando por qPCR utilizando los iniciadores específicos de cada gen (Tabla II) bajo las siguientes condiciones. Cada reacción de qPCR contenía: 2 µl de Master Mix SYBR Green (Qiagen), 0.5 µl de cada par de iniciadores (3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64) y 1 µl de cDNA ó DNA (0.5 µg/µl).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Lightcycler® (Roche Molecular Biomedicals), utilizando el siguiente protocolo: Un ciclo de desnaturalización (95°C/10 min), 40 ciclos de amplificación (95°C/15s, 55°C/20s para 3CL^{PRO}, POL y GP64 ó 68°C/20s para GP116) y un ciclo de elongación (72°C/20s), la fluorescencia fue medida al final de cada paso de elongación. El análisis de la curva de fusión fue realizado de 65°C a 95°C, incrementando 0.5°C/s. El número de transcritos/µl se calculó con la siguiente ecuación (Roche 2003):

$$\text{Gen (copias/}\mu\text{l)} = \frac{6 \times 10^{23} (\text{copias/mol}) \times \text{concentración del plásmido (g/}\mu\text{l)}}{\text{PM del fragmento (g/mol)}}$$

Finalmente, la tasa de replicación (copias/h) se obtuvo al calcular la pendiente obtenida entre las 24 y 72 h, de cinco organismos, los cuales fueron analizados por triplicado. Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar.

ANÁLISIS DE LA ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA RESPUESTA INMUNE

Para evaluar el efecto del YHV en la respuesta inmune, se usó la hemolinfa (500-800 μl), de los mismos organismos empleados para la cuantificación viral (inyectados con el inóculo YHV⁺), en cada uno de los diferentes tiempos (0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h). La hemolinfa fue extraída utilizando solución salina para camarón (SSS: 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES y 10 mM EDTA pH 7.3) (Vargas-Albores, Guzmán-Murillo et al. 1993). Simultáneamente y en los mismos tiempos post-inoculación, se extrajo la hemolinfa de 10 camarones control, los cuales habían sido inoculados con un homogenizado de pleópodos de camarones sanos. Los hemocitos fueron recuperados por centrifugación a 800 g por 15 min, el RNA_{TOTAL} purificado utilizando TRIzol (Gibco BRL) y el cDNA sintetizado con la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen).

MACROARREGLOS

Es una técnica de arreglos moleculares utilizada para analizar la expresión de una gran cantidad de genes simultáneamente. Para

poder realizar esta técnica es necesario contar con una genoteca de camarón. El laboratorio de Biotecnología Marina del CIAD cuenta con una genoteca de cDNAs provenientes de camarones infectados con el virus WSSV, de la cual se tomaron 150 diferentes clonas (Tabla ITabla I. Arreglo molecular de los genes analizados por Macroarreglos).

PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS

Se tomaron 10 μ l de cada clona y se crecieron en 5 ml de medio de cultivo LB a 37°C, durante toda la noche con agitación constante (200 rpm). El paquete celular fue recuperado por centrifugación a 14,000 g por 1 min a 4°C, 10 μ l del sobrenadante fueron re-suspendidos en 95 μ l de agua con DEPC (Dietilpirocarbonato), posteriormente fueron calentados a 95°C durante 10 min para lisar las células. Finalmente se tomo 1 μ l del lisado como templado para la amplificación de los insertos por PCR, usando los iniciadores genéricos T3 y T7 del vector (PCR®2.1-TOPO®). Cada uno de los productos de PCR fue calentado a 100°C por 5 min y se colocó en hielo; después se mezcló con un volumen igual de SSC 20x (Citrato de sodio 0.15 M, NaCl 1.5 M, pH 7.0).

Por otro lado, se prepararon 5 membranas de nylon cargadas positivamente (Hibond™-N⁺, Amersham Biociences) hidratándolas en una solución SSC 10x (de igual composición que la solución SSC 20x) y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente. Las membranas fueron cuadrículadas (1mm x 1mm), para marcar el área donde se colocó 1 μ l (por triplicado) de cada producto de PCR mezclado con SSC 20x (mencionado en el párrafo anterior). Al terminar de aplicar todas las muestras, las membranas se colocaron sobre un papel filtro humedecido con solución desnaturizante (NaCl

1.5M, NaOH 0.5M) durante 5 min. Se continuó neutralizando el pH colocando las membranas sobre un papel filtro humedecido con solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M pH 8.0). Finalmente, se fijó el DNA por exposición a 120,000 micro-Joules de luz UV por 2 min, en un crosslinker (GS-gen Biorad)

Tabla I. Arreglo molecular de los genes analizados por Macroarreglos

La tabla muestra los 5 grupos de genes que se analizaron con los macroarreglos (Ribosomales, Estructurales, Sistema Inmune, Enzima y Desconocidos). Cada gen se fijo en la membrana por duplicado en el orden que se muestra en la tabla.

RIBOSOMALES		ESTRUCTURALES		SISTEMA INMUNE		ENZIMAS		DESCONOCIDOS	
#Clon	Gen	#Clon	Gen	#Clon	Gen	#Clon	Gen	#Clon	Gen
gi007	S8	gi014	Thymosin	gi017	Cytochrome C oxidase polype	gi04	SLP1	g039	Desconocido
gi022	L3	gi040	Annexin (atan calcio)	gi020	Thioredoxin peroxidase	gi057	Mak3p	g064	Desconocido
gi042	S5	gi051	Keratin associated	gi036	Cytochrome C oxidase subunit	gi096	Proteinase inhibitor Kazal	g066	Desconocido
gi050	L13	gi055	Synaptotagamin	gi041	Glycogen debranching enzym	giV114	KI-67	gi117	Desconocido
gi053	S24	gi145	Fibrosin	gi047	fumarate hydrolase	giV127	Peneidin	gi144	Desconocido
gi075	S9	gi148	Microtubule	gi095	ATPase and permease dom	gi128	Farnesyl pyrophosphate synt	gi146	Desconocido
gi081	H3	gi188	Actin	gi143	Esterase; Hormona juvenil	gi131	Chelonianin	gi175	Desconocido
gi103	L44	gi246	Tropomyosin	gi159	Acyl carrier prot	gi137	WAP	gi191	Desconocido
gi109	L10	gi253	Actin-related protein2/3	giV171	Putative Salivary Cys-Rich Secreted	giV154	Peneidina 2	g287	Desconocido
gi170	L17	gi442	Tubulin alpha-1	gi214	ATP synthase	gi158	proPO AF	g297	Desconocido
gi172	L23	gi656	Profilin	gi216	Adenylate kinase	gi174	proPO	g331	Desconocido
gi221	L22	giV790	Flightless	gi225	Acetylsterase	gi240	Anti LPS	g339	EST
gi233	L31	giV115	Transcription initiation Factor TFIID	gi249	Peptidyl-prolyl isomerase	gi282	Proteinase inhibitor	g343	EST
gi242	L39	gi268	Balbani ring prot	gi260	NADH dehydrogenase 1 beta	gi313	Programmed cell death 10	gi349	EST
gi257	L15	gi328	Riken	gi280	NADH dehydrogenase Fe-S	gi337	Dorsal switch prot	gi405	Desconocido
gi262	S14	gi264	Mitochondrial processing	gi293	Aldolasa	gi356	ProPO activating fact	gi413	EST vannamei
gi263	L35	gi300	Histone H1	gi315	F1F0-type ATP synthase	gi430	Heat Shock	gi418	EST vannamei
gi333	L5	gi403	Histone-binding	gi318	Tyrosine phosphatase	gi433	disulfide isomerase	gi439	Desconocido
gi375	S12	gi452	Ribonucleoprotein	gi341	GTP binding proteincdc42	gi448	Proteinase inhibitor Kazal	gi441	Desconocido
gi379	L8	gi485	RNA-binding prot	gi371	glucuronyltransferase	gi567	IgF	gi443	EST vannamei
gi421	L18	gi604	Mito	gi373	SHC (Src homology 2 domain)	gi469	Lamining binding protein	gi447	EST vannamei
gi426	S3	gi060	Transforming growth factor b	giV389	ATP Synthase	gi582	Crustin	gi462	EST vannamei
gi453	S26	gi122	No ident/factor elong	gi440	helicase p72 (DEAD-box)	gi598	Proteinase inhibitor	gi491	Desconocido
gi461	L7a	gi182	Trans factor E2-alpha	gi446	Tgasa	gi689	Ubiquitin	gi511	Desconocido
gi504	L19	gi219	Arginine rich prot	gi539	NADH Dehyd Quinona	giV810	IgF	gi525	Desconocido
gi563	L27	gi251	Elongation factor 1 alpha	gi570	G3P dehydrogenase	A	Lisozima	gi569	Desconocido
gi586	L11	gi312	Translation factor	giV944	Cytochrome C oxidase Sub II	B	Serpin	gi603	Desconocido
		gi364	Similar to sex lethal	giV915	Cytochrome oxidase III	C	Catepsina	gi722	Desconocido
		gi438	Eukaryotic translation initiation			D	STAT	gi727	Desconocido
		gi468	WD40 protein Gao 1			E	Inhibidor K-B Kinasa		
		gi526	ADF/cofilin			G	Relish Homologous Domain		

PREPARACIÓN DE LAS SONDAS

Las sondas se hicieron incorporando digoxigenina-dUTP (Dig-dUTP) durante la síntesis del cDNA. Para esto previamente se preparó la mezcla de nucleótidos que contenía: 14 μl de Dig-dUTP, 1 μl de dATP (100 mM), 1 μl de dCTP(100 mM), 1 μl de dGTP(100 mM), 0.25 μl de dTTP (100 mM) y 2.75 μl de agua para un volumen final de 20 μl . La reacción para realizar la síntesis del cDNA contenía: 1 μl de la mezcla de nucleótidos anterior, 1 μl de oligo-dT (50 μM), 5 μg de RNA_{TOTAL}, esta mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se enfrió en hielo; a continuación se adicionaron 2 μl del amortiguador RT 10X, 2 μl de MgCl₂ 50 mM, 2 μl de DTT 0.1 M y 1 μl de transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). La sonda se incubó a 42°C por 50 min y finalmente se pasó a hielo para detener la reacción.

Siguiendo este protocolo se sintetizaron cinco diferentes sondas utilizando el RNA_{TOTAL} de los hemocitos colectados durante el bioensayo antes descrito. La sonda 1 fue sintetizada a partir de camarones sin inocular, las sondas 2 y 3 fueron sintetizadas de camarones inoculados con el homogenizado YHV⁻ (previamente descrito) muestreados antes y después de las 12 h; las sondas 4 y 5 fueron sintetizadas de camarones inoculados con el homogenizado YHV⁺ muestreados antes y después de las 12 h y.

HIBRIDACIÓN

Para realizar la hibridación de las membranas con las sondas, es necesario ajustar la dilución más adecuada para la hibridación.

Probando diferentes concentraciones se determinó que la dilución 1:100 era la más apropiada.

Antes de diluir, las sondas fueron desnaturalizadas a 100°C por 5 min y después se pasaron a hielo por 1 min. Por otro lado, las membranas se pre-hibridaron colocándolas en bolsas de poliestireno, con una solución de hibridación [SSC 5X, N-Lauril sarcosil al 0.1%, SDS al 0.02%, reactivo de bloqueo al 1% (Blocking Reagent Cat. No. 1096176; disuelto a 65°C en ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M en pH 7.5)], por 1 h a 65°C, con agitación constante. Se prepararon 3 ml de una dilución 1:100 de cada sonda, con solución de hibridación, y se colocaron dentro de la bolsa que contenía la membrana pre-hibridada. Esto debe hacerse evitando la formación de burbujas. Finalmente, las membranas se incubaron con cada una de las cinco diferentes sondas durante 16 h a 65°C y manteniendo agitación constantemente.

Una vez finalizada la hibridación, las membranas se lavaron dos veces por 5 min con SSC 2X- 0.1% SDS, a temperatura ambiente; seguido de dos lavados de 15 min con SSC 2X- 0.1% SDS a 65°C. Después se colocaron 5 min en amortiguador de lavado (ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0.3% en pH 7.5) y 30 min en solución de bloqueo 1X (reactivo de bloqueo al 1% en amortiguador de ácido málico a 65°C). Posteriormente, las membranas se incubaron 30 min con Anti-Dig (anti-digoxigenina-AP conjugado) diluido 1:10,000 (en solución de bloqueo al 1%) y se lavaron dos veces por 15 min en 10 ml de amortiguador de lavado. Finalmente, se equilibraron con 10 ml del amortiguador de detección (Tris base 0.1 M, NaOH 0.1 M y pH 9.5).

DETECCIÓN

Para la detección, después de la hibridación, las membranas fueron colocadas en una bolsa nueva con amortiguador de detección y retirando el exceso. Siete gotas del reactivo sustrato CDP-Star son agregados y la bolsa fue sellada. Después de 5 min la membrana se puso en contacto con la película (Lumi-film chemiluminescent detection film), durante aproximadamente 40 min. La película fue revelada siguiendo las instrucciones y reactivos de Kodak y, posteriormente las imágenes fueron capturadas con un fotodocumentador y analizadas con el programa de análisis de imagen, ID Imagen Analysis (Kodak, Rochester, NY).

EXPRESIÓN DIFERENCIAL

DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA GENES DEL CAMARÓN

Para determinar el efecto del YHV-LvA sobre la respuesta inmune del camarón, se analizó la expresión de varios genes a diferentes tiempos después de la inoculación. Para esto, se diseñaron iniciadores específicos de los siguientes genes: SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor; **EF467169**) (Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2007), SLPI2, HSP 60, crustina (**AY488496**) (Vargas-Albores, Yepiz-Plascencia et al. 2004), peneidina, SIBD (Single IB domain) (Castellanos, Jiménez-Vega et al. 2008), citocromo C oxidasa sub II y III (COII y COIII), Toll (DQ923424), lisozima (**AY170126**), SOD (**AY278201**) (Cedano-Thomas 2003), Kazal (Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2005), I κ B, SWD (**AY464465**) (Jiménez-Vega, Yepiz-Plascencia et al. 2004), proFO y ALF (Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2007).

REACCIONES DE PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como templado los cDNAs sintetizados a partir del RNA_{TOTAL} de hemocitos de camarones infectados y controles (YHV⁻ y YHV⁺), colectados a diferentes tiempos (0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación). La reacción de PCR contenía: amortiguador para PCR 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.3), 10 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 μ M de cada iniciador (sentido y anti-sentido), 1 U Taq DNA polimerasa (Go-Taq®) y 2 μ l de cDNA; el volumen final de la reacción fue de 15 μ l. La temperatura óptima de alineación para cada par de iniciadores, fue determinada por gradientes de temperatura de 50 a 60°C. El programa que se utilizó para la amplificación por PCR fue la siguiente: 1 ciclo de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 40 s, 52-60°C (Tabla IV) por 40 s, 72°C por 1 min y un ciclo final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/ml) y visualizados sobre luz UV.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN

La expresión fue evaluada midiendo la intensidad de las bandas (píxeles) de los geles de agarosa con ayuda del programa ID Imagen Analysis (Kodak, Rochester, NY). Como control de la expresión se utilizó el gen de actina, tanto en los organismos control (YHV⁻), como los inoculados con el YHV⁺. Posteriormente, se calculó el índice de expresión (IE) utilizando la intensidad de las bandas, según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{banda control}}{\text{banda infectados}}$$

$$IE = \frac{\text{banda control de actina/banda infectados de}}{\text{actina}}$$

Se estableció un rango de ± 0.2 (20%) IE como margen de error por la técnica, por lo que, un valor ≥ 1.2 IE fue considerado como aumento de la expresión, mientras que un valor ≤ 0.8 IE como un gen que es suprimido por efecto de la infección con YHV-LvA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El YHV es el segundo patógeno más agresivo para la industria camaronera, siendo *P. monodon* la especie más afectada aunque se han reportado diferentes grados de susceptibilidad de otras especies de camarones. También se han reportado diferentes grados de patogenicidad entre varios aislados geográficos del YHV, lo cual, abrió la interrogante sobre la identidad de la cepa YHV-LvA encontrada en granjas camaroneras mexicanas, su capacidad replicativa y la capacidad del sistema inmune del camarón para reconocer al YHV.

ANÁLISIS GENÓMICO

Gracias a la precisión de las herramientas moleculares, fue posible determinar la identidad del virus (YHV-LvA), su similitud y cercanía filogénica con otros relacionados; comparando la secuencia de su genoma, con la de otros virus.

CEPAS VIRALES

Para confirmar la identidad de la cepa YHV-LvA, fueron analizadas varias regiones del genoma viral, seleccionadas por su relevancia en el mecanismo de replicación, participación en el proceso de infección y similitud con otros virus cercanos filogenéticamente (de Vries, Horzinek et al. 1997; Cowley, Dimmock et al. 2000; Cowley, Dimmock et al. 2002; González, Gomez-Puertas et al. 2003; Jitrapakdee, Unajak et al. 2003; Ziebuhr, Bayer et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006).

Las secuencias utilizadas como referencia, en este estudio fueron de las cepas de YHV llamadas Thailand, Cholburi y Chachoengsao. La cepa Thailand (**AF148846**), fue obtenida de cultivos de *P. monodon* en Tailandia en 1993 y mantenida activa en la Universidad de Arizona por infecciones experimentales en *L. vannamei* (Tang and Lightner 1999), sin embargo, de esta cepa únicamente se han reportado 1160 nucleótidos (región correspondiente a la PEP1, de la cepas YHV-LvA y YHV-PmA). La cepa Cholburi (**EF156405**, **EF156404**), fue aislada de *P. monodon* y reportada en la base de datos NCBI en 2007, de esta cepa únicamente se reporto el ORF2 (correspondiente a la proteína de la nucleocápside) y el ORF3 (el cual codifica para las proteínas GP116 y GP64). Por otro lado, la cepa Chachoengsao (**EU487200**) fue aislada de *P. monodon* colectados de granjas Tailandesas en 1996, actualmente esta es la única cepa de la cual se ha reportado su genoma completo (Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008).

En este análisis también se incluyeron las secuencias de GAV (**AF227196**), del *Coronavirus SARS (Severe acute respiratory síndrome)* (**DQ898174** y **AY502924**) y de TGV (*Transmissible gastroenteritis virus*) (**AY335549**, **DQ201447** y **Y00560**). Estos últimos son virus que han sido clasificados como *Nidovirales*, los cuales se incluyeron como grupos externos para el análisis filogénico, excepto para las regiones correspondiente a PEP1 y GP64, ya que dichas secuencias no poseen homología con otras regiones de virus *Nidovirales*.

DISEÑO DE INICIADORES

En este estudio se diseñaron iniciadores específicos para diferentes regiones genómicas las cuales son: 3CL^{PRO}, ORF1a/1b, PEP1, POL, HEL,

M1, N, GP116, GP64 y ORF4. En la Tabla II se muestran las características de cada par de iniciadores, así como su temperatura de alineamiento, tamaño del producto esperado y región genómica que amplifican según la cepa Chachoengsao (**EU487200**).

Tabla II. Iniciadores específicos para diferentes regiones el genoma del YHV.

La tabla muestra los iniciadores utilizados para la amplificación por PCR y por PCR en tiempo real. Para su posterior secuenciación y análisis de la expresión viral. La localización genómica de cada fragmento fue obtenida de la secuencia EU987200 y se indica en la tabla.

ORF	Proteína codificada	Nombre	Secuencia	Ta (°C)	Tamaño (pb)	Ubicación Genómica
1a	Proteasa 3CL ^{PRO}	3CL-F ^{RT} 3CL-R ^{RT}	5'-TGCTCTCGGTTACACGCAGACC-3' 5'-AGGTCAGCAATACGGATCTGTG-3'	58	1109	8321-8342 9466-9445
1a/1b	Poliproteína Replicativa (Frag)	ORF1a/1b-F* ORF1a/1b-R*	5'-TGCTTTGACCGTGTGACGTCGATGAAGAC-3' 5'-TGACGGTCTTCGTGTAGTTTGTGTATGCGACTGG-3'	56	1600	11985-12014 13605-13571
1b	Peptido1	PEP1-F PEP1-R	5'-CGTATTGCATCGAACGCTCACTG-3' 5'-CAAGATCACTAATAACGCCTGATGC-3'	56	964	12945-12966 13829-13805
	Polimerasa	POL-F ^{RT} POL-R ^{RT}	5'-GCATCGGCATCACTAACTCCC-3' 5'-CAATGGAAGAGAAGACTCGCTCG-3'	56	978	14004-14025 14981-14959
	Helicasa-M1	HEL1-F HEL1-R	5'-CTCCTTAGTTTCATTGCTGCTCG-3' 5'-ATGTGTGGACAGTGTAGATGGGG-3'	56	1162	16253-16275 17414-17392
		HEL2-F HEL2-R	5'-CATCTTCGCTACTCTCCAGTCAACC-3' 5'-TTTTACCACCTTACCGCCCCAG-3'	56	1065	16894-16918 17958-17935
HEL3-F HEL3-R		5'-ATGTAGCCGTCAGTCGTTCCG-3' 5'-GAATGCTTGGATGATACCGTCCG-3'	56	1064	17493-17514 18556-18535	
2	Nucleocápside	N-F N-R	5'-AACGAAGTGACTATGCGCCTTCCA-3' 5'-ATGATATGCGAGCCTGGTGCAGAA-3'	57	1030	20266-20289 21316-21293
3	Glicoproteína 116	GP116-F ^{RT} GP116-R ^{RT}	5'-GCCCATGATAGACATAAGCTCACAC-3' 5'-ACATCATGTTGTAACGGCAATCG-3'	66	1078	21549-21573 22629-22607
	Glicoproteína 64	GP64-F ^{RT} GP64-R ^{RT}	5'-CAGGTGCCGTTTGGATTCTG-3' 5'-CGTCGCATTGTGTATAACTGG-3'	56	924	24847-24867 25770-25749
4	No funcional	ORF4-F ORF4-R	5'-ACACAGGCACTACCGTTTCTC-3' 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	42	338	26347-26365

^{RT} Iniciadores usados para la cuantificación por PCR en tiempo real.

* Iniciadores obtenidos de Sittidilokratnaet *et al.*, 2002.

Ta: Temperatura de alineamiento.

OBTENCIÓN DE SECUENCIAS VIRALES

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados varias veces hasta obtener las secuencias completas y libres de errores. Los cromatogramas, conteniendo los picos de absorbancia de cada

nucleótido, se analizaron y las secuencias sentido y anti-sentido se alinearon para obtener las secuencias consenso. Las secuencias fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso **DQ978355-DQ978363** correspondientes a la cepa YHV-LvA y **EU977577-EU977584** de la cepa YHV-PmA. Las secuencias consenso fueron alineadas con las secuencias de las regiones homologas de las otras cepas virales por CLUSTAL. La distancia genética fue determinada por el método Jukes-Cantor (1969) y los árboles filogénicos, fueron construidos por el método de Neighbor-joining (Saitou and Nei 1987).

ANÁLISIS GENÓMICOS Y FILOGÉNICOS

Con este análisis, se encontró que las secuencias de los genes GP116, N, POL, 3CL^{PRO} y ORF4 de las cepas YHV-LvA y YHV-PmA poseen una alta similitud entre ellas. La diferencias que se encontraron entre los genes fueron de GP64 (0.1%), ORF1ab (0.43%) y HEL-M1 (0.04%), lo que corresponde al 99.93% de similitud entre ambas cepas, sugiriendo que podrían tener el mismo origen geográfico y que son más cercanas entre ellas, que respecto a las cepas YHV-Cholburi y YHV-Chachoengsao con las cuales muestran una similitud del 99% y 98%, respectivamente. Las regiones secuenciadas de las cepas YHV-LvA y YHV-PmA, representan el 36.61% del genoma completo del YHV (Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002; Jitrapakdee, Unajak et al. 2003; Sittidilokratna, Phetchampai et al. 2006; Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008) y alrededor del 70% de las regiones funcionales, lo cual incluye los genes necesarios para la replicación y para la interacción con el hospedero. Por otro lado, la similitud promedio entre las secuencias de YHV-LvA con respecto al GAV fue del 82%.

Las distancias filogénicas, obtenidas al realizar la comparación, de la cepa YHV-LvA con Chachoengsao y Cholburi fue muy baja (0.01671-0.0085, respectivamente), mientras que para GAV, la distancia promedio fue mayor (0.02387), como se observa en la Tabla III. Para la cepa “Thailand”, la distancia filogénica fue de cero, con respecto a la cepa YHV-LvA. Lo que nos indica que ambas regiones genómicas (PEP1) son idénticas y que posiblemente las cepas YHV-LvA y Thailand tengan el mismo origen. Sin embargo, esto último es difícil de confirmar, ya que es necesario analizar más regiones genómicas de la cepa Thailand, de la cual únicamente se ha reportado la región correspondiente a PEP1.

Tabla III. Distancia genética de las regiones del YHV-LvA

Las regiones secuenciadas del YHV-LvA fueron comparadas con cuatro diferentes cepas del YHV (PmA, Thailand, Chachoengsao y Cholburi), una cepa del GAV y dos *Coronavirus*. El análisis se realizó por el método Jukes-Cantor, usando el programa MEGA 4.1 (Kumar, Tamura et al. 2004).

Región Genómica	YHV PmA	YHV Thailand	YHV Chachoengsao	YHV Cholburi	GAV	Coronavirus
3CL ^{PRO}	0	ND	0.0231	ND	0.2242	1.0273
ORF1a/1b	0	ND	0.0244	ND	0.2117	1.1079
PEP1	0	0	0.0179	ND	0.2352	ND
POL	0	ND	0.0149	ND	0.1523	0.9304
HEL-M1	0	ND	0.0208	ND	0.1999	0.9778
N	0	ND	0.0150	0.0075	0.2232	1.0573
GP116	0	ND	0.0198	0.0111	0.4908	1.1350
GP64	0	ND	0.0104	0.0069	0.2614	ND
ORF4	0	ND	0.0041	ND	0.1501	ND

ND: Secuencias genómicas no disponibles.

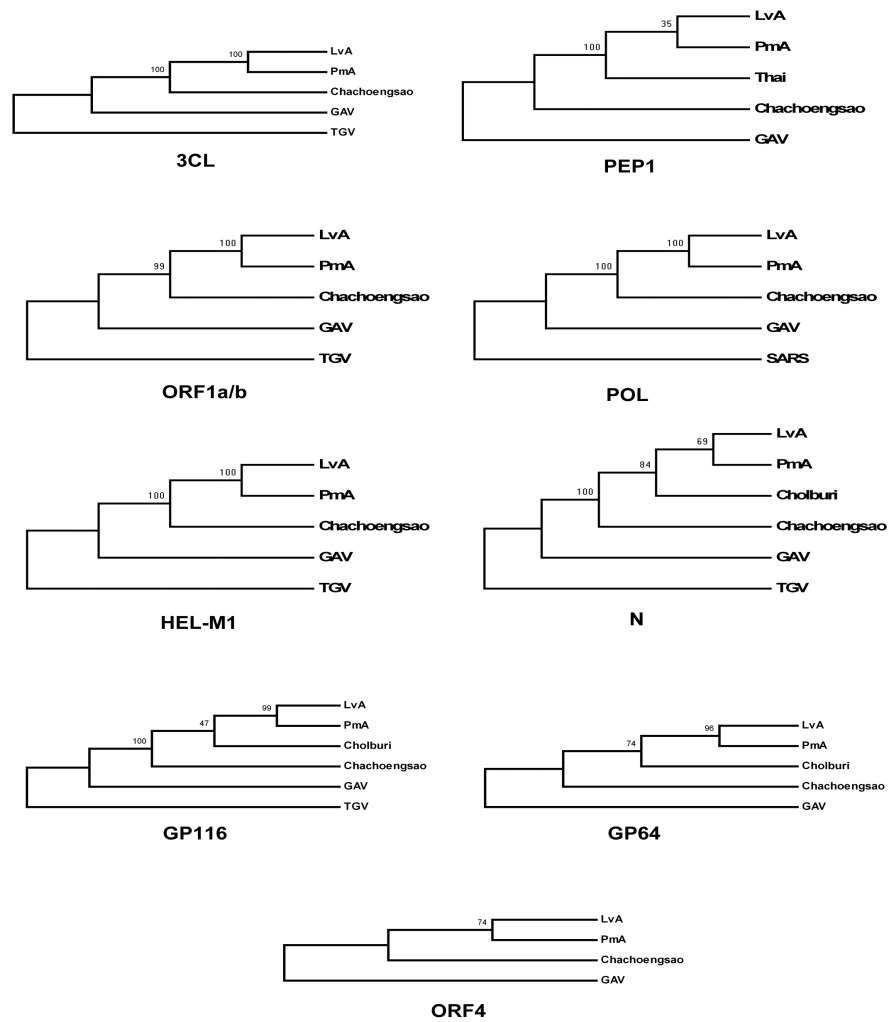


Figura 3. Análisis filogenético de las secuencias genómicas del YHV-LvA.

La figura muestra los árboles filogenéticos construidos para cada uno de los genes analizados utilizando el método neighbor-joining. Para realizar este análisis, se compararon tres cepas del YHV (Thailand, Cholburi y Chachoengsao) y una de GAV, además se utilizaron las secuencias equivalentes de dos Coronavirus como grupo externo. Lv A, cepa de *Litopenaeus vannamei* Americano; PmA, cepa de *Penaeus monodon* Americano; TGV (*Transmissible gastroenteritis virus*).

Al realizar la comparación de las distancias filogénicas entre la cepa YHV-LvA y la cepa Chachoengsao, que es única completamente secuenciada se encontró que las secuencias que codifican para proteínas implicadas en la replicación (3CLpro, ORF1a/1b y HEL-M1) poseen una mayor distancia genética, que las codificantes para las proteínas estructurales (N, GP116 y GP64). Por otro lado, tomando en cuenta las secuencias N, GP116 y GP64, se aprecia menor distancia entre YHV-LvA y la cepa Cholburi, que entre YHV-LvA y Chachoengsao. Esto podría explicar las diferencias en patogenicidad, ya que la cepa Chachoengsao ha sido reportada con un alto grado de virulencia, en granjas Tailandesas (Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002) mientras que para la cepa Cholburi no se han reportado epizootias. Esto último se observa más claramente en los dendogramas de los genes que codifican para la GP64 y la proteína de la nucleocápside, N (Figura 3).

En general, los *Ronivirus* (YHV y GAV) poseen glicoproteínas con funciones muy similares a las descritas en otros *Nidovirales* (Cowley, Dimmock et al. 2002; Cowley and Walker 2002; Jitrapakdee, Unajak et al. 2003), como es el reconocimiento específico de sus células hospederas y la fusión del virus con la membrana celular (de Vries, Horzinek et al. 1997; González, Gomez-Puertas et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006). Además, por estar expuestas, las glicoproteínas de la envoltura (GP64 y GP116) también tiene un papel central en la inducción de la respuesta inmune del hospedero (Spaan, Cavanagh et al. 1988) y, cuando los *Nidovirales* infectan a vertebrados, las glicoproteínas superficiales son fundamentales para determinar la virulencia (Phillips, Chua et al. 1999; Almazan, González et al. 2000).

Por otro lado, una cepa de YHV con baja patogenicidad ha sido aislada a partir de *L. vannamei* cultivados en la provincia de Ratchaburi (Tailandia) y muestra una pérdida en el ORF3, equivalente a 54 aminoácidos en la región N-terminal, que se encuentran presentes en la cepa YHV-Chachoengsao. La pérdida incluye seis residuos de cisteínas y dos sitios con N-glicosilación, lo cual podría estar reduciendo la capacidad del virus para el reconocimiento y complementariedad con los receptores de la célula hospedera (Sittidilokratna, Chotwiwatthanakun et al. 2009). En este estudio se encontró una mayor distancia filogénica, en la secuencia que codifica para la proteína GP116, entre las tres cepas del YHV (-LvA-PmA-Chachoengsao) con respecto a GAV, así como una pérdida de 15 aa en el extremo N-terminal de la GP116. Por lo cual, es posible que las modificaciones en el extremo N-terminal de la GP116, estén directamente relacionadas con las diferencias en la patogenicidad que existen entre las cepas de YHV y GAV (Cowley, Dimmock et al. 1999).

De éste modo, al secuenciar el genoma viral y realizar el análisis genómico, se logró confirmar la identidad de la cepa del virus aislado en granjas del Pacífico Mexicano, ya que se observó una alta similitud de la cepa YHV-LvA con las otras cepas del YHV.

REPLICACIÓN VIRAL

Dosis VIRAL

Para realizar el análisis de la capacidad replicativa del YHV-LvA, su cinética de expresión y la respuesta inmune de camarones inoculados con el YHV-LvA; fue necesario establecer la dosis viral adecuada que

permitiera mantener el 100% de los animales vivos hasta 96 h post-inoculación. Para esto se probaron varias diluciones virales de extracto viral (1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50). Durante el bioensayo realizado se observó que a las 24 h los organismos infectados con la dilución 1:2 murieron y los infectados con las diluciones 1:3, 1:5 y 1:10 presentaron síntomas de la infección como nado errático, baja actividad, inapetencia y murieron 12 h después (36 h post-infección). Así mismo, los camarones inoculados con las diluciones 1:15 y 1:20 presentaron los mismos síntomas de la infección entre las 40 y 60 h y murieron entre las 48 y las 82 h. Por su parte, los camarones infectados con las diluciones 1:30 y 1:40 no presentaron síntomas severos de la infección (únicamente se observaron aletargados) y lograban el 100% de sobrevivencia después de 110 h. Los camarones infectados con la dilución 1:50, no presentaron síntomas de la infección, aún a las 125 h (Figura 4). Los datos fueron integrados en una curva, cuya regresión no lineal siguió la siguiente fórmula: $f = y_0 + a / (1 + \exp(-(x-x_0)/b))$, con una $p < 0.0001$, con la cual se determinó que la dilución adecuada es 1:24; por lo que, para fines prácticos, se utilizó la dilución 1:25.

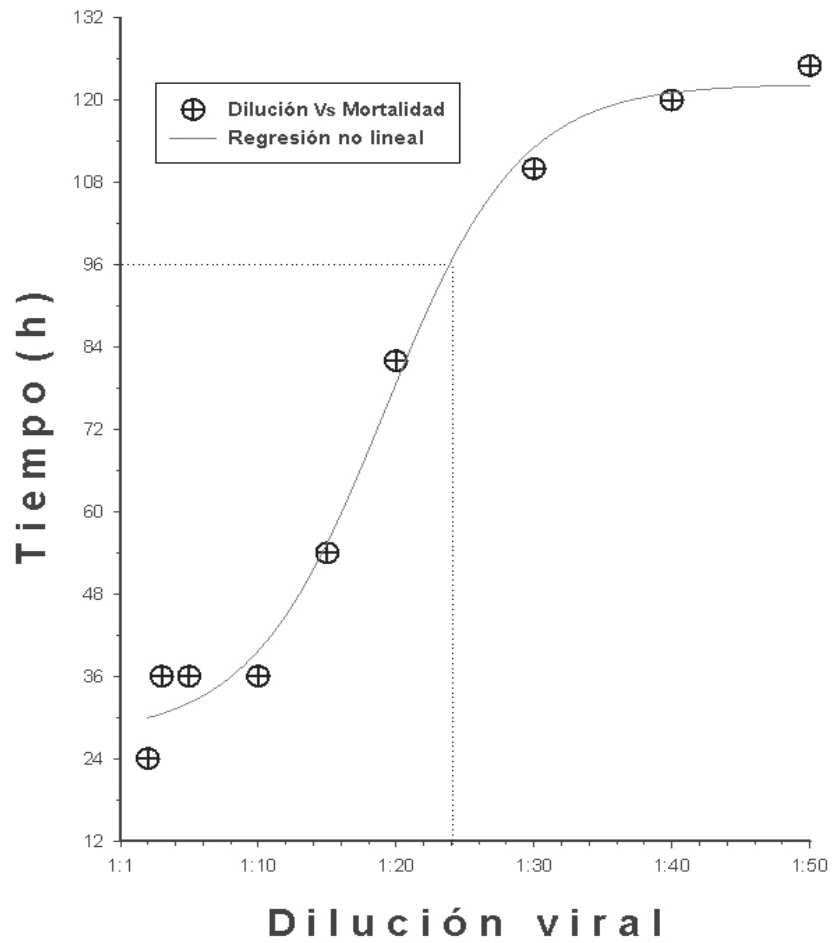


Figura 4. Determinación de la dosis del inóculo viral.

Los camarones *L. vannamei* fueron inoculados con diferentes diluciones del inóculo viral. La dilución viral necesaria (1:24) para asegurar el 100% de supervivencia a un máximo de 96 h fue calculado por regresión no lineal.

SELECCIÓN DEL TEJIDO BLANCO

Para el análisis de la cinética de expresión viral, fue necesario seleccionar el tejido donde las bandas de expresión se apreciaran mejor. Así, se infectaron

L. vannamei sanos con la cepa YHV-LvA y se tomaron muestras de branquias, intestino, músculo y hepatopáncreas a las 24 y 96 h post-inoculación; de hemocitos a las 24, 36 y 96 h y de pleópodos a las 4, 8, 12, 24, 36, 54, 72 y 96 h. Después de obtener el RNA_{TOTAL}, se sintetizó el cDNA y éste fue utilizado como templado para amplificar una región del ORF3 (GP116) y otra del ORF1b (PEP1). Estas regiones fueron seleccionadas como representantes de un gen temprano, implicado en la replicación (PEP1), y un gen tardío, que codifica una proteína estructural (GP116). Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida y teñidos con nitrato de plata, para aumentar la resolución y sensibilidad.

El gene PEP1 no fue detectado por PCR en las muestras de hepatopáncreas e intestino, colectadas a las 24 h y 96 h (Figura 5A). En músculo, se observó mayor expresión a las 24 que a las 96 h; mientras que en branquias la mayor expresión se observó a las 96 h (Figura 5B). Por otra parte, la expresión del gen GP116 no se pudo determinar en músculo, intestino, hepatopáncreas y branquias a las 24 h, únicamente se observó a las 96 h en branquias.

En pleópodos, colectados a las 4, 8, 12, 24, 36, 54, 72 y 96 h, la expresión de ambos genes se pudo detectar desde las 12 h, observándose un aumento gradual conforme transcurría el tiempo (Figura 5C). De igual manera, en los hemocitos, colectados a las 24, 36 y 96 h, se pudo observar la expresión de los dos genes incrementándose con el tiempo (Figura 5D). Aunque los genes virales son detectados en hemocitos y pleópodos con la misma intensidad a partir de las 12 h, la recuperación del RNA_{TOTAL} de hemocitos es menor en hemocitos y requiere un mayor cuidado en la manipulación. Por esto, los pleópodos fueron seleccionados como tejido blanco para realizar el análisis de expresión viral.

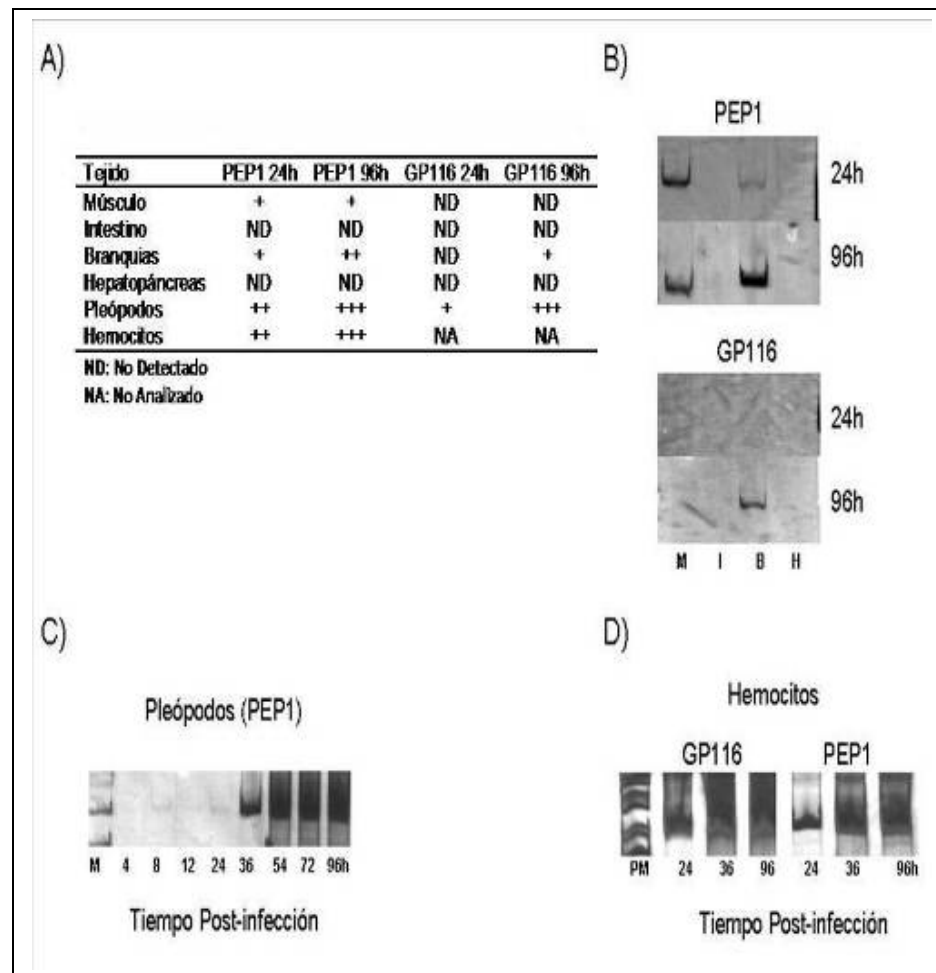


Figura 5. Detección del YHV-LvA en diferentes tejidos del camarón.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida al 7.5% y teñidos con nitrato de plata, usando los iniciadores PEP1 y GP116. A) Tabla resumen de la detección del YHV en los diferentes tejidos, la intensidad de la banda es representada por el símbolo "+", ++ significa intensidad media y +++ alta intensidad. B) Tejidos analizados a las 24 y 96 h: M: músculo, I: intestino, B: branquias y H: hepatopáncreas. C) Detección en pleópodos de las 4 a las 96 h. D) Detección en hemocitos a las 24, 36 y 96 h

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN VIRAL

Para demostrar la capacidad replicativa del YHV-LvA durante el progreso de la infección, se cuantificó la expresión de cuatro genes, 3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64, los cuales fueron seleccionados en base a su relevancia en la replicación viral e interacción con su célula hospedera. En todos los *Nidovirales*, la proteína 3CL^{PRO} ha sido descrita como un componente clave para la replicación, ya que es la proteasa responsable de hidrolizar al polipéptido codificado en el ORF1a/1b produciendo las proteínas necesarias para la replicación viral: RNA-polimerasa, helicasa, una proteína con un sitio de unión ion metálico y dos motivos estructurales (Ziebuhr, J. et al. 2000; Cowley, Dimmock et al. 2002; Cowley and Walker 2002; Ziebuhr, Bayer et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008). Además, la 3CL^{PRO} también es responsable de realizar la hidrólisis del polipéptido codificado en el ORF3, el cual contiene las proteínas estructurales GP116 y GP64 (Ziebuhr, J. et al. 2000; Ziebuhr, Bayer et al. 2003 Jitrapakdee, 2003 #263).

La RNA-polimerasa (POL) es una proteína central de la replicación del virus y está altamente conservada entre todos los *Nidovirales*, lo que sugiere que tienen un ancestro común (de Vries, Horzinek et al. 1997; Cowley, Dimmock et al. 2000; Sittidilokratna, Hodgson et al. 2002). Por su parte, las glicoproteínas estructurales (GP64 y GP116) participan e interactúan con las células de su hospedero (Cavanagh 1995; Cowley, Dimmock et al. 2002; Jitrapakdee, Unajak et al. 2003; Intorasoot, Tanaka et al. 2007) por lo que tienen un papel importante en la inducción de la respuesta inmune y parecen estar asociadas a la virulencia de los *Nidovirales* (Mounir and Talbot 1993; González,

Gomez-Puertas et al. 2003; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008).

De acuerdo con los resultados en este trabajo, la expresión de los genes de YHV-LvA a lo largo de la infección puede dividirse en tres etapas. La primera comprende las primeras 24 h post-inoculación, caracterizada por una baja expresión de los genes virales (Figura 6), posiblemente asociada con la adsorción y/o penetración del virus, etapa en la que el virus aún no inicia la replicación. La segunda etapa transcurre entre las 24 y las 72 h (Figura 6), y se caracterizó por un rápido incremento de la expresión de los genes (mayor a dos órdenes de magnitud, en promedio). Esto es indicativo que la replicación y transcripción de los genes virales es más intensa entre las 24 y las 72 h. En la tercera etapa, entre las 72 y las 96 h (Figura 6), se observa que la expresión viral alcanza su nivel máximo, posiblemente debido a que en esta etapa se realiza el ensamble y liberación del virus de la célula hospedera. Este perfil de expresión, observado en los cuatro genes seleccionados (3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64), es compatible con el modelo de replicación viral, propuesto inicialmente por Ellis and Delbruck (Cann 2005). A pesar que los cuatro genes analizados modificaron su expresión, cada uno presentó diferentes cinéticas y éstas diferencias pueden estar asociadas con el mecanismo de replicación y transcripción del virus.

EXPRESIÓN DE GENES REPLICATIVOS

La expresión de los genes de la proteasa 3CL^{PRO} y la RNA-polimerasa, implicados en la replicación, fueron cuantificados a lo largo de la infección. La expresión de 3CL^{PRO} fue alta (2.08×10^5 copias/ μ l) desde el inicio de la infección; sin embargo, al final de la infección (96 h post-infección) se incrementó en 3 órdenes de magnitud, llegando a

las 1×10^7 copias/ μl (Figura 6). Por su parte, el gen de la polimerasa presentó una concentración inicial menor (1×10^2 copias/ μl); pero también fue seguida por un aumento de 3 órdenes de magnitud en la expresión, llegando a 1×10^5 copias/ μl al final de la infección. Aunque hay una diferencia de 2 órdenes de magnitud en el nivel de expresión inicial de ambos genes replicativos, su comportamiento fue similar durante la infección.

Actualmente, se conoce la organización genómica y el mecanismo de replicación general de los *Nidovirales*, el cual es altamente conservado (de Vries, Horzinek et al. 1997; Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006; Pasternak, Spaan et al. 2006). La organización genómica comprenden todos los elementos necesarios para la replicación (proteasa, polimerasa, helicasa y motivos estructurales), los cuales están organizados de igual manera en todos los *Nidovirales* y se encuentran en un solo transcrito (ORF1a/1b) de 20 Kb, con dos marcos de lectura traslapados. Este transcrito de 20 Kb, se encuentra en el extremo 5' del genoma y codifica una poliproteína replicativa, la cual es procesada proteolíticamente por su propia proteasa viral 3CL^{PRO} (Ziebuhr, Bayer et al. 2003). Por estar codificados en el mismo transcrito (ORF1a/1b), se esperaría encontrar concentraciones equimoleculares de los genes 3CL^{PRO} y POL; sin embargo, la concentración de los transcritos de 3CL^{PRO} fue mayor que la de POL (Figura 6).

Cabe señalar que aunque se ha descrito el mecanismo de replicación de los *Nidovirales*, los componentes y mecanismos necesarios para su transcripción aún no han sido totalmente dilucidados en todas las especies (Pasternak, Spaan et al. 2006; Enjuanes, Sola et al. 2007;

Ziebuhr and Snijder 2007) y particularmente en el YHV. Sin embargo, durante la replicación de los *Nidovirales* se ha detectado la presencia de un transcrito RNA anti-sentido (-) y varios tipos de sg RNA (RNA sub-genómicos), así como la formación de RNAs intermediarios de doble-cadena (sdRNA) (Pasternak, Spaan et al. 2006; Ziebuhr and Snijder 2007). Además, se han identificado varios elementos genómicos, llamados proteínas no estructurales (nsp; nonstructural proteins), localizados principalmente en el ORF1a/b cuya función aún se desconocen (Pasternak, Spaan et al. 2006; Enjuanes, Sola et al. 2007; Ziebuhr and Snijder 2007; de Haan and Reggiori 2008). Por lo anterior, es posible que las diferentes concentraciones iniciales de los genes 3CL^{PRO} y POL, se deba a la expresión de diferentes tipos de RNAs sub-genómicos intermediarios (sg RNA). Por lo que, es posible que varios sg RNA, correspondientes al gen de 3CL^{PRO}, hayan sido detectados y cuantificados por el qPCR con dos órdenes de magnitud mayor de éste gen con respecto a el gen POL. Esta proporción permaneció a lo largo de la infección, como se manifestó en los estudios de cinética de expresión (Figura 6). Por lo cual las diferencias en la expresión de estos dos genes, podría deberse a diferencias ó mutaciones génicas, en las regiones regulatorias de la expresión viral.

Además, recientemente se ha identificado una endonucleasa, llamada NendoU (uridylylate-specific endoribonuclease), la cual parece ser exclusiva para *Coronavirus*, *Arterovirus* y *Ronivirus* (Ivanov, Hertzog et al. 2004; Sittidilokratna, Dangtip et al. 2008), ya que está ausente en otros virus de RNA estudiados. Esta endonucleasa parece ser específica para el dsRNA y se ha confirmado, por mutación dirigida, que NendoU es vital para la replicación viral. La enzima ayuda a la protección de los transcritos virales de cadena sencilla (ssRNA), alargando su vida media y favorece la replicación viral. Debido a la relevancia de 3CL^{PRO} en la replicación de los *Nidovirales*, es probable que su transcrito sea protegido por la NendoU (Ziebuhr, J. et al. 2000; Ziebuhr, Bayer et al. 2003; Tirasophon, Roshorn et al. 2005;

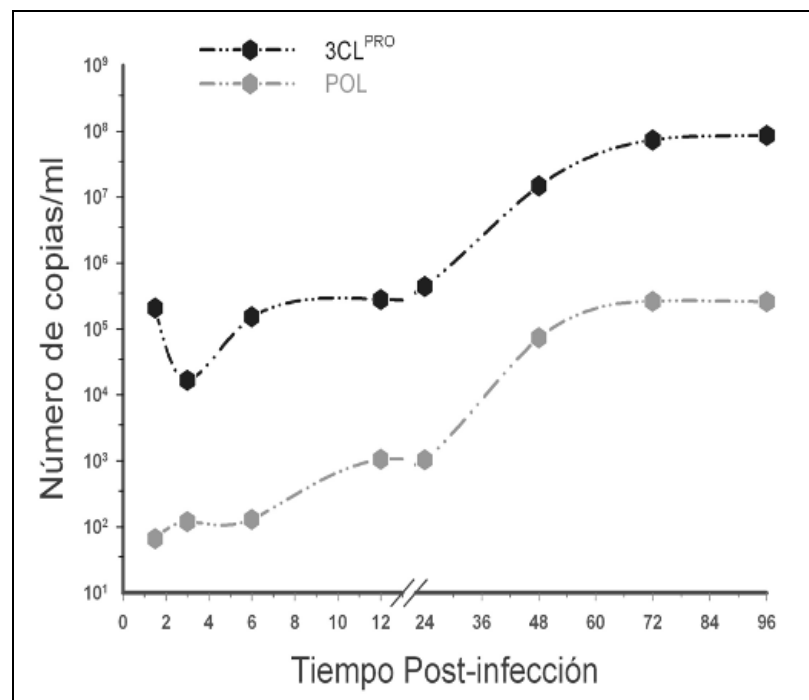


Figura 6. Expresión de 3CL^{PRO} y POL a diferentes tiempos post-infección.

La expresión de estos genes fue monitoreada a diferentes tiempos (entre 1.5-96 h), cuantificando por PCR en tiempo real utilizando SYBR Green.

Yodmuang, Tirasophon et al. 2006; Tirasophon, Yodmuang et al. 2007). Esto ayuda a explicar porque, desde el inicio de la infección, el transcrito de 3CL^{PRO} que está protegido por NendoU, es menos degradado y por lo tanto se encuentra en mayor concentración que el transcrito de POL.

EXPRESIÓN DE GENES ESTRUCTURALES

Los genes de las glicoproteínas GP116 y GP64 están localizados en el ORF3 y son sintetizados a partir de un solo transcrito. Por lo cual, se esperaría que los genes de las proteínas GP116 y GP64 tuvieran el mismo nivel de expresión. Sin embargo, aunque ambos genes tienen un perfil de expresión similar, sus niveles de expresión muestran variaciones, a lo largo de la infección. En general, en las primeras 12 h ambos genes tienen una tasa de replicación baja, e incrementan significativamente su expresión entre las 24 h y 48 h post-inoculación. Hasta las 24 h, el nivel de expresión de GP116 es mayor que el de GP64; sin embargo, entre 24 y 48 h, GP64 tiene un rápido incremento y al final de la infección (48-96 h) el nivel de expresión de GP64 rebasa el nivel de GP116 (Figura 7).

Considerando que la diferencia en la expresión de estos genes no fue mayor de un orden de magnitud, es probable que las variaciones cuantitativas se deban a la sensibilidad y precisión de la técnica y/o a la diferente velocidad de degradación del transcrito, después de ser procesados en los ribosomas. Esto último podría ser explicado por el papel del 3'UTR (Kuersten and Goodwin 2003; Mazumder, Seshadri et al. 2003) e indicaría que existe una mayor degradación en extremo 3', donde se localiza la región codificante para GP64.

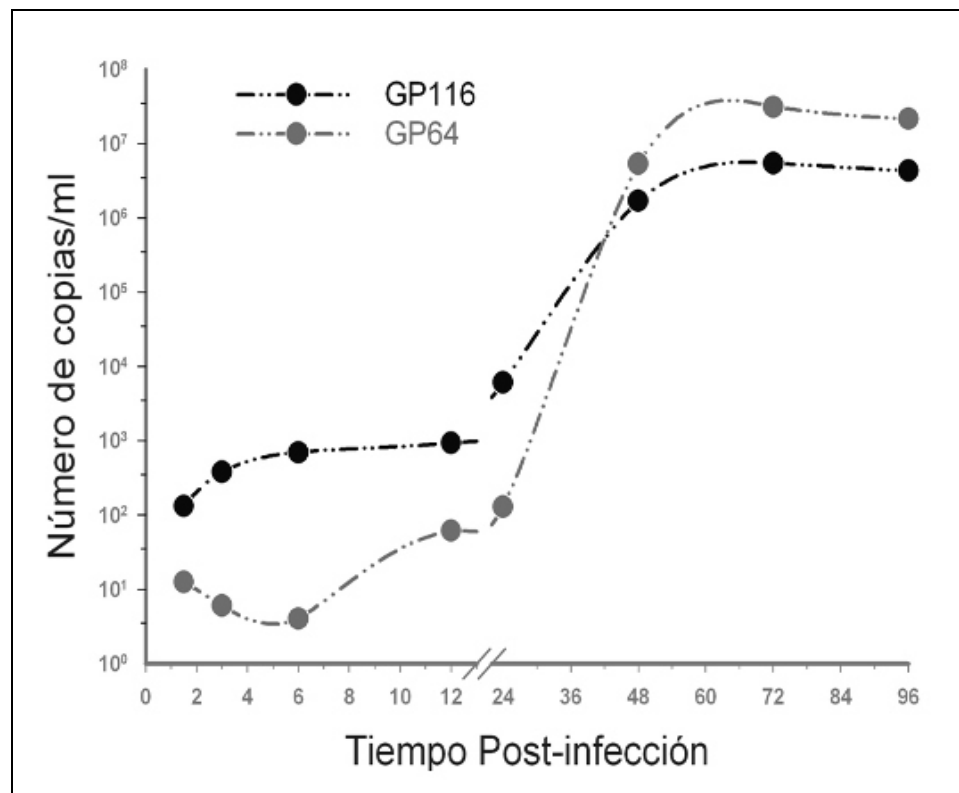


Figura 7. Expresión de GP116 y GP64 a diferentes tiempos post-infección.

La expresión de estos genes fue monitoreada a diferentes tiempos (1.5-96 h), cuantificando por PCR en tiempo real utilizando SYBR Green.

TASA DE REPLICACIÓN ENTRE INDIVIDUOS

Los genes virales 3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64, también se analizaron en cinco camarones, individualmente (Figura 8). En todos los casos se observó una cinética de expresión similar a las observadas de las muestras agrupadas; pero también se observaron algunas diferencias cuantitativas que podrían estar asociadas al grado de susceptibilidad entre los camarones analizados. En términos generales, la cantidad de genes virales está directamente asociada a la tasa de reproducción y/o capacidad replicativa del virus y, consecuentemente, con la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, el organismo más susceptible deberá mostrar una tasa de replicación viral mayor que aquellos organismos que muestran una tasa de replicación menor, los cuales fueron considerados como menos susceptibles a la infección.

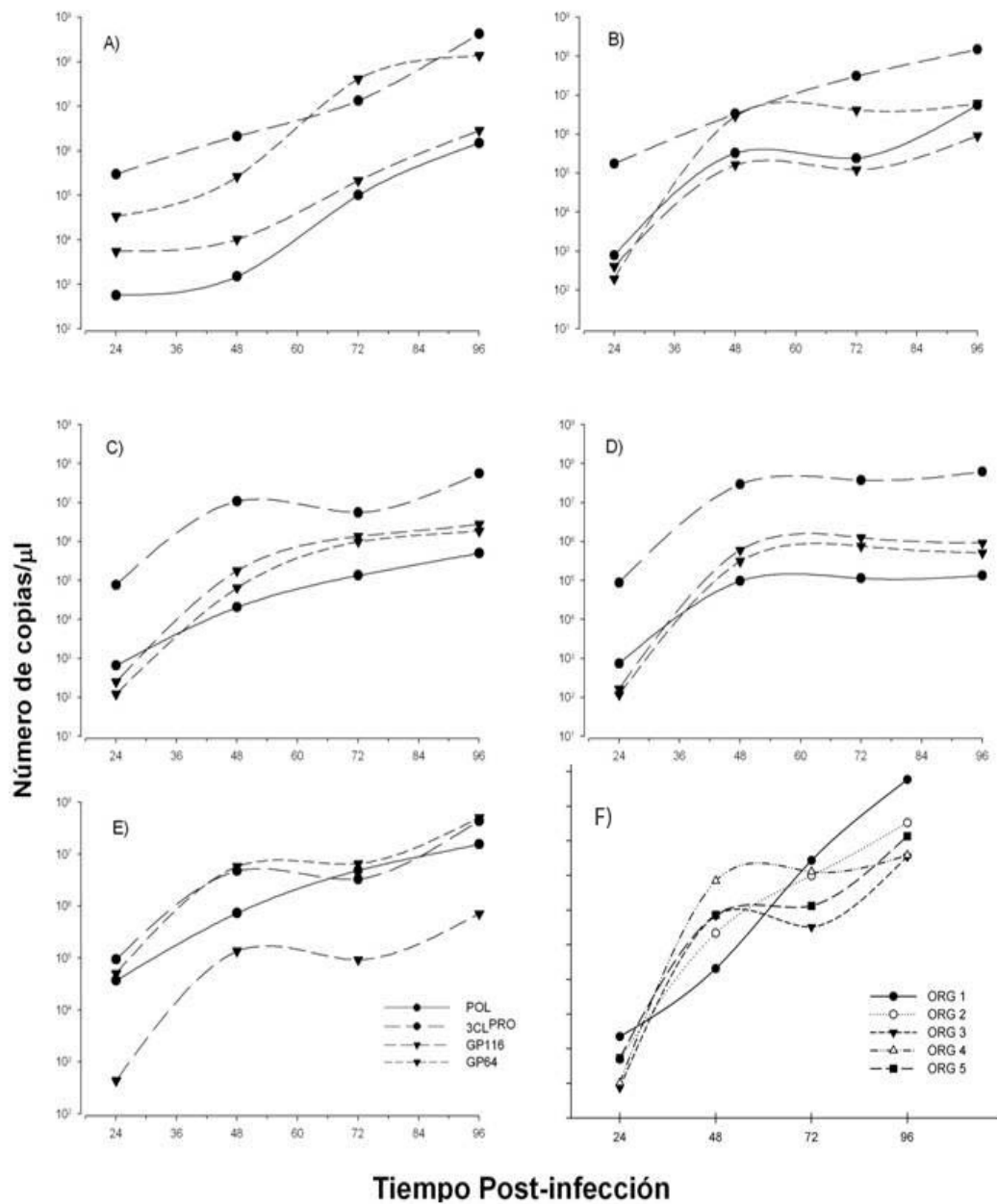


Figura 8. Análisis de expresión viral en muestras individuales.

La figura muestra la cuantificación por qPCR a diferentes tiempos post-infección (24 a las 96 h) de los genes virales 3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64. Las figuras de la A - E, muestran la expresión de los cinco diferentes camarones. En la figura F, se muestra la carga viral de cada organismo.

Considerando que la replicación viral se realizó entre las 24 y las 72 h post-inoculación, la pendiente de la curva durante éste período debe ser un reflejo de la tasa de replicación ó velocidad a la que el virus se está replicando. Según los datos colectados de cada uno de los cinco camarones analizados individualmente, tres de ellos (los organismos 1, 2 y 4) mostraron una tasa de replicación mayor ($1,8 \times 10^5$ copias/h); mientras que los otros dos organismos (3 y 5) tuvieron una tasa de replicación significativamente menor ($7,6 \times 10^4$ copias/h) (Figura 9). De éste modo, los primeros organismos (1, 2 y 4) pueden ser considerados como más susceptibles que los segundos (3 y 5). Con estos datos se demuestra la resistencia natural que tiene algunos camarones (*L. vannamei*) ante la cepa YHV-LvA, ya que presentaron una baja tasa de replicación. Aunque es necesario más análisis para determinar la patogenicidad de la cepa YHV-LvA, la tasa de replicación puede ser utilizada para estimar el grado de susceptibilidad de una población o el grado de severidad de una infección.

En resumen, con el análisis de expresión de los genes virales se pudo determinar la capacidad replicativa de la cepa YHV-LvA en *L. vannamei* y la cinética de expresión de los genes claves en la replicación. Así mismo, se demostró que hay diferencias cuantitativas en la carga viral entre los individuos, que pueden estar asociadas a la resistencia de los organismos. Estas diferencias en la resistencia ó susceptibilidad entre los organismos pueden ser fisiológicas o inmunológicas.

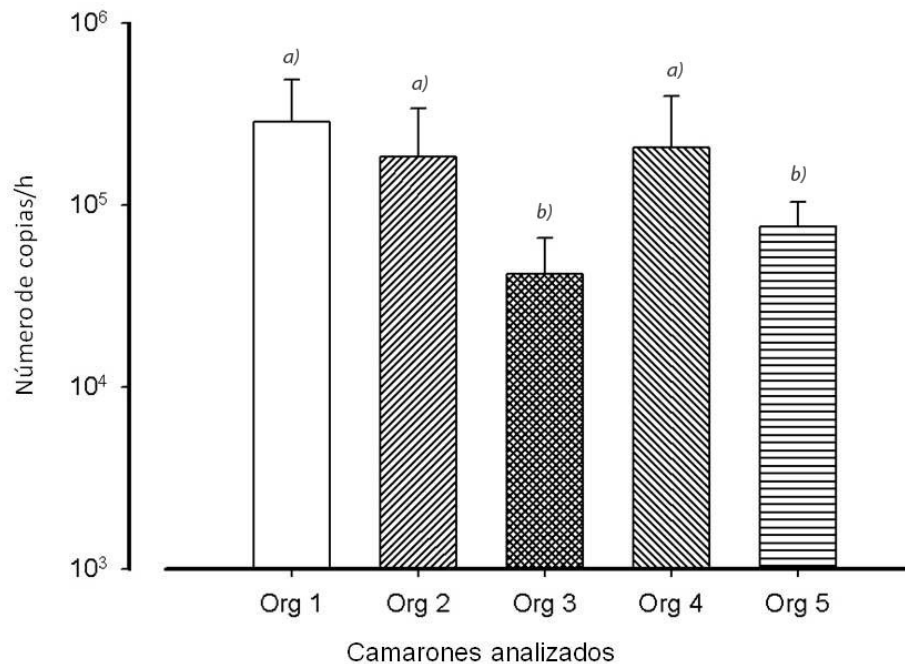


Figura 9. Tasa de replicación de los genes virales.

La figura muestra el promedio de expresión viral de los genes 3CL^{PRO}, POL, GP116 y GP64 monitoreada en los cinco camarones durante la fase replicativa viral (24-72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.05$ ($n=3$).

ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

El YHV es capaz de infectar varios tejidos del camarón incluyendo el órgano linfoide, intestino, gónada, glándula antenal, músculo, hemocitos, tejido hematopoyético, conectivo y nervioso, epitelio cuticular y células epiteliales de las lamelas branquiales (Lightner 1996). Sin embargo, ya que los hemocitos son las células encargadas de sintetizar las proteínas asociadas al sistema de defensa, la

capacidad del sistema inmune del camarón para reconocer la cepa del YHV-LvA fue evaluada en hemocitos.

MACROARREGLOS

Con el propósito de identificar rápidamente las proteínas que modifican su expresión por efecto de la infección con el YHV-LvA, como una técnica exploratoria, se utilizaron los macroarreglos, los cuales ya han sido utilizados en otros estudios con este mismo propósito (Jiménez-Vega 2004; Clavero-Salas, Sotelo-Mundo et al. 2007).

Con los resultados obtenidos con los macroarreglos fue posible observar modificaciones en la expresión de los siguientes genes: Profenoloxidasa (proFO), ALF (factor Anti-LPS), clon 405 (C405; gen desconocido) clon364 (C364; Similar sex to lethal) y un inhibidor tipo Kazal (Figura 10). Sin embargo, la cantidad de RNA_{TOTAL} utilizado para la síntesis de las sondas fue muy poca, resultando en una baja intensidad de la señal observada. Debido a que únicamente se observó la modificación de la expresión de muy pocos genes, la búsqueda se completó con otras proteínas involucradas en el sistema de defensa de los camarones descritas en la sección siguiente.

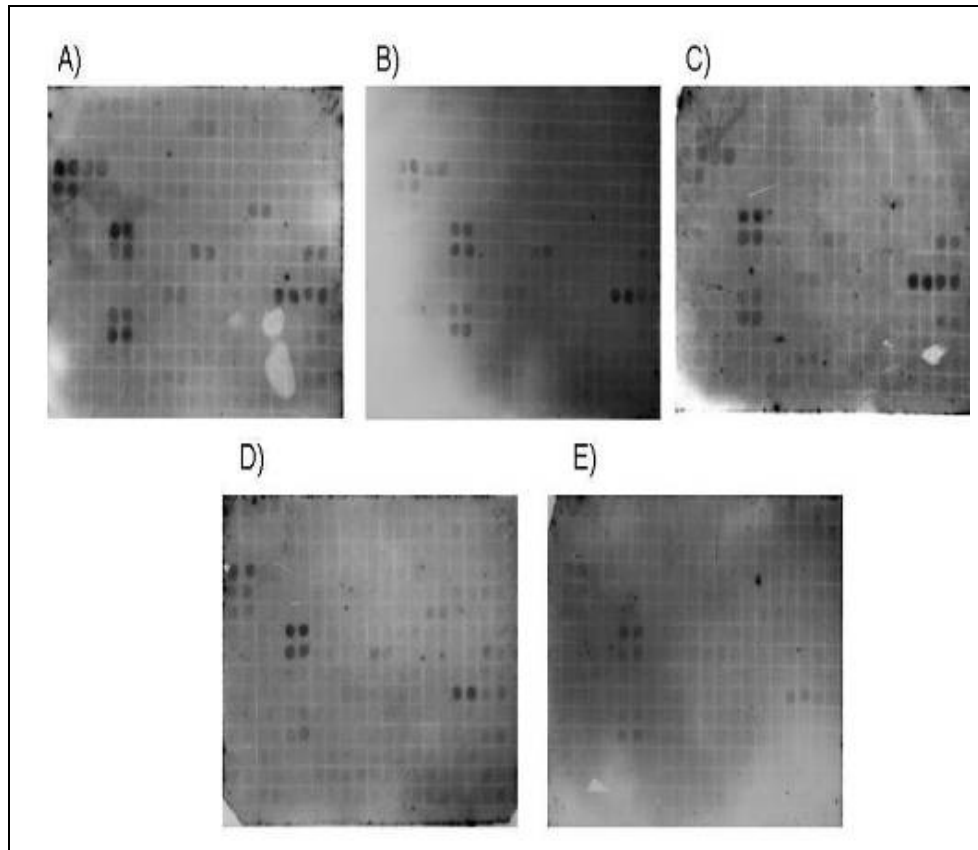


Figura 10. Análisis de Macroarreglos.

La figura muestra cinco membranas, cada una con 150 diferentes clones de genes de camarón (proporcionadas por el Dr. Francisco Vargas Albores) e hibridizadas con una sonda diferente, preparada a partir del cDNA de hemocitos de camarón. Los puntos representan genes expresados marcados con digoxigenina, su intensidad corresponde al nivel de expresión. A) Sonda 1, camarones sin inocular. B) Sonda 2, camarones inoculados con un homogenizado de tejido de camarón sano muestreados antes de las 12 h. C) Sonda 3, camarones inoculados con un homogenizado de tejido de camarón sano muestreados después de las 12 h. D) Sonda 4, camarones inoculados con un homogenizado de tejido de camarón infectados, antes de las 12 h. E) Sonda 5: de camarones inoculados con un homogenizado de tejido de camarón infectados, después de las 12 h.

EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS DEL SISTEMA INMUNE

Además de los genes previamente seleccionados con la técnica de los macroarreglos (ALF, proFO, dos genes de secuencia desconocida y un gen que codifica para una proteína inhibidor de proteinasa tipo Kazal), se analizó la expresión diferencial de varios genes relacionados con el sistema inmune de *L. vannamei* como son: La proteína de reconocimiento Toll, dos péptidos antimicrobianos: crustina y peneidina (PEN4); cuatro enzimas: superóxido dismutasa (SOD), lisozima, citocromo oxidasa II (COII) y citocromo III (COIII); seis diferentes proteínas descritas con actividad inmunológica: SWD, dos SLPI, SIBD, I κ B y HSP 60.

En total fueron analizadas las modificaciones en la expresión de 18 genes de diferentes proteínas relacionadas con el sistema inmune, a lo largo de la infección de camarones inoculados con la cepa YHV-LvA. El análisis de expresión de estas proteínas se realizó por PCR, usando iniciadores específicos para cada uno de los genes, los cuales están enlistados en la Tabla IV. La cuantificación de la expresión se realizó por densitometría y se utilizó actina como gen de referencia para normalizar los niveles de expresión.

Tabla IV. Iniciadores específicos para genes del camarón

Iniciadores utilizados para el monitoreo de las modificaciones en los niveles de expresión de varios genes del camarón, durante la infección con la cepa YHV-LvA.

Proteína	Secuencia (5'→3')	TA (°C)
SLPI ²	Fw: TCAACTGCAGTTCGAGTGTGCGCT Rv: AGGTGCTGGGAAGAGAGGGCAGAA	62
Crustina	Fw: TTTCGCGGCTTCGGACAGCCATTT Rv: ATGAGGGAGGCTTGACACAGTGTT	53
Peneidina	Fw: GGTCCATGAATGTACCGGTGAA Rv: GACAAGTACTCTCTCCCTCGTATG	62
SLPI	Fw: CTTCCGTTTCCGTAAGGAGG Rv: GGTCAGCGTCAAGGAGGTTC	55
SWD	Fw: CTTCCGTTTCCGTAAGGAGG Rv: GGTCAGCGTCAAGGAGGTTC	58
Kazal	Fw: CGGACGGGAAGACCTACTCG Rv: CTCCCGTCGTTGCCACAC	58
ALF	Fw: GGCTGGACGACTATCAGAGG Rv: AGCTCAAGATGGCAGAGCTT	60
Lisozima	Fw: CGAGTCGTCTTCAACACT Rv: CGTGAGACCAGCACTCTG	58
SOD	Fw: GATCATGGAGATTCATCACA Rv: GGAGCCATGTTGGTCCAG	58
Profenoloxidas a	Fw: CGAGACCTTGTTTCATCTACG Rv: CTTGTGAGCGTTGTCAGGATCG	58
SIBD	Fw: CTGCAAATACGGCCTCGTCAAGAA Rv: GGCCGTGCAGATACCATTACCATA	62
Toll	Fw: CTCGACATCCAACACCCACATTGA Rv: GACTGCCACGCGATTTCTATAA	55
HSP60	Fw: AAGGTCATGGAAGCGTCTGGAGAT Rv: CTGTAATGACACTTCGGCTGTGGT	59
COII	Fw: ACCATGACCTCTTACGGGCTCAAT Rv: TCAATACCAAGCGGCAGCTTCA	62
COIII	Fw: GCCCTTCCTTCGTTACGACTGTTA Rv: AACCTGGCCGTTTATCAAGA	62
IκB	Fw: GCCCGTCTCCCTACCCTG Rv: GCACGCTGCTCTTTATTCCTTC	58
C364	Fw: AGAGCGTCGAAAACCGCGGATAAA Rv: ACAACGCCATTTCATGCCACAA	62
C405	Fw: CACGAGGGTGGTATAGTATAGGCT Rv: AGAGTGACAGTCAGGACCTT	55
Actina	Fw: TAGGTGGTCTCGTGGATGCC Rv: GAGACCTTCAACACCCCGC	55

El sistema inmune del camarón es capaz de reconocer la cepa YHV-LvA, como se demostró por las modificaciones en la expresión varios genes de proteínas claves del sistema de defensa que se determinaron en este estudio. Como se observa en la Tabla V, de los 18 genes analizados, 13 presentaron modificaciones en su expresión, de los cuales tres presentaron supresiones. Por otro lado, se observó que los genes de proFO, Toll, Kazal y ALF modificaron su expresión varias veces a lo largo de la infección a diferencia del resto que solo lo hicieron en un punto específico. Cabe señalar que 13 genes presentaron modificaciones en su expresión antes de las 12 h post-infección. Con estos datos podemos decir que el sistema inmune del camarón es capaz de identificar la presencia del virus al inicio de la infección, ya que hay una clara actividad de síntesis de proteínas en los hemocitos, cuando el virus se encuentra en su primera fase de penetración a las células. A continuación se describe y discute detalladamente la modificación de la expresión de cada una de los genes de las proteínas analizadas y las posibles implicaciones de estas.

Tabla V. Resumen del índice de expresión de los genes analizados

La tabla muestra los IE mayores de 1.2 (sobre-expresión) y menor de 0.8 (supresión al nivel basal de expresión) de las 0 h a las 96 h post-infección.

Proteína	Características Generales	IE (tiempo en h)
Kazal	Proteína con características de ser inhibidor competitivo de serin-proteinasa	1.28 (1.5), 0.64 (6), 0.55 (48) y 1.21 (96)
Profenoloxidasa	La proFO es la forma inactiva de la enzima fenoloxidasa (FO) encargada de la formación de la melanina	3.16 (1.5), 1.23 (72) y 1.32 (96)
Toll	Toll forman parte de una súper familia de receptores transmembranales capaces de activar una respuesta inmune contra diversos patógenos	1.82 (1.5) y 0.74 (72)
ALF	ALF (anti-lipopolsaccharide factor) factor con características similares a los péptidos antimicrobianos pero sin actividad antibacteriana reportada	1.76 (1.5), 1.26 (6)
SWD	SWD (Single WAP Domain), está compuesta únicamente por su péptido señal y un dominio WAP	1.75 (1.5)
Lisozima	proteína antibacterial con actividad de hidrólisis en uniones β -1,4-glicosídicos, encontradas en la pared celular de las bacterias	1.42 (1.5)
SLPI	SLPI (Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor) inhibidores de proteasa gracias a sus dos dominios ricos en Cys (dominios WAP)	1.36 (1.5)
SOD	superóxido dismutasa catalizan el intercambio del anión radical del superóxido del peróxido de oxígeno e hidrógeno	1.35 (1.5)
SIBD	factor de crecimiento similar a insulina ó IGF (Insulin-like Growth Factor) descubierto recientemente en camarón y nombrada como SIBD (Single Insulin Binding Domain)	1.29 (1.5)
COIII	proteínas asociadas al consumo de oxígeno de las células y asociadas al metabolismo energético celular	1.24 (1.5)
Crustina	péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas y con un dominio WAP en su extremo C-terminal	1.24 (1.5)
SLPI ²	SLPI (Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor) inhibidores de proteasa gracias a sus dos dominios ricos en Cys (dominios WAP)	1.22 (1.5)
I κ B	Proteína reguladora del sistema NF- κ B	0.63 (1.5)
C364	Función desconocida	No presentó modificaciones
C405	Función desconocida	No presentó modificaciones
COII	proteínas asociadas al consumo de oxígeno de las células y asociadas al metabolismo energético celular	No presentó modificaciones
Peneidina	Primer péptido antimicrobiano reportado en camarón con actividad contra bacterias Gram+ y hongos	No presentó modificaciones
HSP60	Son proteínas de estrés y son inducidas en respuesta a un amplio espectro de agresiones, como infecciones virales, inflamación, fiebre, citotoxinas, shock térmico, pH ácido, etc.	No presentó modificaciones

PROFENOLOXIDASA

La participación de profenoloxidasa como proteína clave dentro del sistema inmune en invertebrados, ha sido ampliamente estudiada. Así como la capacidad de las proteínas y factores que participan en la estimulación del sistema proFO, ya que algunos de estos son capaces de estimular la comunicación celular, la opzonización y la adherencia (Johansson and Söderhäll 1996; Söderhäll, Cerenius et al. 1996; Söderhäll and Cerenius 1998). Recientemente, los estudios sobre proFO se han centrado en determinar la participación del sistema proFO como un factor de estimulación para la síntesis de otros factores inmunológicos (Cerenius, Lee et al. 2008). Sin embargo, existen pocos estudios sobre las modificaciones de la expresión de la proFO, como respuesta a infecciones virales en peneidos.

En este estudio se encontró que, dentro de las proteínas del sistema inmune que fueron analizadas, el gen que codifica para la proFO presentó el nivel más alto de expresión. El transcrito de la proFO, tuvo un aumento significativo desde las 1.5 h post-infección, con un Índice de Estimulación (IE) de 3.16, seguida por una recuperación de los niveles basales, entre las 3 y 48 h. Así mismo, mostró un ligero aumento en la expresión a las 72 y 96 h, con un IE de 1.23 y 1.31, respectivamente (Figura 11a). Resultados similares fueron encontrados en camarones *L. vannamei* infectados con WSSV, donde se observó un incremento en etapas tempranas de infección (Ai, Huang et al. 2008), por lo que la participación del sistema proFO en infecciones virales parece ser consistente.

El sistema proFO en crustáceos, se ha relacionado principalmente con infecciones bacterianas, ya que este es activado por proteínas que reconocen componentes de la pared celular de bacterias (LPS, PG y β -1,3 glucanos) (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia 2000; Sritunyalucksana, Wongsuebsantati et al. 2001; Cerenius and Soderhall 2004). Sin embargo, la activación del sistema proFO también promueve la formación de compuestos citotóxicos y altamente reactivos (radicales libres), los cuales ayudan en la eliminación de diversos patógenos. Por lo cual, es posible que el sistema inmune al identificar las partículas virales, promueva la señalización para la expresión de proFO y probablemente de otros mecanismos defensivos.

TOLL

Las proteínas tipo Toll forman parte de una superfamilia de receptores transmembranales, las cuales han sido muy estudiadas en vertebrados y en algunos invertebrados como un vínculo importante entre la inmunidad innata y la adquirida (Akira, Takeda et al. 2001; Goldstein 2004). Actualmente se han identificado alrededor de nueve diferentes proteínas Toll en invertebrados, dos de las cuales son capaces de activar una respuesta inmune contra virus (Jiravanichpaisal 2005). Utilizando iniciadores específicos, la expresión del receptor Toll fue monitoreada en *L. vannamei*, después de la inoculación con YHV-LvA. En la Figura 11b se observa que al inicio de la infección (1.5 h post-inoculación), hay un marcado aumento en la expresión (IE=1.87) regresando a los niveles basales a partir de las 3 h y hasta las 48 h. La expresión continuó disminuyendo hasta llegar a un IE de 0.74, a las 72 h.

Recientes estudios han identificado al receptor Toll en *P. monodon* (Arts, Cornelissen et al. 2007), *L. vannamei* (Yang, Yin et al. 2007), *Fenneropenaeus chinensis* (Yang, Zhang et al. 2008) y *Marsupenaeus japonicus* (Mekata, Kono et al. 2008). Sin embargo, los resultados observados de la expresión del gen de Toll, en peneidos infectados con WSSV han sido controversiales. Inicialmente, Toll se describió como un gen constitutivo ya que, en camarones *P. monodon* infectados con WSSV, no se observaron modificaciones en su expresión (Arts, Cornelissen et al. 2007). En otro estudio donde se comparó la expresión de Toll en *F. chinensis* después de la inoculación de *V. anguillarum* muertos por calor y WSSV viables, se encontró que la infección viral suprimía la expresión de Toll, mientras que la infección bacteriana aumentaba significativamente la expresión. Tanto con virus, como con bacterias, las modificaciones en la expresión se observaron únicamente en las primeras horas post-infección (Yang, Zhang et al. 2008). De éste modo, todo indica que el tipo de patógeno determina la vía y mecanismo para activar el sistema inmune del camarón.

Por otro lado, se ha reportado que los receptores Toll inducen la expresión de los péptidos antimicrobianos (PAM) en *Drosophila* (Tzou, De Gregorio et al. 2002), pese a que el aumento de la expresión de los PAM no ayuda al combate de una infección viral. Sin embargo, la cascada de señalización de Toll, en *Drosophila*, es vital para inhibir la replicación viral (Zambon, Nandakumar et al. 2005). En este estudio, de los dos PAM analizados, solamente la expresión crustina fue modificada. Para poder explicar estas diferencias se requiere la identificación de nuevos miembros de la familia Toll en camarón para poder determinar el papel de cada uno ya que, como se ha visto en

otros organismos, los tipos de receptores Toll involucrados en la defensa dependen del tipo de patógeno.

ALF

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son un componente esencial del sistema inmune innato de la mayoría de los organismos y, en crustáceos, son uno de los primeros elementos del sistema de defensa (Destoumieux, Bulet et al. 1997). En general los PAM son proteínas de bajo peso molecular, usualmente menores de 10 kDa, y típicamente son catiónicas debido a su alto contenido de lisina y arginina (Boman 1995; Nissen-Meyer and Nes 1997). El factor anti-lipopolisacárido ó ALF (anti-lipopolysaccharide factor) no es propiamente un péptido antimicrobiano, ya que no tiene actividad directa sobre el microorganismo sino sobre uno de los productos, el LPS. Los ALFs fueron originalmente purificados de hemocitos del cangrejo *Limulus polyphemus* (Desch, O'hara et al. 1989; Iwanaga, Miyata et al. 1992). Actualmente, se ha reportado el ALF en *Penaeus monodon* (Somboonwiwat, Marcos et al. 2005; Tharntada, Somboonwiwat et al. 2008), en *Pacifastacus leniusculus* (Liu, Jiravanichpaisal et al. 2006) y recientemente en *L. vannamei* (Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2007; de la Vega, O'Leary et al. 2008).

Durante el análisis exploratorio inicial, utilizando macroarreglos, el gen del ALF mostró aumento en su expresión, por lo que se propuso monitorear los niveles de expresión a diferentes tiempos post-infección, donde se encontró que el IE presenta incrementos del 76% y 26%(1.76 y 1.26), a las 1.5 y 6 h respectivamente (Figura 11c). La expresión de ALF en camarón por efecto de infección con WSSV ha

sido reportada (Liu, Jiravanichpaisal et al. 2006; de la Vega, O'Leary et al. 2008), aunque los resultados son contradictorios. Utilizando la secuencia del gen ALF como RNA de interferencia (iRNA), Liu (2006) reporta un menor IE en la propagación viral y propone que ALF tiene un papel importante en el sistema inmune contra la infección viral, al menos contra el WSSV. Por el contrario, de la Vega (2008) comparó el efecto inhibitorio del gen de ALF como iRNA en infecciones bacterianas y virales. De acuerdo a sus resultados, ALF influye de manera significativa en la protección del camarón contra la infección bacteriana, pero no contra la infección viral, minimizando así la participación de ALF contra WSSV. En este estudio, durante el análisis exploratorio realizado con los macroarreglos se observó una estimulación del gen codificante de ALF, lo cual fue confirmado por PCR al observar un marcado aumento en la primera fase del ataque viral. Lo anterior apoya la participación de ALF en infecciones virales, al menos con el YHV, pero es necesario realizar más estudios para establecer con precisión el papel de ALF en infecciones virales.

LISOZIMA

La lisozima fue la primera proteína antibacterial aislada en invertebrados, la cual posee una acción de hidrólisis en uniones β -1,4-glicosídicos, encontradas en la pared celular de las bacterias. Por eso, durante mucho tiempo fue considerada como la responsable de toda la actividad antibacterial en estos organismos. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio nos indican que posiblemente lisozima, además de actuar en la lisis bacteriana, también tiene una importante participación contra las infecciones virales. Un aumento en la expresión (IE=1.42) del gen de lisozima se observó en las primeras horas post-infección (1.5 h), únicamente ya que

posteriormente se mantiene en niveles similares al basal (Figura 11d). La inducción de este gen se ha observado principalmente en estudios donde se infectaron camarones con bacterias (Cedano-Thomas 2003; de Lorgeril, Saulnier et al. 2005; Somboonwiwat, Supungul et al. 2006; Burge, Madigan et al. 2007), así mismo también se han realizado estudios en organismos infectados con el WSSV (Sotelo-Mundo, Islas-Osuna et al. 2003). Aunque se observan diferencias en los resultados, en general la inducción del gen de lisozima por los virus (YHV y WSSV) es rápida, ya que muestra un incremento de la expresión en las etapas tempranas de la infección.

SOD

El gen de la superóxido dismutasa (SOD) únicamente aumentó su expresión (IE=1.353) al inicio de la infección (1.5 h post-infección) y después se mantuvo en niveles similares a los encontrados en los camarones control (Figura 11e). La modificación en la expresión de SOD en peneidos por infecciones con diferentes cepas bacterianas ha sido ampliamente reportada (Cedano-Thomas 2003; Liu and Chen 2004; Wang and Chen 2005; Chiu, Guu et al. 2007; Su and Chen 2008), mientras que por infecciones virales se ha reportado únicamente con el WSSV (Gómez-Anduro, Barillas-Mury et al. 2006; Zhang, Li et al. 2007). En estos estudios, se reporta un aumento significativo en la expresión de SOD 1 h después de una infección con el WSSV, seguido de una disminución en su expresión (Gómez-Anduro, Barillas-Mury et al. 2006). Esto es similar a lo encontrado en este estudio, por lo que posiblemente la expresión de la SOD sea inducida tanto por infecciones bacterianas como virales, al menos con WSSV y YHV. Considerando que el WSSV es un virus con genoma de DNA, éste es el primer reporte de la inducción de la expresión de SOD por un virus con genoma de RNA.

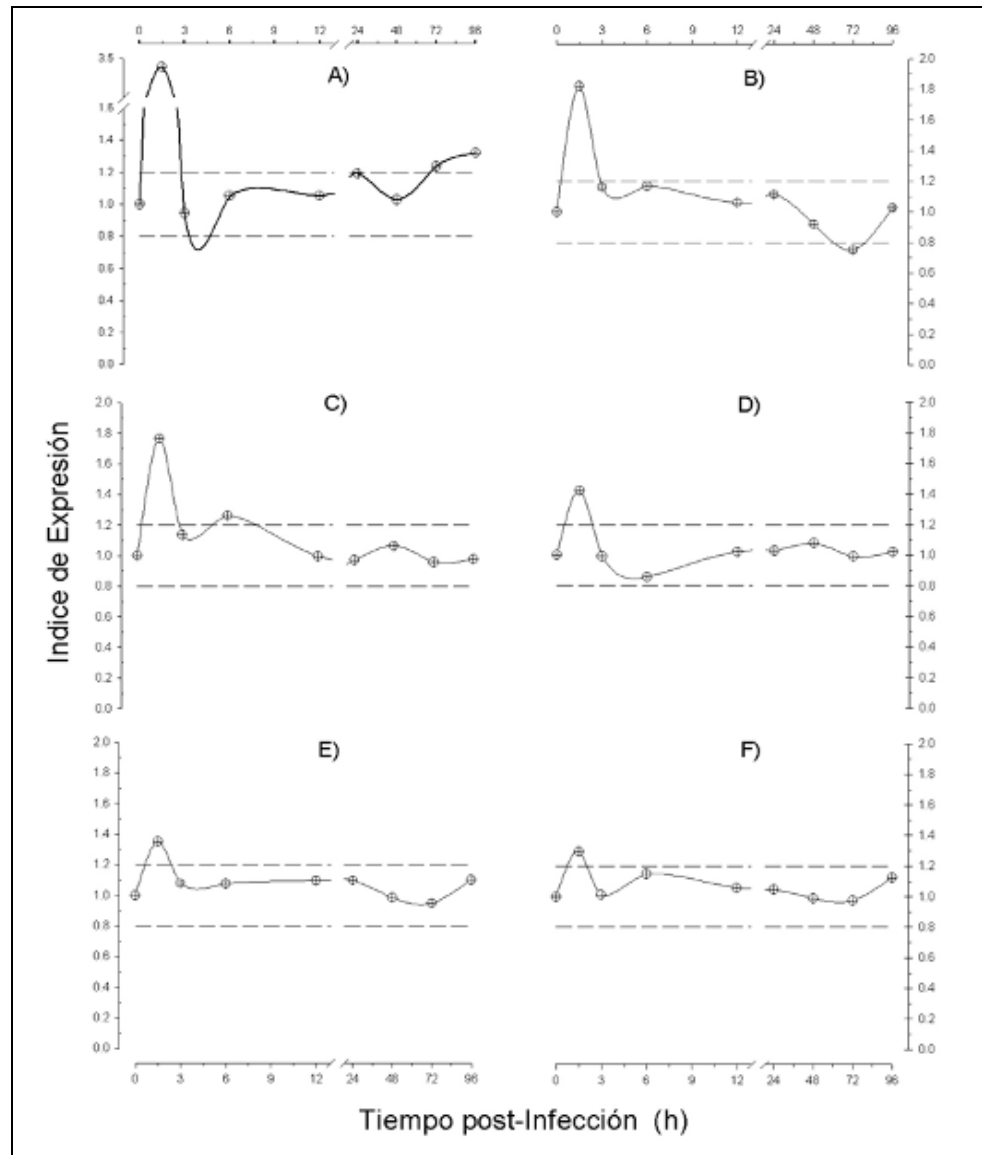


Figura 11. Índice de Expresión de genes de proteínas relacionadas con el sistema inmune.

Las graficas muestran las modificaciones en la expresión de cada gen a diferentes tiempos post-infección. Las líneas punteadas señalan hasta donde se consideró como una expresión basal (entre 0.8 y 1.2 IE), por lo que los puntos fuera de estas líneas se consideran como una modificación en su expresión. A) Profenoloxidasa, B) Toll, C) ALF (anti-lipopolsaccharide factor), D) Lisozima, E) SOD, (Superóxido Dismutasa) y F) SIBD (Single Insulin Binding Domain)

SIBD

El factor de crecimiento similar a insulina ó IGF (Insulin-like Growth Factor) se ha descrito en varios organismos, incluyendo *L. vannamei*, como una proteína que juega un papel clave en el control del crecimiento (Gutiérrez, Nieto et al. 2007). La proteína que reconoce y se une a dicho factor, llamada IGFBP (IGF binding protein) había sido descrita únicamente en vertebrados (Honegger, Galic et al. 2008), como una proteína de varios dominios, incluyendo el llamado dominio IB. Por otra parte, recientemente se describió en *L. vannamei* una proteína que posee únicamente un dominio IB, por lo cual fue nombrada como SIBD (Single Insulin Binding Domain) y que su expresión es modificada por inoculación de *V. alginolyticus*, por lo que parece estar involucrada con la respuesta inmune del camarón (Castellanos, Jiménez-Vega et al. 2008). En el presente estudio, la expresión del gen codificante de SIBD, presentó un ligero aumento (IE=1.29) al inicio de la infección (1.5 h post-inoculación) y luego se mantuvo dentro del rango de los valores basales (Figura 11f). Estas observaciones apoyan la teoría de Castellanos (2008) sobre la participación de SIBD en el sistema inmune del camarón, ya que el gen de SIBD es estimulado por la presencia de bacterias y virus.

PENEIDINA

La primera familia de péptidos antimicrobianos reportada en camarón fueron las peneidinas, las cuales poseen actividad contra bacterias Gram+ y hongos (Destoumieux, Bulet et al. 1997; Destoumieux, Muñoz et al. 2000). La inducción de diferentes tipos de peneidinas se ha reportado ampliamente por efecto de infecciones bacterianas como *Vibrio penaeicida* (de Lorgeril, Saulnier et al. 2005), con LPS (Okumura 2007) y con beta-1,3-glucan (Wang, Chang et al. 2008),

aunque por infecciones virales (WSSV) hay pocos estudios en donde se observe una modificación en la expresión de la peneidina (Rojtinnakorn, Hirono et al. 2002). Por otro lado, en éste trabajo se analizó la expresión del gen de la peneidina 4 (PEN4) (**AF390147**), el cual no mostró modificaciones significativas, ya que a lo largo de la infección se mantuvo dentro de los IE basales, 1.2 y 0.8 (Figura 12a). Por lo que al parecer, la expresión de la peneidina no es afectada por efecto del YHV-LvA. Sin embargo, sería interesante comparar la expresión de las diferentes tipos de peneidinas en camarón infectados con el YHV para verificar si algún tipo de peneidina participa en la defensa del camarón en la infección por YHV.

KAZAL

Las proteínas con dominios tipo Kazal han sido descritas como una gran familia de inhibidores competitivos de serin-proteinasa que tienen una estructura bastante conservada. El gen que codifica para una proteína tipo Kazal fue analizado en este estudio, presentando un ligero aumento en la expresión a las 1.5 h y 96 h post-inoculación (1.28 y 1.21 IE, respectivamente) y una supresión en la expresión a las 6 y 48 h (0.64, y 0.55 IE) (Figura 12b). Por lo cual, el gen de Kazal presenta fluctuaciones importantes a lo largo de la infección por el YHV-LvA. En otros estudios también se ha observado la supresión del gen de proteínas con dominios Kazal en *L. vannemi* por inoculación con *V. alginolyticus* (Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2005) y por infecciones con el WSSV (Rojtinnakorn, Hirono et al. 2002). Lo cual confirma la importante participación de las proteínas tipo Kazal en el sistema inmune de crustáceos.

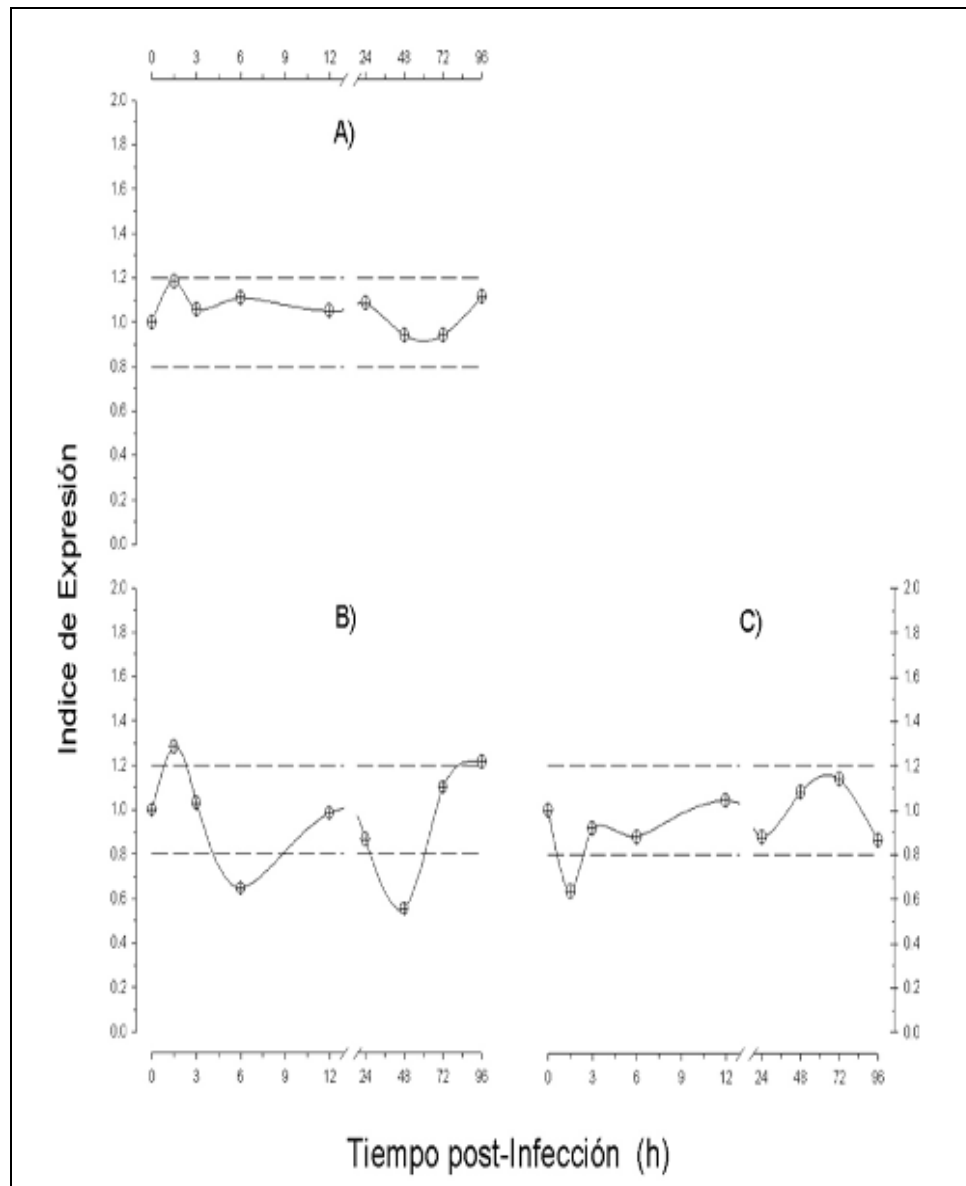


Figura 12. Índice de Expresión de genes de proteínas relacionadas con el sistema inmune II.

Las graficas muestran las modificaciones en el índice de expresión a diferentes tiempos post-infección para los siguientes genes: A) Peneidina, B) Kazal, C) IκB. Las líneas punteadas señalan el IE basal (entre 0.8 y 1.2 IE), por lo que los puntos fuera de estas líneas se consideran como una modificación en su expresión.

I κ B

El gen que codifica para I κ B se ha descrito, tanto en vertebrados como en invertebrados, que las diferentes isoformas de I κ B son reguladoras del sistema NF- κ B, el cual es el encargado de regular e inducir la expresión del sistema inmune innato, por lo que significa que esta proteína es capaz de inhibir ó estimular la expresión de proteínas relacionadas con el sistema inmune (Lodish, Berk et al. 2000). La expresión del gen que codifica para una isoforma de I κ B, analizado en este trabajo, se mantuvo suprimido a lo largo de la infección (Figura 12c), presentando un pico de supresión a las 1.5 h post-infección (IE=0.64). Por ello, es posible que la I κ B esté directamente relacionada con las modificaciones en la expresión de algunos de los genes de las inmunoproteínas, pero no tenemos evidencia. Sin embargo, éste trabajo muestra por primera vez las modificaciones en la expresión del gen de una isoforma de I κ B en camarones infectados con un virus.

EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS WAP

El dominio tipo WAP (Whey Acidic Protein) está compuesto por 50 aminoácidos, con ocho Cys en posiciones muy definidas, que forman cuatro enlaces disulfuro, creando así una estructura característica del dominio. Este dominio ha sido reportado con actividad antibacteriana ó como inhibidor de proteasas (Hagiwara, Kikuchi et al. 2003; Smith, Fernandes et al. 2008).

CRUSTINA

Las proteínas tipo crustina, han sido descritas como péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas y con un dominio WAP en su

extremo C-terminal (Smith, Fernandes et al. 2008) En este estudio, se analizó las modificaciones en la expresión de crustina en camarones infectados con el YHV, donde se observó un ligero aumento en la expresión (IE=1.24) al inicio de la infección (1.5 h post-inoculación) (Figura 13a). Sin embargo, es posible que la baja respuesta observada, se deba a un enmascaramiento de la respuesta al medir las dos isoformas, ya que los iniciadores utilizados en este estudio no fueron diseñados específicamente para detectar la isoforma inducible. La mayoría de los estudios han concluido que estos péptidos son constitutivos (Hauton, Brockton et al. 2006; Jiravanichpaisal, Lee et al. 2007; Supungul, Tang et al. 2008). Sin embargo, Vargas-Albores (2004) demostró la presencia de al menos, seis isoformas de las cuales una es inducible, ya que se observaron modificaciones en la expresión de esta isoforma en camarones inoculados con *V. alginolyticus* (Vargas-Albores, Yepiz-Plascencia et al. 2004). De cualquier modo, este es el primer reporte de la modificación en la expresión de crustina por efecto de la infección con un virus con genoma de RNA (YHV). Es importante señalar que los datos encontrados en este estudio, son contrarios a los detectados en la isoforma de crustina inducible, ya que Vargas-Albores (2004) reporta una supresión a las 12 y 24 h post-inoculación en camarones inoculados con *V. alginolyticus*. Lo cual podría deberse a las diferencias en la respuesta inmune del camarón en infecciones bacterianas y virales.

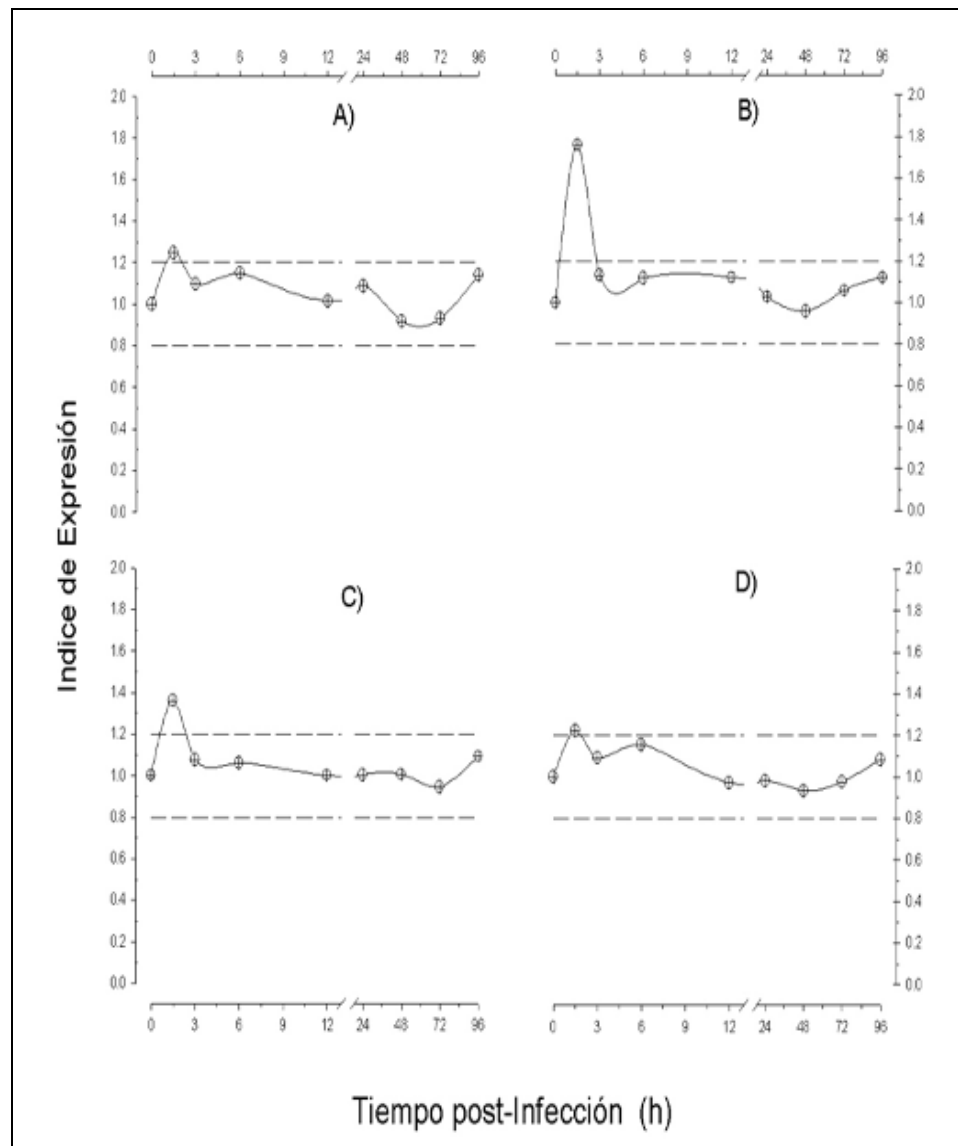


Figura 13. Índice de Expresión de genes de proteínas con un dominio WAP

Análisis de expresión de los genes de proteínas con un dominio tipo WAP. Las graficas muestran las modificaciones en el índice de expresión a diferentes tiempos post-infección para los siguientes genes: A) Crustina, B) SWD (Single WAP Domain), C) SLPI1 (Secretory leukocyte protease inhibitor), D) SLPI2. Las líneas punteadas señalan el IE basal (entre 0.8 y 1.2 IE), por lo que los puntos fuera de estas líneas se consideran como una modificación en su expresión.

SWD

La proteína nombrada como SWD (Single WAP Domain), está compuesta únicamente por su péptido señal y un dominio WAP. Originalmente fue identificada en ratón donde se identificaron sus dos isoformas SWDM1 y SWDM2 (Single WAP Motif protein 1 y 2), de las cuales SWDM1 es inducible y posee una alta actividad antibacteriana y SWDM2 es constitutiva (Hagiwara, Kikuchi et al. 2003). Posteriormente, fue reportada en invertebrados, siendo aislada e identificada en hemocitos de *L. vannamei*, donde se observó un aumento en su expresión entre las 3 y 6 h post-inoculación con *V. alginolyticus*, indicando que SWD tiene una posible participación en la respuesta inmune del camarón (Jiménez-Vega, Yepiz-Plascencia et al. 2004). Recientemente en hemocitos de *P. monodon* se han identificado tres isoformas de proteínas SWD (SWDPm1, SWDPm2 y SWDPm3). SWDPm1 incrementa su expresión durante la infección con *Staphylococcus aureus*, mientras que una infección con WSSV dio lugar a un incremento de la expresión de las isoformas SWDPm1 y SWDPm2 a las 6 h post- infección, seguido por una importante supresión a las 24 h post-infección (Amparyup, Donpuksa et al. 2008). En el presente estudio se observó un aumento significativo en la expresión del gen que sintetiza para la SWD (IE=1.75) al inicio de la infección (1.5 h post-inoculación), seguido de una disminución hasta los valores basales (Figura 13b). Estos datos confirman la participación de SWD, principalmente en las etapas tempranas, tanto en infecciones virales como en bacterianas. Además, en base a lo reportado por Amparyup (2008) en *P. monodon*, es posible que existan varias isoformas de SWD en *L. vannamei*, y que éstas pueden ser inducidas por diferentes mecanismos dependiendo de la

naturaleza del patógeno, ya sean bacterias o virus con diferentes tipos de genomas (WSSV-DNA y YHV-RNA).

SLPI

La proteína llamada SLPI (Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor), fue descrita inicialmente en vertebrados como una proteína secretada por células epiteliales y que forma parte de una superfamilia de inhibidores de proteasa, y que son capaces de inhibir a elastasas, catepsina G, tripsinas y quimiotripsinas; gracias a la actividad de sus dos dominios ricos en Cys (dominios WAP)(Thompson and Ohlsson, 1986; Abe *et al.*, 1991; Potempa, *et al.*, 1994). Esta proteína ha sido descrita en *L. vannamei*, en donde se observó un incremento en su expresión por la inoculación con *V. alginolyticus*, indicando su participación en la respuesta inmune del camarón (Jiménez-Vega and Vargas-Albores 2007). En este estudio se analizaron dos genes de las proteínas SLPI, las cuales presentaron un patrón de expresión similar entre ellas (únicamente un aumento de su IE al inicio de la infección), con la única diferencia en la intensidad de respuesta (Figura 13c). La SLPI-1, presentó un aumento moderado en su expresión (IE=1,36), a diferencia de la SLPI-2, la cual mostró solamente un ligero aumento (IE=1.222) al inicio de la infección (1.5 h post-infección). Estos datos son similares a los reportados por Jiménez-Vega (2007), ya que estos autores reportan únicamente un aumento en la expresión de SLPI al inicio de la infección.

EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO Y DEL ESTRÉS

HSP 60

Las proteínas de estrés fueron descritas por primera vez en 1962, en células de las glándulas salivares de *Drosophila* donde, después de ser expuestas a 37°C durante 30 min, se observó un incremento en la síntesis de proteínas con peso molecular de 70 y 26 kDa; estas proteínas fueron llamadas *heat shock proteins* (HSP) (Ritossa 1962). En general, las HSP son inducidas en respuesta a un amplio espectro de agresiones, como infecciones virales, inflamación, fiebre, exposición de las células a compuestos químicos, citotoxinas, anoxia, shock térmico, pH ácido, etc (Lewis, Handy et al. 1999). Este es un mecanismo de defensa que permite a la célula adaptarse a condiciones adversas y aumentar su capacidad de supervivencia (Kiang and Tsokos 1998).

En el camarón, se ha documentado la inducción de algunos genes de las proteínas HSP (heat shock protein) por estrés (Downs, Fauth et al. 2001; Cimino, Owens et al. 2003) y en algunos casos se ha relacionado la inducción de su expresión al estrés ambiental, por lo que son consideradas biomarcadores del estrés (Tirard, Grossfeld et al. 1995; Lewis, Handy et al. 1999). Además, se han reportado modificaciones en la expresión del gen de la HSP 60, por efecto de la infección de *L. vannamei* con WSSV (Clavero-Salas, Sotelo-Mundo et al. 2007), así como un aumento en la expresión de la HSP 70 en *P. monodon* infectados con GAV (de la Vega, Hall et al. 2006). Por eso, la expresión de las HSP ha sido asociada con las infecciones virales (de la Vega, Hall et al. 2006). Sin embargo, en este estudio no se

detectaron modificaciones en la expresión de la HSP 60 por la inoculación con el YHV (Figura 14a) sugiriendo que ésta HSP no es inducible por infecciones virales.

CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD II Y III

Las citocromo C oxidasa, subunidad II y III (COII y COIII), son proteínas asociadas al consumo de oxígeno de las células, por lo que están directamente asociadas al metabolismo energético celular. En este estudio se observó que la COII no presentó modificaciones en su expresión (Figura 14b). Por otro lado, la COIII presentó un ligero aumento de su expresión al inicio de la infección (1.5 h) (Figura 14c). Estos datos nos hacen suponer que, el consumo de energía del camarón no fue especialmente alterado. Ya que cuando se detecta una reducción en sus niveles de expresión, es posible asociar estas enzimas como indicadores moleculares de una hipoxia así como un aumento en su metabolismo energético (Brouwer, Brown-Peterson et al. 2008).

En algunos estudios, se ha reportado un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético incluyendo la COIII y COII, en camarones infectados con WSSV (Clavero-Salas, Sotelo-Mundo et al. 2007; Leu, Chang et al. 2007; Zhao, Yin et al. 2007), sugiriendo que éste proceso está relacionado con la utilización de energía adicional necesaria para la defensa del organismo. Sin embargo, Rattanarojpong (2007) reportó que la infección con YHV en *P. monodon* indujo la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo glicolítico, el ciclo del ácido tricarbóxico y el metabolismo de aminoácidos, pero no reporta la expresión de proteínas involucrados en la producción de energía como la ATP

sintetasa mitocondrial, concluyendo que la infección con YHV puede no estar relacionada con el aumento en la producción de energía. En cambio, Bourchoukarn (2008) reporta el aumento de la expresión de la ATP sintetasa subunidad beta y una baja expresión de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa en *P. monodon* infectado con YHV, concluyendo que la alteración de estas dos enzimas, involucradas con el metabolismo energético, puede estar relacionada con el gasto de energía utilizada por parte del camarón durante la infección con el YHV (Bourchoukarn, Havanapan et al. 2008).

Aunque los resultados de los estudios con YHV no son compatibles con los reportados para camarones infectados con WSSV (Clavero-Salas, Sotelo-Mundo et al. 2007; Leu, Chang et al. 2007; Zhao, Yin et al. 2007), es posible que estos genes por sí solos no reflejen el gasto energético de los organismo, sobre todo si se considera que los genes COII y COIII son más utilizados como referencias en estudios filogenéticos (Tokuda, Yamada et al. 2006; Luttikhuisen, Campos et al. 2008; Muñoz, Gomez et al. 2008). Lo anterior nos sugiere que es necesario el análisis de otras proteínas, relacionadas con el metabolismo energético del camarón para poder tener un panorama más claro acerca de los efectos metabólicos que producen las infecciones virales en crustáceos.

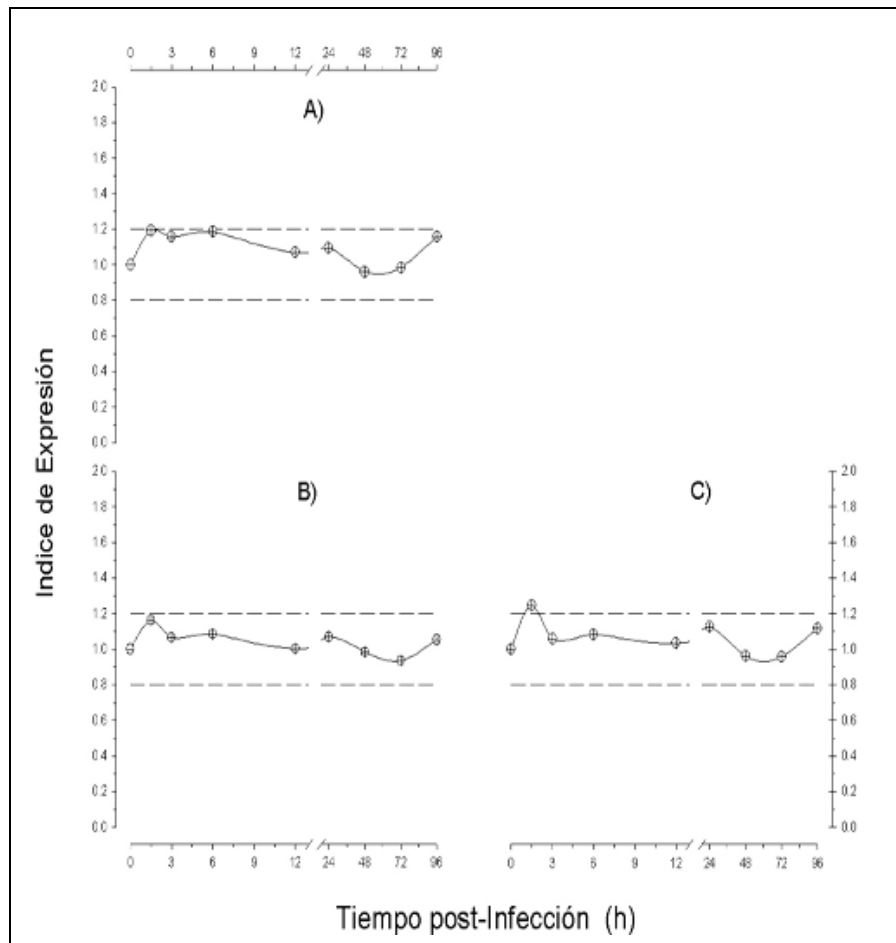


Figura 14. Índice de expresión de genes de proteínas del metabolismo energético y de estrés.

Las graficas muestran las modificaciones en el índice de expresión a diferentes tiempos post-infección para los siguientes genes: A) HSP 60 (heat shock proteins); B) COII (citocromo C oxidasa sub II); C) COIII (citocromo C oxidasa sub III). Las líneas punteadas señalan el IE basal (entre 0.8 y 1.2 IE), por lo que los puntos fuera de estas líneas se consideran como una modificación en su expresión.

EXPRESIÓN DE GENES DESCONOCIDOS

Los genes llamados C405 y C364 (por referencia al número de clona usada de la genoteca de cDNAs), son genes de secuencia desconocida que mostraron una ligera modificación en la expresión en los macroarreglos realizados, sin embargo, al realizar la confirmación por PCR individualmente durante la infección, no se observaron modificaciones en la expresión en ninguno de los dos genes en comparación con la expresión de los organismo control (Figura 15). Por ello, no se continuó su caracterización para definir su identidad.

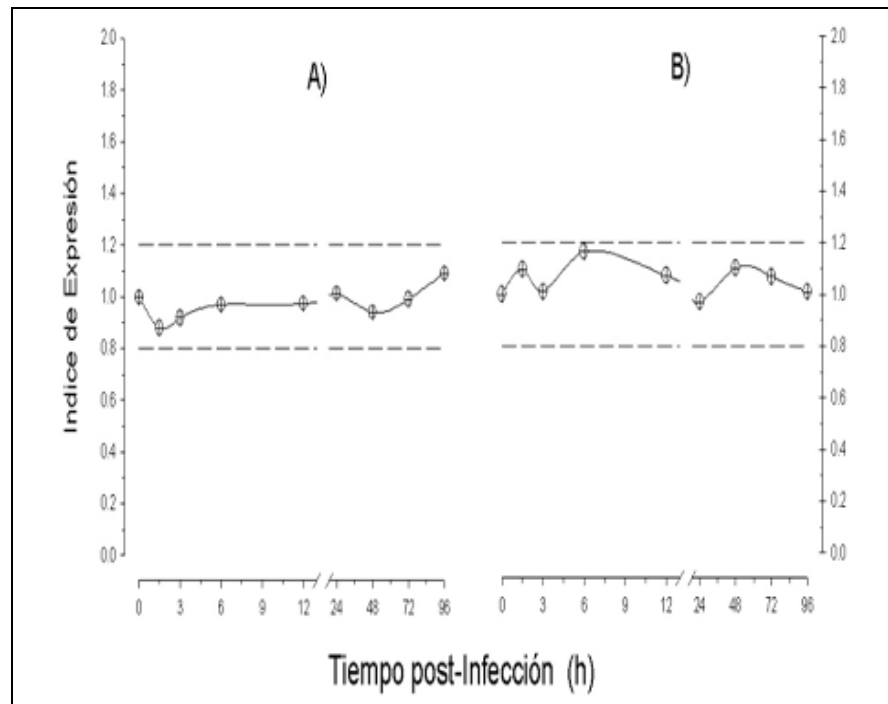


Figura 15. Índice de Expresión de genes de proteínas desconocidas.

Análisis de expresión de los genes de proteínas del metabolismo energético y de estrés. Las graficas muestran las modificaciones en el IE a diferentes tiempos post-infección para los siguientes genes: A) C405 (clon405), B) C364 (clon364). Las líneas punteadas señalan el IE basal (entre 0.8 y 1.2 IE).

CONCLUSIONES

Por secuenciación del 70% de las regiones funcionales del genoma y la comparación de cepas conocidas, se logró confirmar la identidad de la cepa YHV-LvA. Lo que garantiza la identidad de la cepa YHV-LvA, es que muestra un 98% de similitud con respecto a una de las cepas más patógenas y que se conoce todo el genoma, la cepa YHV-Chachoengsao.

Del análisis de la cinética de expresión, se logro establecer la cinética de replicación de la cepa YHV-LvA en *L. vannamei* durante una infección experimental. También se logro diferenciar la expresión de genes tempranos (implicados en la replicación) y genes tardíos (implicados en la formación estructural), encontrando que la primera fase 24 h, lo que significa que el virus requiere al menos un día para ingresar la célula, adueñarse de la maquinaria celular y obtener su capacidad replicativa.

El sistema inmune de *L. vannamei* es capaz de reconocer al YHV, ya que se detectaron modificaciones en la expresión varios genes de proteínas claves del sistema de defensa, como son; proFO, Toll, ALF, IκB, Kazal, SWD, SLPI, SOD, SIBD, COIII, crustina y lisozima. Estos genes presentaron diferencias en sus niveles de expresión antes de las 12 h post-infección lo que indica que el reconocimiento se realiza en las primeras horas, a través de proteínas capaces de identificar al YHV y activar la respuesta inmune del camarón. Siendo proFO, Toll, ALF, SWD y Kazal las que presentaron una mayor modificación en su expresión.

Este es el primer estudio que describe la cinética de expresión de un *Roniviridae* y la respuesta inmune que induce a lo largo del proceso de infección en *L. vannamei*.

REFERENCIAS

- Abe, T., Kobayashi, N., Yoshimura, K., Trapnell, B. C., Kim, H., Hubbard, R. C., Brewer, M. T., Thompson, R. C. and Crystal, R. G. (1991). Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 87: 2207-2215.
- Ai, H. S., Huang, Y. C., Li, S. D., Weng, S. P., Yu, X. Q. and He, J. G. (2008). Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by *White spot syndrome virus*. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 28-39.
- Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675-680.
- Almazan, F., González, J. M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J. and Enjuanes, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 5516-5521.
- Amparyup, P., Donpuksa, S. and Tassanakajon, A. (2008). Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 1497-1509.
- Anderson, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 13-19.
- Arts, J. A., Cornelissen, F. H., Cijssouw, T., Hermsen, T., Savelkoul, H. F. and Stet, R. J. (2007). Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 504-513.
- Aspan, A., Huang, T. S., Cerenius, L. and Soderhall, K. (1995). cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 939-943.
- Barracco, M. A., Duvic, B. and Söderhäll, K. (1991). The β -1,3-glucanbinding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3 glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res.* 266: 491-497.
- Bartlett, T. C., Cuthbertson, B. J., Shepard, E. F., Chapman, R. W., Gross, P. S. and Warr, G. W. (2002). Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4: 278-293.
- Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 393-416.
- Binns, M. M., Bournsnel, M. E., Cavanagh, D., Pappin, D. J. and Brown, T. D. (1985). Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the *Coronavirus* IBV. *J. Gen. Virol.* 66: 719-726.

- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.
- Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Aekpanithanpong, U. and Chantanachookin, C. (1993). Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of Yellow-head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.* 28: 103-109.
- Bourchookarn, A., Havanapan, P. O., Thongboonkerd, V. and Krittanai, C. (2008). Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of *Yellow head virus* infected *Penaeus monodon*. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 504-511.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. M12-Aquaculture production, FAO. 79.
- Brouwer, M., Brown-Peterson, N. J., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S. and Denslow, N. (2008). Changes in mitochondrial gene and protein expression in grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 66: 143-145.
- Burge, E. J., Madigan, D. J., Burnett, L. E. and Burnett, K. G. (2007). Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 327-339.
- Cann, A. (2005). "Principles of Molecular Virology." University of Leicester, U.K., 315 DOI:
- Castellanos, M., Jiménez-Vega, F. and Vargas-Albores, F. (2008). Single IB domain (SIBD) protein from *Litopenaeus vannamei*, a novel membre for the IGFBP family. *Comp. Biochem. Physiol.* 3: 270-274.
- Cavanagh, D. (1995). The Coronavirus surface glycoprotein. *The Coronaviridae*. S. G. Siddell. New York, Plenum Press 73-113.
- Cedano-Thomas, Y. (2003). Expresión diferencial de genes del sistema de defensa de *Litopennaeus vannamei* inducidos por la inoculación con *Vibrio harvey*. Maestría. CICESE. *Biotecnología Marina*. Ensenada, Baja California. 88.
- Cerenius, L. and Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116-126.
- Cerenius, L., Lee, B. L. and Soderhall, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29: 263-271.
- Cimino, E. J., Owens, L. and Anderson, T. A. (2003). A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A: 591-598.
- Clavero-Salas, A., Sotelo-Mundo, R. R., Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J., Peregrino-Uriarte, A. B., Muhlia-Almazan, A. and Yepiz-Plascencia, G. (2007). Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *White spot syndrome virus*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 459-472.
- Cowley, J. A., Dimmock, C. M., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S. and Walker, P. J. (1999). *Yellow head virus* from Thailand and *Gill-associated*

- virus* from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Dis. Aquat. Org.* 36: 153-157.
- Cowley, J. A., Dimmock, C. M., Spann, K. M. and Walker, P. J. (2000). *Gill-associated virus* of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 81: 1473-1484.
- Cowley, J. A., Dimmock, C. M. and Walker, P. J. (2002). Gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns transcribes 3H-coterminally subgenomic mRNAs that do not possess 5H-leader sequences. *J. Gen. Virol.* 83: 927-935.
- Cowley, J. A. and Walker, P. J. (2002). The complete sequence of *Gill-associated virus* of *Penaeus monodon* prawns indicates a gene organisation unique among Nidoviruses. *Arch. Virol.* 147: 1977-1987.
- Cowley, J. A., Cadogan, L. C., Spann, K. M., Sittidilokratna, N. and Walker, P. J. (2004). The gene encoding the nucleocapsid protein of Gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns is located upstream of the glycoprotein gene. *J. Virol.* 78: 8935-8941.
- Chen, Z., Kuo, L., Rowland, R. R., Even, C., Faaberg, K. S. and Plagemann, P. G. (1993). Sequences of 3' end of genome and of 5' end of open reading frame 1a of lactate dehydrogenase-elevating virus and common junction motifs between 5' leader and bodies of seven subgenomic mRNAs. *J. Gen. Virol.* 74: 643-659.
- Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M. and Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 364-377.
- de Groot, R. J., Maduro, J., Lenstra, J. A., Horzinek, M. C., van der Zeijst, B. A. and Spaan, W. J. (1987). cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of *Feline infectious peritonitis virus*. *J. Virol. Meth.* 68: 2639-2646.
- de Haan, C. A. and Reggiori, F. (2008). Are nidoviruses hijacking the autophagy machinery? *Autophagy* 4: 276-279.
- de la Rosa-Vélez, J., Cedano-Thomas, Y., Cid-Becerra, J., Mendez-Payan, J. C., Vega-Perez, C., Zambrano-Garcia, J. and Bonami, J. R. (2006). Presumptive detection of *Yellow head virus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot hybridization in *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* cultured on the Northwest coast of Mexico. *J. Fish Dis.* 29: 717-726.
- de la Vega, E., Hall, M. R., Degnan, B. M. and Wilson, K. J. (2006). Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of *Gill associated virus* (GAV). *Aquaculture* 253: 82- 90.
- de la Vega, E., O'Leary, N. A., Shockey, J. E., Robalino, J., Payne, C., Browdy, C. L., Warr, G. W. and Gross, P. S. (2008). Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. *Mol. Immunol.* 45: 1916-1925.

- de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M. G., Gueguen, Y. and Bachere, E. (2005). Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol. Genomics* 21: 174-183.
- de Vries, A. A. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M. and de Groot, R. J. (1997). The genome organization of the *Nidovirales* : similarities and differences between arteri-, toro-, and *Coronaviruses*. *Semin. Virol.* 8: 33-47.
- den Boon, J. A., Snijder, E. J., Chirnside, E. D., de Vries, A. A., Horzinek, M. C. and Spaan, W. J. (1991). *Equine arteritis virus* is not a *Togavirus* but belongs to the *Coronavirus*-like superfamily. *J. Virol.* 65: 2910-2920.
- Desch, C. E., O'hara, P. and Harlan, J. M. (1989). Antilipopolsaccharide factor from horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, inhibits lipopolysaccharide activation of cultured human endothelial cells. *Infect. Immun.* 57: 1612-1614.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Vandorsselaer, A., Rodriguez, J. and Bachère, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). *J. Biol. Chem.* 272: 28398-28406.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet, P., Comps, M. and Bachère, E. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113: 461-469.
- DeWalt, B. R. (2001). Community forestry and shrimp aquaculture in México: social and environmental issues. Washington DC, Distinguished service professor of public and international affairs, University of Pittsburgh 18.
- Dhar, A. K., Roux, M. M. and Klimpel, K. R. (2002). Quantitative assay for measuring the *Taura syndrome virus* and *Yellow head virus* load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *J. Virol. Meth.* 104: 69-82.
- Downs, C. A., Fauth, J. E. and Woodley, C. M. (2001). Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Mar. Biotechnol.* 3: 380-397.
- Duarte, M. and Laude, H. (1994). Sequence of the spike protein of the *Porcine epidemic diarrhoea virus*. *J. Gen. Virol.* 75: 1195-1200.
- Duckmanton, L. M., Tellier, R., Liu, P. and Petric, M. (1998). Bovine *Torovirus*: sequencing of the structural genes and expression of the nucleocapsid protein of Breda virus. *Virus Res.* 58: 83-96.
- Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S. and Moreno, J. L. (2007). *Coronavirus* RNA Synthesis: Transcription. *Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*. V. Thiel. Switzerland, Caister Academic Press 81-107.
- Godeny, E. K., Chen, L., Kumar, S. N., Methven, S. L., Koonin, E. V. and Brinton, M. A. (1993). Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV). *Virology* 194: 585-596.
- Goldstein, D. R. (2004). Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 538-544.
- Gómez-Anduro, G. A., Barillas-Mury, C. V., Peregrino-Uriarte, A. B., Gupta, L., Gollas-Galvan, T., Hernández-López, J. and Yepiz-Plascencia, G. (2006). The

- cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 893-900.
- González, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E. and Enjuanes, L. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. *Arch. Virol.* 148: 2207-2235.
- Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J. and Snijder, E. J. (2006). *Nidovirales*: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* 117: 17-37.
- Gutiérrez, A., Nieto, J., Pozo, F., Stern, S. and Schoofs, L. (2007). Effect of insulin/IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 170-175.
- Hagiwara, K., Kikuchi, T., Endo, Y., Huqun, Usui, K., Takahashi, M., Shibata, N., Kusakabe, T., Xin, H., Hoshi, S., Miki, M., Inooka, N., Tokue, Y. and Nukiwa, T. (2003). Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif. *J. Immunol.* 170: 1973-1979.
- Hauton, C., Brockton, V. and Smith, V. J. (2006). Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Mol. Immunol.* 43: 1490-1496.
- Honegger, B., Galic, M., Kohler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E. and Stocker, H. (2008). Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J. Biol.* 7: 1-10.
- Intorasoot, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Leelamanit, W. (2007). Characterization and diagnostic use of a recombinant single-chain antibody specific for the gp116 envelop glycoprotein of *Yellow head virus*. *J. Virol. Meth.* 143: 186-193.
- Ivanov, K. A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E. and Ziebuhr, J. (2004). Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 12694-12699.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F. and Muta, T. (1992). Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. *Thromb. Res.* 68: 1-32.
- Iwanaga, S. and Lee, B. L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 128-150.
- Jiménez-Vega, F. (2004). Serin-proteinasas y sus inhibidores en la respuesta inmune del camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Doctorado. Centro de investigaciones biológicas del noroeste. La paz, Baja California. 108.
- Jiménez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G., Soderhall, K. and Vargas-Albores, F. (2004). A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 681-687.
- Jiménez-Vega, F. and Vargas-Albores, F. (2005). A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 385-391.
- Jiménez-Vega, F. and Vargas-Albores, F. (2007a). Isoforms of *Litopenaeus vannamei* anti-lipopopolysaccharide and its expression by bacterial challenge. *J. Shellfish Res.* 26: 1169-1175.

- Jiménez-Vega, F. and Vargas-Albores, F. (2007b). A secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)-like protein from *Litopenaeus vannamei* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 1119-1126.
- Jiravanichpaisal, P. (2005). *White spot syndrome virus* interaction with a freshwater crayfish. Doctor. Uppsala Universitet. *Faculty of science and technology*. Uppsala. 58.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, S. Y., Kim, Y.-A., Andrén, T. and Söderhäll, I. (2007). Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 441-455.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratna, N., Hodgson, R. A., Cowley, J. A., Walker, P. J., Panyim, S. and Boonsaeng, V. (2003). Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of Yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *J. Gen. Virol.* 84: 863-873.
- Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1988). Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106: 1795-1803.
- Johansson, M. W., Lind, M. I., Holmblad, T., Thörnqvist, P.-O. and Söderhäll, K. (1995). Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 1079-1087.
- Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1996). The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 16: 46-66.
- Johansson, M. W. (1999). Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.*: 303-315.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*. H. N. Munro. New York, Academic Press 21-132.
- Kiang, J. G. and Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80: 183-201.
- Kiatpathomchai, W., Jitrapakdee, S., Panyim, S. and Boonsaeng, V. (2004). RT-PCR detection of *Yellow head virus* (YHV) infection in *Penaeus monodon* using dried haemolymph spots. *J. Virol. Meth.* 119: 1-5.
- Kobayashi, M., Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1990). The 76 kD cell adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell Tissue Res.* 260: 13-18.
- Kroneman, A., Cornelissen, L. A., Horzinek, M. C., de Groot, R. J. and Egberink, H. F. (1998). Identification and characterization of a porcine *Torovirus*. *J. Virol.* 72: 3507-3511.
- Kuersten, S. and Goodwin, E. B. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4: 626-637.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26: 186-192.

- Laude, H. and Masters, P. S. (1995). The *Coronavirus* nucleocapsid protein. The Coronaviridae. S. G. Siddell. New York, Plenum Press 141-163.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
- Leu, J. H., Chang, C. C., Wu, J. L., Hsu, C. W., Hirono, I., Aoki, T., Juan, H. F., Lo, C. F., Kou, G. H. and Huang, H. C. (2007). Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and *White spot syndrome virus* infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics* 8: 120.
- Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z. and Depledge, M. H. (1999). Stress proteins (HSP's) : Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8: 351-368.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. and O'Neill, L. A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 446-458.
- Lightner, D. V. (1996). Epizootiology, distribution and the impact of international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. Sci. Tech.* 15: 579-601.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Poulos, B. T., Nunan, L. M., Mari, J. L. and Hasson, K. W. (1997). Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Rev. Sci. Tech.* 16: 146-160.
- Liu, C.-H. and Chen, J.-C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 16: 321-334.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Cerenius, L. and Söderhäll, K. (2006). Antilipopolysaccharide factor interferes with *White spot syndrome virus* replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Virol.* 80: 10365-10371.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000). *Biology molecular cell*. New York.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. (2005). Differences in susceptibility of palaemonid shrimp species to *Yellow head virus* (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.* 64: 5-12.
- Longyant, S., Sattaman, S., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W. and Sithigorngul, P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by *Yellow head virus* (YHV). *Aquaculture* 257: 83-91.
- Lu, Y., Tapay, L. M., Brock, J. A. and Loh, P. C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.* 17: 649-656.
- Luttikhuisen, P. C., Campos, J., Bleijswijk, J., Peijnenburg, K. T. and van der Veer, H. W. (2008). Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46: 1015-1030.

- Ma, H., Overstreet, R. M. and Jovonovich, J. A. (2009). Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *J. Invertebr. Pathol.* 101: 112-118.
- Mazumder, B., Seshadri, V. and Fox, P. L. (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem. Sci.* 28: 91-98.
- Mekata, T., Kono, T., Yoshida, T., Sakai, M. and Itami, T. (2008). Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 122-133.
- Meulenbergh, J. J., Hulst, M. M., de Meijer, E. J., Moonen, P. L., den Besten, A., de Kluyver, E. P., Wensvoort, G. and Moormann, R. J. (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192: 62-72.
- Mohan, C. V., Shankar, K. M., Kulkarni, S. and Sudha, P. M. (1998). Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis. Aquat. Org.* 34: 9-12.
- Mohankumar, K. and Ramasamy, P. (2006). *White spot syndrome virus* infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res.* 115: 69-75.
- Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I. and Vargas-Albores, F. (1999). Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122B: 381-387.
- Mounir, S. and Talbot, P. J. (1993). Molecular characterization of the S protein gene of human *Coronavirus* OC43. *J. Gen. Virol.* 74: 1981-1987.
- Muñoz, J., Gomez, A., Green, A. J., Figuerola, J., Amat, F. and Rico, C. (2008). Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (*Branchiopoda Anostraca*). *Mol. Ecol.*
- Nadala, J., E.C.B., Tapay, L. M. and Loh, P. C. (1997). *Yellow-head virus*: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 31: 141-146.
- Nissen-Meyer, J. and Nes, I. F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Archives of Microbiology* 167: 67-77.
- O'Neill, L. A. and Greene, C. (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J. Leukoc. Biol.* 63: 650-657.
- Okumura, T. (2007). Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 68-76.
- Pan, C. Y., Chao, T. T., Chen, J. C., Chen, J. Y., Liu, W. C., Lin, C. H. and Kuo, C. M. (2007). Shrimp (*Penaeus monodon*) anti-lipopolysaccharide factor reduces the lethality of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 7: 687-700.
- Pan, D., He, N., Yang, Z., Liu, H. and Xu, X. (2005). Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 103-112.

- Pasternak, A. O., Spaan, W. J. M. and Snijder, E. J. (2006). *Nidovirus* transcription: how to make sense...? *J. Gen. Virol.* 87: 1403-1421.
- Phillips, J. J., Chua, M. M., Lavi, E. and Weiss, S. R. (1999). Pathogenesis of MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J. Virol.* 73: 7752-7760.
- Rattanarojpong, T., Wang, H. C., Lo, C. F. and Flegel, T. W. (2007). Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after *Yellow head virus* infection. *Proteomics* 7: 3809-3814.
- Relf, J. M., Chisholm, J. R., Kemp, G. D. and Smith, V. J. (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* 264: 350-357.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
- Roche, A. S. (2003). Overview of LightCycler Quantification Methods. E. o. t. s. concentration. Germany, Roche Diagnostics GmbH 1-20.
- Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., Takahashi, Y. and Aoki, T. (2002). Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 69-83.
- Rönnbäck, P. (2003). Critical analysis of certified organic shrimp aquaculture in Sidoarjo, Indonesia. Swedish Society for Nature Conservation. 6.
- Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R. and Dhar, A. K. (2002). The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in *White spot virus*-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.* 76: 7140-7149.
- Rutschmann, S., Kilinc, A. and Ferrandon, D. (2002). Cutting edge: the Toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J. Immunol.* 168: 1542-1546.
- Sagarpa (2005). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. C. n. d. a. y. pesca. Mexico.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. and Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17: 914-921.
- Sittidilokratna, N., Hodgson, R. A., Cowley, J. A., Jitrapakdee, S., Boonsaeng, V., Panyim, S. and Walker, P. J. (2002). Complete ORF1b-gene sequence indicates *Yellow head virus* is an invertebrate *Nidovirus*. *Dis. Aquat. Org.* 50: 87-93.
- Sittidilokratna, N., Phetchampai, N., Boonsaeng, V. and Walker, P. J. (2006). Structural and antigenic analysis of the *Yellow head virus* nucleocapsid protein p20. *Virus Res.* 116: 21-29.
- Sittidilokratna, N., Dangtip, S., Cowley, J. A. and Walker, P. J. (2008). RNA transcription analysis and completion of the genome sequence of yellow head nidovirus. *Virus Res.* 136: 157-165.

- Sittidilokratna, N., Chotwiwatthanakun, C., Wijegoonawardane, P. K., Unajak, S., Boonnad, A., Wangnai, W., Jitrapakdee, S., Cowley, J. A. and Walker, P. J. (2009). A virulent isolate of yellow head nidovirus contains a deformed envelope glycoprotein gp116. *Virology* 384: 192-200.
- Smith, V. J. and Soderhall, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.* 233: 295-303.
- Smith, V. J., Fernandes, J. M. O., Kemp, G. D. and Hauton, C. (2008). Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 758-772.
- Snijder, E. J. and Horzinek, M. C. (1995). The molecular biology of *Toroviruses*. The Coronaviridae. S. G. Siddell. New York, Plenum Press 219-238.
- Söderhäll, K. and Smith, V. J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 229-239.
- Söderhäll, K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.* 59: 141-151.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. and Johansson, M. W. (1996). The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In *New Directions in Invertebrate Immunology*. G. V. a. S. I. Edt. K. Söderhäll, Fair Haven, SOS Publications. 229-253.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-Activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G. and Bachere, E. (2005). Recombinant expression and antimicrobial activity of anti-lipopolsaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 841-851.
- Somboonwiwat, K., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I. and Tassanakajon, A. (2006). Differentially Expressed Genes in Hemocytes of *Vibrio harveyi* challenged Shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39: 26-36.
- Sotelo-Mundo, R. R., Islas-Osuna, M. A., de-la-Re-Vega, E., Hernandez-Lopez, J., Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (2003). cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 15: 325-331.
- Spaan, W., Cavanagh, D. and Horzinek, M. C. (1988). *Coronavirus* structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69: 2939-2952.
- Spann, K. M., Cowley, J. A., Walker, P. J. and Lester, R. J. G. (1997). A Yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 31: 169-179.
- Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (2001). Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 353-363.

- Sritunyalucksana, K., Lee, S. Y. and Söderhäll, K. (2002). A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 237-245.
- Sturman, L. S., Ricard, C. S. and Holmes, K. V. (1985). Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine *Coronavirus*: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *J. Virol.* 56: 904-911.
- Su, B. K. and Chen, J. C. (2008). Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 74-81.
- Supungul, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. (2008). Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 61-70.
- Tacon, A. G. J. (2002). Thematic review of feeds and feed management practices in shrimp aquaculture. Consortium. Kaneohe, HI USA, World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. 69.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335-376.
- Tang, K. F. and Lightner, D. V. (1999). A *Yellow head virus* gene probe: nucleotide sequence and application for in situ hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 35: 165-173.
- Tharntada, S., Somboonwiwat, K., Rimphanitchayakit, V. and Tassanakajon, A. (2008). Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 46-54.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Tirard, C. T., Grossfeld, R. M., Levine, J. F. and Kennedy-Stoskopf, S. (1995). Effect of hyperthermia in vitro on stress protein synthesis and accumulation in oyster haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 9-25.
- Tirasophon, W., Roshorn, Y. and Panyim, S. (2005). Silencing of *Yellow head virus* replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 102-107.
- Tirasophon, W., Yodmuang, S., Chinnirunvong, W., Plongthongkum, N. and Panyim, S. (2007). Therapeutic inhibition of *Yellow head virus* multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res.* 74: 150-155.
- Tokuda, G., Yamada, A., Nakano, K., Arita, N. and Yamasaki, H. (2006). Occurrence and recent long-distance dispersal of deep-sea hydrothermal vent shrimps. *Biology letters* 2: 257-260.
- Tzou, P., De Gregorio, E. and Lemaitre, B. (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 102-110.

- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J. L. (1993). A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 407-413.
- Vargas-Albores, F. (1995). The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.* 3: 153-156.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. M. (1997). Purification and comparison of beta-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 116: 453-458.
- Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191: 13-21.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., Jiménez-Vega, F. and Avila-Villa, A. (2004). Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp. Biochem. Physiol.* 138B: 415-422.
- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C. and Xiang, J. (2006). Discovery of the genes in response to *White spot syndrome virus* (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Mar. Biotechnol.*
- Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H. Y., Tung, M. C., Chang, C. F., Su, M. S. and Kou, G. H. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated *With white spot syndrome* (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 23: 239-242.
- Wang, S. H. and Chen, J. C. (2005). The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 191-204.
- Wang, Y. C., Chang, P. S. and Chen, H. Y. (2008). Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of beta-1,3-glucan. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 113-121.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21: 69-77.
- Yang, C., Zhang, J., Li, F., Ma, H., Zhang, Q., Jose Priya, T. A., Zhang, X. and Xiang, J. (2008). A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 564-574.
- Yang, L. S., Yin, Z. X., Liao, J. X., Huang, X. D., Guo, C. J., Weng, S. P., Chan, S. M., Yu, X. Q. and He, J. G. (2007). A Toll receptor in shrimp. *Mol. Immunol.* 44: 1999-2008.
- Yodmuang, S., Tirasophon, W., Roshorm, Y., Chinnirunvong, W. and Panyim, S. (2006). YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 351-356.

- Zambon, R. A., Nandakumar, M., Vakharia, V. N. and Wu, L. P. (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 7257-7262.
- Zhang, Q., Li, F., Wang, B., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, Q. and Xiang, J. (2007). The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 429-440.
- Zhao, Z. Y., Yin, Z. X., Weng, S. P., Guan, H. J., Li, S. D., Xing, K., Chan, S. M. and He, J. G. (2007). Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of *White spot syndrome virus*-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 520-534.
- Ziebuhr, J., J., S. and Gorbalenya, A. E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* 81: 853-879.
- Ziebuhr, J., Bayer, S., Cowley, J. A. and Gorbalenya, A. E. (2003). The 3C-Like Proteinase of an Invertebrate *Nidovirus* Links *Coronavirus* and *Potyvirus* Homologs. *J. Virol.* 77: 1415-1426.
- Ziebuhr, J. and Snijder, E. J. (2007). The *Coronavirus* Replicase Gene: Special Enzymes for Special Viruses. *Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*. V. Thiel. Switzerland, Caister Academic Press. 33-65.